

Tesis de Posgrado

Expresión de CD44 en tumores murinos y humanos y su relación con el proceso metastásico

Ladeda, Virginia Edith

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ladeda, Virginia Edith. (1998). Expresión de CD44 en tumores murinos y humanos y su relación con el proceso metastásico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3005_Ladeda.pdf

Cita tipo Chicago:

Ladeda, Virginia Edith. "Expresión de CD44 en tumores murinos y humanos y su relación con el proceso metastásico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3005_Ladeda.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Cs. Exactas y Naturales

Tesis de Doctorado

Tema:

*Expresión de CD44 en Tumores Murinos y Humanos y
su Relación con el Proceso Metastásico*

Autora:
Virginia Edith Ladeda

Directora:
Dra. Elisa Bal de Kier Joffé

Instituto de Oncología
"A.H.Roffo"
Universidad de Bs.As.

1998

№ 50054

52

*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Cs.Exactas y Naturales*

Ph. D. THESIS

Title:

*CD44 expression in murine and human tumors, and its
relationship with the metastatic process*

Author:

Virginia Edith Ladeda

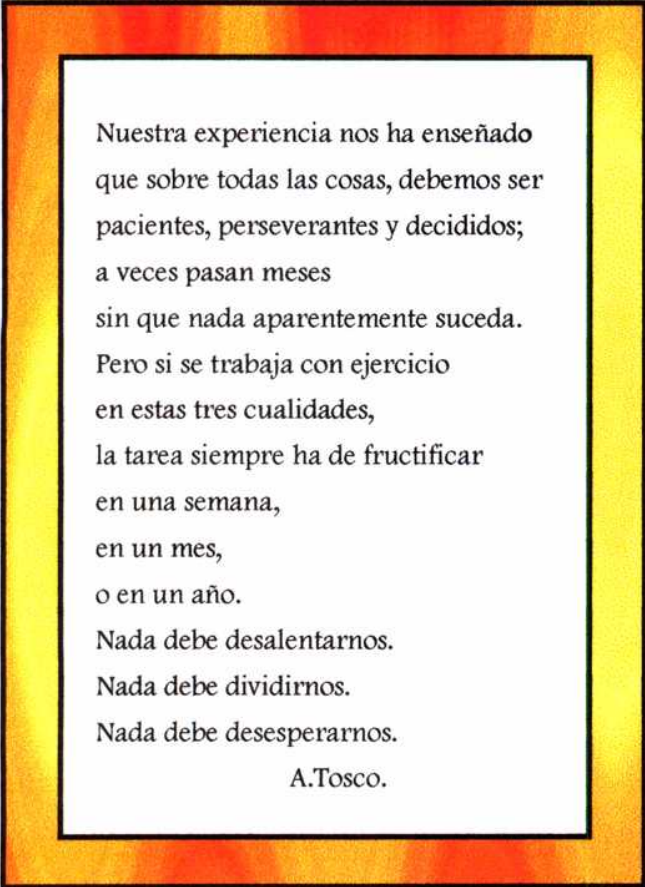
Director:

Elisa Bal de Kier Joffé, MD, Ph. D.

Research Area
Instituto de Oncología
"A.H.Roffo"

-1998-

143 005.4



Nuestra experiencia nos ha enseñado
que sobre todas las cosas, debemos ser
pacientes, perseverantes y decididos;
a veces pasan meses
sin que nada aparentemente suceda.
Pero si se trabaja con ejercicio
en estas tres cualidades,
la tarea siempre ha de fructificar
en una semana,
en un mes,
o en un año.
Nada debe desalentarnos.
Nada debe dividirnos.
Nada debe desesperarnos.
A.Tosco.

a Elida,
a Eugenio, que ya no está,
al Dr. Ernesto Bertellotti.

Agradecimientos

Agradezco haber encontrado en mi camino a muchas personas que han contribuido a que pudiera llegar donde me encuentro hoy.

Elisa Bal, mi jefa, no solo me ha formado académicamente, sino también en lo personal, a través de su presencia constante y su trato maternal, amistoso y sobre todo paciente.

La Dra. Eugenia Lustig me ha dado con su presencia el ideal de mujer investigadora que me gustaría ser, por su riqueza profesional y espiritual.

Lilia Lauría, mi consejera de Tesis, siempre ha sido más que generosa en su trato hacia mí.

Julio Aguirre y Eduardo Farías han compartido conmigo mucho trabajo, amistad y también complicidades y secretos. Además, Julio ha colaborado incondicional y valiosamente en el desarrollo de los capítulos 2, 3 y 4 de esta Tesis.

Alejandro Urtreger fue mi compañerito de la primera hora, con quien compartí charlas y también discusiones.

Lucas Colombo siempre ha demostrado ser generoso y con un gran espíritu entusiasta por la investigación.

Marta Vilensky ha compartido una cálida amistad laboral, al igual que Alicia Rivelli y Gloria Solarz, además de los asuntos de trabajo.

También debo mencionar a Dory Loria, Lydia Puricelli y Elena Matos por intervenir en distintas etapas laborales y personales durante estos años.

Mirta Carnero, nuestra secretaria, siempre me ha allanado con paciencia las dificultades burocráticas.

Leo, Cata y Antonia han sido los encargados de limpiar y ordenar todo aquello que yo (entre otros), dejaba sucio.

Finalmente, Jorge Filmus, fue la persona que dio el impulso inicial en el tema desarrollado sobre CD44, y posteriormente me acompañó con sus consejos y bromas a través del e-mail.

A todos, gracias.

*EXPRESION DE CD44 EN TUMORES MURINOS Y
HUMANOS Y SU RELACION CON EL PROCESO
METASTASICO.*

INDICE

<i>Resumen</i>	7
<i>Abstract</i>	11
<i>Glosario y abreviaturas</i>	15

*Primera Parte**Introducción*

La Cascada Metastásica.....	17
◊ Etapas y mecanismos.....	20
◊ Enzimas proteolíticas.....	22
◊ Moléculas de la matriz extracelular.....	27
◊ Contactos focales y transducción de señales	31
◊ Moléculas de adhesión.....	35
<i>Hipótesis y Objetivos</i>	48

*Segunda Parte**Desarrollo Experimental**Capítulo 1*

Expresión de CD44 en tumores mamarios murinos y líneas celulares.....	51
---	----

Capítulo 2

Rol de CD44 durante la adhesión, el spreading, la migración y la invasión,
en la línea celular tumoral F3II.....71

Capítulo 3

Relación entre CD44 y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa
(uPA) en células F3II.....100

Capítulo 4

Señales involucradas en la expresión de CD44 en células F3II.....111

Capítulo 5

Expresión de CD44 en tumores humanos del SNC.....126

Tercera Parte

Discusión y Conclusiones Generales

Capítulo 6

Discusión General.....143

Capítulo 7

Conclusiones Generales.....153

Referencias.....155

Resumen

CD44, receptor del ácido hialurónico, es una glicoproteína de membrana con un dominio extracelular altamente glicosilado, una porción transmembrana y una cola citoplasmática que interactúa con el citoesqueleto. Originalmente fue descrita como receptor “homing” en células linfocitarias, pero luego se vio que también se expresa en otros tipos celulares. Existen múltiples formas de esta molécula, llamadas *variantes*, que se generan por splicing alternativo de 10 exones. La forma más abundante es la llamada estándar ó hemopoyética (CD44s/H), que carece de los diez exones alternativos y se expresa predominantemente en células hemopoyéticas y mesenquimáticas. Su peso molecular es de 80-90 kDa. Sus principales funciones son participar en la activación de linfocitos y en la adhesión y migración celular. Las formas variantes tienen un peso molecular de 120-150 kDa y se expresan con predominio en tejidos epiteliales. Las funciones precisas de estas isoformas aún no están claras.

En 1991, Gunthert y col., demostraron que la isoforma v6 confería capacidad metastásica al ser transfectada en células tumorales no metastásicas de rata. Como consecuencia de este hallazgo ha surgido un gran interés por el estudio de CD44 en otros modelos tumorales.

En el desarrollo de este plan de Tesis, hemos estudiado la función, expresión y distribución de CD44 en una línea celular tumoral mamaria murina, F3II, altamente invasiva y metastásica. El estudio de la expresión de CD44 en cortes histológicos de tumores F3II, mostró una alta expresión de esta molécula asociada al crecimiento subcutáneo de los mismos, mientras que dicha expresión fue prácticamente nula en tumores F3II crecidos en forma peritoneal. El análisis de la expresión de CD44, por

Western blot e inmunohistoquímica, en cultivos de células tumorales F3II y normales NMuMG, mostró que las monocapas de células F3II expresan mayores niveles que las células normales. En ambas líneas se pudo detectar, por Western blot, una banda principal de 80 kDa, correspondiente a CD44s. También se observó la presencia de bandas de mayor peso molecular, que podrían corresponder a la expresión de variantes de CD44, aunque dicha expresión fue menos evidente en las células NMuMG.

Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico anti-CD44 (KM201), hemos demostrado que los procesos de adhesión y spreading de células F3II pueden ser inhibidos en forma significativa. El análisis de la expresión de CD44, por inmunocitoquímica durante el spreading, mostró que esta molécula se distribuye en forma continua (no punctata) sobre la membrana plasmática, particularmente en los bordes anteriores o de avance y en la zona perinuclear de la membrana plasmática. CD44 no fue detectado en estructuras como filopodios o lamelipodios, pero sí entre dichas estructuras. Las células totalmente extendidas sobre el sustrato, presentaron una significativa disminución de la tinción de CD44 sobre la membrana plasmática, comparado con los estadios iniciales del spreading. Este descenso en la expresión a lo largo del spreading fue confirmado por Western Blot.

En ensayos de migración e invasión de células F3II en cámaras Transwell, demostramos que el anticuerpo anti-CD44, fue también capaz de inhibir en forma significativa ambos procesos. Además, el tratamiento de células F3II con anti-CD44 conjuntamente con anti-uPA, la inhibición de la migración se incrementó en un 90%, sugiriendo una acción sinérgica entre CD44 y uPA en favor de la migración de estas células tumorales. Además de la asociación funcional entre CD44 y el uPA en el

en el proceso de migración, los resultados de ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, indicaron que el receptor CD44 estaría físicamente asociado con el uPA, sugiriendo la participación conjunta de ambas moléculas en algunas etapas de la cascada metastásica de células tumorales mamarias murinas.

En conjunto estos resultados demuestran que, en la línea celular tumoral F3II, CD44 cumple un rol activo en eventos críticos que tienen lugar durante la cascada metastásica, como la adhesión, spreading, migración e invasión celular.

Mediante un enfoque farmacológico, se estudiaron las vías de señalización que participarían en la regulación de la expresión de CD44 en células F3II. El tratamiento de células F3II con PMA, activador de PKC, o ácido fosfatídico, producto de la degradación de fosfatidilcolina dependiente de PLD, aumentaron en forma significativa la expresión de CD44. Cuando los cultivos fueron tratados con H7, inhibidor específico de PKC, o con propranolol, inhibidor de la conversión de ácido fosfatídico a DAG, se observó una sensible disminución de la expresión de CD44. Los resultados de estos experimentos sugieren la participación de PKC y PLD en las vías de señales que regulan la expresión de este receptor.

Los tumores cerebrales raramente metastatizan pero son muy invasivos a nivel local. Dado que el AH es un componente abundante de la matriz extracelular del sistema nervioso central y que CD44 participa en su degradación, la sobreexpresión de este receptor podría facilitar el proceso invasivo de estos tumores. En un trabajo colaborativo con los Servicios de Oncología y Patología del Hospital Italiano, hemos analizado la expresión de CD44 en 57 tumores de cerebro (14 astrocitomas de bajo grado, 13 astrocitomas anaplásicos, 22 glioblastomas multiformes, 5

ependimomas y 3 meduloblastomas). Cuando se analizaron los glioblastomas de distintos estadios, se observó que la sobreexpresión de CD44s se correlaciona en forma lineal con el grado de agresividad de estos tumores (clasificación de Burger). En cambio, el mismo análisis en ependimomas, tumores poco agresivos, mostró una alta expresión de CD44s, mientras que, en meduloblastomas, tumores altamente agresivos, la expresión de esta molécula, fue casi nula. No se detectó expresión de variantes de CD44 en ninguno de los tumores estudiados. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de CD44s podría ser de importancia durante el desarrollo de tumores humanos de origen neuroglial.

Abstract

CD44, the receptor of hyaluronan acid, is a transmembrane glycoprotein, which has an extracellular domain, a transmembrane portion, and a cytoplasmic tail which is connected to the cytoskeleton. CD44 was originally described as the lymphocyte “homing receptor” to lymph nodes endothelium. A large number of isoforms are generated by alternative splicing of up to 10 variant exons. Further diversity is created by variable side chain glycosilation. The most abundant form is the so called standard or hematopoetic form, CD44s/H, expressed predominantly in hematopoetic and mesenchymal cells. CD44s lacks the variant exons and has a molecular weight of 80-90 kD. Its multiple functions include lymphocyte activation, cell adhesion and migration. The variant forms range from 120 to 250 kD and are expressed predominantly in epithelial tissues. The precise functions of these isoforms are not clear at present.

A considerable amount of interest in this molecule was generated by the finding reported by Gunthert et al (1991), that a particular isoform (v6), when transfected into non metastatic rat pancreatic carcinoma cells, conferred metastatic capability. This was followed by a series of papers indicating increased expression of CD44s and variants in other tumor models.

In this Thesis project, we have studied the function, expression and distribution of CD44 in the highly invasive and metastatic murine mammary tumor cell line, F3II. We detected a high CD44 expression on F3II subcutaneous tumors, while the expression was almost nule when the tumor grew intraperitoneally. Confluent monolayers of normal

murine mammary cells (NMuMG) and F3II tumor cells were assayed for their capacity to express CD44 by Western blot and immunohistochemistry. F3II cells were found to express significantly higher levels of CD44 than NMuMG. The Western blot analysis showed a main specific band of 80 kDa on both cell lines, corresponding to CD44s, and minor bands of higher molecular weight suggesting the expression of CD44 variants.

A mAb anti-CD44 (KM201) dramatically blocked F3II cell adhesion and spreading. Immunocytochemistry of spreading cells revealed that CD44 distributed in bands on the cell surface, particularly in the tip of leading edges and in the perinuclear zones of the cell membrane. CD44 antigen was never detected in filopodia or lamellipodia but was detected as strong interlamellar bands. CD44 staining never showed a distribution compatible with association to focal adhesion-like structures. Fully spread cells showed remarkably less CD44 staining compared to cells in early stages of spreading. This decrease observed by ICC studies, correlated with a reduced expression of CD44, as detected by Western blot.

KM201 mAb significantly inhibited F3II cell migration and invasion in Transwell chambers. When F3II cells migration was assayed in the presence of both anti-CD44 and anti-uPA antibodies, the inhibition on migration was dramatically enhanced (90% inhibition). This result suggest a synergistic cooperation between CD44 and uPA during migration of F3II cells. In addition to the functional cooperation between CD44 and uPA during cell migration, we demonstrated by immunoprecipitation with specific antibodies, a physical link between both molecules on F3II cells. These results may indicate that the close

proximity of CD44 and uPA may be important for the functional synergy during the migration process of murine mammary tumor cells.

Taken together, these results demonstrate that CD44 plays an important role during F3II cells adhesion, spreading, migration and invasion, all of them critical events during tumor metastasis.

We used a pharmacological approach to study the signal pathways regulating CD44 expression in F3II cells. Treatment of F3II cells with PMA, a PKC activator, or phosphatidic acid, the product of PLD-dependent phosphatidylcholine degradation, significantly enhanced CD44 expression. When F3II cells monolayers were treated with H7, a specific PKC inhibitor, or propranolol, which inhibits phosphatidic acid conversion to DAG, it was observed a dramatic decrease of CD44 antigen levels. These results suggest the involvement of PKC and PLD pathways in the regulation of CD44 expression.

Primary brain tumors are characterized by their highly invasive behaviour, although they seldom metastasize to distant organs. HA, a main component of the extracellular matrix in the central nervous system, may be substrate for tumor cell invasion through CD44. In a collaborative study with the “Hospital Italiano”, we have analyzed CD44 expression on 57 human brain tumor biopsies (14 low grade astrocytomas, 13 anaplastic astrocytomas, 22 glioblastomas multiforme, 5 ependymomas and 3 medulloblastomas). In the astrocytomas group we found that overexpression of CD44s correlates with tumor aggressiveness (upon Burger grade). In contrast, in ependymomas, less aggressive tumors, CD44s expression was high, while CD44s expression was almost negative in medulloblastomas, highly aggressive tumors. No CD44

variants expression was detected in any of the samples analyzed. Our results suggest that overexpression of CD44s could be important during the development of human astrocytomas.

Key words: adhesion molecules, CD44, cell motility, cellular signaling, metastatic cascade

Glosario y abreviaturas

AH	ácido hialurónico
CD44s	CD44 estándar
CD44v	CD44 variante
CD44E	CD44 epitelial
cluster	agrupación de receptores sobre la membrana plasmática
core	eje proteico que forma parte de los PG
DAB	diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
MEC	matriz extracelular
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FN	fibronectina
GAGs	glicosaminoglicanos
LN	laminina
MEC	matriz extracelular
MEM	medio esencial mínimo
MMP	metaloproteasas
PA	ácido fosfatídico
PAI	inhibidor del activador del plasminógeno
PG	proteoglicanos
PKC	proteína kinasa C
PLD	fosfolipasa D
PMA	phorbol myristate acetate
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
smear	bandas de alto peso molecular; "chorreado"
SNC	sistema nervioso central
spreading	extensión celular
TIMP	inhibidor tisular de metaloproteasas
uPA	activador de plasminógeno tipo uroquinasa
uPAR	receptor del uPA



PRIMERA PARTE

Introducción

Introducción

La Cascada Metastásica

La metástasis puede definirse como la capacidad que adquieren las células tumorales de diseminarse en sitios distantes del tumor primario donde dan lugar a un nuevo tumor. Tanto la invasión como la metástasis representan dos grandes obstáculos para el tratamiento de los tumores. La metástasis es un proceso ineficiente, dado que pocas células tumorales liberadas a la circulación (alrededor del 0.01%) pueden escapar del sistema inmune (Schirrmacher, 1985). Sin embargo, la diseminación de células tumorales es una de las causas más comunes de muerte en pacientes con cáncer.

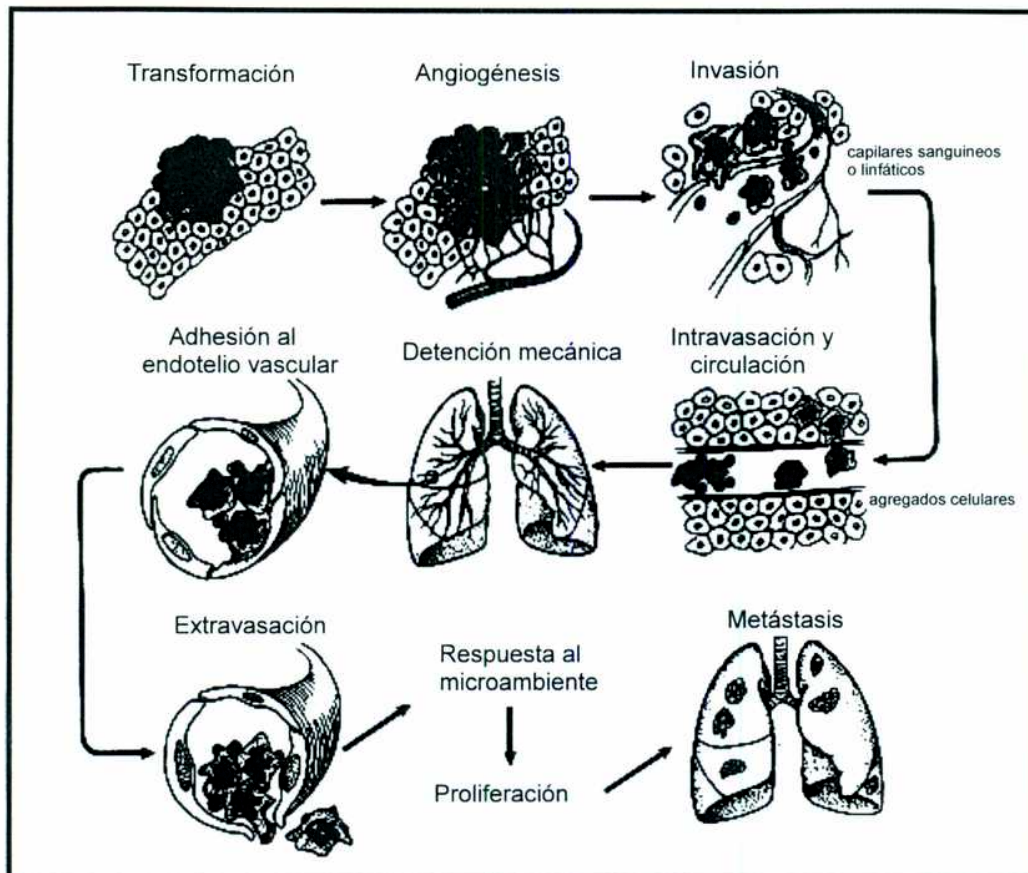
Las metástasis no se distribuyen al azar entre los diferentes órganos, sino que algunos tumores tienden a colonizar órganos específicos. La metástasis depende de la acción conjunta de factores propios de la célula tumoral y del huésped (Schirrmacher, 1985). Esto fue descrito por primera vez por Paget en 1889, quien describió un modelo hipotético en cual las *semillas* (células tumorales) pueden diseminarse en todas las direcciones llevadas por el *viento* (circulación sanguínea), pero sólo sobreviven y crecen en un suelo que responda a sus requerimientos (órgano blanco). Sin embargo, Ewing en 1928 propuso que las conexiones vasculares del tumor primario son las que determinan la ruta de diseminación y los sitios donde se detendrán las células tumorales, demarcando así el patrón metastásico. Ambas teorías no son mutuamente excluyentes y deben tenerse en cuenta al tratar de explicar la forma de colonización de un tumor (Rusciano y Burger, 1992).

Una célula tumoral no necesariamente es una célula metastásica. La cascada metastásica comprende una serie de pasos secuenciales a través de los cuales la célula tumoral debe adquirir ciertas características fenotípicas que le permitan la sobrevida y la colonización de otros órganos. Estas características incluyen (Fig. 1):

- Eficiencia en su crecimiento e invasión en el sitio primario.
- Penetración en el sistema circulatorio, ya sea como célula aislada o en cluster .
- Sobrevida en el microambiente de la circulación sanguínea.
- Detención en la microvasculatura del órgano blanco y extravasación en el parénquima de dicho órgano.
- Eficiencia de invasión y crecimiento en el sitio secundario.

Sólo las células que cumplan con estas características podrán establecer una colonia metastásica.

Figura 1: Representación esquemática de las distintas etapas de la cascada metastásica (modificado de De Vita, 1997).



Etapas y mecanismos

El crecimiento de un tumor sólido, ya sea primario o una metástasis, cuyo tamaño sobrepase 1-2 mm de diámetro, requiere la inducción de neovascularización o angiogénesis por parte de las células tumorales, dado que éste es el tamaño límite que puede asegurar la difusión de nutrientes (Blood y Zetter, 1990). La primera etapa del crecimiento tumoral es avascular y es posible, para estos tumores pequeños, permanecer en estado de latencia por un período prolongado, hasta que algún evento actúe como gatillo en la producción de factores angiogénicos. En esas condiciones el tumor tendrá acceso a los nutrientes en forma más eficiente acelerando de inmediato su crecimiento. Además, dado que los nuevos vasos tienen una matriz extracelular poco organizada, las células tumorales pueden fácilmente alcanzar el lumen vascular y escapar hacia sitios secundarios (Blood y Zetter, 1990). Esto sugiere que el proceso de angiogénesis es importante tanto para el crecimiento del tumor primario como para la generación de metástasis a partir del mismo.

No se ha encontrado relación entre el patrón específico de distribución de la metástasis y la angiogénesis. La propiedad de inducir neovascularización parecería ser intrínseca del tumor y no estaría relacionada con el microambiente en donde se establece. La producción de factores angiogénicos por parte de la célula tumoral podría estar influenciada por sus interacciones con las células y la matriz circundantes. Holmgren y col. (1995) demostraron que las metástasis pueden entrar en estado de latencia (o quiescencia) debido a la falta de capacidad por parte de las células tumorales que la forman, de inducir neovascularización. En un trabajo más reciente, Yu y col. (1997)

demonstraron que ese estado de latencia coincide con la falta de expresión del receptor del uPA (uPAR).

Griffioen y col. (1997) demostraron que CD44 se sobreexpresa en células endoteliales de carcinoma renal. Estos autores también demuestran que el tratamiento con factores angiogénicos de células endoteliales cultivadas in vitro es capaz de inducir la expresión de CD44. Los resultados de este trabajo sugieren que la sobreexpresión de CD44, en el endotelio vascular tumoral, podría jugar un importante rol en el proceso angiogénico.

Una característica fundamental de las células tumorales es su capacidad de proliferar en forma descontrolada. Esta capacidad se ve particularmente favorecida en el momento que comienza la etapa vascular del tumor. La interacción de la célula tumoral con el tejido del huésped permite un intercambio de factores generados por señales autócrinas, parácrinas y/o endócrinas (Nicholson, 1993; Radinsky, 1993). En este sentido, tanto la activación de proto-oncogenes como la inactivación de genes supresores juegan también un rol crítico (García y col., 1989; Pavelic y col., 1992). Fidler y Hart (1982) han propuesto que la metástasis es un proceso selectivo donde sobreviven ciertas subpoblaciones del tumor primario. Esta selección podría estar regulada por la expresión diferencial de genes que participan en el crecimiento y la diferenciación celular.

La invasión y la motilidad son propiedades de las células tumorales que tienen una gran relevancia en el fenotipo metastásico, ya que a través de estos eventos, entre otros, la célula tumoral coloniza los tejidos adyacentes al tumor primario.

El tumor epitelial *in situ* se encuentra separado del estroma intersticial por la membrana basal. La transición a la malignidad requiere que la célula tumoral atraviese la membrana basal y degrade el estroma que rodea al tumor primario. (Fig 1) Para tener acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos deberá cruzar la membrana basal subendotelial e intravasarse (Hart y col, 1989; Liotta y Stettler Stevenson, 1991). Esta es la etapa de *invasión local*. Luego, si sobrevive al microambiente de la circulación sanguínea, comienza la etapa de *invasión secundaria*. La detención de células malignas circulantes en un órgano puede ocurrir por atrapamiento mecánico en la microvasculatura, que puede estar facilitado por agregación homotípica entre células tumorales o agregación heterotípica con las plaquetas del huésped. Seguidamente, se establecen contactos con el endotelio vascular (Belloni y Tressler, 1990). En esta fase, la célula, ya adherida al endotelio de la microvasculatura del órgano blanco, comienza a degradar la membrana basal del vaso sanguíneo. Luego de extravasarse, si las condiciones son favorables, comenzará la etapa de colonización del órgano blanco (Rusciano y Burger, 1993).

Enzimas proteolíticas

Las células transformadas pueden alterar la integridad estructural de la matriz adyacente promoviendo así la progresión tumoral. Para atravesar la membrana basal e invadir el estroma intersticial, tanto en el tumor primario como durante la intra y extravasación, la célula tumoral requiere la acción de enzimas proteolíticas. Las enzimas producidas por las células tumorales pueden degradar los distintos componentes de la MEC, como colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Algunos autores han demostrado que esta matriz enzimáticamente alterada es una fuente

de moléculas que pueden modular el comportamiento de la célula tumoral, incluyendo la adhesión, sobrevivencia, crecimiento y migración (Mignatti y Rifkin, 1993; DeClerck e Imren, 1994).

Los activadores del plasminógeno (PA) de tipo tisular (tPA) o tipo urokinasa (uPA) son serino-proteasas con alta especificidad, que se sintetizan como zimógeno (pro-uPA). El pro-uPA puede ser activado por plasmina, y el uPA resultante es capaz de clivar plasminógeno generando plasmina (Ellis y col., 1991). La plasmina a su vez, es una serino proteasa que participa en la cascada fibrinolítica (Hart, 1989; Mueller, 1996). Además, la plasmina puede degradar otros componentes de la MEC como proteoglicanos y glicoproteínas (Liotta y col, 1981; Kramer y col, 1982), o activar procolagenasas (Gross y col. 1982; Schultz y col. 1988; Paranjpe y col 1980), facilitando la degradación del colágeno.

Numerosos autores han demostrado la importante participación del uPA en la diseminación metastásica (Ossowski y Reich, 1983; Dano y col., 1985; Mignatti y Rifkin, 1993; Yu y Schultz, 1990). Pereyra-Alfonso y col. (1988) demostraron, en un modelo tumoral murino, que un aumento de la secreción de uPA en cultivos primarios de tumores mamarios, se correlacionaba con una mayor capacidad metastásica. Alonso y col. (1993), trabajando en el mismo modelo, describieron un descenso de los niveles de actividad de uPA en el plasma de ratones portadores de tumor. También se ha demostrado que la sobreexpresión de uPA en algunos tumores humanos estaría asociada con un mal pronóstico (Janicke y col, 1990; Sim y col, 1988; Duggan y col, 1995).

El receptor de uPA (uPAR) está unido a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosil-fosfatidilinositido (GPI), careciendo de dominio citoplasmático. El uPA y pro-uPA se unen con alta afinidad al uPAR en la superficie celular (Nielsen y col., 1988; Moller, 1993). Esta

unión acelera y aumenta la actividad proteolítica del uPA, comparado con el uPA soluble (Ellis y col, 1991; Stephens y col, 1989). Debido a esta unión, la actividad degradativa del uPA está aumentada sobre la superficie celular, lo cual hace que las células sean más invasivas. Bloqueando la actividad del uPA con drogas específicas anticatalíticas (amilorida, B623, B428), es posible inhibir la invasión local de células tumorales, en forma dramática (Alonso y col, 1996). Similares resultados se han obtenido al tratar células tumorales con anticuerpos anti-uPA (Ossowski y Reich, 1983).

El sistema PA/plasmina está regulado por inhibidores específicos: inhibidores del PA o PAI, el inhibidor de plasmina o $\alpha 2$ antiplasmina, la $\alpha 2$ macroglobulina y el PAI placentario (Bizik y col 1989; Mueller 1996). Cajot y col (1986) describieron los PAI tipo 1 y tipo 2. Se encontró que, en algunos tumores, la sobreexpresión de uPA, se correlaciona con una disminución en la expresión de estos inhibidores (Laiho y Keski-Oja, 1989).

Las metaloproteasas de la MEC (MMPs) son una familia de proteasas Ca^{++} y Zn^{++} dependientes. Según la especificidad de sustrato, se dividen en tres subclases: colagenasas, gelatinasas y estromelisin. Las colagenasas degradan colágenos fibrilares (tipo I, II, III). Las gelatinasas A y B actúan sobre gelatinas (colágenos desnaturalizados) y sobre colágeno IV. Finalmente, las estromelisin tienen mayor rango de actividad, degradando glicoproteínas, proteoglicanos y colágeno IV (Matrisian, 1992).

La síntesis y secreción de MMPs es inducible por factores de crecimiento, oncogenes y promotores tumorales (Frisch y Werb, 1989). Como ya se mencionó, las MMPs latentes pueden ser activadas por

plasmina. La actividad está regulada por inhibidores tisulares específicos (Murphy y col, 1994) denominados TIMP, de los cuales se conocen el 1 y el 2 (Denhardt y col., 1993). Varias evidencias experimentales demuestran la participación de las MMPs en el fenotipo tumoral (Stetler-Stevenson y col., 1993):

- la producción de MMP se correlaciona positivamente con el comportamiento invasivo y metastásico de ciertas líneas celulares tumorales y en algunos tumores humanos
- ciertos factores de crecimiento y oncogenes aumentan la producción de MMPs
- los TIMPs son capaces de inhibir la invasión tumoral y las metástasis experimentales.

Las catepsinas B, L y H son cisteíno-proteasas lisosómicas que, al ser liberadas por las células tumorales, actúan como endo o ectopeptidasas sobre componentes de la MEC. La actividad de catepsina B ha sido correlacionada positivamente con el potencial metastásico de células tumorales y con la progresión tumoral (Sloane y col, 1990). Los inhibidores de cisteíno-proteasas son capaces de bloquear la motilidad de células de melanoma que expresan catepsinas (Boike y col. 1991).

Las heparanasas conforman otro grupo de enzimas proteolíticas que se encargan de degradar los proteoglicanos presentes en la MEC. Algunos trabajos han descrito la implicancia de la actividad heparanasa en la metástasis de células de melanoma en modelos murinos, y en suero de pacientes con melanoma se han detectado altos niveles de estas enzimas (Nakajima y col., 1988). Se ha reconocido también un inhibidor

de heparanasas en células con baja capacidad invasiva (Keren y col., 1989).

TABLA 1: proteasas participantes en la invasión tumoral

Enzimas	Especificidad	Sustratos e inhibidores
MMP1 (colagenasa intersticial) MMP2 y MMP9 (Gelatinasa A y B o Colagenasa IV) Stromelisin Matrilisinas	Metaloproteasas (Ca ²⁺ y Zn ²⁺ dependientes)	Degradan todo tipo de colágenos pero también pueden actuar sobre proteoglicanos o glicoproteínas Inhibidores:TIMP- 1 y TIMP-2
uPA tPA Plasmina	Serino-proteasas	Activan el plasminógeno a plasmina pero puede degradar otras moléculas de la MEC como FN Inhibidores: PAI-1 y PAI-2 Degrada LN, colágeno IV, FN, activa metaloproteasas y puede activar pro-uPA. Inhibidores: α 2-macroglobulina
Catepsina B	Cisteíno-proteasas	Proteasa de amplio espectro y activadora de uPA y MMPs
Catepsina D	Aspartil-proteasas	Participa en la degradación lisosomal de proteínas, pero puede encontrarse en la periferia celular
Heparanasas Hialuronidasas	Glicosidasas	Degradan heparán sulfato, heparinas, proteoglicanos. Inhibidores: TIMP y heparinas químicamente modificadas

Moléculas de la matriz extracelular

Un componente fundamental del entorno celular es la MEC, que está formada por glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos, secretados y ensamblados localmente en una red organizada. La adhesión de las células a la MEC es fundamental para mantener la integridad tisular. Las células pueden estar completamente rodeadas de MEC, como los condrocitos, o sólo contactarla a través de una zona de la superficie celular, como los epitelios. Esta malla, base estructural sobre la cual las células están adheridas (Hay, 1981), puede también actuar como barrera física o filtro selectivo de moléculas solubles. Por lo tanto, la MEC no es una estructura pasiva, sino que es una entidad biológica activa que contribuye también a determinar la morfología y función de las células (Schnaper y Kleinman, 1993). Streuli y Bissell (1990) han demostrado, mediante experimentos *in vitro*, que la expresión y la deposición de componentes de la MEC está regulada por el sustrato.

Dentro de la MEC, las membranas basales conforman la barrera natural más importante que encuentran las células tumorales a lo largo de la cascada metastásica. Sus principales componentes son glicoproteínas, como LN, FN, y proteoglicanos, como HS y colágeno IV.

La laminina (LN) es una glicoproteína de gran tamaño, compuesta por tres cadenas polipeptídicas (A, B1 y B2) que forman una estructura cruciforme (Beck y col, 1990). Por análisis de su secuencia se han identificado péptidos biológicamente activos (Schnaper y Kleinman, 1993; Schnaper y col. 1993). La cadena A contiene la secuencia RGD, descrita en fibronectina, que media la adhesión LN-célula. La cadena B1, contiene la secuencia YIGSR (tir-ile-gly-ser-arg) e interviene en la adhesión a

laminina y al Matrigel (membrana basal artificial) (Graf y col, 1987). La tercera secuencia, también en la cadena A, es la SIKVAV (ser-ile-lys-val-ala-val), que participa en la inducción del crecimiento de la neuritas de las células del sistema nervioso (Sephel y col, 1989). Además, péptidos sintéticos correspondientes a esta secuencia son capaces de aumentar la metástasis (Kanemoto y col, 1990), el crecimiento tumoral y la angiogénesis in vivo (Kibbey y col, 1992), y de aumentar la actividad del tPA (Stack y col, 1991).

La molécula más abundante de la MEC es el colágeno. Existen varios tipos de colágeno, cada uno producto de un gen diferente con una localización específica de tejido. El colágeno puede formar fibras u hojas, dando fuerza y elasticidad a los tejidos. Colágenos de tipo I y IV han sido usados para recubrir la superficie de placas de cultivo, ya que promueven la adhesión y la supervivencia celular (Yamada y Kleinman, 1992). Tanto el colágeno I como el IV poseen sitios RGD en su estructura (Agrez y col, 1991).

La fibronectina (FN) es una glicoproteína heterodimérica de alto peso molecular (220 y 230 kD cada subunidad), que se presenta en dos formas: en el plasma, como molécula soluble, o en los tejidos donde se localiza extracelularmente en forma de fibrillas (Mosher, 1984). La FN posee tres tipos de secuencias aminoacídicas repetidas, y, como consecuencia de *splicing* alternativo, pueden obtenerse distintos polipéptidos (Petersen y col., 1983). Dentro de su estructura se encuentra la secuencia RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), que es reconocida por el receptor tipo integrina $\alpha 5\beta 1$ y constituye la región de la molécula con mayor rol en la adhesión celular (Pierschbacher y col., 1981). La FN también es

reconocida por la integrina $\alpha 4\beta 1$ en un segundo sitio de unión a células, distinto al anterior (Giancotti y Mainiero, 1994). La unión de FN a integrinas está vinculada a vías de transducción de señales intracelulares, que participan en los procesos de crecimiento y diferenciación celular (Horowitz y col, 1986).

La pérdida de expresión de FN en células tumorales ha sido correlacionada con un aumento de la capacidad metastásica (Muro y col. 1991; Urtreger y col. 1997). Otros autores han demostrado que menores niveles de FN en células malignas eran consecuencia de una disminución en la vida media de esta molécula (Tyagi y col, 1983). También se ha demostrado que la pérdida de anclaje, característica de las células malignas, puede ser inhibida si se agrega FN en el medio de cultivo, aunque el fenotipo transformado de las células no se altera (Boyd y col. 1988; Roman y col. 1989).

La FN ha sido propuesta como posible molécula target para el tratamiento antimetastásico. La coinyección de células tumorales con péptidos sintéticos que codifican secuencias específicas de la FN (Saiki y col. 1989a, 1989b, 1990) produce una sensible disminución en el número de colonias metastásicas pulmonares.

Los proteoglicanos (PG) son macromoléculas que se encuentran en todos los tejidos conectivos, matrices extracelulares y en la superficie de muchos tipos celulares. Están formados por un core proteico con una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) asociadas covalentemente (Ruoslahti, 1988; Templeton, 1992). Los GAGs son largas cadenas poliméricas lineales de disacáridos en los que, en general, un azúcar es un ácido urónico y el otro azúcar puede ser N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Los azúcares pueden tener residuos sulfatados. Los

GAGs se clasifican en cuatro clases, según el tipo de azúcar que los componen:

- ácido hialurónico (AH)
- condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS)
- keratán sulfato
- heparán sulfato (HS) y heparina

El AH y la heparina son los únicos GAGs que no están unidos a un core proteico (Hascall y col., 1994). Un PG puede tener más de una clase de GAGs, como el sindecan-1, por ejemplo (Bernfield y col., 1992). Las proteínas que forman el core de los GAGs están codificadas por distintos genes (Esko, 1991; Kjellen y Lindahl, 1991), y la combinación de un dado core proteico con el GAG apropiado, confieren a esa molécula una estructura y propiedades biológicas únicas.

Los PG participan en múltiples procesos biológicos, como morfogénesis, desarrollo embrionario, adhesión celular y regulación de la proliferación y la diferenciación celular (Kjellen y Lindahl, 1991; Esko, 1991; Ruoslahti y Yamaguchi, 1991; Wight y col., 1992).

Los HSPG (heparán sulfato PG) pueden interactuar con varias moléculas de la MEC, como inhibidores de proteasas, factores de crecimiento, enzimas y proteínas de virus y parásitos (Kjellen y Lindahl, 1991; David. 1993).

Los sindecanos pueden funcionar como co-receptores de componentes de la MEC (Elenius y Jalkanen, 1994). El sindecan-1 también participa en la adhesión célula-célula en epitelios (Bernfield y col., 1992). Leppa y col. (1992) han demostrado que células tumorales

mamarias murinas, transfectadas con sindecan-1, son capaces de recuperar su morfología epitelial. Estas evidencias sugieren que el sindecan-1 participaría en la organización del tejido epitelial.

El ácido hialurónico, miembro de esta familia, es el principal ligando de CD44. Su estructura y funciones serán descritas en detalle en la sección *Moléculas de adhesión*, al referirnos a CD44.

TABLA 2: Componentes más importantes de la MEC (según Asha Nair y col, 1994)

Tipo	Componente	Propiedades
Colágeno	Colágeno I,III,IV,V	Forma la estructura de sostén reticular de las membranas basales y matrices intersticiales
Glicoproteínas	Laminina	Media la adhesión entre células epiteliales y endoteliales
	Fibronectina	Esencial en el desarrollo y en procesos como remodelación tisular y reparación de heridas
Proteoglicanos	Glicosaminoglicanos	Intervienen en la morfogénesis, adhesión celular, regulación de la proliferación y diferenciación

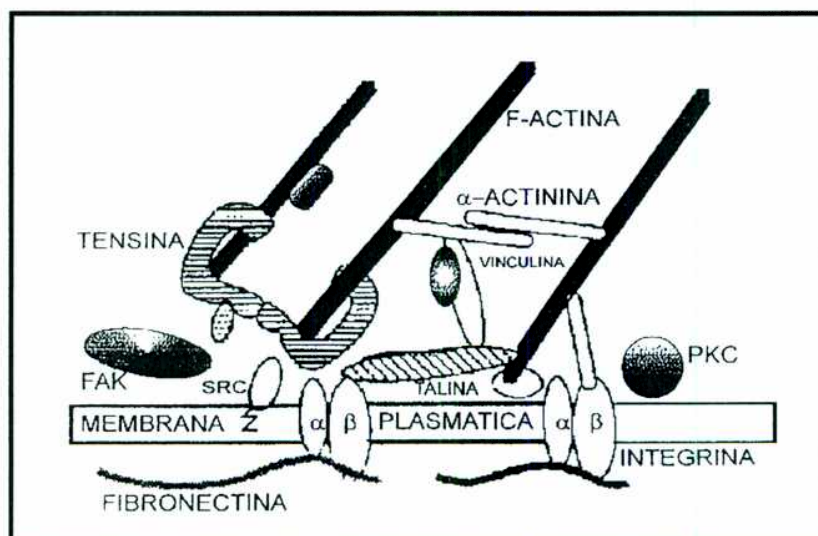
Contactos Focales y Transducción de Señales

Los contactos adhesivos, también llamados contactos focales, son estructuras que participan en la interacción célula-sustrato. Están formados básicamente por un receptor de adhesión, en general de tipo integrina, asociado con proteínas del citoesqueleto y con proteínas componentes de la MEC (Figura 2).

En el grupo de proteínas citoplasmáticas se incluyen: talina, vinculina, α -actinina, paxilina y proteínas quinasas (Turner y Burridge,

1991; Gumbiner, 1993). Estas proteínas son el principal nexo entre los filamentos de actina y la superficie celular, y su formación está asociada con el proceso de *spreading* o extensión celular. De manera que los contactos focales son sitios de coordinación entre la adhesión celular y la motilidad celular: las células muy móviles tienen contactos focales difíciles de detectar, probablemente porque son estructuras transitorias o más pequeñas (Gumbiner; 1996). En forma similar, ha sido descrito en algunos modelos de células tumorales, una disminución significativa en el número de contactos focales (Yoshimura y col, 1995). Esto se correlaciona con su baja capacidad adhesiva y alta capacidad migratoria (Juliano, 1994). Friedl y col. (1997) demostraron que, a diferencia de las integrinas, durante la migración de células sobre colágeno, CD44 no se distribuye en forma de *clusters* o parches en los sitios de contacto con el sustrato.

Figura 2: representación esquemática del complejo de proteínas que forman un *contacto focal* (Modificado de Hao Lo y Bo Chen, 1994).



Pero el contacto focal no sólo es una estructura mediadora de la adhesión celular sino que, a través de señales intracelulares, establece una vía de comunicación entre el entorno celular y el núcleo, regulando la transcripción de genes que participan en el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis (Rosales, 1995). Ha sido demostrado que factores de crecimiento (Segall y col. 1996) o mediadores lipídicos presentes en el suero como ácido lisofosfatídico (Kwon Soo y col, 1994), son capaces de disparar una cascada de señales al unirse con su receptor, regulando la organización de los componentes del citoesqueleto involucrados en la adhesión, el spreading y la migración (Juliano, 1994).

En las células tumorales, esos receptores pueden estar alterados por mutaciones que los mantienen activados en forma constitutiva (Wright y col. 1990). Así, la célula tumoral adquiere, entre otras características, independencia de anclaje, aumento de la proliferación y dediferenciación.

El ensamblaje de proteínas que forman el contacto focal puede estar regulado por la unión al ligando extracelular, como es el caso de las integrinas. Cuando las integrinas son ocupadas por el ligando, la quinasa de adhesión focal (FAK) se activa fosforilando paxilina y tensina para el ensamblado del contacto focal (Burrige y col 1992; Schwartz y col, 1995). Las interacciones del contacto focal con la actina del citoesqueleto también está regulada por GTPasas (Rac, Cdc42 y Rho), para la formación de filopodios, lamelipodios y fibras de estrés (Nobes y Hall, 1995).

En líneas celulares fibroblásticas la polimerización de actina está regulada por la fosfolipasa D (FLD) que hidroliza fosfatidilcolina (PC), luego de ser activada con LFA o α -trombina (Kwon-Soo y col, 1994). La hidrólisis de PC dependiente de FLD resulta en la producción de ácido

fosfatidico (PA) que puede ser convertido por fosfolipasas (FAP) en diacilglicerol (DAG) (Exton, 1994).

La proteína quinasa C (PKC) ha sido detectada en contactos focales y su activación se correlacionó con la fosforilación de FAK durante la adhesión y el spreading (Vuori y Ruoslahti, 1993). Estos mismos autores han demostrado que la adhesión dependiente de integrinas está conectada con la PKC, que es uno de los componente claves de las vías de señalización mitogénica donde interviene la proteína quinasa mitogénica (MAPK) (Burgering y Bos, 1995). En la década de los 80s dos descubrimientos establecieron la importancia de la PKC en la transducción de señales y en la promoción tumoral. El primero de ellos estuvo referido a la capacidad del DAG de estimular la actividad basal de la PKC (Kishimoto y col., 1980). El segundo hallazgo demostró que la PKC era el principal receptor intracelular de promotores tumorales, como los ésteres de forbol, entre ellos, el PMA (Castagna y col., 1982; Niedel y col., 1983). Los ésteres de forbol inducen la activación de PKC debido a que son análogos estructurales del DAG, aunque se unen en un sitio distinto.

Existen distintas isoformas de PKC , que se clasifican en tres grupos según la estructura proteica y los requerimientos para su activación (Tabla 3).

También se ha demostrado que la actividad mitogénica del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la activación de la MAPK, están asociados a la actividad de la PLD. Esto sugiere que PKC y PLD participan en la misma vía de señales mitogénicas (Foster 1993; Jones y col., 1994).

Tabla 3 : Clasificación de PKCs (Perletti y col., 1996).

PKC	Tipo*	Dependencia de Ca ⁺⁺ (1)	Dependencia de DAG(2)	Función
α	c	si	si	participaría en la diferenciación celular; posible oncogen en algunos modelos.
β	c	si	si	su sobreexpresión puede tener efecto transformante
γ	c	si	si	contribuye a la transformación maligna
ϵ	n	no	si	en ciertos tipos celulares podría comportarse como oncogen; en otros participaría en la diferenciación celular
δ	n	no	si	relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular
ζ	a	no	no	relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular

* c= isoformas clásicas; n= nuevas; a= atípicas

(1) requieren Ca⁺⁺ para su activación

(2) requieren DAG para su activación

Moléculas de adhesión

El proceso metastásico implica una serie de eventos basados en interacciones célula-célula y célula-sustrato. Durante el “viaje” de una célula tumoral hacia el órgano blanco, hay varios pasos en los cuales la capacidad de adherirse o no al sustrato es fundamental. Como se explicó anteriormente, la unidad funcional de la adhesión celular es un complejo proteico formado, básicamente, por tres clases de proteínas: las moléculas o receptores de adhesión, las proteínas de la matriz extracelular (MEC), y las proteínas citoplasmáticas.

La metástasis se inicia cuando ocurre un evento de desagregación o desprendimiento de las células que forman el tumor primario, lo cual

implica una ruptura de la adhesión intercelular. Así, la invasión, dependerá de nuevas interacciones adhesivas con los componentes de la membrana basal y el tejido mesenquimático en el sitio primario. Posteriormente, para acceder a la circulación sanguínea y extravasarse a órganos distantes, la célula tumoral necesitará establecer contactos heterotípicos con las células endoteliales. Finalmente, las interacciones con la MEC, son la base de la penetración en el estroma del órgano blanco donde eventualmente se formará el foco metastásico. (Beherens J., 1993)

Existe variada información sobre las moléculas de adhesión que tienen un rol causal en la formación de metástasis. Podría decirse que depende del tipo de tumor o del modelo experimental en el que se esté investigando. Pero los candidatos importantes como componentes clave en la diseminación metastásica son las integrinas y las variantes de CD44. (Ponta, 1994).

Las integrinas conforman una gran familia de receptores de superficie celular que median interacciones célula-célula y célula-MEC. Estructuralmente se componen de dos subunidades, las cadenas α y β . Se conocen al menos 15 cadenas α y 9 cadenas β , que se pueden combinar entre sí para formar receptores con distintas afinidades por los componentes de la MEC, como colágeno, fibronectina, laminina y vitronectina.

El rol de estos receptores en la metástasis fue sugerido a partir de la observación de que algunas integrinas están poco expresadas en células tumorales con bajo potencial metastásico (Ponta, 1994).

Algunos autores describen que las células transformadas poseen menor capacidad de retener fibronectina, colágeno o laminina en su

superficie. Una explicación posible es que en estas células se expresan receptores que tienen menor afinidad por sus ligandos (Rusciano y Burger, 1993). De esta manera, si bien la célula transformada puede adherirse a los componentes de la membrana basal, tienen mayor libertad de movimiento lo cual facilitaría la migración. El análisis de la expresión de receptores integrinas en células murinas normales y transformadas, demostró que éstas últimas expresan menores niveles de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de fibronectina, y mayores niveles del receptor $\alpha 3\beta 1$, que es de baja afinidad. Estos mismos autores encuentran que otros dos receptores de la familia $\beta 1$ se pierden por completo luego de la transformación (Plantefaber y Hynes, 1989).

El sitio de reconocimiento de las integrinas es un tripéptido formado por Arg-Gly-Asp (RGD). Esta secuencia está presente en las moléculas de la MEC que se unen a las integrinas, y la función de estos receptores puede ser bloqueada por péptidos RGD sintéticos, inhibiendo así tanto la invasión in vitro como la formación de metástasis experimentales (Gehlsen, 1988; Humphries, 1986; Saiki, 1989).

TABLA 4: Familias de moléculas de adhesión (Alberts y col., 1994; Rosales y col., 1995)

Familia	Integrantes
Adhesión célula-célula	
Cadherinas	Cadherina E, N, P
Inmunoglobulinas	N-CAM, I-CAM1, V-CAM1, MHCII, L1, DCC, CEA
Selectinas	L, F, E
Integrinas	LFA-1 ($\alpha 1\beta 2$), Mac1 ($\alpha m\beta 2$)
Interacción célula-MEC	
Integrinas	$\alpha 1-8$; $\beta 1-4$
Proteoglicanos	Sindecán, Glipican, Betaglican

CD44

CD44 pertenece a una familia de glicoproteínas de superficie de la membrana celular. CD44 fue inicialmente descrita como “homing receptor” en linfocitos, por mediar la adhesión linfocito-endotelio en nódulos linfáticos y otros tejidos linfoides. Posteriormente, se vio que también, participa en la diferenciación celular (Horst y col., 1990), proliferación (Aruffo y col., 1990; Alho y col., 1989), migración (Thomas y col., 1993), adhesión célula-célula y célula-MEC, invasión (Pauli y col., 1988; Okada y col., 1996) y metástasis (Guo y col. 1994), en células de origen mesenquimático y epitelial.

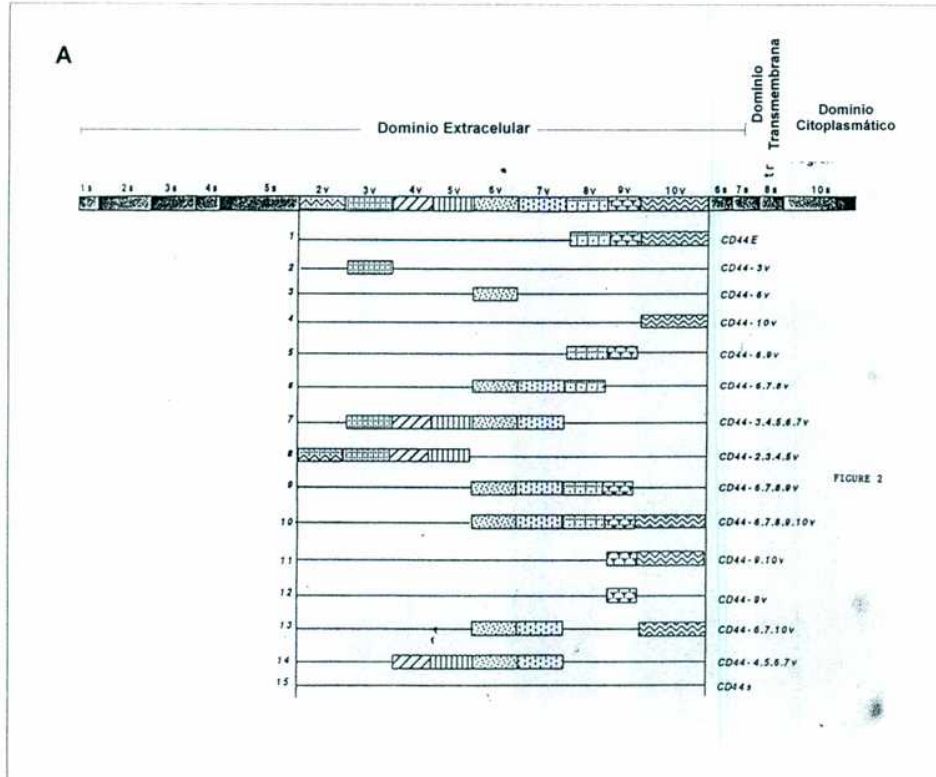
◆ *Estructura génica*

CD44 está representada por un gen de copia única ubicado en la banda p13 del cromosoma 11 en el humano (Goodfellow y col. 1982; Franke y col., 1983), siendo su peso molecular de 60 kb. Su contraparte murina se encuentra en el cromosoma 2 (Lesley 1982). Está compuesto por 10 exones estándar (Fig.3A) que codifican para CD44s (o CD44H), y 10 exones que sólo se expresan por splicing alternativo, dando lugar a un gran número de variantes (CD44v) (Screaton y col., 1992; Jackson y col., 1992). Las variaciones en la cola citoplasmática resultan de la utilización diferencial de uno de dos exones (los exones 18 y 19). Los tres primeros aminoácidos de ambas colas están codificados en el exón 17. El exón 18 codifica una zona rica en secuencias AT no traducida, que podría conferir inestabilidad al mRNA. El exón v1 no se expresa en el humano por la presencia de un codón stop.

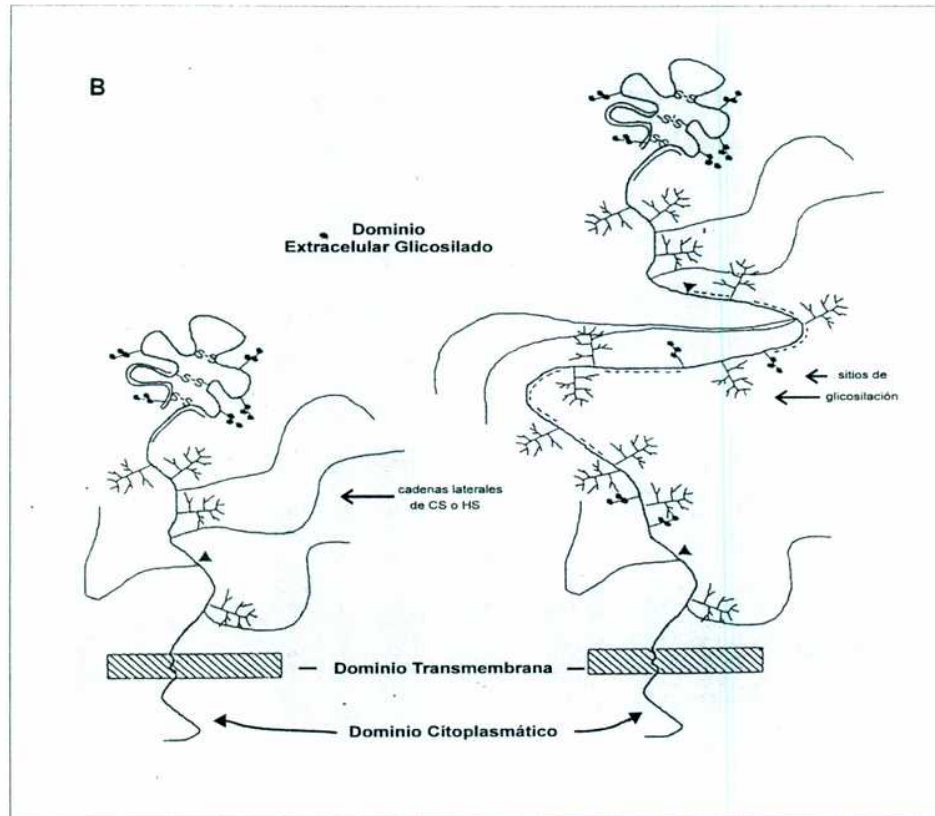
Algunos autores han analizado la presencia de secuencias regulatorias en el gen de CD44. En células humanas de neuroblastoma se vio que no existen TATA y CCAAT boxes, pero sí zonas ricas en secuencias GC (Shtivelman, 1991). Sin embargo tanto en el gen humano como en el de ratón, clonados por Herrlich et al (1993) se ha encontrado un TATA box en las posiciones -31 a -35. Por ensayos de transfección también se demostró la existencia de elementos regulatorios negativos (Shtivelman 1991). Tanto el gen humano como el murino tienen, además, sitios potenciales de unión el factor de transcripción SP-1. También en estos genes existe un sitio de unión al factor AP-1. En ensayos de transfección con este sitio mutado, se vio una reducción en la eficiencia de transcripción de CD44, como también una menor respuesta a la inducción por ésteres de forbol (Herrlich y col., 1993). Por otro lado, Zhang et al (1996) han demostrado la presencia de “EGF-responsive elements” en el promotor de CD44, capaces de regular la transcripción de este receptor.

Figura 3: Estructura genómica y proteica de CD44.

A) Mapa de exones: los exones "s" representan la región constante. Los exones "v" son insertados por splicing alternativo en la región variable. Debajo del mapa de exones se han representado algunos ejemplos de transcritos generados por splicing alternativo.



B) Estructura proteica: representación esquemática de dos moléculas de CD44 que difieren en el grado de glicosilación. Se representan sus tres dominios, regiones unidas por puentes disulfuro (S-S), cadenas laterales de condroitin sulfato (CS) o heparán sulfato (HS), sitios de glicosilación y la región variable (Δ).



◆ *Estructura del mRNA*

En el patrón más simple de expresión de CD44 se observan tres especies de mRNA. El tamaño de las mismas es de 1.6, 2.2 y 4.8 kb en humanos (Stamenkovic y col., 1989; Goldstein y col., 1989; Brown y col., 1991), y de 1.6, 3.3 y 4.6 en ratón (Wolffe y col., 1990). Esta variación resulta, aparentemente, por el uso de múltiples señales de poliadenilación. (Harn y col., 1991). Han sido descritos al menos 18 transcritos. Esta heterogeneidad resulta de que 12 de 20 exones pueden sufrir splicing alternativo y entre los exones 5 y 7 hay sitios dadores y aceptores de splicing.

No se sabe con certeza si todas las especies generadas por splicing alternativo, dan lugar a una proteína madura.

◆ *Estructura proteica*

CD44 está conformada por un dominio extracelular altamente glicosilado, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular que se conecta con el citoesqueleto (Fig. 3B).

Dominio citoplasmático

El dominio citoplasmático está compuesto por una secuencia de 70 aminoácidos, y posee un 80-90% de homología entre especies. Dentro de este dominio existen cinco residuos conservados de serina, dos de los cuales son fosforilados in vivo. La fosforilación in vitro de CD44 aumenta su afinidad por ankirina (Lokeshwar y col., 1992). Sin embargo esto no fue comprobado en células MDCK intactas (Neame y col., 1992). Por otro lado, CD44 purificado es capaz de unir GTP y tiene actividad GTPasa como se demostró en ensayos in vitro (Lokeshwar y col., 1992). En células BHK y fibroblastos de ratón, también se ha demostrado que CD44 está

asociado con tres proteínas, ezrina, radixina y moesina, que se localizan debajo de la membrana citoplasmática, y cuya función, en este caso, sería servir de nexo entre CD44 y los filamentos de actina del citoesqueleto (Tsukita y col., 1994). La delección de la cola citoplasmática, impide la localización de CD44 en la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas (Neame y col., 1992).

Analizando posibles funciones del dominio citoplasmático, se demostró que mutaciones en el mismo disminuyen o anulan la capacidad de CD44H de unirse a su ligando, el ácido hialurónico (Liao y col., 1993).

Dominio transmembrana

Se conoce poco acerca de este dominio. Perschl y col. (1995) han estudiado la importancia de la porción transmembrana de CD44 en fibroblastos de ratón. Estos autores observaron, mediante el uso de mutantes para el dominio citoplasmático y transmembrana, que este último es importante para establecer una interacción entre CD44 y el citoesqueleto de actina. Dicha interacción se mantendría gracias al contacto entre el dominio transmembrana y los lípidos que forman parte de la membrana citoplasmática.

Dominio extracelular

La porción N-terminal del dominio extracelular, está comprendida por 90 residuos hidrofóbicos y tiene un 80-90% de homología entre especies. (Zhou y col., 1989). El dominio más próximo a la membrana es el menos conservado, pues posee aproximadamente un 50% de homología entre distintas especies. Esta zona contiene tres o cuatro sitios consenso para la unión de condroitínsulfato y varios sitios para O-glicosilación. En el humano se han descrito al menos seis sitios de unión de carbohidratos.

Tanto en células normales como tumorales, se ha reportado la expresión de variantes como resultado de un splicing alternativo. En keratinocitos y células de carcinoma se encontraron transcritos cuyo core proteico deglicosilado, tiene mayor peso molecular que el de la forma estándar (Hofmann y col., 1991; Kugelman y col., 1992; Haggerty y col., 1992). Al compararlos con CD44s, que predomina en las células hemopoyéticas, se vio que esos cores tienen 338 aminoácidos más en el dominio extracelular. Además se comprobó que poseen tres sitios de N-glicosilación, varios de O-glicosilación, y dos de unión a condroitínsulfato.

No se han descrito secuencias de unión a heparán sulfato (Brown y col., 1991; Haggerty y col., 1992).

Una misma célula es capaz de sintetizar simultáneamente, más de una variante de CD44 (He y col., 1992).

◆ *El ligando*

El principal ligando de CD44 es el *ácido hialurónico* (AH). Los principales componentes de la MEC son proteínas de la familia del colágeno y proteoglicanos. Estos últimos son glicosaminoglicanos (GAG) unidos covalentemente a un core proteico. El AH es un GAG cuya estructura consiste en un polímero lineal de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. A diferencia de otros GAGs, el AH no se une en forma covalente al core proteico. Su peso molecular puede ser de varios millones, y en solución es capaz de capturar gran cantidad de solvente (Laurent, 1992).

En 1983, Underhill et al. encontraron que el receptor para AH en fibroblastos era una molécula de 85 kDa. Esta molécula se encontraba fosforilada y asociada al citoesqueleto a través de filamentos de actina

(Underhill y col., 1985). Posteriormente, Culty et al. (1990), demostraron que esa unión podía ser bloqueada específicamente por un anti-CD44 monoclonal (KM201). No todos los anticuerpos bloquean la unión AH-CD44, demostrando la existencia de ciertos epitopes que son específicos de esta unión. Sin embargo, no todas las células positivas para CD44 son capaces de unir AH (Lesley y col., 1990; Miyake y col., 1990).

También se demostró que no todas las isoformas de CD44 tienen afinidad por AH. Stamenkovic (1991) y posteriormente Dougherty (1994), demostraron que células que expresan CD44E no son capaces de reconocer y unirse al AH. La capacidad de CD44 unirse a dicho ligando sería dependiente de 3 aminoácidos en las posiciones 109, 221 y 306 del dominio extracelular. Sy y col. (1991) han descrito que la invasión tumoral puede observarse, en algunos casos, en regiones con alta concentración de AH, como el intersticio de la zona medular y papilar del tejido renal, la submucosa del tracto gastrointestinal, y debajo de la cápsula hepática. Hobarth y col. (1992) demostraron que el AH era capaz de formar un halo alrededor de las células tumorales conformando así una barrera protectora contra el sistema inmune. Recientemente Lokeshwar y col. (1997) han demostrado que la presencia de altos niveles de AH en la orina de pacientes con cáncer de vejiga podría ser de utilidad como marcador.

◆ *Expresión de CD44 en tejidos normales*

La expresión de CD44s y de CD44v ha sido descrita en tejidos normales por Fox (1994) y Mackay (1994). Estos autores han encontrado una alta expresión de variantes en los epitelios normales, cuya función estaría asociada a la adhesión intercelular y a la migración de las células residentes en el tejido. Dentro de los tejidos epiteliales, las variantes se

expresan con mayor intensidad en las células “stem” o sea, en células con alta capacidad de proliferación, como las células basales del epitelio escamoso, o las células glandulares. Las variantes analizadas fueron v3, v4/5, v6 y v8/9. El epitelio gastrointestinal expresa las variantes en forma débil, mientras que las glándulas del endometrio son positivas durante todas las fases del ciclo menstrual y la decidua. Ovario, timo, bazo, músculo estriado y liso, hígado y riñón resultaron negativos, como así también el SNC. El mismo análisis para la forma estandar, mostró positividad para casi todos los tejidos analizados, con excepción de ovario e hígado.

◆ *Expresión de CD44 en tumores*

En 1991 Gunthert y col. demostraron que la isoforma v6 confiere capacidad metastásica al ser transfectada en células tumorales no metastásicas de rata. Como consecuencia de este hallazgo, surgió un gran interés por el estudio de CD44 en diferentes tumores, como colon (Wielenga y col., 1993), pulmón (Penno y col., 1994), gastrinomas (Chaudry y col., 1994), glioblastomas (Kuppner y col., 1992), linfomas no-Hodking (Koopman y col., 1993), entre otros. Estos estudios demuestran que CD44s o CD44v pueden estar sobreexpresadas, que los tumores tienen patrones de splicing más complejos que los tejidos normales y que la expresión diferencial de CD44 ocurre en distintos subtipos histológicos.

En neuroblastoma, sin embargo, se ha demostrado que la ausencia de expresión de CD44 asociada a la sobreexpresión de N-myc, sería un indicador de agresividad en estos tumores (Combaret et al, 1995). Similarmente, en carcinomas de células escamosas, Salmi y col. (1993),

han reportado que una disminución de la expresión de CD44 se asociaba con un mal pronóstico.

Por otro lado, si bien en tumores de mama los resultados son aun conflictivos, CD44 podría funcionar como marcador de diferenciación (Friedrichs y col., 1995) o como marcador pronóstico (Kaufmann y col., 1995).



HIPOTESIS y OBJETIVOS

CD44 es una molécula de adhesión que ha sido implicada en procesos fisiológicos normales y patológicos como la activación de linfocitos y macrófagos, la reparación de heridas, la adhesión de linfocitos al endotelio, y la capacidad invasiva y metastásica de células tumorales. Sin embargo, su localización y expresión durante el spreading celular como así también las vías de señales intracelulares que regulan su expresión, han sido poco explorados.

Tomando como base estos y otros antecedentes experimentales ya mencionados en la introducción, nuestra hipótesis de trabajo se basa en el análisis de la participación de CD44 en las diferentes etapas que componen la cascada metastásica. Para ello, en el comienzo del desarrollo de este plan de Tesis, se analizará la expresión de CD44 in vivo e in vitro de tres líneas celulares tumorales murinas, con el objeto de seleccionar una de ellas para profundizar nuestro estudio sobre esta molécula. En el modelo seleccionado nos proponemos estudiar el rol de CD44 en los procesos de adhesión, spreading, migración e invasión in vitro. Posteriormente, analizaremos los caminos de señalización intracelulares que regularían su expresión, así como la posible relación de este receptor con otras moléculas que también participan en los procesos de invasión y metástasis.

En el último capítulo de este plan de trabajo, en colaboración con los Servicios de Patología y Oncología del Hospital Italiano, se analizará la expresión de CD44 en tumores humanos cerebrales. La sobreexpresión de CD44s y sus variantes ha estado relacionada con la progresión tumoral y la capacidad metastásica en distintas neoplasias humanas. En algunos

tumores se ha demostrado que CD44 podría ser un marcador pronóstico, mientras que en otros su utilidad en este sentido es aún dudosa. En base a estos datos nos hemos propuesto evaluar si la expresión de CD44s y algunas variantes en tumores humanos de cerebro, podría correlacionarse con los distintos estadios tumorales, y, si ese fuera el caso, establecer su utilidad como marcador diagnóstico o pronóstico.

Brevemente, los objetivos específicos a desarrollar en el presente plan de tesis son:

- Analizar la expresión de CD44 in vivo e in vitro, en distintos modelos experimentales tumorales murinos
- Determinar el rol de CD44 en las diferentes etapas de la cascada metastásica
- Investigar la posible relación de este receptor con otras moléculas involucradas en el proceso metastásico
- Estudiar los caminos de señalización que participarían en la regulación de la expresión de CD44
- Evaluar la expresión de CD44s y algunas variantes en tumores humanos del SNC, y su correlación con otros parámetros clinicopatológicos.



SEGUNDA PARTE

Desarrollo Experimental



Capítulo 1

CAPITULO 1

Expresión de CD44 en Tumores Mamarios Murinos y Líneas Celulares

Modelo Tumoral

En el Area Investigación del Instituto “A.H.Roffo” contamos con adenocarcinomas mamarios murinos de diferente capacidad invasiva y metastásica que se han empleado como modelo para investigar las moléculas críticas determinantes de la progresión tumoral y la diseminación metastásica.

El adenocarcinoma mamario M3 moderadamente metastásico en pulmón, surgió espontáneamente en una hembra BALB/c. A partir de éste, por un procedimiento de selección in vivo (Colombo y col., 1980), se obtuvo la variante tumoral MM3, con alta capacidad metastásica en pulmón. Ambos tumores se mantienen por pasajes in vivo mediante trasplantes subcutáneos en ratones singeneicos BALB/c. El análisis histopatológico muestra que ambos son adenocarcinomas moderadamente diferenciados con cordones celulares de células polihédricas y algunos acinos, separados por haces de estroma. Ninguno presenta destacable capacidad invasiva a nivel local. A partir de estos tumores se pueden obtener cultivos primarios que han sido extensamente caracterizados (Bal de Kier Joffé y col., 1983; Pereyra Alfonso y col., 1988).

Mediante procedimientos in vitro se han establecido las líneas celulares continuas LM3 y LMM3, derivadas de M3 y MM3

respectivamente (Urtreger y col., 1997). Las mismas guardan similitudes y al mismo tiempo difieren en algunos aspectos de sus tumores parentales de origen. Al ser inoculadas por vía subcutánea, dan tumores con capacidad metastásica en pulmón, siendo la línea LM3 más metastásica que el tumor parental, mientras que la línea LMM3 mantiene el mismo potencial metastásico que el tumor MM3. El análisis histopatológico de los tumores generados por estas líneas muestra que son adenocarcinomas poco diferenciados, con capacidad invasiva en la dermis y en las capas muscular y adiposa subcutáneas. Las células en estos tumores no tienen estructura polarizada y se observa escaso estroma intercelular.

Se cuenta además con la línea celular F3II, que es de particular interés. Esta línea celular derivó de un clon obtenido, a partir de suspensiones celulares del tumor primario M3, por la técnica de dilución límite (Alonso y col., 1996). Las células F3II presentan morfología fusiforme. A pesar de su morfología ahusada, el análisis ultraestructural muestra que se trata de células de estirpe epitelial, con características típicas de carcinomas, como microvellosidades, numerosos ribosomas y uniones intercelulares rudimentarias. Los desmosomas son escasos y poco desarrollados, y no se detectaron tonofilamentos. Los núcleos en general son grandes, con varios nucleolos y áreas de condensación de la cromatina. Algunas células poseen cisternas con partículas virales de tipo A. La tinción inmunohistoquímica de las células F3II mostró expresión de citoqueratinas y ausencia de vimentina, confirmando su estirpe epitelial.

Al ser inoculadas por vía subcutánea, las células F3II forman tumores que dan metástasis espontáneas en pulmón, con una incidencia del 100%. Una característica muy importante de estos tumores es su gran invasividad a nivel local. A diferencia del tumor parental M3, las células

F3II producen mayores niveles de uPA unido a membrana, característica que permite focalizar la actividad del uPA sobre la superficie celular favoreciendo el proceso de invasión. Además, al ser inoculadas por vía intravenosa en ratones BALB/c, desarrollan metástasis experimentales en pulmón.

Como ya se mencionó, la *invasión* y la *motilidad* en una célula tumoral son propiedades críticas, dado que le permiten colonizar los tejidos normales del huésped. Entre las moléculas mediadoras de estos eventos, las moléculas de adhesión, dentro de las que se encuentra CD44, constituyen un grupo de gran interés. En los modelos tumorales estudiados en nuestro Instituto, aún no se conoce la expresión y el rol de CD44.

Por otra parte, en nuestro laboratorio contamos con la línea celular NMuMG (normal murine mammary gland) derivada de tejido mamario normal de ratón (cedida por el Dr. J. Filmus). Sus características morfológicas ultraestructurales corresponden con las de un epitelio secretorio por la presencia de desmosomas o uniones intermedias, microvellosidades y tonofibrillas (ATCC, CRL 1636).

A fin de iniciar el desarrollo del tema de investigación de esta tesis, se evaluó la expresión de CD44 en cortes histológicos de tumores F3II, LM3 y LMM3 y en monocapas de estas mismas células. La línea celular NMuMG fue usada como control de células normales en algunos experimentos in vitro.

Materiales y Métodos

Cultivos Celulares

Las líneas F3II, LM3 y LMM3 se mantienen in vitro en MEM (410-1500, Gibco) suplementado con SFB (5%), L-glutamina (2mM) y gentamicina (80 µg/ml). La línea celular NMuMG se mantiene D-MEM (430-1600, Gibco), suplementado con SFB (5%), L-glutamina (2mM), gentamicina, estreptomycin y penicilina (50 µg/ml c/u) e insulina (40 U/ml).

Todas las líneas celulares son cultivadas en atmósfera húmeda bajo condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂. Al llegar a confluencia son repicadas empleando una solución 0.25% de tripsina y 0.02% de EDTA.

Todas las líneas celulares son controladas periódicamente para descartar la presencia de micoplasmas.

Tumores

Cultivos confluentes o subconfluentes de células F3II, LM3 y LMM3 fueron tripsinizados y se contó el número de células viables por exclusión con azul tripán. Luego de dejar que las células se recuperen en MEM durante una hora a 37°C en estufa gaseada, las mismas fueron inoculadas en ratones singeneicos hembras BALB/c de aproximadamente 14 semanas de edad. Cada ratón recibió 2×10^5 células (F3II, LM3 o LMM3) en 0.2 ml de MEM, por vía subcutánea en el flanco izquierdo, o por vía intraperitoneal (sólo células F3II). Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos (20, 25 y 32 días los subcutáneos, y 15-20 días los intraperitoneales). Una parte de los tumores fue fijada en 3% de

paraformaldehído y procesada para su estudio por inmunohistoquímica (IHQ). El resto fue congelado en N₂ para su análisis por western blot (WB) o inmunoprecipitación (IP).

Anticuerpo

En estos experimentos se usó un anti-CD44 murino proveniente del hibridoma KM201 hecho en rata (Miyake y col., 1990), cedido por el Dr. J. Filmus. Este anticuerpo reconoce la forma estándar y todas las variantes de CD44 murinas.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Los tumores F3II, LM3 o LMM3 de distintos tiempos de evolución fueron incluidos en parafina. Se hizo IHQ sobre los cortes histológicos y las monocapas, según el siguiente protocolo:

Los cortes histológicos fueron desparafinados por lavados sucesivos con xilol, etanol absoluto, etanol 96% y etanol 70%. Posteriormente, para desenmascarar el antígeno, las muestras se sumergieron en buffer citrato (pH= 6) y se trataron por tres períodos de 10 min. cada uno, en horno a microondas, agregando buffer para que las muestras no se sequen.

Las monocapas de células F3II, LM3, LMM3 y NMuMG fueron fijadas en 3% de paraformaldehído durante 30 min. a temperatura ambiente y luego de lavarlas en PBS, se guardaron a 4°C hasta su tinción.

Los pasos siguientes fueron comunes en el procesamiento de los cortes y las monocapas:

Se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las muestras con 3% de H₂O₂ en PBS durante 20 min., seguido de un lavado con PBS. Luego de incubar con buffer de bloqueo (5% de leche en PBS), a fin de impedir la unión inespecífica de los anticuerpos, se agregó el primer anticuerpo (anti-CD44 murino, sobrenadante sin diluir del hibridoma KM201) y se incubó a 4°C toda la noche. Un anticuerpo anti-IgG de rata biotinilado fue usado como segundo anticuerpo (dil. 1:500, Vector) por dos horas a temperatura ambiente. Luego de lavar se incubó con estreptavidina-peroxidasa por 40 min. a temperatura ambiente (dil. 1:500, Vector) y finalmente se reveló con una solución al 7% de DAB (diaminobencidina) y 3% de H₂O₂ en PBS, como cromógeno. Se hizo contratinción de núcleos con hematoxilina de Harris, y se procedió al montado en bálsamo de Canadá. Como control negativo se omitió la incubación con el primer anticuerpo.

Western Blot (WB)

Se prepararon homogenatos de fragmentos de tumores F3II, por machacado de los mismos en N₂ líquido y resuspensión del lisado en 1% PMSF en PBS. Por otro lado, las monocapas de células F3II o NMuMG fueron levantadas por rastrillado, resuspendidas en 1% PMSF en PBS y sonicadas. Luego de calentarlos durante 3 minutos en buffer de siembra, los lisados fueron corridos en geles FAA (poliacrilamida) al 7% (Laemmli, 1970). En cada calle se sembró la misma cantidad de proteínas totales. Luego de la corrida, las proteínas fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa (Bio-Rad). La determinación de proteínas totales se hizo por el método de Lowry, usando albúmina bovina como estándar.

La identificación de CD44 en las muestras se realizó incubando las membranas en presencia del primero y segundo anticuerpos, usando las mismas concentraciones que en el protocolo para la IHQ. El revelado, en el caso de WB, se hizo incubando las membranas en estreptavidina-fosfatasa alcalina (dil. 1:1000, Vector) durante 40 min., y como cromógeno se utilizó NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium, Sigma; y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, Sigma). Las bandas proteicas fueron analizadas en un densitómetro modelo GS-700 (Bio-Rad, USA).

Inmunoprecipitación (IP)

Se incubaron extractos proteicos (100 ug) provenientes de lisados tumorales en presencia del anticuerpo monoclonal anti-CD44 (dil. 1:5, aprox. 0.05 ug/ul de sobrenadante de hibridoma), durante toda la noche a 4°C. Luego se agregó proteína A-Sepharosa (Sigma) a la mezcla antígeno/anticuerpo y se incubó durante una hora más a 4°C. Los complejos se recuperaron por centrifugación en frío a 5000 g por 1 min. y se lavaron dos veces con buffer de lisis adicionado con NaCl 0.5M y dos veces con buffer de lisis en ausencia de NaCl. El pellet final se resuspendió en buffer de siembra, se calentó 3 min y se analizó por electroforesis en geles PAA al 7%. Luego de transferir los geles a membranas de nitrocelulosa, se realizó el revelado según el protocolo detallado para Western blot.

RESULTADOS

Expresión de CD44 en líneas celulares murinas mamarias normales (NMuMG) y tumorales (F3II, LM3 y LMM3):

Se analizó la expresión de CD44 en monocapas de células LM3 y LMM3 por IHQ. Las células F3II y NMuMG (control normal) se estudiaron por IHQ y WB.

La IHQ sobre monocapas confluentes de todas las líneas celulares, mostró un patrón de tinción de la membrana celular, en casi el 100% de las células. También se observó una leve tinción citoplasmática en algunos grupos celulares, que podría explicarse por la presencia de formas carentes de la cola citoplasmática, que no alcanzan a ubicarse en la membrana celular (Neame 1992) (Fig.1.1: a-f). La expresión de CD44 en células F3II fue diferente, según el grado de densidad celular. Se observó que las monocapas subconfluentes tenían un alto grado de expresión que disminuía al alcanzar la confluencia (Fig. 1.1 a y b).

Figura 1.1: Análisis por IHQ de la expresión de CD44 en líneas celulares mamarias murinas tumorales y normales (400x):

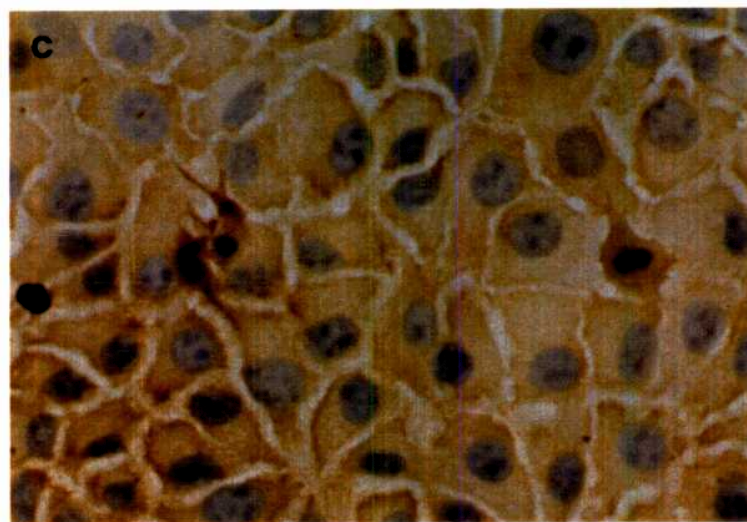
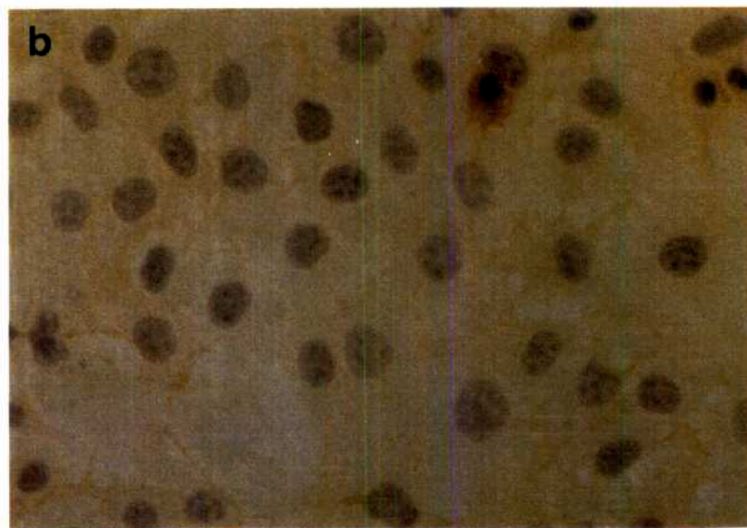
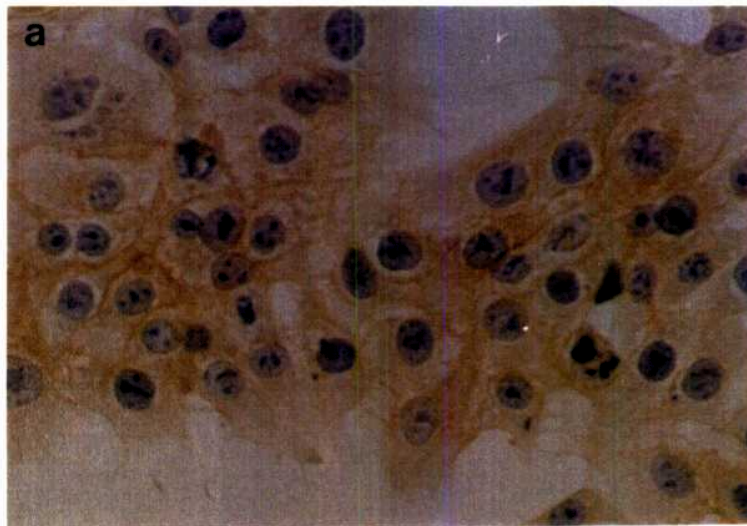
Cultivos de la línea celular tumoral F3II:

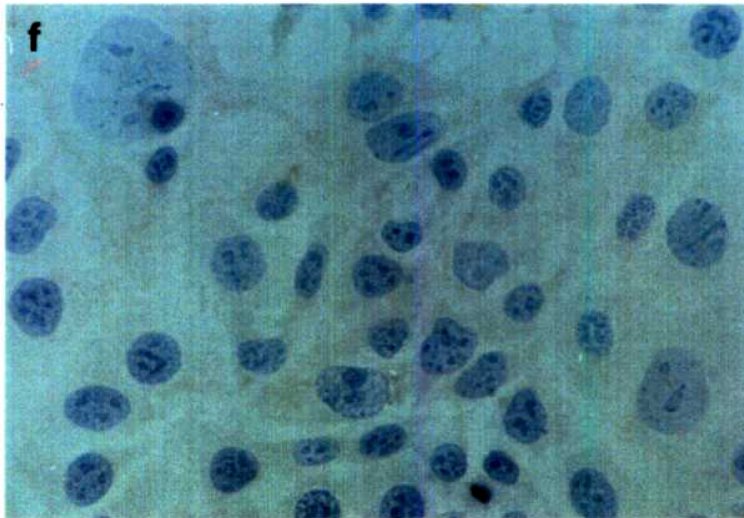
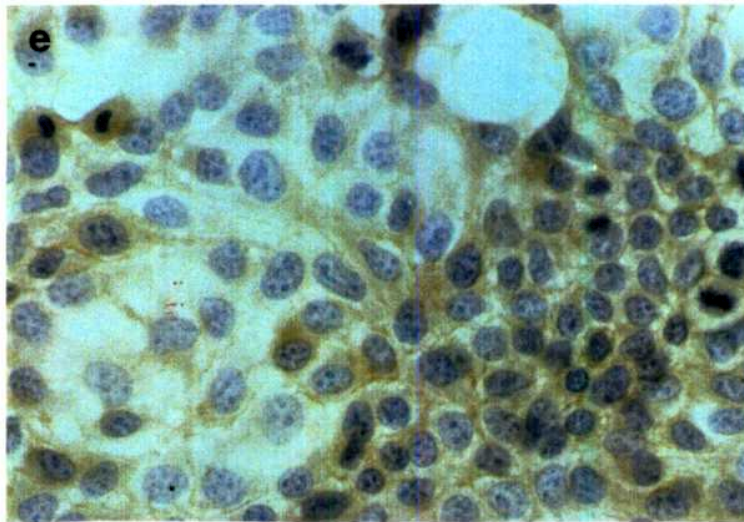
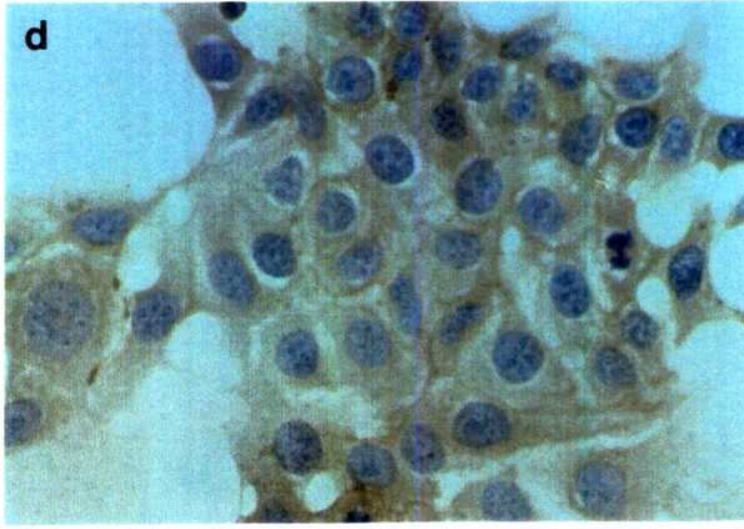
Se puede observar una alta expresión de CD44 en monocapas subconfluentes (a), mientras que al alcanzar la confluencia (b) dicha expresión disminuye sensiblemente.

c) Monocapas de células mamarias murinas normales NMuMG. Puede observarse la tinción de CD44 sobre la membrana celular.

Cultivos de las líneas celulares tumorales LM3 (d) y LMM3 (e): la tinción para CD44 se distribuye en forma heterogénea en estos cultivos: se pueden observar grupos celulares que presentan mayor expresión de ésta molécula.

f) Control en ausencia del primer anticuerpo.





La expresión de CD44 en lisados de monocapas confluentes de NMuMG y F3II fue también analizada por técnicas de WB. Tkach y col. (1996), han reportado que las células NMuMG expresan CD44s y las variantes v7-v10. El análisis densitométrico del WB demostró que las células F3II expresan niveles más altos que sus pares normales (Fig. 1.2). Al ser incubadas durante 24 horas en presencia de 5% de SFB, las células NMuMG presentaron un aumento de 3.7 veces en la expresión de CD44, respecto de los cultivos en ausencia de suero, mientras que las células F3II presentaron un aumento de 2.5 veces en las mismas condiciones.

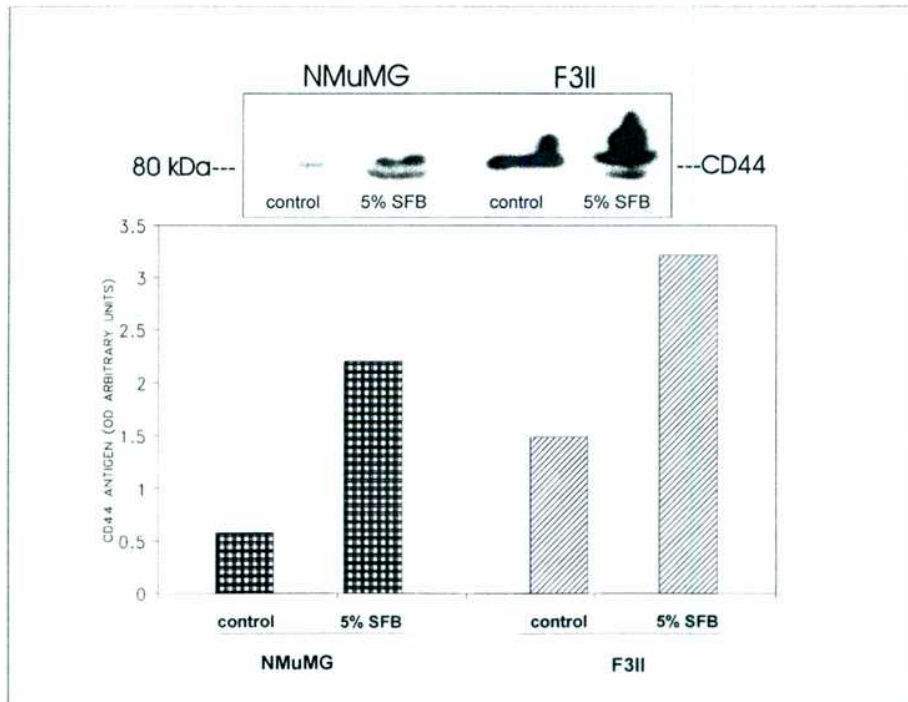


Figura 1.2: Análisis por Western blot y densitometría, de la expresión de CD44 en células NMuMG y F3II. Las células fueron cultivadas en presencia o en ausencia de 5% de SFB durante 24 hs.

Como se ha mencionado, el anticuerpo usado en nuestros ensayos proviene del hibridoma KM201, que reconoce la forma estándar de CD44 y también las variantes. El análisis de la expresión de CD44 por WB, tanto en las células tumorales F3II como en el control normal, NMuMG, reveló la presencia de una banda principal de 80 kDa, correspondiente a CD44s. El WB de las células F3II mostró además, un patrón de “smear” o productos de mayor peso molecular, indicando que estas células expresan isoformas de CD44, con distintos grados de glicosilación y heterogeneidad de pesos moleculares. En las células NMuMG dicha expresión fue mucho menos evidente (Fig. 1.3). Nuestro análisis posterior sobre la expresión de CD44 en la línea celular F3II se focalizó en la banda de 80 kDa que identifica a la forma estándar.

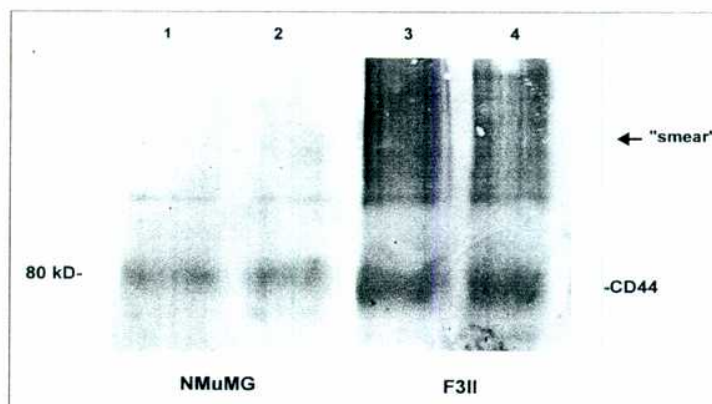


Figura 1.3: Western blot de lisados de células NMuMG (calles 1 y 2) y F3II (calles 3 y 4). En ambas líneas celulares aparece una banda principal de 80 kDa, correspondiente a CD44s. En las células F3II, pueden verse, además, productos proteicos de mayor peso molecular (“smear”) correspondientes a la presencia de variantes de CD44, mientras que en las células NMuMG dicha presencia es menos evidente.

Expresión de CD44 en tumores F3II, LM3 y LMM3

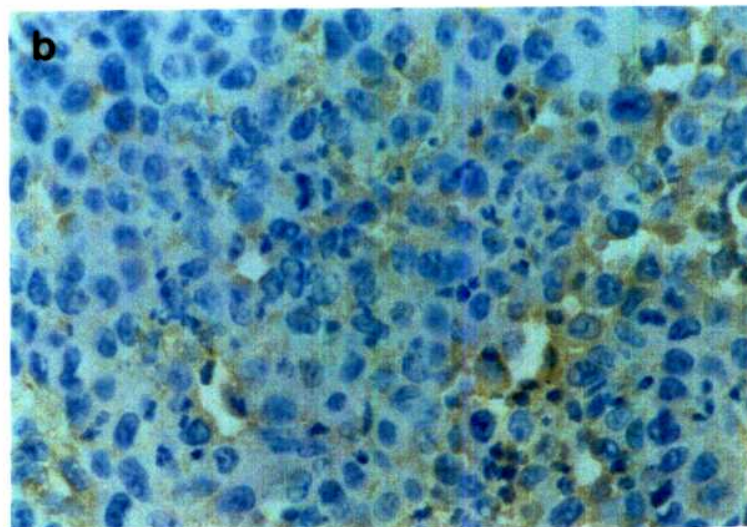
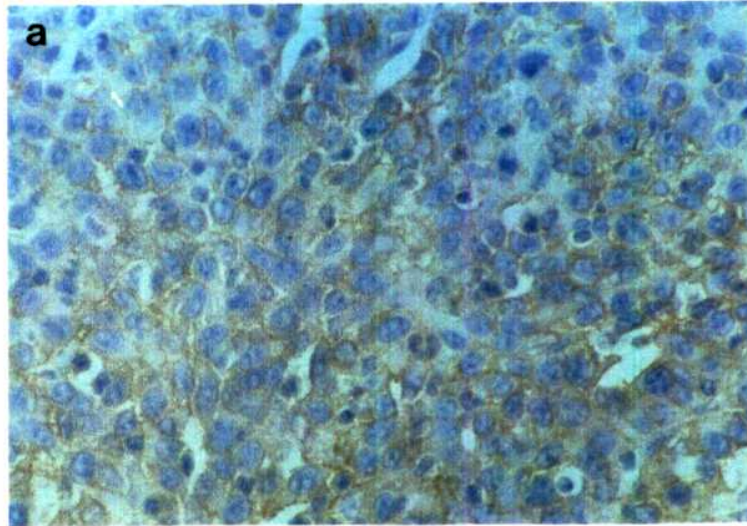
A fin de evaluar si había correlación entre la expresión in vitro de CD44 y la expresión in vivo, se analizó la presencia de CD44 por IHQ sobre cortes histológicos de tumores subcutáneos F3II, LM3 y LMM3. Asimismo, la expresión de CD44 también fue estudiada por WB e IP en el caso de los tumores F3II.

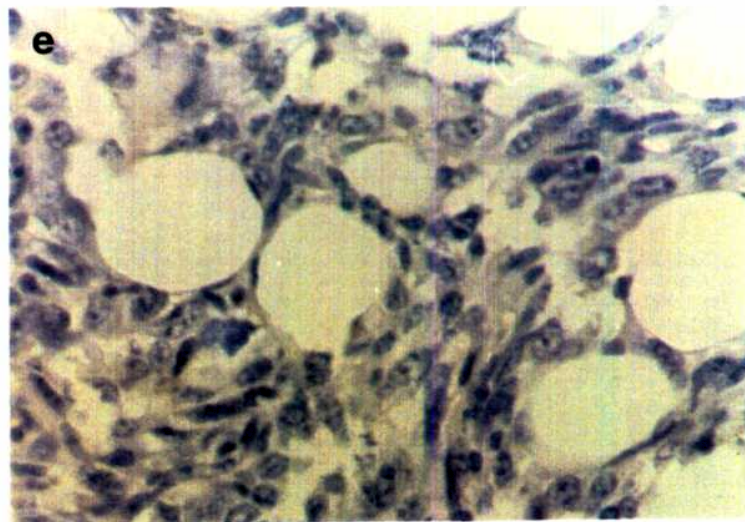
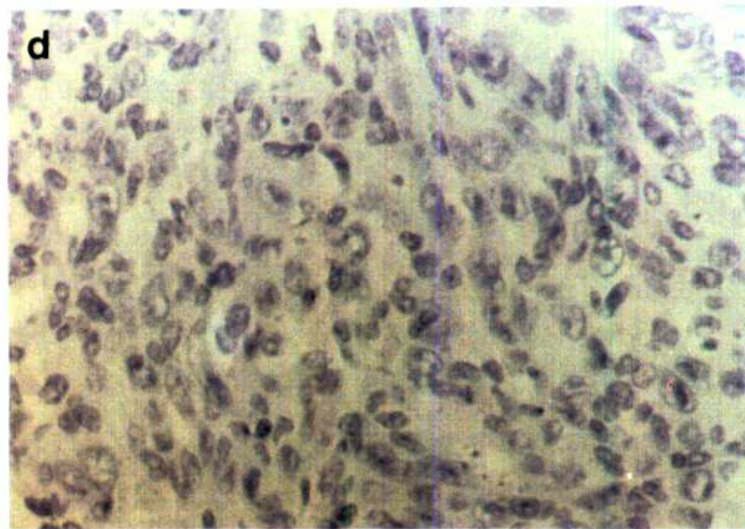
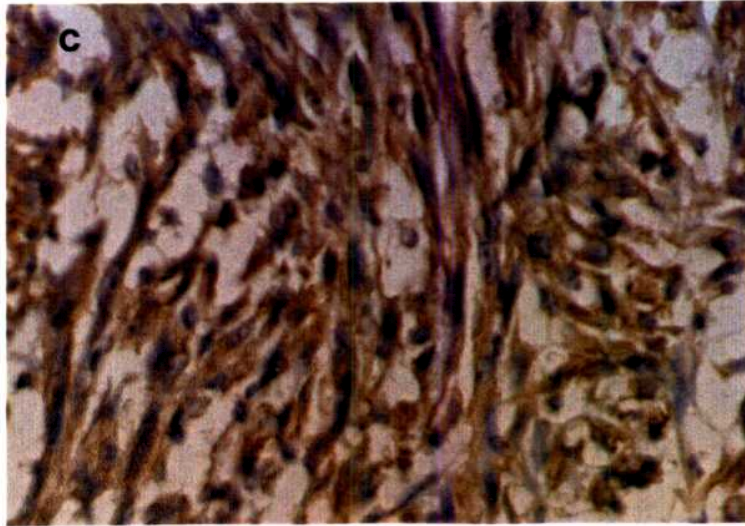
Los tumores LM3 y LMM3 de distinto tiempo de evolución mostraron débil expresión de CD44 (Fig. 1.4 a y b). La tinción de los cortes histológicos de tumores F3II crecidos en forma subcutánea, en cambio, muestran una alta expresión de CD44 (Fig. 1.4 c), especialmente los de mayor tiempo de evolución (25 y 32 días). Cuando se analizaron los tumores F3II crecidos por inoculación intraperitoneal, la expresión de CD44 fue prácticamente nula (Fig. 1.4 d).

Figura 1.4: Expresión de CD44 en cortes histológicos de tumores murinos. Tinción por IHQ (400x):

La expresión de CD44 en tumores subcutáneos LM3 (a) y LMM3 (b) fue muy débil o nula. El mismo análisis sobre tumores F3II crecidos en forma subcutánea, reveló una alta expresión de CD44 (c). Sin embargo, la IHQ sobre cortes histológicos de tumores F3II intraperitoneales (d), mostró una pérdida de la expresión de esta molécula.

e) Control en ausencia del primer anticuerpo.





Para confirmar estos resultados, lisados de estos mismos tumores fueron analizados por IP y WB. El análisis densitométrico de las bandas (Tabla 1.1) muestra que los tumores s.c. expresan niveles significativamente más altos que los tumores i.p. Las débiles bandas detectadas en estos últimos podrían provenir de la expresión de CD44 en células normales como fibroblastos, endotelio vascular o células del sistema inmune, que se encuentran en el tumor.

Tabla 1.1: Expresión de CD44 tumores F3II crecidos en diferentes sitios

	Tumores	
	Subcutáneos	Intraperitoneales
Experimento 1	306*	68
Experimento 2	270	85
Media	288	76.5**
SD	25.4	12

Lisados de tumores F3II subcutáneos o intraperitoneales fueron inmuno precipitados con anti-CD44 en presencia de proteína A Sepharosa, y luego analizados por WB y densitometría.

* unidades arbitrarias de absorbancia

** $p < 0.05$ (t-test)

DISCUSION

La motilidad celular está asociada a distintos procesos normales o patológicos, en los cuales las moléculas de adhesión juegan un papel importante. Dentro de este grupo de moléculas se encuentra CD44 (Ponta, 1993).

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio contamos con varios modelos tumorales murinos, entre ellos el tumor F3II, caracterizado por su alta invasividad local y su capacidad metastásica (Alonso y col., 1996). Este hecho hace que las células F3II

constituyan un modelo ideal para el estudio de una molécula de adhesión como CD44. Las líneas celulares LM3 y LMM3, que al ser inoculadas en ratón son altamente metastásicas en pulmón e invasivas localmente (aunque menos agresivos comparados con el F3II), también fueron estudiados para determinar la expresión de CD44.

Los ensayos preliminares *in vitro* demostraron que todas las líneas celulares analizadas por IHQ (F3II, LM3, LMM3 y NMuMG), mostraron expresión de CD44. En coincidencia con lo ya descrito por Kogerman (1996) y Griffioen (1997) en otros modelos experimentales, la expresión de CD44 en células F3II fue mayor en monocapas subconfluentes, disminuyendo al alcanzar la confluencia. Esto no fue observado en las otras líneas.

Al analizar la expresión de esta molécula en tumores subcutáneos derivados de estas líneas tumorales, encontramos que sólo los tumores F3II expresaban altos niveles de CD44, mientras que los tumores LM3 y LMM3 mostraron una débil expresión de ésta molécula. Este resultado nos llevó a seleccionar la línea F3II para profundizar nuestro trabajo de investigación sobre el rol de CD44 durante el proceso metastásico.

El estudio de CD44 en cortes histológicos de tumores F3II, mostró una alta expresión de esta molécula asociada al crecimiento subcutáneo de estos tumores. Sin embargo, la expresión se pierde cuando el tumor se inocula por vía intraperitoneal. A la luz de estos datos se podría pensar que existen factores a nivel local que estarían modulando la expresión de CD44. Los animales portadores de tumores F3II intraperitoneales tienen una breve supervivencia, 15 a 20 días luego de la inoculación, falleciendo por ascitis. En ese corto periodo de tiempo no es posible detectar desarrollo de metástasis pulmonares. Sin embargo, en un trabajo anterior

efectuado en nuestro laboratorio (Aguirre Ghiso y col, 1997c) con el tumor M3 (tumor parental de la línea F3II), también se describe una significativa disminución en la incidencia de metástasis pulmonares en tumores crecidos en peritoneo, al compararlos con los mismos tumores implantados en forma subcutánea. Si bien existen diferencias entre el parental M3 y la línea F3II, se podría hipotetizar que una disminución en la expresión de CD44 en tumores F3II intraperitoneales, tendría relación con una menor capacidad metastásica.

En un estudio preliminar (datos no mostrados), se analizó también la expresión de CD44 en metástasis pulmonares experimentales o espontáneas (de tumores F3II crecidos en forma subcutánea). La tinción por IHQ mostró una débil expresión de este receptor, con mayor intensidad en algunos grupos celulares.

Algunos autores han descripto que la composición de la MEC es capaz de modular la regulación de la actividad celular (Schnaper y Kleinman, 1993). Estos estudios indicarían que al menos tres factores podrían tener influencia:

- la estimulación mecánico-química que ocurre cuando la célula se adhiere a la matriz, lo cual provoca cambios en su forma creando fuerzas tensionales
- la presencia de citoquinas y factores de crecimiento
- las interacciones célula-célula y célula-MEC

En teoría todas las proteínas componentes de la MEC serían capaces de generar señales que alteren la actividad celular (Schnaper y Kleinman, 1993). Por ejemplo, se ha demostrado que la interacción de células con matrices de colágeno es capaz de regular la actividad transcripcional en forma específica (Di Persio y col., 1991). Otros autores demostraron que la síntesis y secreción de proteínas de la leche en líneas

celulares mamarias murinas epiteliales normales estaría regulada no sólo por la presencia de hormonas lactogénicas, sino también por la composición de la MEC sobre la cual fueron cultivadas (Li y col., 1987; Chen y col., 1987). Streuli y col. (1990) también han descrito que la MEC cumpliría un rol fundamental en controlar el fenotipo celular en tejidos especializados. Estas evidencias experimentales nos permiten hipotetizar que pequeñas diferencias en la composición del microambiente tisular que rodea a la célula tumoral (F3II), en este caso peritoneo o zona subcutánea o pulmón, podrían ser determinantes en la síntesis y expresión de CD44.

El análisis comparativo de la expresión de CD44 en monocapas de células tumorales F3II y normales NMuMG por la técnica de IHQ, nos permitió ver que las monocapas subconfluentes de células F3II presentan mayor expresión de esta molécula que sus pares normales. Cuando las monocapas fueron analizadas por WB también se observó mayor expresión de CD44 en las células F3II que en las NMuMG. El análisis del WB en lisados de células F3II y NMuMG mostró una banda principal de 80 kDa, correspondiente a CD44s. También se observó la presencia un "smear" o productos de mayor peso molecular, que estarían indicando la expresión de variantes de CD44 en células F3II, mientras que dicha expresión fue mucho menor en las células NMuMG.

Se ha reportado que factores de crecimiento y mediadores lipídicos presentes en el suero son capaces de regular la motilidad celular y la expresión de genes (Jalnik y col., 1994). El análisis densitométrico del WB demostró que tanto las células F3II como el control normal, NMuMG, aumentan la expresión de CD44 en presencia de 5% de SFB.

En este primer capítulo hemos evaluado comparativamente la expresión de CD44 en tres líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios murinos emparentados, encontrando que todos expresan esta molécula cuando son cultivados in vitro. Sin embargo, esta expresión se mantiene in vivo sólo en los tumores F3II crecidos en forma subcutánea.

Este dato nos permitió iniciar una serie de estudios in vitro destinados a dilucidar la regulación de la expresión y el rol funcional de CD44 en la línea celular F3II, durante los eventos que tienen lugar a lo largo de la cascada metastásica en este modelo.



Capítulo 2

CAPITULO 2

Rol de CD44 durante la adhesión, el spreading, la migración y la invasión, en la línea celular tumoral F3II.

En una célula tumoral, la *motilidad* es de vital importancia, ya que le permitirá la colonización de tejidos del huésped. La capacidad de una célula de moverse a través del sustrato comprende una serie de eventos que dependen de la cooperación coordinada de diferentes moléculas.

El primer evento del proceso de motilidad celular es la *adhesión* al sustrato (Gumbiner, 1996). Esa adhesión está mediada por receptores que se encuentran en la membrana celular (moléculas de adhesión), los que establecen un puente de comunicación entre el espacio extracelular y la maquinaria molecular citoplasmática. Seguidamente, la célula se *extiende* sobre el sustrato, fenómeno denominado de *spreading*. Durante el spreading, la célula puede emitir proyecciones de diferente morfología, como espículas, filopodios o lamelipodios. Luego del spreading, la célula inicia la etapa de *migración* sobre el sustrato. Para migrar la célula debe adquirir una asimetría espacial que le permitirá generar fuerzas internas para su translocación (Lauffenburger y Horwitz, 1996). La manifestación de esta asimetría es una morfología polarizada, o sea, en la célula se distingue claramente un frente de avance y una zona de retracción. Esta polarización celular puede ser la respuesta a un estímulo, por ejemplo, un agente quimioattractante.

Finalmente, en conjunto con el proceso de migración, la célula puede ser capaz de *invadir* un nuevo “territorio” ó tejido. En esta etapa, al igual que en las anteriores, las moléculas de adhesión cumplen un rol fundamental. Sin embargo, para que la invasión a otro tejido sea efectiva, las enzimas proteolíticas, junto a las moléculas de adhesión, juegan un rol central en este proceso (Schmitt y col., 1992).

Como ya se ha mencionado, CD44 pertenece a una familia de proteínas de transmembrana que participan en la adhesión y la migración, como también en el ensamblado de la MEC. (Knudson y col., 1993; Thomas y col., 1993). Si bien en algunos modelos experimentales se conoce el rol que juega esta molécula en el proceso de invasión y diseminación metastásica (Bartolazzi y col., 1994; Guo y col., 1994a), en algunos casos se han obtenido evidencias contradictorias (Birch y col., 1991; Ota y col., 1995; Gao y col., 1997). La línea celular F3II como se mencionó anteriormente, es un modelo de gran interés dado que al ser inoculada en ratones singeneicos da lugar a la formación de carcinomas altamente invasivos y metastásicos. Los estudios desarrollados en el capítulo 1 mostraron que estas células expresan altos niveles de CD44 tanto in vivo como in vitro, por lo que consideramos que constituye un modelo ideal para estudiar el papel de este receptor durante la progresión tumoral. En este capítulo hemos estudiado la función y distribución de CD44 en los procesos de adhesión y de spreading, como también su rol en la migración e invasión in vitro de células F3II.

Materiales y Métodos

Cultivos Celulares

Se utilizó la línea celular F3II cultivada en las condiciones descritas en el capítulo 1.

Ensayos biológicos in vitro

a- Adhesión

- Adhesión a plástico:

Estudiamos el rol de CD44 durante la adhesión de células F3II a placas plásticas de cultivo. Se partió de cultivos subconfluentes que fueron tripsinizados e incubados en MEM a 37°C durante 2 hs para permitir la recuperación de los antígenos de superficie. Luego de ese tiempo, las células se lavaron y se incubaron en presencia o en ausencia del anticuerpo KM201(dil 1:50), o con un anticuerpo irrelevante, durante 10 min a temperatura ambiente o 1 hora en hielo. Luego se sembraron a razón de 2×10^5 células por placa de Petri de 35 mm, permitiendo su adhesión durante 10, 30 y 60 min, a 37°C. Las células no adheridas fueron lavadas con PBS. Las células adheridas fueron tripsinizadas y contadas en cámaras de Neubauer.

- Adhesión a ácido hialurónico (AH):

◊ *Tratamiento de placas plásticas de cultivo con AH:*

Se preparó un coating de AH (Sigma) (1 mg/ml) en placas multiwell de 48 pocillos o en placas de Petri de 35mm (Corning Costar). Luego de incubar durante 18 hs. a 4°C, los pocillos se lavaron con FBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en 1% de BSA para bloquear sitios de unión inespecíficos. Como control, pocillos no tratados con AH se bloquearon también con BSA. Luego de ese tiempo, se volvió a lavar con FBS y se procedió al sembrado de las células.

◊ *Tratamiento de células con anti-CD44:*

Las células F3II, obtenidas por tripsinización, se incubaron a 37°C durante 2 hs para permitir la recuperación de los antígenos de superficie, y se trataron con una dilución 1:50 (aprox. 0.05 ug de anticuerpo/ul de sobrenadante de hibridoma) del anticuerpo anti-CD44 durante 1 hora en hielo, antes de sembrarlas en las placas tratadas o no con AH. Como control las células se incubaron en las mismas condiciones pero en ausencia del anticuerpo o con un anticuerpo irrelevante. El número de células viables se evaluó por recuento en cámara de Neubauer en presencia de azul tripán. La viabilidad fue mayor del 90% en todos los casos.

◊ *Tratamiento de células con PMA:*

Monocapas subconfluentes de células F3II fueron tratadas con una dosis de 10 nM de PMA durante 24 hs. Las placas control no fueron tratadas. Luego de este tratamiento, las células fueron levantadas con una solución 25 mM de EDTA y sembradas en placas de 35 mm tratadas o no con AH.

◊ *Ensayo de adhesión a AH:*

Las células tratadas con anticuerpo o con PMA y los controles sin tratar fueron sembradas en las placas multiwell (5×10^4 células/well) o en las placas de Petri (1×10^5 células/placa) tratadas o no con AH, en MEM sin suero, por triplicado o cuadruplicado. Las placas se incubaron durante 45 minutos a 37°C en estufa gaseada. Al cabo de ese tiempo, las células no adheridas fueron lavadas con PBS. Se contaron las células adheridas en la placa multiwell en 7 a 10 campos al azar en cada well, bajo microscopio invertido con un aumento de 100X. Las células en las placas de 35 mm fueron levantadas por tripsinización y se hizo recuento con azul tripán en cámara de Neubauer.

b- Spreading

7×10^4 células F3II, resuspendidas en MEM, fueron sembradas en placas de Petri plásticas de 35 mm. Luego de 100 minutos se hicieron lavados con PBS para remover las células no adheridas, y se agregó medio de cultivo adicionado o no con distintas diluciones de KM201 (1:5 a 1:50).

Cada 30 minutos se determinó el porcentaje de células en spreading, por observación en microscopio de contraste de fase (Nikon). Para cada tratamiento, se contaron 200-300 células en campos seleccionados al azar y por triplicado (Aguirre Ghiso, 1997a; Tawil, 1996).

c- Migración

La migración quimiotáctica de células F3II fue evaluada utilizando filtros policarbonados con poros de 8 mm de diámetro en cámaras de cultivo Transwell (Corning Costar). Dichas cámaras constan de dos compartimentos separados por los filtros mencionados. En el compartimento inferior se agregaron 500 µl de MEM adicionado con 0.1% de BSA y 10 µg/ml de fibronectina soluble como agente quimioattractante. En el compartimento superior se sembró una suspensión celular de F3II en MEM/0.1% BSA (2×10^5 células /150 µl/well). Para los ensayos de inhibición de la migración, se agregó en ambos compartimentos una dilución 1:50 de anti-CD44, o 10 µg/ml de anti-uPA murino, o una combinación de ambos anticuerpos.

Luego de incubar durante 6 horas a 37°C en estufa gaseada, los filtros fueron fijados en metanol y teñidos con hematoxilina-eosina. Las células de la superficie superior del filtro fueron removidas con hisopo de algodón y los filtros se deshidrataron y montaron en bálsamo de Canadá. Las células que migraron fueron contadas bajo microscopio óptico, 10 a 15 campos en aumento de 400X, y se expresaron como número de células por campo.

d- Invasión

La capacidad de invasión de las células F3II fue evaluada en cámaras de cultivo Transwell, descritas para el ensayo de migración. En este caso, la cara inferior del filtro se cubrió con una película de solución de gelatina (0.1% en agua destilada) y se dejó secar a temperatura ambiente en esterilidad (bajo flujo laminar). Posteriormente, en el compartimento superior de cada cestilla se sembraron 12.5 ug de Matrigel (membrana basal artificial reconstituída) en 100 ul de MEM adicionado con 0.1% BSA, y se incubó toda la noche a 37°C en estufa seca. Al otro día el Matrigel se hidrató con 50 ul de MEM/BSA, durante una hora a temperatura ambiente. Luego se sembró, en el compartimento superior, una suspensión celular de F3II en MEM/BSA (1.5×10^5 células/150 μ l/well). En el compartimento inferior se agregaron 500 μ l de MEM/BSA y 10 μ g/ml de fibronectina soluble como agente quimioattractante. Para los ensayos de inhibición de la invasión, se agregó anti-CD44 purificado (dil 1:100; aprox. 0.08 ug de anticuerpo/ul), a los 30 minutos de sembrar las células, en ambos compartimentos.

Luego de incubar durante 20 horas a 37° C en estufa gaseada, los filtros fueron procesados como se describió para el ensayo de migración. Los experimentos se realizaron dos veces por duplicado. Las células que invadieron el Matrigel, fueron contadas bajo microscopio óptico en 25 campos seleccionados al azar por cada filtro, con un aumento de 450X, y se expresaron como número de células por campo.

Anticuerpos

En los ensayos de adhesión, spreading y migración se usó el anticuerpo monoclonal anti-CD44 murino descrito en el capítulo anterior. También se utilizó un anti-uPA murino policlonal que reconoce el dominio catalítico de la enzima, cedido por la Dra. G.H.Hansen.

Purificación del anticuerpo KM201

El hibridoma KM201 produce trazas de gelatinasas (datos no mostrados). Dada la importancia de las enzimas proteolíticas durante la invasión tumoral, hemos purificado el anticuerpo anti-CD44 proveniente de este hibridoma, para ser utilizado en los ensayos de invasión. Dicha purificación se realizó por columna de proteína A (Hi Trap, Protein A, Pharmacia Biotech). Los anticuerpos de la subclase IgG₁ tienen baja afinidad por la proteína A. Dado que nuestro anti-CD44 pertenece a dicha subclase, se utilizó un protocolo de alta concentración salina para aumentar la afinidad del anticuerpo por la proteína A y así, mejorar el rendimiento.

Se lavó la columna con dos volúmenes de agua destilada y luego se equilibró con cinco volúmenes de PBS. Se partió de 25 ml de sobrenadante de hibridoma, ajustando la concentración de NaCl en 3.3M. Se agregó una dilución 1/10 de borato de sodio 1M (pH 8.9) y se pasó esta preparación de anticuerpos a través de la columna. Se lavó con 10 volúmenes de una solución 3M de NaCl y 50 mM de borato de sodio (pH 8.9). Luego se lavó con 10 volúmenes de una solución 3M de NaCl y 10 mM de borato de sodio (pH 8.9). Finalmente se eluyó la columna con una solución 100 mM de glicina (pH 3) y se recogió el eluido en fracciones de

500 ul c/u en tubos eppendorf conteniendo 50 ul de Tris-Cl 1M (pH 8). El contenido proteico de las fracciones se determinó por el método de Lowry. La funcionalidad del anticuerpo purificado fue confirmada por WB e IHQ (datos no mostrados).

Estudio de la expresión de CD44 durante el spreading

Con el fin de analizar la expresión de CD44 durante el spreading de las células F3II, se partió de suspensiones celulares, obtenidas por tripsinización de monocapas, que se incubaron durante 2 horas en MEM a 37° C, en estufa gaseada para permitir la recuperación de los antígenos de superficie celular. Para hacer el análisis sobre células aisladas, las mismas fueron sembradas a baja densidad (1×10^5) sobre cajas de petri de 35 mm que contenían cubreobjetos preparados para cultivos celulares. Luego de 45, 90 y 180 minutos, las células fueron fijadas en 4% de paraformaldehído en PBS por 10 min. y conservadas en PBS a 4° C hasta su tinción por ICQ. Como control de tiempo cero, se fijaron células F3II en suspensión.

Con un protocolo similar, se prepararon células para analizar la expresión de CD44 por WB. Brevemente: se sembraron suspensiones de células F3II, a baja densidad ($1,5 \times 10^6$ células) en cajas de petri de 10 cm, que se incubaron a 37° C durante 45, 90 y 180 min. Al cabo de cada tiempo, las células, en diferentes grados de spreading, se lavaron con PBS, se levantaron por rastrillado, se resuspendieron en una solución de 1% tritón X-100/ 1% PMSF en PBS y se sonicaron. Como control para tiempo cero, una suspensión del mismo número de células fue procesada de igual modo. El contenido proteico se determinó por el método de Lowry. Las células fueron congeladas a -20° C hasta su análisis por WB.

Rol de proteasas en la expresión de CD44 durante el spreading

Para evaluar el rol de proteasas endógenas en la expresión de CD44 durante el spreading, se sembraron 1×10^6 células F3II en placas de Petri de 10cm, y se dejó que las células avanzaran en el spreading. Luego de 45 min se agregó la siguiente combinación de inhibidores de proteasas: PMSF (0.5mM), benzamidina (0.2 mM), DTT (0.05 mM), B623 (5 uM) y B428 (5 uM) (Towle y col., 1993). Como control se incubaron células sembradas en ausencia de inhibidores. Las placas se incubaron en estufa gaseada a 37°C. A los 45 y 180 min las células fueron lisadas y analizadas por Western Blot.

Inmunocitoquímica (ICQ)

La ICQ se realizó sobre las células, sembradas a baja densidad sobre cubreobjetos, y fijadas en 4% de paraformaldehído. El procedimiento se efectuó según el protocolo descrito en el capítulo anterior al referirnos a la técnica de IHQ.

Western Blot (WB)

Las células sonicadas y congeladas a -20° C luego del ensayo de spreading, fueron analizadas por WB. Para la electroforesis de proteínas en geles de FAA y transferencia a membranas de nitrocelulosa, se siguió el protocolo descrito para WB en el capítulo anterior.

RESULTADOS

Rol de CD44 en los procesos de adhesión, spreading, migración e invasión de células F3II.

Adhesión:

Se ensayó la capacidad de adhesión de células F3II a placas plásticas de cultivo, en presencia o en ausencia de KM201. Como muestra la Fig. 2.1A una dilución 1:50 de anti-CD44 inhibió significativamente la adhesión de estas células en todos los tiempos ensayados, con un máximo de 74% de inhibición a los 60 minutos. Se observaron idénticos resultados tanto al preincubar las células con el anticuerpo a temperatura ambiente como al preincubarlas en hielo.

A continuación, se estudió la capacidad de adhesión de células F3II a ácido hialurónico (AH), ligando específico de CD44, también en presencia y en ausencia de KM201. El análisis de la Fig. 2.1B muestra que el anticuerpo KM201, inhibe sensiblemente la adhesión de las células F3II a AH. La fig 2.1B también muestra que las células F3II se adhieren significativamente menos a AH que a BSA.

Estos datos concuerdan con lo reportado por Lesley (1992), quien describe que ciertas líneas celulares que expresan CD44 no presentan alta capacidad de adhesión a AH, a menos que sean tratadas con ésteres de forbol. Este fenómeno es mencionado como “activación o forma activada de CD44”. Para verificar la presencia de esta *forma activable* de CD44 en esta línea celular, partimos de cultivos confluentes de F3II que fueron tratados durante 24 horas con 10 nM de PMA en ausencia de suero. Para evaluar el efecto del PMA sobre moléculas preexistentes de CD44 durante ese lapso de tiempo, las células fueron levantadas con EDTA. En la figura

2.1C se observa que las células tratadas con PMA aumentan nueve veces su adhesión a AH, respecto de las no tratadas. La adhesión a un sustrato inespecífico, como BSA, también se vio incrementada por este tratamiento, aunque en menor proporción (tres veces).

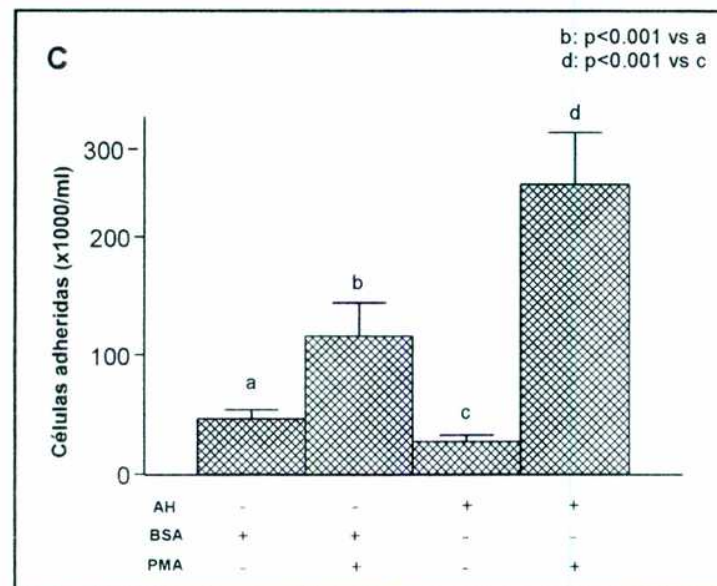
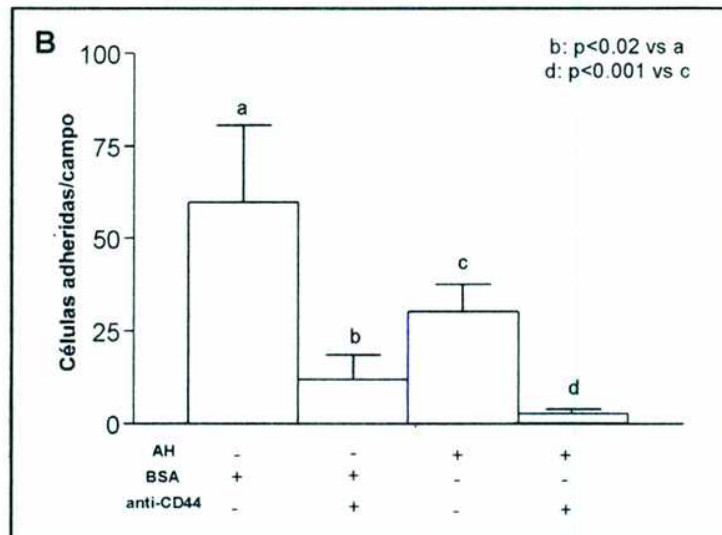
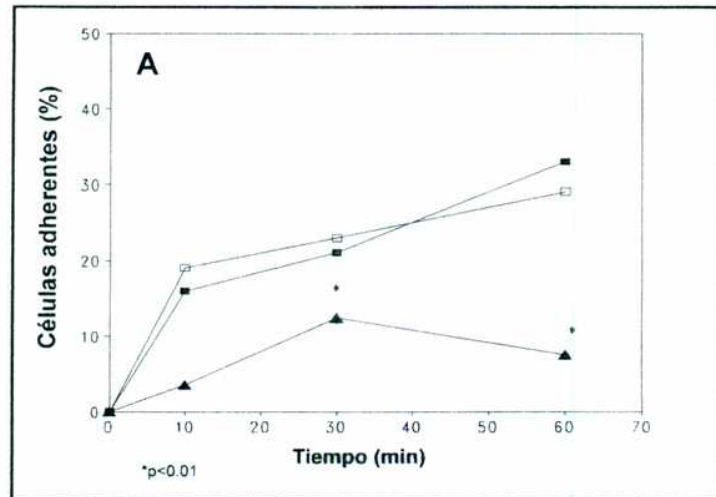
Figura 2.1: Ensayo de adhesión de células F3II.

A) Curva de adhesión de células F3II a placas de cultivo plásticas: control de células sin tratar (○), células tratadas con un anticuerpo irrelevante (■), células tratadas con anti-CD44 (▲)

B) Efecto del anti-CD44 sobre la adhesión de células F3II a AH: las células fueron incubadas en presencia o en ausencia del anti-CD44 durante 1 hora en hielo, antes de sembrarlas sobre placas de cultivo tratadas con BSA (control) o AH.

C) Efecto del PMA sobre la adhesión de células F3II a AH: las células fueron tratadas en presencia o en ausencia de PMA (10 nM) durante 24 hs. Posteriormente, fueron levantadas con EDTA y se evaluó su capacidad de adhesión en placas cubiertas con BSA (control) o AH.

Análisis estadístico: test-t de Student



Spreading:

Estudiamos también la capacidad de spreading de células F3II en presencia y en ausencia de anti-CD44. Las células con aspecto redondeado y refringentes, resistentes a los lavados con PBS, fueron incluídas en el grupo sin spreading, mientras que aquellas en las que se podía apreciar un aspecto achatado, no refringentes y en algunos casos con lamelipodios o filopodios ya formados, fueron incluídas en el grupo de células en spreading (Figura 2.3) (Aguirre Ghiso 1997a; Tawil 1996).

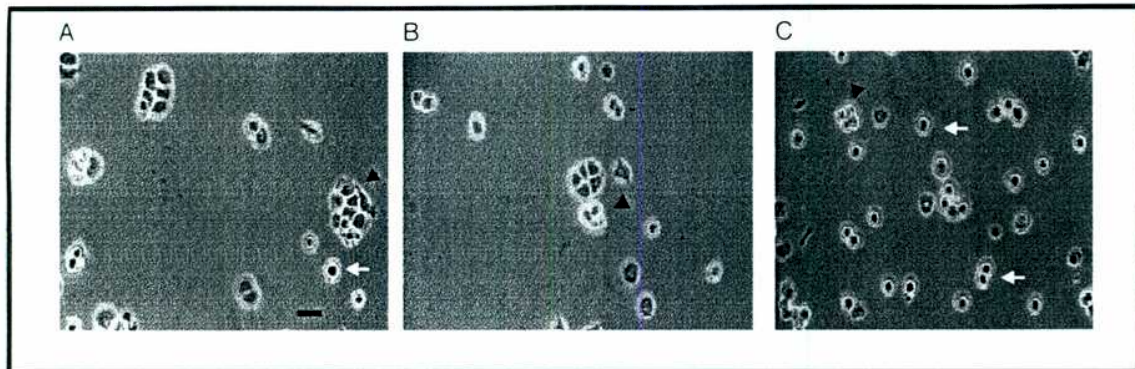


Figura 2.3: Características morfológicas de las células F3II a lo largo del spreading. Las células que mostraron una base extendida y opalescente o lamelas, espículas o filopodios (flechas negras), se incluyeron en el grupo de células en spreading (A y B). Las células redondeadas y refringentes (flechas blancas) que resistieron los lavados con PBS fueron incluídas en el grupo de no-spreading. C) Las células tratadas con anti-CD44 mostraron una morfología redondeada y refringente. Barras de escala: 50 μ m.

El análisis de la Fig. 2.4 muestra que una dilución 1:50 de anti-CD44 fue capaz de bloquear el spreading de células F3II.

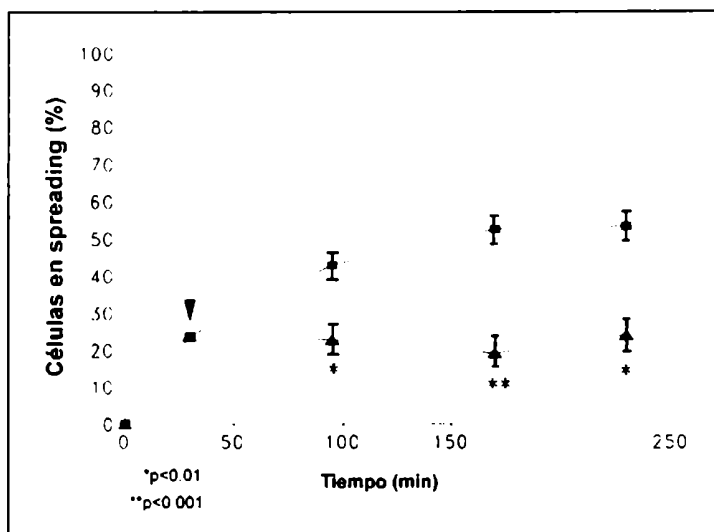


Figura 2.4: Efecto del anti-CD44 sobre el spreading de células F3II

A) 30 min luego de la siembra de las células F3II, éstas fueron lavadas y tratadas con una dilución 1:50 (▲) de anti-CD44 (control de células sin tratar: ■).

Migración:

Luego se estudió la capacidad de migración de células F3II en cámaras Transwell. En presencia de KM201 se pudo observar un 64% de inhibición de la migración (Figura 2.5 A), lo cual sugiere un importante rol de CD44 como mediador de los eventos motiles de esta línea celular tumoral.

La línea F3II, altamente invasiva, produce uPA que se encuentra asociado a la membrana celular en una gran proporción (Alonso y col. 1996). Como fue demostrado por Wei y col.(1996) y Stahl y Mueller (1997), el uPA asociado a su receptor participa en la migración de células normales y tumorales. Tomando en cuenta estos datos, hemos usado un anticuerpo anti-uPA murino como control positivo de inhibición de la migración en células F3II. Así, en nuestros experimentos, observamos que el anti-uPA era capaz de bloquear significativamente la migración de estas células (44%). Más aún, cuando las células F3II fueron incubadas simultáneamente con anti-CD44 y anti-uPA, la inhibición de la migración aumentó en forma dramática (90% de inhibición) (Fig 2.5A).

Invasión:

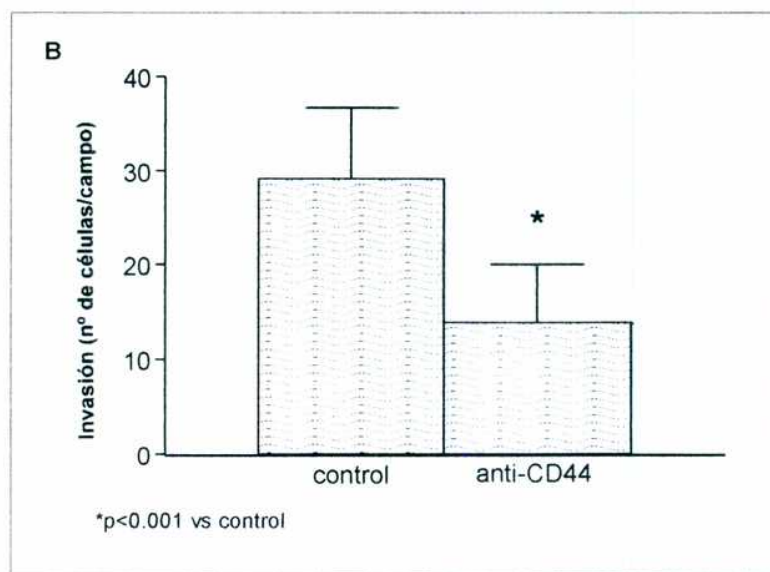
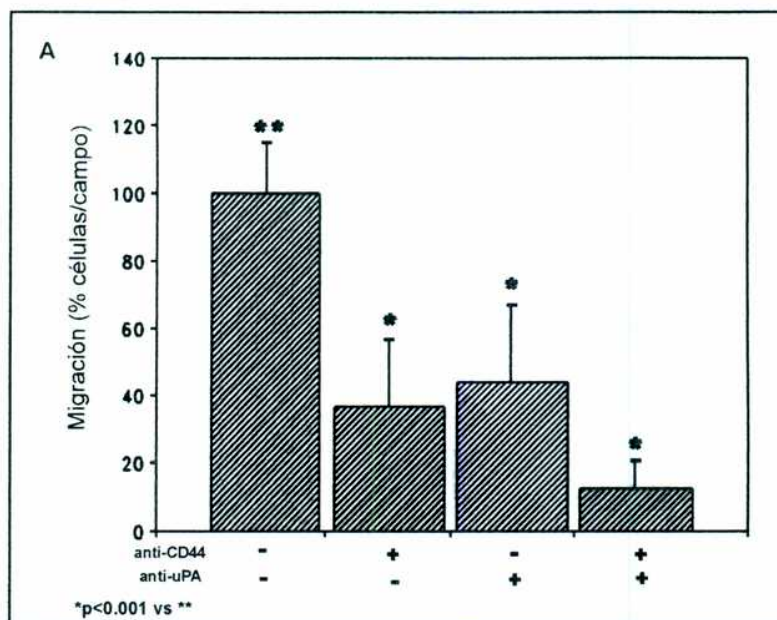
Finalmente, se estudió la capacidad de las células F3II de invadir Matrigel en presencia de anti-CD44. En un ensayo preliminar observamos que el hibridoma KM201 produce trazas de gelatinasas (datos no mostrados). Dado que las enzimas proteolíticas tienen una activa participación durante el proceso de invasión tumoral, hemos purificado el anticuerpo anti-CD44 proveniente de este hibridoma, para ser utilizado en los ensayos de invasión. Nuestros resultados muestran que la capacidad invasiva de las células F3II fue inhibida en un 52.4% respecto del control sin tratar (Fig. 2.5B), confirmando así el rol activo que CD44 podría tener durante el proceso invasivo en este modelo tumoral.

Figura 2.5: Ensayos de migración e invasión de células F3II:

A) Inhibición de la migración en cámaras Transwell: las células fueron tratadas con anti-CD44 (dil 1:50), anti-uPA (10 ug/ml) o ambos. La figura muestra un experimento representativo de dos independientes, realizados por duplicado.

B) Inhibición de la invasión en Matrigel: las células F3II fueron incubadas en presencia o en ausencia de anti-CD44 purificado (dil 1:100).

En ambos experimentos se evaluó el número de células por campo, contando 20-50 campos por membrana. El análisis estadístico se realizó por el test-t de Student.



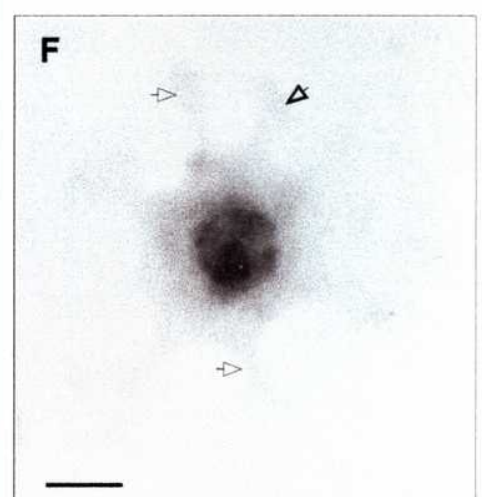
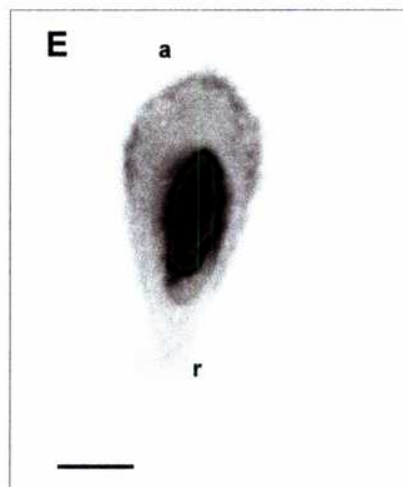
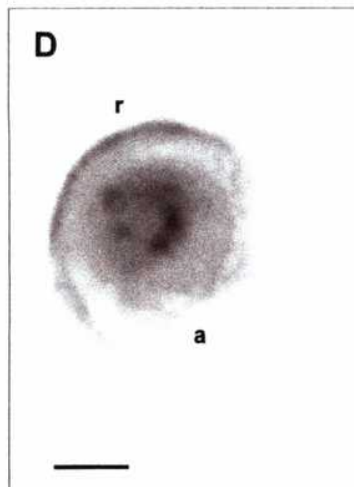
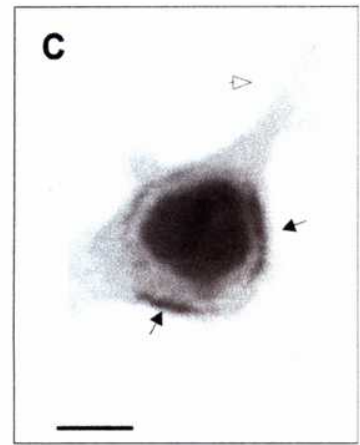
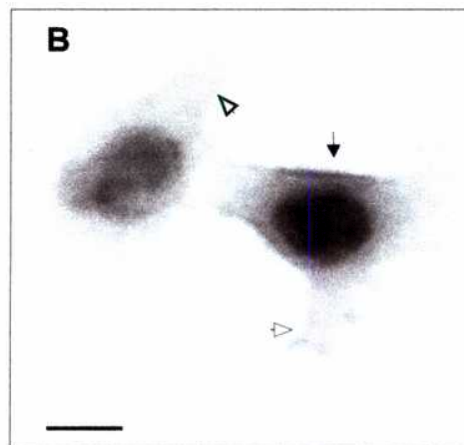
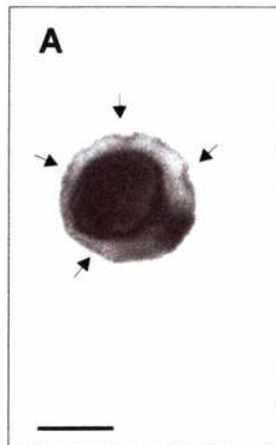
Expresión y distribución de CD44 durante el spreading

Luego de estudiar el efecto de la inhibición de CD44 sobre el spreading de células F3II, hemos analizado, mediante ICQ, la cinética de la expresión y distribución de esta molécula durante este proceso.

En las células teñidas en el tiempo cero, cuando aún no han hecho spreading, se observa que CD44 se distribuye forma homogénea y con una tinción intensa en toda la membrana celular (Fig 2.6A). Durante el spreading, en cambio, la expresión de CD44 se observa principalmente en la membrana plasmática a nivel de los bordes anteriores o de avance y posteriores o de retracción de la célula (Fig 2.6 D y E), desapareciendo, en cambio, de estructuras como lamelipodios y filopodios (Fig 2.6 B, C, F). Sin embargo, es interesante destacar que se observó una intensa tinción en la membrana plasmática entre lamelipodios y filopodios (Fig 2.6 B y C). En las etapas finales o tardías del spreading celular (180 min), prácticamente no se observó tinción para CD44, que reapareció posteriormente en la fase de proliferación celular. Nunca se observó una distribución de tipo punctata de la tinción, descartando así, la presencia de CD44 en estructuras del tipo contacto focal.

Figura 2.6: Localización de CD44 durante el proceso de spreading de células F3II (tinción por ICQ).

Durante las etapas iniciales del spreading, las células mostraron una tinción uniforme sobre la membrana plasmática (A, flechas negras). CD44 se distribuyó, principalmente, en los frentes de avance y de retracción de la célula (D y E, “a” y “r”). La expresión no fue detectada en lamelipodios o filopodios (B, C, F, flechas blancas), pero sí entre dichas estructuras (B y C, flechas negras). En los estadios finales del spreading (180 min) la expresión de CD44 fue casi nula (F). Barras de escala: fig. D: 4.3 μm ; figs. A, B, C, E y F: 10 μm .



Para cuantificar la variación en la expresión de CD44 durante el spreading, se realizó un recuento del número de células positivas para CD44 por campo, a distintos tiempos. En el grupo de células fijadas en suspensión (tiempo cero), se verificó el mayor número de células positivas para CD44 (97.8%, Fig 2.7A). En células fijadas a los 45 minutos, se observó un aumento del spreading y redistribución de CD44, junto con una reducción en el porcentaje de células positivas. A los 90 minutos de la siembra, se pudo apreciar claramente un incremento del estado de spreading y una disminución significativa del porcentaje de células positivas. Finalmente, en tiempos avanzados de spreading (180 min.), había aún antígeno detectable en algunas células, pero el porcentaje de células positivas era sensiblemente menor comparado con los tiempos iniciales (Figura 2.7A).

Para estudiar si el descenso de la señal de CD44, observada por ICQ durante los estadios avanzados del spreading, era una consecuencia de la redistribución de la molécula o era debido a una disminución en la expresión de la misma, se efectuó un análisis por WB. Como muestra la Fig 2.7B, el análisis densitométrico de las bandas reveladas por WB, mostró un claro descenso de los niveles de antígeno a los 90 y 180 minutos, mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión de CD44 en estadios tempranos del spreading celular (45 min). Esto sugiere que los cambios observados en la tinción por ICQ antes de los 90 minutos, serían una consecuencia de la redistribución de esta molécula, mientras que a tiempos más avanzados podría estar ocurriendo una regulación negativa o una degradación proteolítica del antígeno. A los fines de evaluar esta última hipótesis, células F3II en spreading se

incubaron en presencia o en ausencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (ver materiales y métodos). Luego de 180 minutos, las células se lisaron y se ensayaron por WB. Como muestra el análisis densitométrico del mismo (Fig 2.7C), la expresión de CD44, en presencia de los inhibidores de proteasas, mantiene a los 180 min, los mismos niveles que en las células lisadas a los 45 min en ausencia de los inhibidores. Es interesante mencionar que, como consecuencia del tratamiento con los inhibidores, se observó una leve disminución del número de células en spreading.

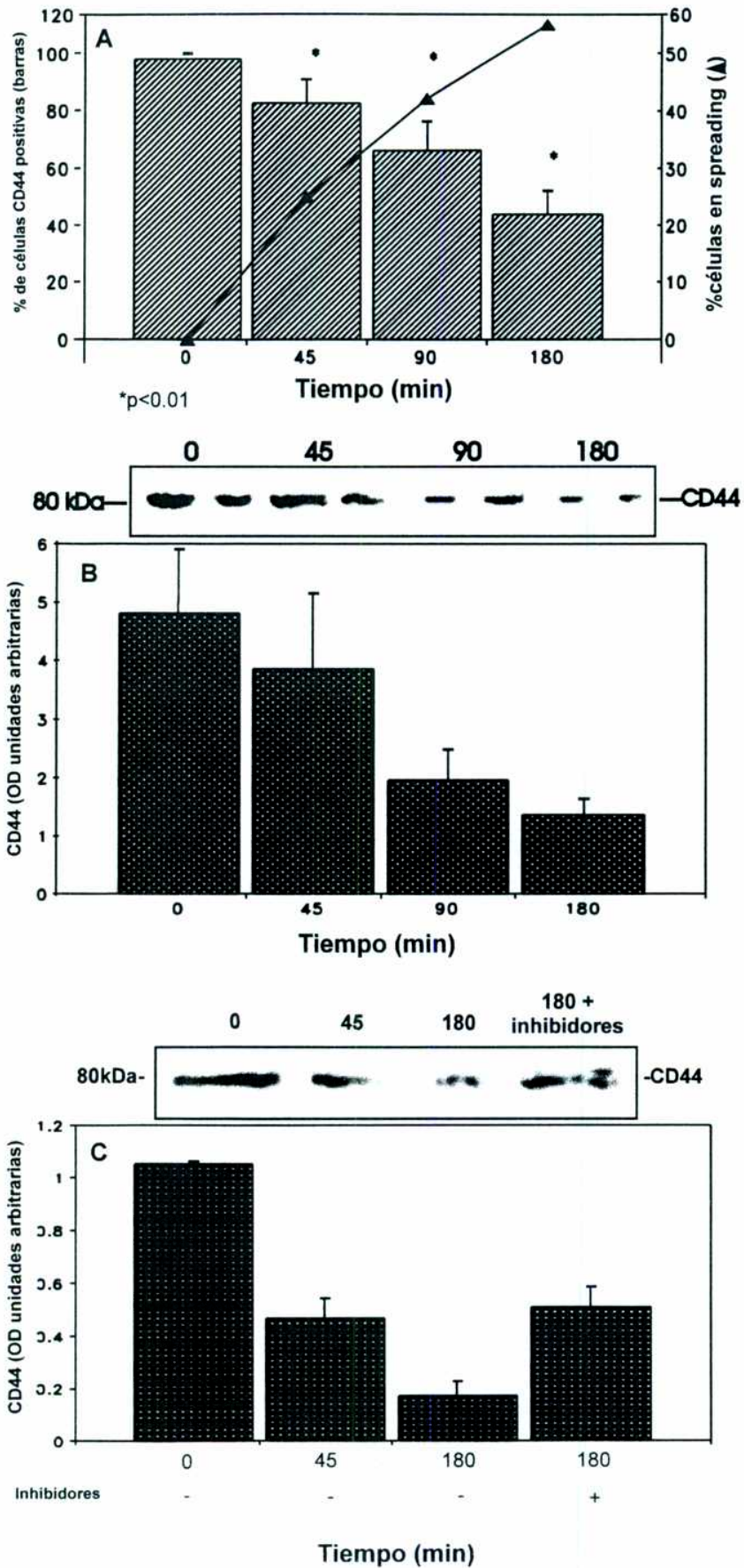
Figura 2.7: Análisis cuantitativo de la expresión de CD44 durante el spreading de células F3II:

A) Porcentaje de células positivas (por ICQ), a distintos tiempos (gráfico de barras) y porcentaje de células en spreading en cada tiempo (▲). En cada punto se contaron 200-300 células (400x) por triplicado en tres experimentos independientes.

B) Western blot y análisis densitométrico de la expresión de CD44 durante el spreading desde tiempo 0 min hasta 180 min.

C) Western blot y análisis densitométrico de la expresión de CD44 durante el spreading, en presencia de inhibidores de proteasas (ver Materiales y Métodos).

Análisis estadístico: test-t de Student.



DISCUSION

La motilidad celular está asociada a distintos eventos celulares normales y patológicos, como la reparación de heridas, la diferenciación, el desarrollo tumoral y la formación de metástasis (Brodt, 1996). La adhesión, el spreading, la migración y la invasión son procesos críticos en la progresión tumoral, que involucran la motilidad celular. Todos estos eventos están finamente regulados, involucrando la participación de distintos tipos de proteínas, como los factores de crecimiento, las enzimas proteolíticas, y las moléculas de adhesión, entre otras. Ha sido demostrado que la interacción de células tumorales con células del estroma estimula la secreción de factores angiogénicos (West y Kumar, 1989) y la producción de hialuronato (Knudson y col., 1984), mientras que la adhesión a proteoglicanos permite a las células tumorales acceder a los factores de crecimiento secuestrados dentro de la MEC (Ruoslahti, 1989; Ruoslahti y Yamaguchi, 1991). El efecto de la interacción CD44-hialuronato sobre la motilidad y la adhesión de una célula tumoral podría, en parte, explicar el alto grado de agresividad que poseen algunos tumores con alta expresión de CD44 (Sy y col., 1991; Knudson y col., 1989; Horst y col., 1990; Lokeshwar y col., 1995).

En este capítulo hemos demostrado que CD44 juega un importante rol en los eventos de adhesión, motilidad y capacidad invasiva de una línea celular tumoral mamaria murina altamente invasiva y metastásica.

Durante estos últimos años ha crecido el interés por el estudio de CD44 y su potencial rol en el crecimiento y diseminación de tumores

humanos. Inicialmente se demostró que la tumorigenicidad y el potencial metastásico de ciertos tumores se correlacionaba con una sobreexpresión de ciertas variantes de CD44 (Gunthert y col., 1991; Sy y col., 1991). En estudios posteriores, algunos autores han demostrado la importancia de CD44 en la adhesión celular (Merzak y col., 1994; Bartolazzi y col., 1994; Faasen y col., 1992; Thomas y col., 1992). En coincidencia con lo reportado por dichos autores, nosotros demostramos que el receptor CD44 juega un importante rol en la adhesión de células F3II, mediante ensayos de inhibición con el anticuerpo específico KM201. Este anticuerpo, que interactúa en el sitio de unión de CD44 con AH (Miyake y col., 1990; Zheng y col., 1995), fue capaz de inhibir en forma significativa la adhesión de células F3II a placas de cultivo. El efecto inhibitorio de este anticuerpo fue aún mayor cuando el ensayo se hizo sobre placas recubiertas con AH. Así, demostramos la importancia de la interacción de CD44 con su ligando en esta línea celular tumoral altamente invasiva, durante los eventos de adhesión.

Lesley y col. (1992 y 1993) han descrito que CD44 podía ser activado en respuesta al tratamiento con ésteres de forbol, como TPA o PMA, o con ciertos anticuerpos específicos. El término “activación” describe moléculas preexistentes de CD44 que pueden ser convertidas de un estado de baja afinidad por el AH a una forma de alta afinidad por este ligando (Lesley y col., 1993). La inducción de activación por anticuerpos ha sido también descrito para las integrinas LFA-1 (Figdor y col., 1990) y para la glicoproteína de plaquetas IIb-IIIa (O’Toole y col., 1990). No se conoce la importancia biológica de esta activación. Sin embargo, es probable que existan factores solubles in vivo que induzcan la activación de moléculas preexistentes de CD44. Este modelo sería interesante en aquellos tumores altamente invasivos donde uno de los principales

componentes de la MEC sea el AH, y además sobreexpresen CD44. En nuestros experimentos pudimos verificar que las células F3II, altamente invasivas, expresan la forma “activable” de CD44, ya que el tratamiento con ésteres de forbol aumentó significativamente la adhesión a AH mediada por CD44, indicando un punto importante de regulación. No se conoce aún si esta activación implica un aumento de expresión de CD44.

Además de adherirse al sustrato, la célula tumoral debe extenderse sobre el mismo para luego iniciar la migración. De manera que el proceso de spreading o extensión celular, está íntimamente ligado al de adhesión y migración. Sin embargo el rol de CD44 durante el spreading de células tumorales mamarias no ha sido descrito. Hemos demostrado que un anticuerpo monoclonal específico anti-CD44 es capaz de bloquear el spreading de células F3II, indicando un rol crítico de CD44 durante este proceso. Ha sido descrito que CD44 interactúa con proteínas intracelulares asociadas al citoesqueleto (Lokeshwar y col., 1992; Bourguignon y col., 1993; Tsukita y col., 1994). Nuestros resultados sugieren que la interacción de CD44 y el anticuerpo KM201 sobre la superficie de células F3II puede, de alguna manera, alterar la señal derivada de CD44 durante el spreading, bloqueando este proceso.

En este trabajo, a través de técnicas de ICQ, también hemos demostrado que la localización celular, distribución y expresión de CD44 durante el proceso de extensión sobre el sustrato, es un proceso dinámico a través del tiempo. En las etapas iniciales del spreading (0 a 45 minutos luego de la siembra), CD44 se localizó sobre la membrana plasmática en forma de bandas continuas, en particular en el borde anterior o de avance de la célula. En estadios más avanzados del spreading, la señal de CD44 se visualizó en zonas de la membrana celular comprendidas entre extensiones celulares, como lamelipodios o filopodios, pero nunca se

detectó expresión de esta molécula en estas extensiones celulares. En coincidencia con otros autores (Friedl y col., 1997), nuestros resultados indican que la distribución de CD44 difiere de la típica distribución de otros receptores de adhesión como las integrinas, que se organizan en contactos focales (Hao Lo y Bo Chen, 1994; Juliano, 1994; Aguirre Ghiso y col. 1997a), ya que nunca se observó tinción para CD44 en forma punctata que indicara la presencia de dichas estructuras.

A lo largo del proceso de spreading, se observó una disminución del número de células positivas para CD44. Hemos investigado si este cambio era consecuencia de una redistribución de la molécula o si era causado por una verdadera caída en los niveles de la proteína CD44. El análisis por WB mostró claramente un descenso en la expresión de CD44 a lo largo del proceso de spreading. Si bien, el descenso observado en la expresión de CD44 a los 45 min por ICQ puede ser consecuencia de la redistribución de esta molécula, ya que el WB de los lisados celulares muestra los mismos niveles de CD44 a los 45 min y a tiempo cero, el descenso observado a los 90 y 180 min por ICQ, coincide con los resultados obtenidos por WB, indicando que, en esos tiempos, se produce una “verdadera” disminución de los niveles de este antígeno.

Dado que las células F3II producen altas cantidades de enzimas proteolíticas (Alonso y col., 1996), es posible hipotetizar que el descenso de la expresión de CD44 en estadios avanzados del spreading podría, en parte, deberse a una proteólisis sobre la superficie celular. Algunos autores han demostrado, en cultivos de células de melanoma, que durante el proceso de migración, CD44 es liberado en forma fragmentos, sugiriendo un clivaje de tipo enzimático que facilitaría la des-adhesión del sustrato (Goebeler y col., 1996; Friedl y col., 1997). Esto no ha sido demostrado durante el proceso de spreading celular. Al incubar células

F3II en presencia de una combinación de inhibidores de proteasas durante el spreading, se observó por análisis densitométrico del WB, un incremento de la expresión de CD44 a los 180 min comparado con el control en el mismo tiempo pero sin tratar. Estos resultados sugieren que el descenso en los niveles de CD44 durante el spreading podría ser consecuencia de una degradación de esta molécula, dependiente de las proteasas celulares que participan en la cascada metastásica.

Algunos autores han descripto la importancia de CD44 durante la migración celular (Faasen y col., 1992; Thomas y col., 1992). El uPA también es una molécula clave en la migración celular (Busso y col., 1994; Wei y col., 1996; Stahl y Mueller, 1997). La unión a su receptor favorece la actividad proteolítica pericelular, y este evento sería de fundamental importancia en el proceso metastásico (Ossowski y Reich, 1983; Ossowski y col., 1991).

En este capítulo hemos investigado el rol de CD44 durante la migración de células F3II. Como control positivo de inhibición de la migración, usamos un anticuerpo anti-uPA. La migración fue inhibida en forma significativa por anticuerpos anti-CD44 y anti-uPA, efecto que fue aditivo al ensayar ambos anticuerpos al mismo tiempo. Estos datos sugieren que, además de una *cooperación* funcional entre ambas moléculas durante este proceso, podría haber una proximidad espacial que favorecería la intervención de las mismas en la migración de células F3II. Este punto será desarrollado en el capítulo 3.

Finalmente, analizamos la participación de CD44 en la invasión celular. Faasen y col. (1992), demostraron la importancia de esta molécula en células de melanoma altamente invasivas, estudiando el rol

de la glicosilación en la motilidad sobre matrices de colágeno I. Dado que el modelo tumoral F3II es altamente invasivo in vivo, hemos evaluado si un anticuerpo anti-CD44 sería capaz de afectar este proceso in vitro. Para tal fin hemos utilizado cámaras de cultivo Transwell, provistas con una membrana porosa de policarbonato. Cubriendo esta membrana con componentes de la MEC (Matrigel), estamos en condiciones de evaluar no sólo la motilidad celular, sino también su capacidad de degradar componentes de la MEC para dar lugar al proceso invasivo. La invasión de células F3II a través de Matrigel fue inhibida en forma significativa (52.4%) en presencia de anti-CD44, respecto de las células control sin tratar, confirmando así, la participación de esta molécula en la colonización de la MEC, por parte de células tumorales.

En base a los datos experimentales obtenidos sobre adhesión, spreading, migración e invasión, proponemos un modelo hipotético que describe el rol de CD44 a lo largo de estos eventos. Luego de la adhesión, en la cual participa CD44 junto con otras moléculas, y en el inicio del spreading, CD44 sería necesario para la formación de filopodios, que es el primer paso en la formación de las extensiones celulares (Nobes y Hall, 1995). Una vez formado el filopodio, una proteólisis pericelular y una redistribución pondría fin a la intervención de CD44 dando lugar a otras moléculas como integrinas, para afianzar la unión al sustrato a través de contactos focales (Juliano y col., 1995). La presencia de CD44 en la membrana de células F3II entre lamelipodios y filopodios, podría tener un rol en el desarrollo de lamelipodios, que es el segundo paso en la formación de las extensiones celulares. Ya completada esta etapa, CD44 desaparecería en forma similar a la descrita anteriormente favoreciendo la adhesión estable al sustrato. Los procesos de migración e invasión

requieren eventos coordinados de adhesión y des-adhesión, como también extensión sobre el sustrato (spreading) y retracción. Es probable que la expresión de CD44 in vivo siga la misma cinética observada durante el spreading in vitro. Algunos autores han descrito que durante la migración de células de melanoma, CD44 podría ser clivado por proteólisis pericelular como mecanismo de des-adhesión (Goebeler y col., 1996). Durante la invasión la célula debe integrar movimientos migratorios con degradación de la MEC, donde probablemente intervengan en forma coordinada CD44 con otras moléculas como el complejo uPA/uPAR.

Al comienzo de este capítulo señalamos que no se conocía el rol de CD44 en el comportamiento de las células F3II.

A través de nuestros experimentos hemos podido demostrar una participación activa del receptor del AH, CD44, en los procesos críticos de la cascada metastásica, en los cuales la motilidad celular juega un importante rol.

En el próximo capítulo se analizarán las posibles interacciones de CD44 con otras moléculas involucradas en el proceso metastásico.



Capítulo 3

CAPITULO 3

Relación entre CD44 y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en células F3II

El pro-uPA secretado es un zimógeno que debe ser clivado proteolíticamente para desarrollar su actividad enzimática. La interacción del uPA con su receptor específico (uPAR) sobre la membrana plasmática, facilita la activación del plasminógeno unido a membrana (Ellis y col., 1991), y focaliza la actividad proteolítica sobre la superficie celular (Vasalli y col., 1985; Flow y col., 1986; Roldan y col., 1990). Existen muchas evidencias experimentales que demuestran la participación del uPA unido a membrana en la degradación de componentes de la MEC (Dano y col., 1985; Cajot y col., 1989; Blasi y col., 1994; Stahl y Mueller, 1997). Estreicher y col. (1990) demostraron que el uPAR podría dirigir la proteólisis dependiente de uPA durante el proceso migratorio. Algunos autores han demostrado que una colonia metastásica podría entrar en estado de latencia o quiescencia hasta el momento en que las células tumorales que la forman, sean capaces de inducir neovascularización (Holmgren y col., 1995). Más recientemente, Yu y col. (1997) han demostrado que ese estado de latencia puede ser inducido por la falta de expresión de uPAR. Tanto el uPA como el pro-uPA se unen con alta afinidad al uPAR en la superficie de la célula (Moller, 1993).

Algunos autores han encontrado asociación reversible entre el uPAR y el receptor tipo C3 del complemento en neutrófilos y monocitos

(Kindzelskii y col., 1996; Sitrin y col., 1996; Wei y col., 1996). En monocitos ha sido descrita una cooperación funcional entre la integrina $\beta 2$, la quinasa Src y el uPAR, que formarían un complejo en la membrana celular (Bohuslav y col., 1995). Más recientemente, Xue y col. (1997) demostraron, en células de fibrosarcoma, la asociación física entre el uPAR y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, y sugirieron que esa asociación sería dependiente del tipo de sustrato. Este tipo de interacción permitiría a la célula tumoral, adherida al sustrato por una integrina, focalizar en ese mismo punto, la degradación de componentes de la MEC a través del uPA asociado a su receptor.

Varios autores han demostrado la participación de CD44 en el proceso de migración celular (Faasen y col., 1992; Thomas y col., 1992). Además, CD44 participa en la captura y degradación lisosomal de su propio ligando, el AH (Culty y col., 1992), evento que podría ser de gran relevancia durante la migración de células tumorales.

Como ya hemos descrito en el capítulo 2, habíamos observado que el co-tratamiento con anti-CD44 y anti-uPA, inhibía la migración de las células F3II en forma muy dramática (90%). Este resultado sugeriría una cooperación de tipo funcional entre CD44 y el uPA durante este proceso. En base a los datos experimentales reportados por otros autores demostrando la asociación de uPAR con otras moléculas, nuestro objetivo, en esta etapa de la Tesis, ha estado dirigida a dilucidar posibles asociaciones entre CD44 y otras moléculas en la superficie de las células F3II.

Materiales y Métodos

Anticuerpos

En estos experimentos se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD44, hibridoma KM201, anti-uPA, cedido por la Dra. G. Hansen (Dinamarca); anti-RalA (Transduction Laboratories); anti-PKC α (Sigma); anti-PKC β (Sigma); anti-PKC δ (Sigma); anti-Src (Sigma); anti-Fak (Sigma); anti-integrina β 1 (Sigma).

Preparación de lisados celulares

Monocapas confluentes o subconfluentes de células F3II se lavaron con PBS y se levantaron por rastrillado. Luego de centrifugar la suspensión celular, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en PBS y se sonicó. Para poder medir la actividad enzimática del uPA, no se agregaron inhibidores de proteasas en el buffer de lisis celular. Por este motivo, durante todos los pasos las células se mantuvieron en hielo para evitar la activación de proteasas endógenas. El contenido proteico se determinó por el método de Lowry.

Inmunoprecipitación

Los extractos proteicos (100 ug) provenientes de los lisados celulares se incubaron en presencia del anticuerpo monoclonal anti-CD44 (dil. 1:5 de sobrenadante de hibridoma) o anti-uPA (0.2 ug/100 uI), durante toda la noche a 4°C. Luego se agregó proteína A-Sepharosa (Sigma) a la mezcla antígeno/anticuerpo y se incubó durante una hora más a 4°C. Los complejos se recuperaron por centrifugación en frío a 5000 g por 1 min. y se lavaron dos veces con buffer de lisis adicionado

con NaCl 0.5M y dos veces con buffer de lisis en ausencia de NaCl. El pellet final se resuspendió en buffer de siembra y se analizó por dos métodos: western blot o zimografía.

En todos los experimentos se hizo un control con lisado celular y proteína A-Sepharosa, en ausencia de anticuerpo.

Western blot

Para estudiar los inmunoprecipitados por WB, se efectuó la electroforesis en geles PAA al 7%. Luego de transferir los geles a membranas de nitrocelulosa, se realizó el revelado según el protocolo detallado para Western blot. Las muestras inmunoprecipitadas con KM201 fueron reveladas usando alternativamente los siguientes anticuerpo primarios: anti-CD44 (sobrenadante de hibridoma sin diluir), anti-uPA (dil 1:500), anti-Src (dil 1:500), anti-Ral (dil 1:5000), anti-Fak (dil 1:500), anti- PKC (α , β ó δ) (dil 1:500), anti-integrina β 1 (dil 1:500). Las muestras inmunoprecipitadas con anti-uPA fueron reveladas con anti-CD44.

Posteriormente, las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios biotinilados: anti-rata para CD44; anti-conejo para PKC α y uPA, y anti-ratón para PKC β ó δ , Fak, Src, Ral e integrina β 1. Todos los anticuerpos secundarios se usaron en una dilución 1:500. El revelado del WB se efectuó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1.

Zimografía

Con el fin de medir la presencia de actividad del uPA en los lisados celulares de F3II, inmunoprecipitados con anti-CD44, se efectuaron zimografías de corridas en geles de PAA al 10% en SDS (Laemmli, 1970).

Una vez terminada la corrida, el gel se lavó en Tritón X-100 2% para remover el SDS, se lavó con agua destilada y se incubó durante 24 hs, sobre una placa de agar-caseína-plasminógeno para revelar la actividad caseinolítica específica. Se usó un estándar de uroquinasa humana (Serono) como control positivo (0.5 UI/ml). Como control de especificidad se realizó una incubación en presencia de amiloride (inhibidor de la actividad de uPA).

RESULTADOS

En los lisados de células F3II inmunoprecipitados con anti-CD44, se detectó, mediante WB, la presencia de una banda positiva para uPA, indicando la asociación espacial entre ambas moléculas (Fig. 3.1A).

Las membranas fueron también reveladas con otros anticuerpos para investigar la presencia de otras moléculas. Se pudo observar una banda correspondiente a la isoforma PKC δ en los inmunoprecipitados con anti-CD44 (Fig. 3.1B). En cambio, no se detectó co-precipitación de CD44 con Src, Fak, Ral, integrina β 1, o PKC α ó β (datos no mostrados). En todos los casos, como control, se incubó proteína A-Sepharosa con lisado celular de F3II en ausencia de anticuerpo.

El revelado de las membranas con anti-CD44 confirmó la presencia de ésta molécula en los inmunoprecipitados (Fig. 3.1C).

Para verificar la coexistencia de uPA con CD44 en los inmunoprecipitados, en otro experimento se inmunoprecipitó un lisado celular F3II con anti-uPA murino, y la membrana se reveló con anti-CD44, confirmando una vez más la co-precipitación de ambas moléculas (Fig. 3.1D).

Finalmente, para confirmar los resultados de WB, inmunoprecipitados de extractos celulares F3II con anti-CD44 fueron analizados mediante zimografías para identificar uPA por su actividad enzimática y peso molecular. Como control de la ausencia de uPA en el medio condicionado del hibridoma, se corrió al mismo tiempo una alícuota del sobrenadante puro en una de las calles.

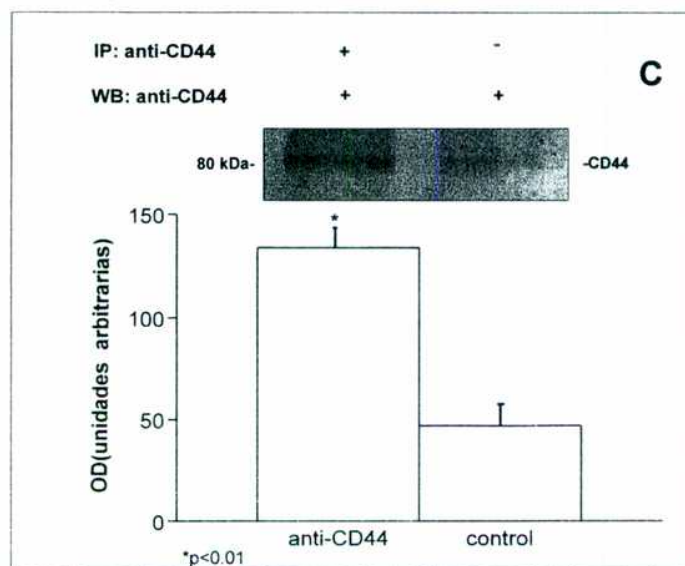
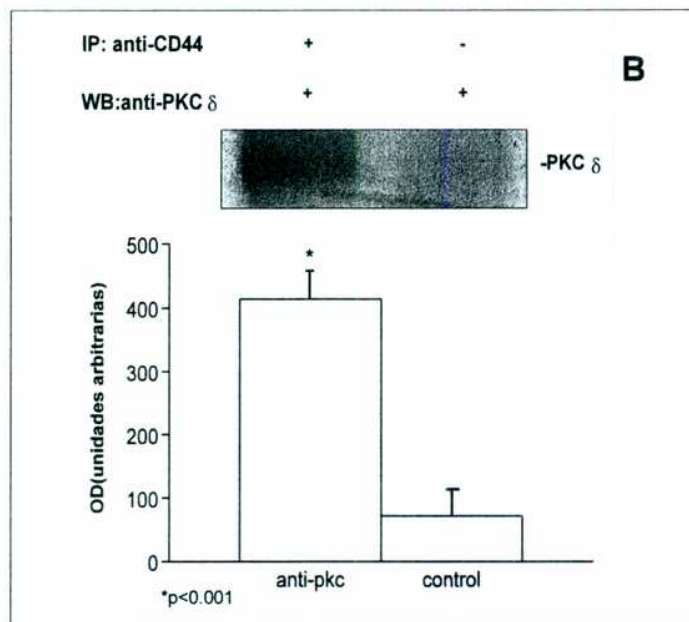
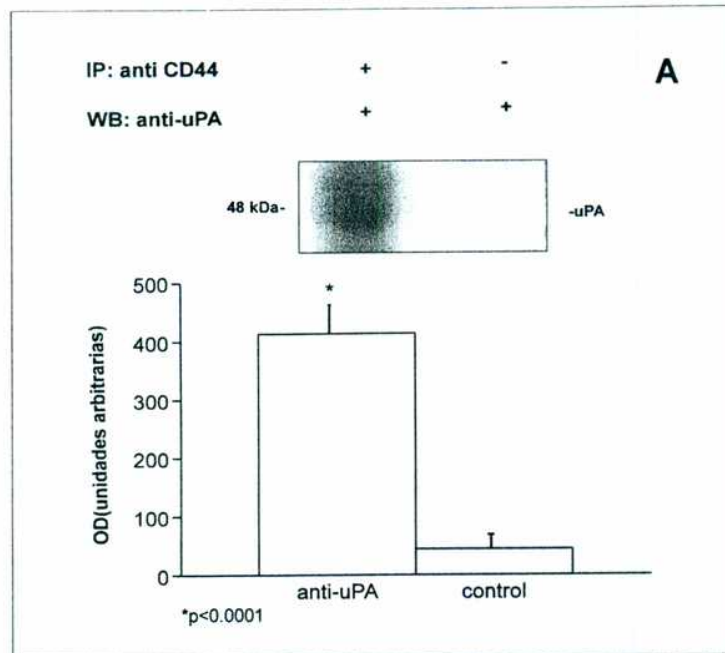
Los resultados de la zimografía muestran una banda con actividad caseinolítica dependiente de plasminógeno asociada a los inmunoprecipitados con anti-CD44, cuyo peso molecular se corresponde con el de uPA (Fig. 3.1E). No se detectó actividad enzimática en el hibridoma (datos no mostrados), lo cual confirma que la actividad enzimática detectada en los inmunoprecipitados proviene de los lisados celulares F3II.

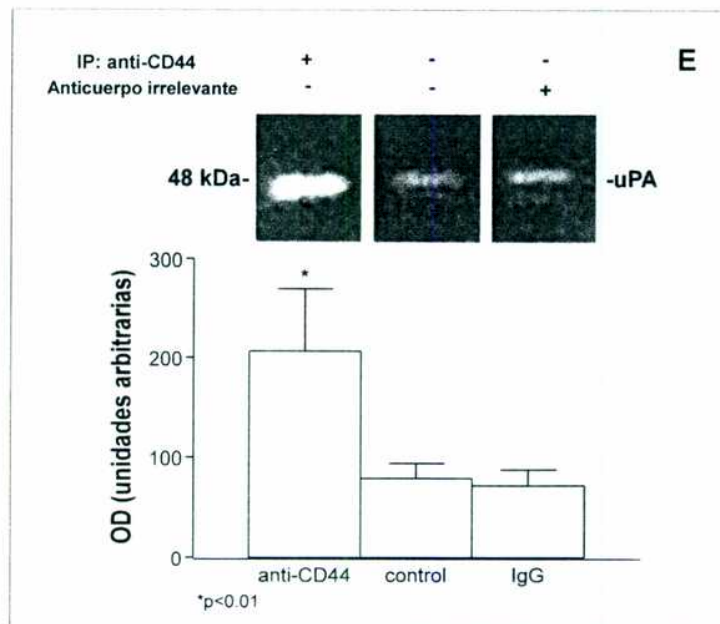
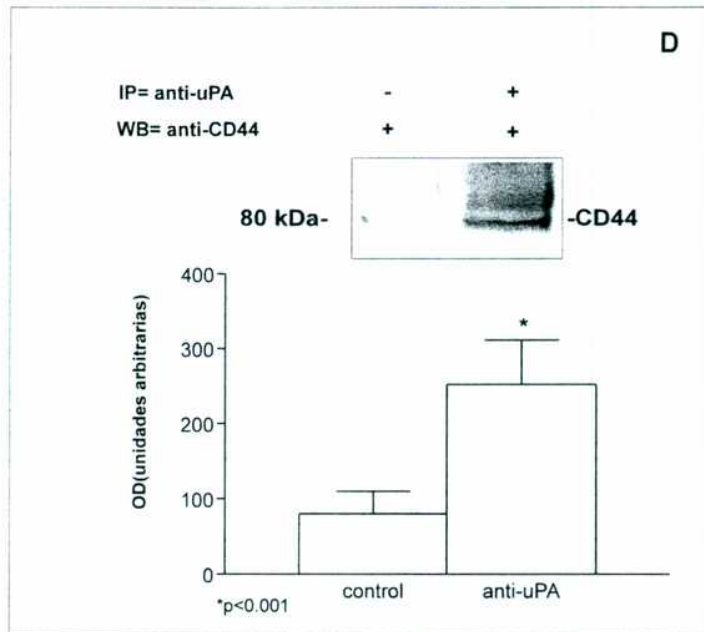
Figura 3.1: Ensayos de inmunoprecipitación en lisados de células F3II.

Los lisados de células F3II inmunoprecipitados con anti-CD44, fueron revelados con anti-uPA (A) o anti-PKC δ (B) o anti-CD44 (C) por WB.

Los lisados inmunoprecipitados con anti-uPA fueron revelados con anti-CD44 por WB (D). En los mismos inmunoprecipitados se detectó actividad de uPA mediante zimografías de corridas electroforéticas (E).

En todos los experimentos se hizo un control incubando proteína A y lisado celular, en ausencia de anticuerpos.





DISCUSION

Varios autores han demostrado la asociación directa entre CD44 y proteínas del citoesqueleto (Kalomiris y col., 1989; Lokeshwar y col., 1992 y 1994; Tsukita y col., 1994). Más recientemente Iida y col (AACR, abstract 3571, 1997) reportaron la asociación de CD44v3 con la metaloproteasa MMP-9 en una línea celular tumoral mamaria. Sin embargo, hasta la fecha no hay trabajos que relacionen CD44 con el activador de plasminógeno (uPA).

Ha sido demostrado, en diferentes modelos experimentales, que el uPAR estaría asociado a otras moléculas. Dentro de esta línea, Bohuslav y col. (1995) demostraron en células monocíticas que el uPAR, junto con Src e integrina $\beta 2$, forman un complejo molecular en la membrana plasmática. Sitrin y col. (1996), también en células monocíticas, demostraron que las funciones adhesivas dependientes del receptor del complemento C3, estarían facilitadas por su asociación con el complejo uPA-uPAR. Estos mismos autores también demostraron (Kindzelskii y col., 1996) que la asociación uPAR-C3 es reversible y tiene una distribución diferencial sobre la membrana plasmática, según el estado de polarización de la célula. Dos trabajos recientes han demostrado la co-localización de uPAR con integrinas en contactos focales. Esta interacción podría promover la adhesión y migración sobre vitronectina (Wei y col., 1996) en células humanas normales. En células tumorales, esta asociación entre uPAR e integrinas, estaría favoreciendo la proteólisis direccional durante el proceso de invasión (Xue y col., 1997).

En el capítulo 2 hemos descrito que el tratamiento de células F3II con anticuerpos anti-CD44 o anti-uPA, inhibían en forma significativa la migración en cámaras Transwell. Al incubar las células con la combinación de ambos anticuerpos se potenciaban los efectos inhibitorios de cada anticuerpo, llegando al 90% de inhibición de la migración. Esta cooperación de tipo funcional nos llevó a plantear la hipótesis de una probable cercanía física entre estas dos moléculas. En un trabajo previo en nuestro laboratorio (Alonso y col. 1996), había sido demostrado que la línea celular F3II produce uPA y presenta una alta actividad de uPA unida a membrana.

Para evaluar la asociación de CD44 con uPA, hemos inmunoprecipitado lisados celulares de F3II con anti-uPA. El análisis por WB reveló la presencia de CD44 en los complejos antígeno-anticuerpo. Por otro lado, la presencia de uPA en los inmunoprecipitados con anti-CD44 fue revelada por dos métodos: análisis por WB y detección de actividad caseinolítica dependiente de plasminógeno mediante zimografía. Como se mencionó anteriormente, el uPA es activado más rápidamente y con mayor eficiencia cuando se encuentra asociado a su receptor en la membrana celular (Moller, 1993). Estos resultados sugieren un probable nexo físico entre CD44 y el complejo uPA-uPAR.

Por otra parte, no hemos encontrado asociación de CD44 con otras moléculas como Fak, integrina $\beta 1$, Ral o Src.

Kalomiris y col. (1989) demostraron que CD44 podía ser fosforilado por PKC en células de linfoma, evento que facilitaría la interacción de dicho receptor con ankirina en el citoesqueleto. Este antecedente nos permitió especular sobre una posible asociación de CD44 con alguna isoforma de PKC en células F3II. Para corroborarlo, lisados celulares de F3II inmunoprecipitados con anti-CD44 fueron analizados

por WB con anti-PKC α , β ó δ . El análisis de los inmunoprecipitados con anti-CD44 reveló la presencia de la PKC δ , mientras que las isoformas α ó β no coprecipitaron con CD44.

El uPAR pertenece a la familia de proteínas que carecen de dominio transmembrana, y se asocian a la membrana plasmática a través de un ancla compuesta por un glicofosfoinositido (GPI). Algunos autores (Wei y col, 1996) han propuesto que la asociación de proteínas unidas a GPI, con receptores de transmembrana sería importante para establecer conexiones con el citoesqueleto. En un trabajo anterior, ha sido demostrado que la línea celular F3II presentaba una alta actividad enzimática dependiente de uPA, unida a membrana (Alonso y col., 1996). Si bien no lo hemos podido analizar en forma directa por no contar con el anticuerpo anti-uPAR murino, la co-precipitación de uPA con CD44 sería una forma indirecta de detectar una probable asociación con uPAR.

Nuestras evidencias experimentales, sugieren que la proximidad física de CD44 y el uPA podría ser un mecanismo estratégico para focalizar la actividad del uPA en los puntos de migración celular. Esta hipótesis se ve reforzada por la evidencia experimental presentada sobre este tema en el capítulo 2, donde los inhibidores de proteasas (entre ellos B428 y B623, potentes inhibidores de la actividad de uPA) eran capaces de inhibir la degradación proteolítica de CD44 que ocurriría durante el spreading celular. Si bien no lo hemos demostrado en este trabajo, queda abierta la posibilidad de que estas moléculas también actúen cooperativamente en otras etapas de la cascada metastásica.

Estos resultados muestran por primera vez un nexo físico y funcional entre el receptor del hialuronato CD44 y el uPA.



Capítulo 4

CAPITULO 4

Señales involucradas en la expresión de CD44 en células F3II

La interacción de las células tumorales con los componentes de la MEC es un fenómeno crítico en varias etapas de la cascada metastásica (Juliano 1994, Brodt, 1996). Esa interacción está presente en diversos eventos como la adhesión, el spreading y la migración celular. Todos estos son procesos dinámicos que involucran una continua reorganización del citoesqueleto. A su vez, esta reorganización estructural implica la activación de vías de señales que llevan el mensaje desde la membrana celular hasta el núcleo (Hao Lo y Bo Chen, 1994; Aguirre Ghiso y col. 1997b).

Cuando las células se adhieren a un determinado sustrato, se produce un agrupamiento de las integrinas que dispara señales intracelulares, dando como resultado final la formación de un contacto focal (Hao Lo y Bo Chen, 1994). Durante la adhesión y el spreading, la actina filamentosa (f-actina) se asocia con proteínas específicas, como integrinas, vinculina, talina, organizando el contacto focal. Algunas células tumorales necesitan anclarse al sustrato para poder crecer. Sin embargo, ha sido descrito un número significativamente menor de contacto focales en la membrana celular tumoral (Yoshimura y col, 1995), hecho que se correlaciona con una menor capacidad adhesiva y alta capacidad migratoria (Juliano, 1994). Asimismo, Sadano y col.

(1992) demostraron que el citoesqueleto de las células tumorales se halla menos organizado que en las células normales, característica que les confiere mayor flexibilidad durante el spreading y la migración.

Las señales que la célula recibe de su entorno son captadas por receptores ubicados en la superficie celular. Estos receptores, en general, están compuestos por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (Alberts y col., 1994). Para poder transmitir la señal al núcleo, donde generalmente se integra y activa la respuesta final a la señal recibida, los receptores se asocian con diferentes proteínas en la cara intracelular de la membrana plasmática.

Como ya fue descrito en la *Introducción*, CD44 es una glicoproteína, ubicada en la membrana plasmática, que funciona como receptor del AH. Algunos autores han demostrado que la funcionalidad de CD44 puede ser modulada por distintos factores, algunos de los cuales participan en vías de señalización intracelular. En este sentido las evidencias experimentales muestran que la adhesión de CD44 a su ligando, el AH, puede ser modulada por factores de crecimiento, como como TGF- β (Faasen y col. 1993), EGF (Zhang y col., 1996) y por ésteres de forbol o anticuerpos (Lesley y col, 1990). Además, la expresión de CD44 puede ser regulada por la sobreexpresión de oncogenes como *ras* y *src* (Hofmann y col., 1993; Jamal y col., 1994; Kogerman y col., 1996).

Evidencias experimentales demostraron la asociación de CD44 con proteínas del citoesqueleto. CD44 posee en su estructura un dominio de unión a componentes del citoesqueleto. Algunos trabajos indican que esta unión sería necesaria para la interacción entre CD44 el AII (Bourguignon

y col., 1991; Lokeshwar y col, 1994). Koopman y col. (1990) demostraron que la agregación celular mediada por CD44 dependiente de LFA-1, podía ser bloqueada por inhibidores de PKC (H7, AMG) o por inhibidores de la formación de microfilamentos (citocalacina B), sugiriendo la dependencia, en este proceso, de la actividad de PKC y de la integridad del citoesqueleto.

En el presente capítulo presentamos evidencias experimentales sobre las vías de señales que participarían en la regulación de la expresión de CD44 en células F3II. También se discutirán los resultados obtenidos en un trabajo colaborativo con el Dr. Foster (USA), sobre otro modelo experimental, que nos ha permitido profundizar los conocimientos relativos a las vías de señalización que regulan la expresión de esta molécula.

Materiales y Métodos

Tratamiento de células F3II con PA, PMA, EGF, H7 y Propranolol

Para analizar el efecto de diferentes agonistas y antagonistas en la expresión de CD44, se partió de cultivos confluentes de células F3II, que fueron tratados según los siguientes esquemas:

Tratamiento	Concentración	Tiempo (hs)
PMA	1-100 nM	2 ó 24
H7	50 uM	24
EGF	20 ng/ml	24
PMA/H7	10 nM/50 uM	24
EGF/H7	20 ng/ml/50 uM	24
PA	1-100 ng/ml	24
Propranolol	20-200 uM	24

Luego de los tratamientos, los cultivos fueron rastrillados y lisados en presencia de inhibidores de proteasas. Se cuantificó el contenido proteico por el método de Lowry. Las muestras fueron congeladas a -20°C y posteriormente analizadas por Western Blot como se describió en el capítulo 1.

RESULTADOS

Se estudiaron por técnicas de WB, las vías de señalización que participan en la expresión de CD44 en monocapas confluentes de células F3II. El tratamiento de células F3II con PMA, activador de PKC, en un rango de 1-10 nM, aumentó la expresión de CD44 hasta 24 hs de tratamiento (Fig. 4.1A). En cambio, una dosis de 100 nM de PMA sólo estimuló la expresión de esta molécula cuando la exposición fue de 2 hs (Fig. 4.1A, inset). El tratamiento prolongado (24 hs) con PMA 100 nM no modificó en forma significativa los niveles de expresión de CD44 respecto del control (Fig. 4.1A).

Monocapas de células F3II fueron también tratadas con 50 uM de H7, un inhibidor específico de PKC, durante 24 hs. El análisis densitométrico del WB muestra que el tratamiento con H7, en dosis no citotóxica, es capaz de inhibir la expresión de CD44, comparado con el control sin tratar (Fig. 4.1C). Al tratar las monocapas con una combinación de PMA y H7, se observó, al igual que en el tratamiento anterior, un descenso en el nivel de expresión de CD44 (Fig. 4.1C).

También ensayamos el efecto del tratamiento con EGF (20 ug/ml) sobre los cultivos de células F3II. El análisis densitométrico del WB no mostró diferencias significativas en los niveles de expresión de CD44, respecto del control sin tratar (Fig. 4.1C).

Los datos experimentales obtenidos con PMA y H7, sugieren la participación de PKC en la vía de señales que regula la expresión de CD44 en células F3II.

Ha sido descrito que la activación de la PKC dependería también de ácido fosfatídico y DAG, productos de la degradación de PC dependiente de PLD, involucrando a PKC y PLD en la misma vía. En los siguientes experimentos, analizamos, por WB, el efecto sobre la expresión de CD44, del tratamiento de monocapas de células F3II con PA (1-100 ng/ml) o con propranolol (20-200 μ M), inhibidor de la conversión de PA a DAG (Jiang y col., 1994). Como resultado del tratamiento con PA, se observó un significativo aumento de la expresión de CD44 (Fig. 4.1B), mientras que, el tratamiento con propranolol inhibió la expresión de este receptor en forma dosis dependiente (Fig. 4.1 D). Estos datos sugieren la participación de la vía de señales de PLD en el control de la expresión de CD44 en células F3II.

Figura 4.1: Efecto de agonistas y antagonistas de la PKC y la PLD sobre la expresión de CD44: Western blot y análisis densitométrico.

A) Expresión de CD44 en lisados de células F3II tratadas con distintas concentraciones de PMA (1 a 100 nM) durante 24 hs.

Inset: Análisis de la expresión de CD44 en lisados de células F3II tratadas con PMA (100 nM) durante 2 hs.

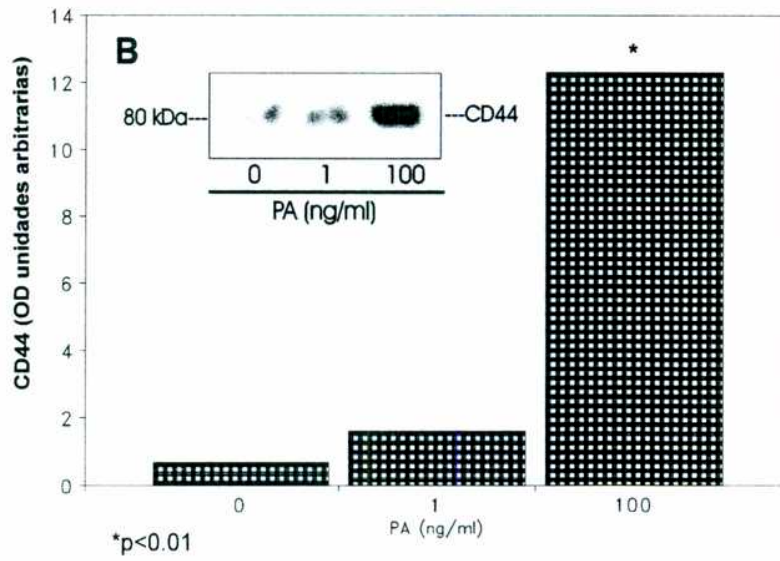
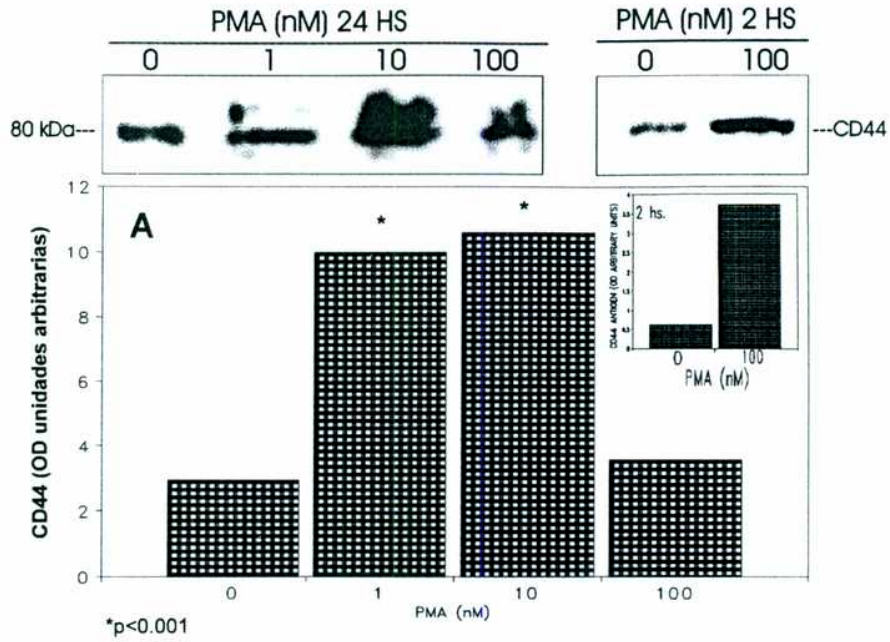
B) Efecto del tratamiento con PA (1-100 ng/ml) sobre la expresión de CD44 en lisados de células F3II tratadas durante 24 hs.

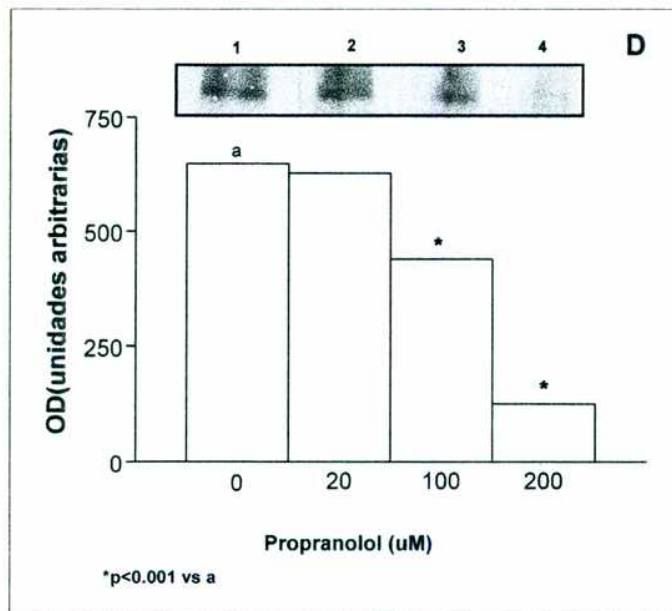
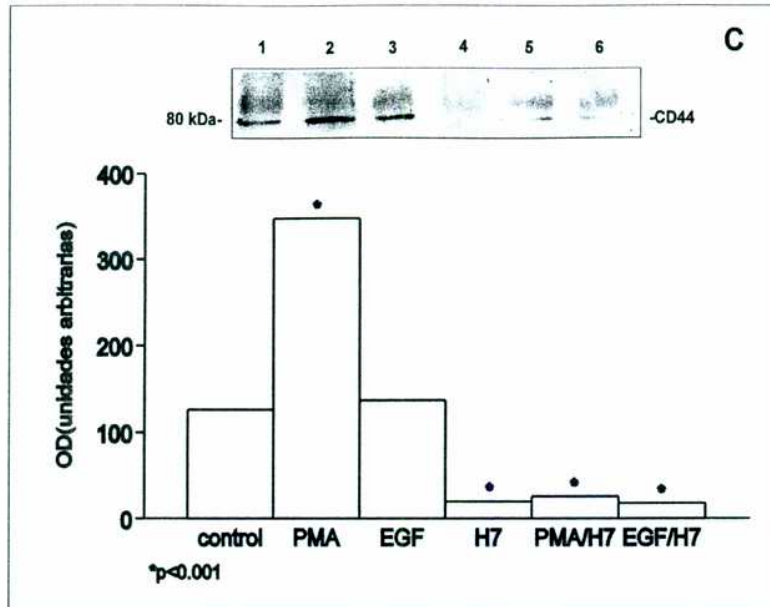
C) Análisis de la expresión de CD44 en células F3II tratadas durante 24 hs en presencia de activadores y/o inhibidores de la PKC. Calle 1: control sin tratar; calle 2: PMA 10 nM; calle 3: EGF 10 ng/ml; calle 4: H7 50 μ M; calle 5: tratamiento combinado de PMA y H7; calle 6: tratamiento combinado de EGF y H7.

D) Efecto del tratamiento con propranolol (20-200 μ M) sobre la expresión de CD44 en células F3II tratadas durante 24 hs. Calle 1: control; calle 2: 20 μ M; calle 3: 100 μ M; calle 4: 200 μ M.

Análisis estadístico: test-t de Student.

Las figuras muestran un experimento representativo de por lo menos tres independientes.





DISCUSION

Existen evidencias experimentales demostrando que la expresión de CD44 puede ser modulada por oncogenes como *ras* o *src* (Hofmann y col., 1993; Jamal y col., 1994; Kogermann y col., 1996), o por factores de crecimiento, como el EGF (Zhang y col., 1996) (Fig.4.2).

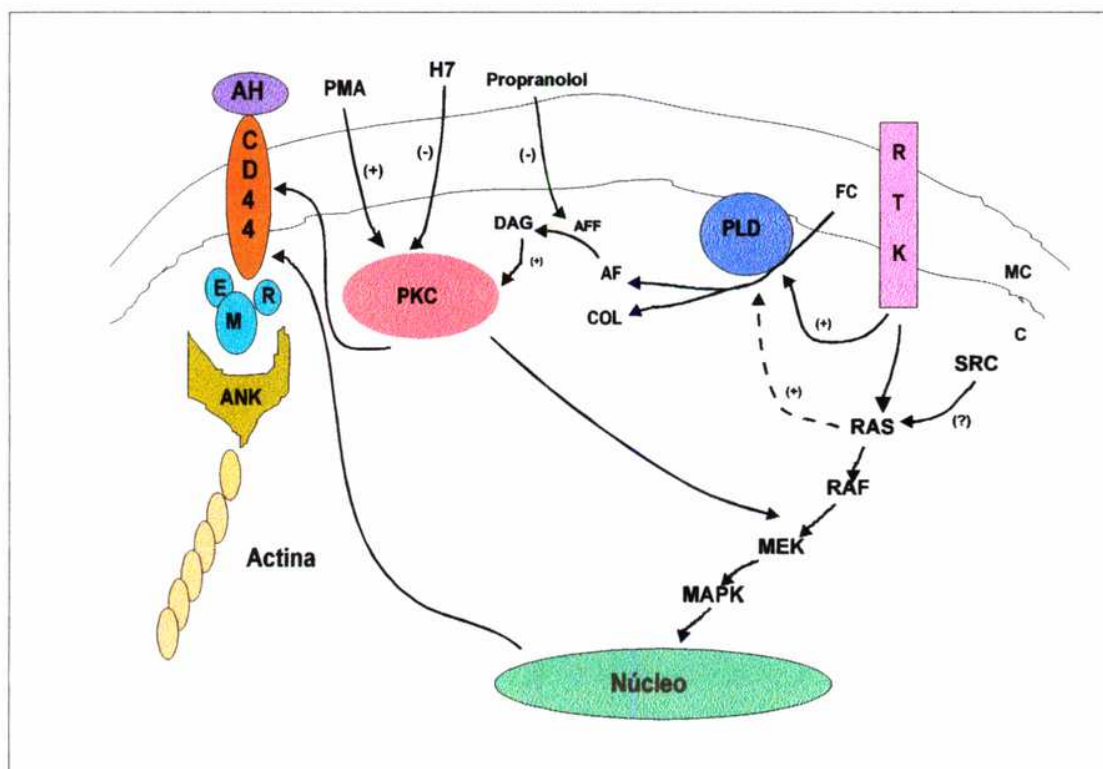


Figura 4.2: Esquema que representa la interacción de CD44 con proteínas del citoesqueleto y vías de señales que regularían su expresión en células F3II. (AH: ácido hialurónico; AF: ácido fosfatídico; Ank: ankirina; AFF: ácido fosfatídico fosfohidrolasas; C: citoplasma; Col: colina; DAG: diacilglicerol; E: ezrina; FC: fosfatidilcolina; M: moesina; MC: membrana citoplasmática; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; MEK: quinasa MAPK/ERK; R: radixina; RTK: receptor tirosina quinasa).

Algunos autores han propuesto que CD44 tendría un importante rol en la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular, facilitando así la extravasación y la diseminación metastásica (Griffioen y col., 1997). Lesley y col. (1992a) también han presentado evidencias demostrando que en linfocitos y células de linfoma la adhesión al endotelio estaría mediada por CD44. Por otro lado, ha sido demostrada la participación de la PKC en el proceso metastásico (Schwartz y col., 1990; Dumont y col., 1992) y también se ha propuesto que PKC jugaría un importante rol como modulador de la adhesión de células tumorales a la MEC y al endotelio vascular (Herbert y col., 1991).

En este trabajo hemos analizado si la vía de señales dependientes de PKC, participan en la regulación la expresión de CD44 en células F3II. Nuestros resultados muestran que el PMA, activador específico de la PKC, aumenta la expresión de CD44 en concentraciones hasta 10 nM durante 24 hs. Es interesante observar que las células F3II tratadas durante 2 hs con 100 nM de PMA también aumentan la expresión de CD44, mientras que la prolongación del tratamiento a 24 hs produce una disminución de la expresión respecto del tratamiento corto. Es probable que este efecto se deba a una depleción de la PKC producida por el PMA en altas dosis y tiempo prolongado (Young y col., 1987).

En el capítulo 2 hemos demostrado que el PMA es capaz de modular la funcionalidad de CD44 aumentando la afinidad de este receptor por su ligando, el AH. El mecanismo a través del cual el PMA aumenta dicha afinidad no se conoce. En el presente capítulo demostramos que el tratamiento con PMA aumenta los niveles de expresión de esta molécula. Tomando en conjunto estos datos podríamos

hipotetizar que el incremento de la afinidad de CD44 por el AH es consecuencia del aumento de expresión de CD44 por activación de la PKC. Sin embargo, este mismo efecto también puede lograrse por tratamiento con anticuerpos específicos (Lesley y col., 1993). Esto nos hace pensar que la modulación de la funcionalidad de CD44 y el aumento de expresión de este receptor en respuesta al tratamiento con PMA, sean regulados, probablemente, por mecanismos independientes.

Luego de estudiar los efectos de un activador de la PKC sobre la expresión de CD44, analizamos el efecto del H7, un inhibidor que interactúa con el dominio catalítico de las isoformas α y ζ de la PKC (Mizuno y col., 1995). Nuestros resultados muestran que, en cultivos de células F3II, el tratamiento con H7 es capaz de disminuir los niveles de expresión de CD44, confirmando la participación de PKC en la vía de regulación de CD44. Cuando los cultivos fueron tratados con una combinación no tóxica de ambas drogas, predominó el efecto inhibitorio de H7 sobre CD44. Esto indica que, en esta combinación de dosis ensayadas, la acción inhibitoria del H7 sobre la PKC puede revertir el efecto estimulador del PMA sobre la expresión de CD44.

Zhang y col., (1996) han demostrado, en células derivadas de la línea NIH 3T3, que el EGF, a través de su receptor, EGFR, es capaz de estimular la expresión de CD44 y modular la adhesión al AH in vitro. Muchas de las señales transducidas por la PKC provienen de receptores tirosina-quinasa cuyos ligandos son factores de crecimiento, como EGF o PDGF (Blobe, 1994).

Nuestros resultados demostraron que, en este modelo de células tumorales epiteliales, EGF no modula la expresión de CD44. Sin embargo,

en trabajos anteriores se demostró que el tratamiento de células F3II con EGF estimula la expresión de otras moléculas, como uPA y metaloproteasas (Aguirre Ghiso y col., 1997b). Como mencionamos en la *Introducción*, existen varias isoformas de PKC según los requerimientos de Ca^{++} y DAG para su activación (Perletti y col., 1996). En base a nuestros resultados, es probable que en este modelo tumoral, la regulación de la expresión de CD44 se produzca a través de una isoforma de PKC no dependiente de Ca^{++} , pero dependiente de DAG para su activación y, en consecuencia, sensible al tratamiento con PMA.

En los últimos años se ha demostrado que la activación de la PLD está asociada a señales mitogénicas dependientes de receptor (Foster, 1993; John-Challiss y col., 1993; Suzuki y col., 1996; Ha, 1994). La activación de PLD por factores de crecimiento lleva, a su vez, a la activación de la PKC (Foster, 1993; Blobe y col., 1994). Se ha demostrado también que activadores de la PKC, como ésteres de forbol, inducen la activación de la PLD (Song y Foster, 1993). En base a estos datos, estudiamos el efecto del PA, producto de la degradación de PC dependiente de PLD, y del propranolol, inhibidor de la conversión de PA a DAG mediada por AFF (Jiang y col., 1994) sobre la expresión de CD44. Nuestros datos muestran que el tratamiento con PA aumenta la expresión de este receptor en un rango de concentraciones que regulan otros eventos celulares como la polimerización de actina (Ha y col., 1994) y la producción de proteasas (Aguirre Ghiso y col., 1997b). Por otro lado, los oncogenes que aumentan la expresión de CD44 (ras y src) median sus señales a través de PLD (Jiang y col., 1995). Además, el tratamiento de células F3II con propranolol disminuyó en forma significativa los niveles de expresión de CD44. Estos datos sugieren que la vía de señales dependiente de PLD participaría en la regulación de la expresión de CD44

en células F3II. En suma, podríamos proponer que la vía dependiente de PLD estaría produciendo DAG en forma constitutiva, manteniendo activada la PKC, modulando así la expresión de este receptor en este modelo tumoral.

Las evidencias experimentales presentadas en este capítulo sugieren que las vías de señales dependientes de PKC y PLD participarían en la regulación de la expresión de CD44.

Recientemente, en un trabajo colaborativo con el Dr. Foster (University of New York, USA), junto con el Dr. Aguirre Ghiso, hemos profundizado nuestra línea de investigación sobre las vías de señalización que regulan la expresión de CD44, en otro modelo experimental. Como se mencionó anteriormente, los oncogenes ras y src aumentan la expresión de CD44. Jiang y col. (1995) demostraron que la actividad de PLD inducida por el oncogen v-Src es mediada por v-Ras. A su vez, Ras interactúa con el factor RalA-GDS, responsable de activar la GTPasa RalA. Estos mismos autores (Jiang y col., 1996) demostraron, recientemente, que la vía Ras/RalA participa en la activación de la PLD1 a través de Src. (Figura 4.3)

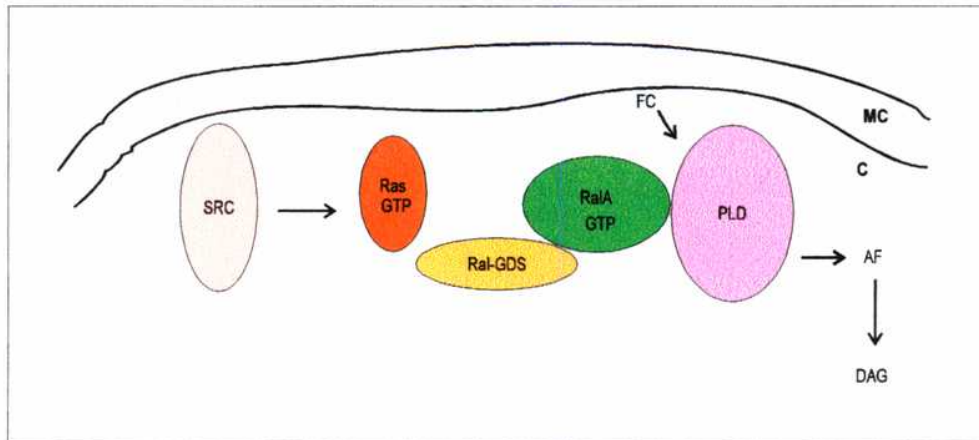


Figura 4.3: Esquema ilustrando la participación de la GTPasa RalA en la vía de activación de PLD dependiente de v-Src. RalA sirve como ancla para PLD a través de su extremo amino-terminal. Ral-GDS mediaría el nexo entre RalA-PLD y el oncogen v-Ras activado (esquema modificado de Jiang y col, 1995) (AF: ácido fosfatídico; C: citoplasma; FC: fosfatidilcolina; MC: membrana citoplasmática; DAG: diacilglicerol)

Brevemente, en el laboratorio del Dr. Foster, se obtuvieron líneas celulares derivadas de NIH 3T3 transfectadas con v-Ras o v-Src, o éstas últimas cotransfectadas con S28N-RalA o con el plásmido control, siendo S28N-RalA una mutante dominante negativa de RalA. Los experimentos realizados en nuestro laboratorio, muestran un aumento de la expresión de CD44 en las células NIH transfectadas con v-Ras o v-Src. Estos resultados coinciden con lo ya reportado por otros autores (Hofmann y col, 1993; Jamal y col, 1994; Kogerman y col., 1996). Sin embargo, en las células cotransfectadas con la mutante negativa S28N-RalA, se observó una anulación casi completa de la sobreexpresión constitutiva de CD44 en las células transformadas con los oncogenes Ras y Src. Estos experimentos demuestran por primera vez que la GTPasa RalA participaría en la vía que media la señal endógena dependiente de dichos oncogenes que lleva a la sobreexpresión de CD44. No se conoce aún si RalA participa en la regulación de la expresión de CD44 en el modelo tumoral murino F3II.



Capítulo 5

CAPITULO 5

Expresión de CD44 en tumores humanos del SNC

La mayoría de los tumores del sistema nervioso central (SNC) derivan de la glía, y dentro de éstos, los astrocitomas son los tumores cerebrales más frecuentes en el adulto. Histológicamente, los astrocitomas se dividen en tres categorías de acuerdo al grado de malignidad, según el criterio de la WHO y el índice de Burger (DeVita y col., 1977):

	WHO	Burger
Astrocitoma de bajo grado	II	I
Astrocitoma anaplásico	III	II
Glioblastoma multiforme	IV	III

De acuerdo a esta clasificación los astrocitomas de bajo grado son los más benignos, aunque son infiltrativos y tienen una marcada tendencia a la progresión maligna. Esta capacidad invasiva es evidente tanto en astrocitomas de bajo grado como de alto grado, lo cual implica que el fenotipo invasivo es una característica que estos tumores adquieren en una etapa temprana de la tumorigénesis. En los astrocitomas de bajo grado, han sido descritas alteraciones en el gen supresor p53 (Louis, 1994), alteraciones en moléculas de adhesión como CD44, gangliósidos e integrinas, y sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores (Pilkington, 1994). La transición de astrocitoma de bajo grado a astrocitoma anaplásico está acompañada por un marcado aumento en el comportamiento maligno. En estos tumores la principal característica es su elevado índice mitótico. A nivel molecular, las alteraciones más

importantes han sido descritas en proteínas que participan en la regulación del ciclo celular, como p16, ciclina D1 y Rb (gen supresor) (Serrano y col., 1993). También han sido descritas alteraciones cromosómicas, como la pérdida del 9p, 19q y 13q. La supervivencia de pacientes con astrocitoma anaplásico es menor, comparada con los de bajo grado (Ueki y col., 1994; Henson y col., 1994).

El glioblastoma multiforme (GBM) es el de mayor grado de malignidad en este grupo de tumores, siendo la supervivencia de los pacientes menor de dos años. Estos tumores se caracterizan por un alto índice proliferativo, alta proliferación de células endoteliales y necrosis focal, dando como resultado una gran cantidad de alteraciones genéticas, que se suman a las mencionadas anteriormente. La pérdida del cromosoma 10 ha sido reportada en el 95% de los GBM (von Deimling y col., 1992). Esta anomalía cromosómica está acompañada, en la mayoría de los casos, por amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo cual sugiere la participación de esta vía de señales en la progresión maligna del GBM.

Existen también gliomas mixtos, llamados oligodendrogliomas u oligoastrocitomas. Estos tumores están clínicamente y biológicamente relacionados con los astrocitomas de bajo grado. Estos tumores son poco comunes y tienen mejor pronóstico. Los oligodendrogliomas son más sensibles a los tratamientos quimioterápicos y la supervivencia de estos pacientes puede llegar hasta 10 años (Cairncross y col., 1992). Las pérdidas cromosómicas más características son las 1p y 19q, afectando entre el 40 y el 80% de estos tumores (von Deimling y col., 1992; Kraus y col., 1995). A pesar de tener buen pronóstico, las alteraciones genéticas

en este tipo de tumores pueden contribuir a la progresión maligna, llegando a transformarse en astrocitomas anaplásicos o en GBM (Wu y col., 1993).

Los endimomas son un grupo clínicamente diverso de gliomas, que pueden ser tumores intraventriculares altamente agresivos en niños, hasta tumores benignos de la médula espinal en adultos. Es frecuente encontrar pérdida del 22q en estos tumores (James y col., 1990), y raramente se encuentran alteraciones del gen p53 (Ohgaki y col., 1991) . La transición de endimoma a GBM no es frecuente.

Los meduloblastomas son tumores muy malignos, que se originan en la fosa posterior. En el 50% de estos tumores ha sido descrito el isocromosoma 17q (Bigner y col., 1990) . Esto sugería la participación del gen p53 mutado, que también mapea en el cromosoma 17, en este tipo de tumores, pero luego se confirmó que las mutaciones en este gen son poco frecuentes (Ohgaki y col., 1991; Saylor y col., 1991). También ha sido descrita la pérdida del 6q, mientras que la amplificación de oncogenes ha sido reportada en casos esporádicos (Bigner y col., 1990).

En algunos trabajos se ha observado que las variantes de CD44 sólo se expresan en metástasis cerebrales, cuyo tumor primario se localiza en riñón, pulmón o colon, mientras que, en tumores primarios del SNC, se expresa principalmente la forma estándar de CD44 (Nagasaka y col., 1995; Frank y col., 1996). Estos datos sugieren un posible rol de las variantes de CD44 en el establecimiento de metastásis en SNC. No se ha estudiado en los trabajos citados, el valor de CD44 como potencial marcador pronóstico en tumores primarios del SNC.

Los tumores del SNC, aunque raramente dan metástasis, son altamente invasivos. Como ya se describió en capítulos anteriores, la invasión es un proceso complejo que involucra interacciones entre las células tumorales, las células normales y la MEC. Dichas interacciones están mediadas por moléculas de adhesión. El AH y el condroitín sulfato son las moléculas más abundantes en el espacio extracelular del SNC (Asher y col. 1991; Bertolotto y col, 1990), siendo los astrocitos los principales productores de AH (Yu y col. 1994; Pilkington y col., 1993). En líneas celulares continuas de glioma, se ha observado que CD44 es capaz de intervenir en los procesos de adhesión e invasión in vitro (Merzak y col., 1994). Además, CD44 participa en la captura y degradación del AH en fibroblastos transformados (Culty y col. 1992). Estos trabajos sugieren que, a través de la degradación del AH, CD44 podría promover el crecimiento invasivo en tumores del SNC. La invasividad, que como ya mencionamos, caracteriza a los tumores cerebrales, constituye el mayor obstáculo para la aplicación de un tratamiento efectivo. Otra característica biológica relevante en los gliomas, es su resistencia a la radio y quimioterapia. Las evidencias experimentales presentadas hasta hoy, sumadas a la falta de marcadores de utilidad en el manejo clínico de pacientes con tumores cerebrales, hacen que CD44 sea una molécula de interés para su estudio en estos tumores.

En el presente trabajo, en colaboración con el Departamento de Oncología y Patología del Hospital Italiano, hemos evaluado por IHQ la expresión de CD44s y las variantes v3, v4/5 y v6, en tumores de cerebro. Además, se correlacionó dicha expresión con diferentes parámetros anatomopatológicos y clínicos.

Materiales y Métodos

Pacientes y Tumores

Se estudiaron 57 tumores de cerebro correspondientes al período 1990-96 del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Italiano de Buenos Aires. Los datos sobre los pacientes se obtuvieron por revisión de las historias clínicas. Los cortes analizados pertenecen, en todos los casos, a la biopsia diferida realizada luego de la primera intervención quirúrgica.

Tabla 5.1: Clasificación de pacientes según sexo y edad

Sexo	Número	Edad*
Hombres	35	56 (18-70)
Mujeres	22	47 (17-75)

*Mediana (rango)

Tabla 5.2: Distribución de los tumores según su tipo histológico y estadio

Clasificación Histológica	Nº de pacientes	Estadios (Burger)
Astrocitoma (bajo grado)	14	I
Astrocitoma anaplásico	13	II
Glioblastoma multiforme	22	III
Ependimoma	5	-
Meduloblastoma	3	-

IHQ

Para evaluar la expresión de CD44s y variantes, se emplearon cortes histológicos de biopsias incluidas en parafina. Las muestras fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas por tratamiento con alcoholes de grados decrecientes (100° a 70°). Luego de desparafinar los cortes, se los incubó durante 20 min con 3% H₂O₂ (30 vol) en PBS para bloquear la peroxidasa endógena. Para exponer el antígeno los cortes, sumergidos en buffer citrato (pH 6), se sometieron a dos ciclos de horno a microondas de 1000 w (1 min), 500 w (1.30 min) y 750 w (2.30 min). Luego de incubar con buffer de bloqueo (5% de leche en PBS) a fin de impedir la unión inespecífica de los anticuerpos, se agregó el primer anticuerpo (anti-CD44s, v3, v4/5 y v6; dil. 1:1000, R&D Systems, Minneapolis, USA) y se incubaron a 4°C en cámara húmeda toda la noche. Un anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado fue usado como segundo anticuerpo (dil. 1:500, Gibco, BRL, USA) incubándose por una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar se incubó con estreptavidina-peroxidasa por 40 min. a temperatura ambiente (dil. 1:500, Vector) y finalmente se reveló con una solución al 7% de DAB (diaminobencidina) y 3% de H₂O₂ en PBS, como cromógeno.

Se hizo contratinción de núcleos con hematoxilina de Harris, y se procedió a la deshidratación y montaje de los cortes en bálsamo de Canadá. En todos los casos, como control, un corte se incubó en ausencia del primer anticuerpo.

La expresión de CD44 fue analizada en forma semicuantitativa por recuento de células tumorales positivas por campo (aumento en 400x). Se consideró como marcación positiva la tinción sobre la membrana plasmática del soma celular. Los tumores fueron clasificados según el porcentaje de células positivas por campo:

- ◆ (-) <10%
- ◆ (+) 10-50%
- ◆ (++) 50-70%
- ◆ (+++) > 70%

Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue hecho en colaboración con la Dra. E. Matos del Instituto “A.H.Roffo”. La asociación entre la expresión CD44 y otros parámetros clínicos se evaluó mediante el test Chi-cuadrado y el test de ANOVA.

RESULTADOS

Se analizó la expresión de CD44s, v3, v4/5 y v6 en 57 tumores cerebrales. Dado que en el tejido nervioso normal CD44s se expresa débilmente en las prolongaciones celulares (Moretto y col., 1993), sólo aquellas células tumorales gliales que expresaban este antígeno sobre la membrana del soma celular fueron consideradas como positivas. Según este criterio, la tinción para CD44s fue observada con diferentes intensidades en los distintos tumores (Tabla 5.3), y también dentro de un mismo corte, revelando una marcada heterogeneidad.

Tabla 5.3: Distribución de los tumores según el porcentaje de células CD44s positivas.

Diagnóstico	Nº de casos según la expresión de CD44*				Total
	-	+	++	+++	
Ependimoma	-	-	-	5	5
Meduloblastoma	2	1	-	-	3
Astrocitoma de bajo grado	1	6	2	5 (35.7%)	14
Astrocitoma anaplásico	-	-	3	10 (76.9%)	13
Glioblastoma multiforme	-	2	1	19** (86.3%)	22

*clasificación:

- (-) <10%
- (+) 10-50%
- (++) 50-70%
- (+++) > 70%

(porcentaje de células positivas)

**p<0.03

Más del 70% (+++) de las células tumorales expresaban CD44s en el 35,7% (5/14) de los astrocitomas de bajo grado, en el 76,9% (10/13) de los astrocitomas anaplásicos, y en el 86.3% (19/22) de los glioblastomas multiformes (Tabla 5.3 y Fig. 5.1a, b y c). Estos resultados muestran que, en el grupo de tumores correspondiente a los astrocitomas, el aumento de la expresión de CD44s se asoció linealmente con el grado de malignidad, siendo el porcentaje más alto de casos positivos (+++, 86.3%) en los glioblastomas multiformes (Burger III) ($p < 0.03$). El análisis de otras variables como la edad y el sexo, no mostró una relación con el grado de expresión de CD44.

El escaso número de muestras en algunos de los grupos histológicos no permitió realizar un análisis detallado de la supervivencia. Sin embargo, como muestra la tabla 5.4, no se observó relación entre el número de pacientes vivos hasta el año 1995 y la expresión de CD44. Asimismo, tampoco se observó relación entre la expresión de CD44 y los meses de supervivencia en estos pacientes (tabla 5.5). En el grupo de glioblastomas por ejemplo, todos los pacientes presentaron igual tiempo de supervivencia, independientemente del grado de expresión de CD44s en el tumor primario.

Tabla 5.4: Supervivencia global de los pacientes según el tipo histológico y el grado de expresión de CD44

Diagnóstico	Supervivencia según la expresión de CD44*			
	-	+	++	+++
Ependimomas				2/5**
Meduloblastomas	1/2			
Astrocitomas de bajo grado	1/1	1/5	0/2	2/5
Astrocitomas anaplásicos			1/3	5/10
Glioblastomas		0/2	0/1	0/19

*ver tabla 5.3

**se expresa como número de pacientes vivos sobre número total (supervivencia global hasta el año 1995)

Tabla 5.5: Tiempo de sobrevida global de los pacientes según el tipo histológico y el grado de expresión de CD44

Diagnóstico	estado#	Tiempo de sobrevida según la expresión de CD44*			
		-	+	++	+++
Ependimomas	vivos				66(68-64)**
	fallecidos				14(12-45)
Meduloblastomas	vivos	68(68)			
	fallecidos	23(23)	10(10)		
Astrocitomas de bajo grado	vivos	29(29)	33(33)		29(25-34)
	fallecidos		27(9-35)	35(23-48)	28(12-42)
Astrocitomas anaplásicos	vivos			50(50)	29(26-56)
	fallecidos			14(14)	20(6-48)
Glioblastomas	vivos				
	fallecidos		13(13-14)	16(16)	15(5-24)

*ver tabla 5.3

**mediana y rango de la sobrevida global en meses hasta el año 1995

#se indica si los pacientes estaban vivos o fallecidos hasta 1995

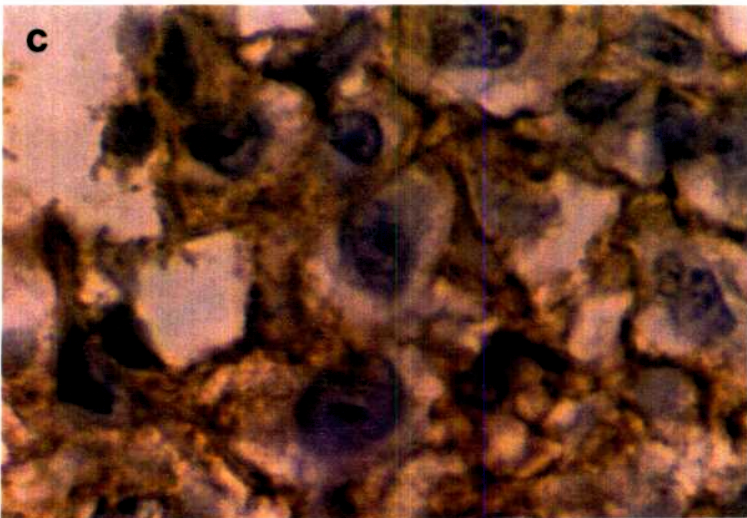
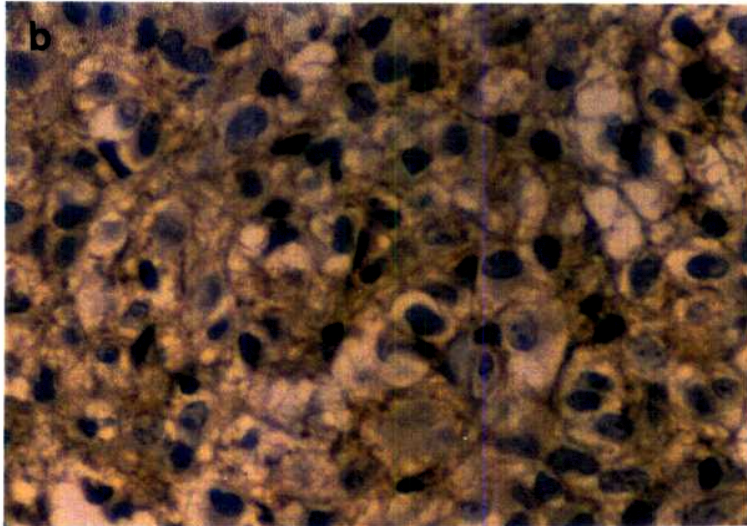
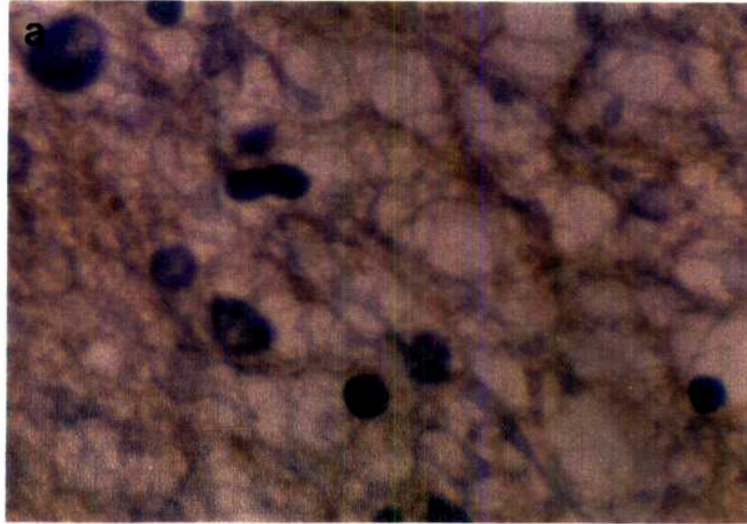
Los tumores que no están incluidos en la clasificación de Burger (ependimomas y meduloblastomas), presentaron un comportamiento diferente. Todos los endimomas analizados (5/5), tumores de bajo grado de malignidad, mostraron alta expresión de CD44s, mientras que el 100% de los meduloblastomas (3/3), tumores indiferenciados y altamente agresivos, presentaron nula o escasa tinción (dos casos negativos y uno con menos del 50% de células positivas por campo) (Fig. 5.1 d y e).

Las prolongaciones citoplasmáticas de células gliales presentaron tinción positiva leve para CD44, tanto en el tejido peritumoral normal como en los tumores (Burger grado I)(Fig.5.1 f).

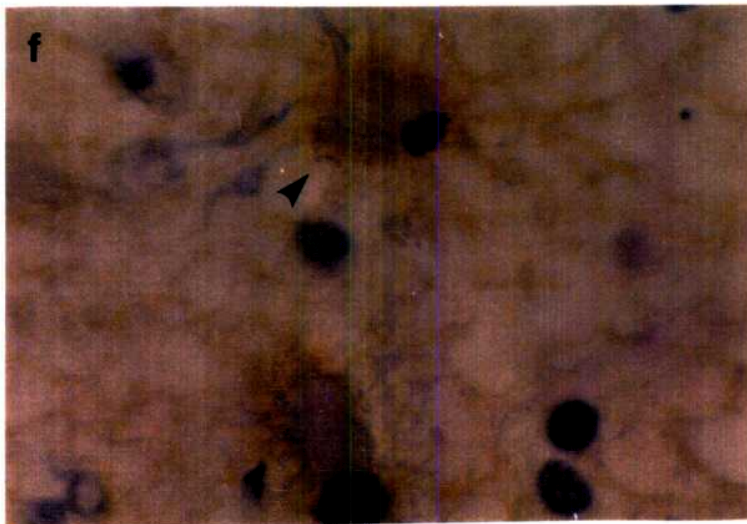
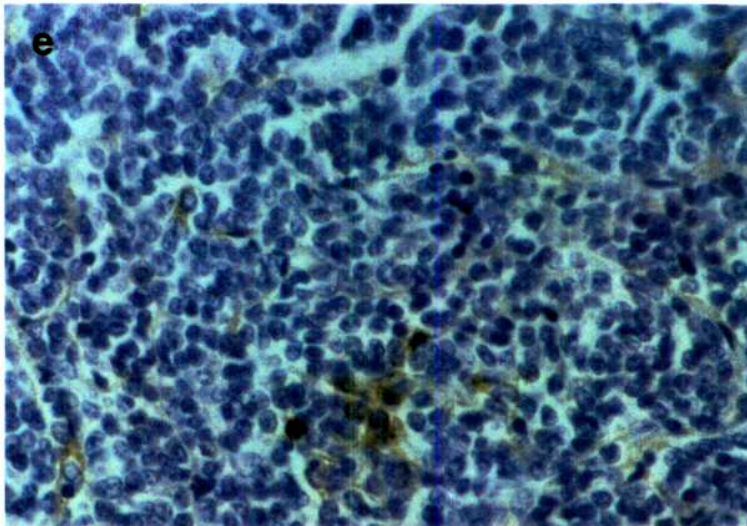
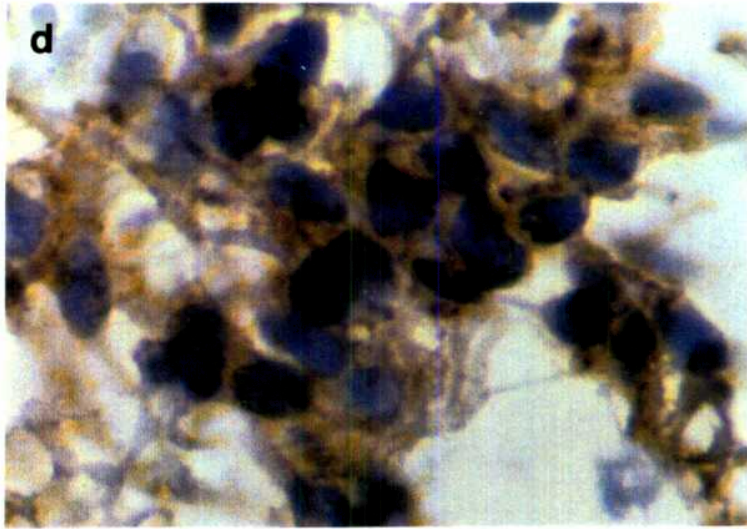
El análisis inmunohistoquímico para las variantes v3, v4/5 y v6 de CD44 no mostró tinción positiva para ninguna de ellas en los 57 casos estudiados (datos no mostrados).

Figura 5.1: Expresión de CD44s en cortes histológicos de tumores de cerebro. Tinción por IHQ.

- a) Astrocitoma de bajo grado (Burger I, +): tumores con alto grado de diferenciación, cuya organización histoarquitectural se asemeja a la corteza cerebral normal. Se observa que la mayor parte de las células tumorales no presentan marcación a nivel de la membrana plasmática (200x)
- b) Astrocitoma anaplásico (Burger II, ++): obsérvese una alta tinción de la membrana plasmática de las células tumorales (200x)
- c) Glioblastoma multiforme (Burger III, +++): puede observarse tinción positiva en más del 90% de los astrocitos malignos (400x)
- d) Ependimoma: obsérvese una alta expresión de CD44 en casi la totalidad de las células tumorales (400x)
- e) Meduloblastoma: la expresión de CD44 en estos tumores fue prácticamente nula. En la foto puede observarse una débil tinción en algunos grupos celulares (400x).
- f) Tejido normal peritumoral: La flecha indica un astrocito con tinción en sus prolongaciones citoplasmáticas (400x). También pudo observarse leve positividad a nivel de membrana del soma celular.



c



DISCUSION

Los tumores neurogliales o gliomas derivan de células neuroectodérmicas, siendo los astrocitomas la variante clínica más importante. Los astrocitomas constituyen el 80% de los tumores cerebrales primarios del adulto. Estos tumores exhiben diferentes grados de agresividad, desde astrocitoma de bajo grado (grado I de Burger) hasta glioblastoma multiforme (grado III de Burger). Los tumores del SNC raramente metastatizan pero son altamente invasivos.

La invasión tumoral está mediada, en parte, por la interacción de las células con la MEC, siendo el AH uno de los principales componentes del parénquima cerebral y CD44, su receptor. Merzak y col. (1994) demostraron que CD44 jugaría un importante rol en la adhesión e invasión in vitro de líneas celulares de glioma humano. En algunos tumores humanos, ha sido demostrado que la expresión de CD44s o sus variantes podría correlacionarse con la capacidad invasiva o la diferenciación celular (Seelentag y col., 1996; Guriec y col., 1997; Friedrichs y col., 1995). La bibliografía que avala el valor de CD44 como marcador pronóstico en tumores humanos es escasa (Penno y col., 1994; Mulder y col., 1994; Wielenga y col., 1993). Su rol como marcador en tumores humanos de cerebro aún no ha sido demostrado. Sin embargo, en neuroblastomas (tumores de estirpe neuronal), la ausencia de expresión de CD44 se correlaciona con la sobreexpresión del oncogen N-myc y por lo tanto, con mal pronóstico (Christiansen y col., 1995; Combaret y col., 1995; Gross y col., 1995; Terpe y col., 1995).

En el tejido nervioso normal, CD44s se expresa principalmente en la sustancia blanca, con predominio en astrocitos perivasculares, mientras que la glia cortical es negativa (Flanagan y col., 1989; Picker y col., 1989; Nagasaka y col., 1995). En estos trabajos los autores no detectan expresión de variantes de CD44 en cortes de tejido nervioso normal.

En el presente trabajo hemos evaluado por IHQ, la expresión de CD44s y cuatro variantes (v3, v4/5, v6) en 57 tumores cerebrales. En coincidencia con lo reportado por otros autores (Nagasaka y col., 1995; Frank y col., 1996; Kuppner y col., 1992), CD44s es la isoforma predominante que se expresa en tumores primarios neurogliales. En el grupo de tumores comprendido por astrocitomas de bajo grado, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas multiformes, la sobreexpresión de CD44s se correlacionó linealmente con el grado de agresividad de estos tumores (clasificación de Burger). Todos los gliomas analizados resultaron negativos para la expresión de las variantes. Esta observación podría explicarse por las evidencias que demuestran que CD44s, y no sus variantes, es el principal receptor para el AH, y que el AH es el principal componente de la MEC en el SNC (Lesley y col., 1992; Asher y col., 1991; Bignami y col., 1992). Así, una sobreexpresión de CD44s favorecería la interacción de la célula tumoral con un entorno rico en AH.

Los tumores analizados que no entran en la clasificación de Burger, como ependimomas y meduloblastomas, mostraron un comportamiento diferente en lo que refiere a la expresión de CD44s. Nuestros resultados muestran que todos los ependimomas (5/5), tumores de bajo grado de agresividad, expresaron altos niveles (>70% de células positivas por campo) de CD44s. En cambio, los meduloblastomas (3/3),

tumores altamente agresivos, mostraron muy baja expresión de esta molécula (dos casos negativos y uno con menos del 50% de células positivas por campo). Tampoco se detectó expresión de las variantes en estos dos tipos de tumores. En coincidencia con nuestros resultados, otros autores (Frank y col., 1996) han demostrado expresión de CD44s en 4/5 ependimomas. En cambio, Nagasaka y col. (1995) mediante el análisis a través de RT-PCR, altamente sensible, encontraron expresión del mRNA CD44s en 7/7 meduloblastomas. En estos dos trabajos, tanto el análisis por IHQ como por RT-PCR resultaron negativos para la expresión de variantes de CD44 en ambos tipos tumorales, al igual que la serie de tumores evaluados en esta Tesis.

Desde el punto de vista histológico la clasificación de Burger es un indicador del grado de malignidad de los tumores neurogliales, y se relaciona con la sobrevida. En nuestro trabajo hemos demostrado una significativa asociación lineal entre el aumento de la expresión de CD44 y el grado de malignidad según Burger. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el grado de expresión de CD44 no tendría valor pronóstico, ya que no encontramos relación entre este parámetro y la sobrevida de los casos estudiados.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la forma estándar de CD44 tendría un importante rol en el desarrollo de tumores primarios de origen glial.

Agradecimientos:

Se agradece la colaboración de las Dras. E. Matos, L. Puricelli y S. Ranuncolo, del Instituto "A.H.Roffo", y A. Morandi, G. Pallota y M. Varela del Hospital Italiano, en este capítulo de la Tesis.



TERCERA PARTE

Discusión y Conclusiones Generales



Capítulo 6

Capítulo 6

Discusión General

CD44 es una glicoproteína presente en la superficie celular, cuyo principal ligando es el ácido hialurónico. La forma más abundante es la estándar (CD44s), pero existen variantes (CD44v) de mayor peso molecular debido al splicing alternativo de 10 exones presentes en su gen. Inicialmente fue descrita en linfocitos como molécula mediadora de la adhesión linfocito-endotelio. A partir de un trabajo demostrando que la variante v6 podía conferir capacidad metastásica al ser transfectada en células tumorales no metastásicas (Gunthert y col., 1991), muchas evidencias experimentales han sido presentadas referidas a la participación de CD44 en el proceso tumorigénico y metastásico.

En el presente trabajo de tesis hemos estudiado la expresión y el rol de CD44, en un modelo tumoral mamario murino que ya había sido estudiado para otras características relacionadas con el proceso de diseminación tumoral (Alonso y col., 1996).

Tomando las células NMuMG (mamarias normales) como control positivo de la expresión de CD44, se realizó un análisis preliminar en las líneas celulares tumorales F3II, LM3 y LMM3. Los resultados mostraron que los niveles de expresión de esta molécula eran más altos en las células F3II, comparadas con las demás líneas, tanto en cultivos in vitro como en tumores crecidos en forma subcutánea por inoculación de las mismas.

Estos resultados nos permitieron seleccionar esta línea celular para focalizar nuestra investigación sobre CD44.

Por análisis densitométrico de WB, observamos, que la línea celular F3II expresaba una banda principal de 80 kDa coincidente con el peso molecular correspondiente a CD44s. También se detectaron productos de mayor peso molecular, indicando la presencia de variantes de CD44.

La capacidad de moverse a través del sustrato es de fundamental importancia para la célula tumoral, ya que le facilitará la colonización de sitios distantes del tumor primario. La motilidad depende de una serie encadenada de eventos que se llevan a cabo por la cooperación coordinada de distintas moléculas, entre ellas, los receptores de adhesión (Gumbiner, 1996).

La expresión y funcionalidad de CD44 ha sido poco estudiada en modelos tumorales murinos de estirpe mamaria. En el desarrollo de este plan de Tesis comenzamos estudiando la *funcionalidad* de CD44 in vitro, en células mamarias murinas, durante diferentes etapas del proceso metastásico, en las cuales la motilidad celular es un evento crítico. El tratamiento de las células F3II con un anticuerpo monoclonal (KM201), que reconoce la forma estándar y las variantes de CD44, e interactúa con el sitio de binding de CD44 a su ligando (Miyake y col., 1990; Zheng y col, 1995), bloqueó en forma parcial, distintas etapas de la cascada metastásica, como adhesión, spreading, migración e invasión.

Ha sido descripto, en algunos modelos, que el tratamiento con ésteres de forbol, como el PMA, o con anticuerpos específicos, son capaces de modular la funcionalidad de CD44, modificando la afinidad de esta

molécula por su ligando, el AH (Lesley y col., 1990 y 1992). A este fenómeno se lo denominó “activación”. Hemos estudiado la capacidad de adhesión de células F3II a AH, a través de su receptor específico CD44. Nuestros estudios revelaron que las células F3II expresan la forma *activable* de CD44 ya que, mediante el tratamiento de cultivos de células F3II con PMA, se observó un significativo aumento de la adhesión de células F3II a AH, indicando la activación del receptor CD44. Además, el tratamiento de células F3II con anti-CD44 inhibió en forma altamente significativa la adhesión a placas de cultivo tratadas o no con AH.

El paso siguiente a la adhesión es la extensión sobre el sustrato o spreading. Durante el spreading la célula emite proyecciones como lamelipodios y/o filopodios. En los procesos de adhesión y extensión sobre el sustrato la célula establece puntos de contacto a través de los receptores localizados en la membrana celular, que sirven de nexo entre el espacio extracelular y el citoesqueleto (Hao Lo y Bo Chen, 1994; Gumbiner, 1996). Si bien algunos autores han demostrado que CD44 participa en la adhesión celular (Merzak y col., 1994; Bartolazzi y col., 1994), su rol durante el spreading de células tumorales no ha sido descrito. Por tratamiento con un anti-CD44 monoclonal hemos verificado una significativa inhibición del proceso de spreading de células F3II. Se ha descrito que CD44 interactúa con proteínas intracelulares asociadas al citoesqueleto (Lokeshwar y col., 1992; Bourguignon y col., 1993; Tsukita y col., 1994). Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de CD44, con un anticuerpo específico, estaría alterando la señal derivada de este receptor durante el spreading, anulando este proceso.

Analizamos también, por ICQ, la cinética de la *expresión* y de la *localización* celular de CD44 durante el proceso de extensión de la célula sobre el sustrato. En las etapas tempranas del spreading, CD44 se localizó sobre la membrana plasmática en forma de bandas continuas, con predominio en los bordes anteriores o de avance de la célula. En estadios más avanzados del spreading, la señal de CD44 se visualizó en zonas de la membrana celular comprendidas entre extensiones celulares, como lamelipodios o filopodios, pero nunca se detectó expresión de esta molécula en las propias extensiones celulares. La tinción para CD44 no mostró un patrón de distribución compatible con localización en estructuras del tipo contacto focal.

Algunos autores han descrito la participación de CD44 durante la migración e invasión de células de melanoma (Faasen y col., 1992; Thomas y col., 1992). Dado que el modelo tumoral mamario murino F3II es altamente invasivo y metastásico (Alonso y col., 1996), hemos evaluado si un anticuerpo anti-CD44 sería capaz de afectar los procesos de migración e invasión *in vitro*. El anticuerpo monoclonal KM201 inhibió en forma significativa tanto la migración como la invasión *in vitro* de células F3II. En los ensayos de migración, usamos además, un anticuerpo anti-uPA como control positivo de inhibición de la migración. El efecto del co-tratamiento de células F3II con anti-CD44 y anti-uPA fue aditivo sobre la inhibición del proceso de migración, sugiriendo una cooperación funcional entre estas dos moléculas.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos podríamos afirmar que CD44 tendría una importante participación en la *diseminación* tumoral de las células F3II, derivadas de un tumor mamario, favoreciendo así el proceso metastásico.

Al analizar la expresión de CD44 en metástasis pulmonares, hemos observado una marcada disminución de la expresión de esta molécula (datos no mostrados). Estos resultados darían lugar varias interpretaciones. Podríamos hipotetizar que la regulación de la expresión endógena de CD44 estaría modulada por la funcionalidad de la molécula en un momento determinado de la cascada metastásica. Por ejemplo, una vez establecido el foco secundario en el órgano blanco, CD44 cumpliría un rol menos preponderante que estaría asociado a la disminución de su expresión. Como segunda posibilidad podríamos pensar que el microambiente ejercería algún tipo de modulación sobre la expresión de CD44; tal es así que los tumores F3II subcutáneos presentan altos niveles de expresión, mientras que al crecer en forma peritoneal dicha expresión es prácticamente nula. Algunos autores han descrito la influencia que puede ejercer la composición de la MEC sobre la regulación de la actividad celular (Schnaper y Kleinman, 1993). Estos mismos autores han postulado que, en teoría, todas las proteínas componentes de la MEC serían capaces de generar señales que alteren la actividad celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la interacción de células con matrices de colágeno es capaz de regular la actividad transcripcional en forma específica (Di Persio y col., 1991). Otros trabajos han descrito que la síntesis y secreción de proteínas de la leche en líneas celulares mamarias murinas epiteliales normales estaría regulada no sólo por la presencia de hormonas lactogénicas, sino también por la composición de la MEC sobre

la cual fueron cultivadas (Li y col., 1987; Chen y col., 1987). Estas evidencias experimentales nos permiten hipotetizar que pequeñas diferencias en la composición del microambiente tisular que rodea a la célula tumoral (por ejemplo F3II), en este caso peritoneo o zona subcutánea o pulmón, podrían ser determinantes de la síntesis y expresión de CD44.

Como se describió anteriormente, el tratamiento de cultivos de células F3II con anti-CD44 y anti-uPA en forma conjunta, produce una significativa inhibición de la migración celular en cámaras Transwell. Estos resultados estarían indicando una cooperación funcional entre CD44 y uPA. La interacción del uPA con su receptor uPAR sobre la membrana plasmática, facilita la activación del plasminógeno unido a membrana (Ellis y col., 1991). Varios autores han demostrado que el uPA participa en la degradación de los componentes de la MEC (Dano y col., 1985; Stahl y Mueller, 1994). Además, en diferentes modelos, ha sido descrita la asociación entre el uPAR y otras moléculas, como el receptor tipo C3 del complemento (Kindzelskii y col., 1996; Sitrin y col., 1996), la integrina $\beta 2$ y la quinasa Src (Bohuslav y col., 1995), o las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ (Xue y col., 1997). En el este trabajo de Tesis, por técnicas de inmunoprecipitación, hemos demostrado por primera vez, que habría un asociación de tipo física entre CD44 y el uPA en células F3II. Nuestros resultados sugieren que esta proximidad entre ambas moléculas sería un mecanismo que facilitaría una acción sinérgica focalizando la actividad proteolítica en los puntos de migración de células F3II sobre el sustrato. En un trabajo previo se demostró que las células F3II presentan una alta actividad de uPA unida a membrana (Alonso y col., 1996), y dado que el uPA es activado en forma más eficiente por unión a su receptor, nuestros

resultados sugieren un probable nexo entre CD44 y el complejo uPA-uPAR.

Hemos estudiado también las *vías de transducción de señales* que participarían en la regulación de la expresión de CD44 en células F3II. Conociendo las vías de señalización que regulan la sobreexpresión de ciertas moléculas involucradas en los procesos de invasión y metástasis (Aguirre Ghiso y col., 1997), hemos utilizado un enfoque farmacológico tomando como target las señales intracelulares. La interacción de las células tumorales con componentes de la MEC es crítica a lo largo de toda la cascada metastásica (Juliano, 1994; Brodt, 1996), e involucra procesos dinámicos de reorganización del citoesqueleto. Este ensamblaje y desensamblaje de proteínas requiere la activación de vías de señales que lleven la información al núcleo donde será procesada (Hao Lo y Bo Chen, 1994). La PKC está presente en contactos focales y su activación se correlacionó con la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (Fak) durante la adhesión y el spreading, y la adhesión dependiente de integrinas está también conectada con la PKC (Vuori y Ruoslahti, 1993). También ha sido descrita la participación de PKC como modulador de la adhesión de células tumorales a la MEC y a la vasculatura (Herbert y col. 1991). Por otro lado, se ha demostrado, en líneas celulares fibroblásticas, que la polimerización de actina está regulada por la PLD, que hidroliza fosfatidilcolina resultando en la producción de ácido fosfatídico y diacilglicerol (DAG) (Exton, 1994). A su vez, el DAG es capaz de activar la PKC (Kishimoto y col., 1980). El PMA es un activador específico de la PKC y además es capaz de modular la afinidad de CD44 por el AH, como se describió anteriormente. En este trabajo hemos observado que el PMA es también capaz de inducir un significativo aumento de la expresión de

CD44 en células F3II *in vitro*. En forma similar, el tratamiento con PA, producto de la degradación de fosfatidilcolina mediada por PLD, también fue capaz de aumentar la expresión de este receptor. Cuando los cultivos fueron tratados con H7, un inhibidor específico de PKC, o con una combinación de PMA/H7, se observó una disminución de la expresión. En forma similar, al tratar las células F3II con propranolol, inhibidor de la conversión de PA a DAG mediada por AFF, se observó un significativo descenso de los niveles de expresión de CD44. Estos resultados sugieren que la PKC y la PLD participarían en la vía de señales que regulan la expresión de CD44 en células F3II.

Como se mencionó en la introducción, existen varias isoformas de PKC, según los requerimientos de Ca^{++} y/o DAG para su activación. Ha sido descrito que el EGF, por unión a su receptor, es capaz de activar las isoformas clásicas y nuevas de PKC, además de movilizar el calcio intracelular (Blobe y col., 1994). Por otro lado, Zhang y col. (1996), demostraron que el EGF es capaz de estimular la expresión de CD44 en células murinas derivadas de NIH 3T3. Nuestros resultados han demostrado que, en este modelo tumoral, EGF no modula la expresión de CD44. Sin embargo, en un trabajo anterior, se había observado que EGF era capaz de estimular la expresión de otras moléculas en cultivos de células F3II (Aguirre Ghiso y col., 1997b). Dado que la sobreexpresión de CD44 en este modelo responde al estímulo de PMA pero no al de EGF, nuestros resultados indicarían que la sobreexpresión de CD44 en células F3II estaría mediada por una isoforma de PKC no dependiente de Ca^{++} , pero dependiente de DAG para su activación y, por lo tanto, sensible a la estimulación con PMA.

Como hemos mencionado en el capítulo 3, en un estudio colaborativo con el Dr. Foster (USA), hemos profundizado, en otro modelo experimental, nuestro estudio sobre las vías de señales que regulan la expresión de CD44. En líneas celulares derivadas de NIH 3T3, cotransfectadas con los oncogenes v-ras o v-src y una mutante negativa de la GTPasa RalA, se estudió la expresión de distintas moléculas, entre ellas, CD44. Nuestros resultados indican que la GTPasa RalA estaría mediando las vías de señales que llevan a la activación de la PLD1 dependiente de los oncogenes Ras y Src, que participan en la regulación de la expresión de CD44.

Finalmente, analizamos la expresión de CD44 en tumores humanos de cerebro. Algunos grupos de investigación han analizado la expresión de CD44s y CD44v en tumores primario de cerebro y en metástasis cerebrales. Las conclusiones de estos trabajos han remarcado la importancia de la expresión de las variantes en las metástasis cerebrales (cuyos tumores primarios se encontraban en otros órganos), y su valor como potencial marcador de diagnóstico diferencial en pacientes con metástasis en cerebro (Nagasaka y col., 1995; Frank y col., 1996).

Nuestros resultados mostraron que la expresión de CD44s se correlacionó en forma lineal con el grado de agresividad de tumores gliales. No se detectó expresión de variantes de CD44 en ninguno de los tumores analizados. El resultado de nuestro análisis, sugiere que la sobreexpresión de CD44s sería necesaria en la iniciación y el desarrollo de tumores humanos de origen neuroglial, pero no tendría influencia en el pronóstico del paciente evaluado en etapas más avanzadas.

A lo largo de este trabajo de tesis hemos citado trabajos de otros autores que avalan la participación de CD44 en la biología tumoral. Sin embargo, el rol de este receptor en el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica varía según el modelo experimental estudiado. Por ejemplo, el aumento en el número de metástasis ha sido correlacionado con mayor expresión de CD44s por Birch y col.(1991) mientras que Gao y col. (1997) correlacionan este aumento con una menor expresión de CD44s. Por otro lado, Bartolazzi y col. (1994) demostraron que el tratamiento con anti-CD44 es capaz de inhibir el desarrollo tumoral, mientras que Strobel y col. (1997), trabajando en un modelo diferente, demostraron que anticuerpos anti-CD44 podían inhibir la implantación de células tumorales en el peritoneo pero no inhibían el crecimiento del tumor. También es interesante mencionar los resultados de Ota y col. (1995) demostrando que células de melanoma tratadas con anti-CD44 aumentaban su capacidad metastásica al ser inoculadas en ratones.

Toda la extensa bibliografía publicada hasta la fecha sobre CD44, demuestra que es una molécula multifuncional cuyo rol específico es difícil de predecir y, por lo tanto, es importante estudiarla en los diferentes modelos experimentales.



Capítulo 7

CAPITULO 7

Conclusiones Generales

La metástasis, o diseminación de células tumorales hacia sitios distantes en el cuerpo, hace del cáncer una enfermedad letal. La cascada metastásica es un proceso complejo que se cumple por etapas, en el cual intervienen múltiples factores. Sería difícil pensar que la neutralización de uno de ellos, como CD44 por ejemplo, fuera capaz de anular todo el proceso, ya que las ventajas adaptativas que adquiere una célula tumoral, no están confinadas a una sola molécula. Sin embargo, CD44 es capaz de satisfacer parte de los requerimientos de una célula metastásica para cumplir exitosamente todas las etapas de la cascada.

En nuestro laboratorio, usando como modelo tumores espontáneos transplantables y líneas celulares tumorales de ellos derivadas, se han analizado algunas de las distintas moléculas que participan en el proceso metastásico, como metaloproteasas, uPA, fibronectina, heparinas, entre otras.

A lo largo de este trabajo de Tesis nuestros resultados han aportado nuevos conocimientos acerca del rol de CD44 en el proceso de diseminación tumoral usando como modelo la línea celular F3II derivada de un tumor mamario murino, que fue obtenida e inicialmente caracterizada por el Dr. Alonso. Esta línea celular presenta ciertas características, como alta invasividad local y capacidad metastásica, que hacen de ella un modelo interesante para el estudio del proceso de diseminación tumoral. Nuestras evidencias experimentales han demostrado que CD44 es una de las moléculas que tiene activa

participación, junto a los otros factores, en el comportamiento invasivo y metastásico de células F3II.

En las siguientes conclusiones presentamos una síntesis del aporte de esta Tesis para dilucidar el papel de CD44 en el proceso metastásico :

- En coincidencia con lo reportado en otros modelos experimentales, hemos demostrado que CD44 cumple un activo rol durante los procesos de *adhesión, migración e invasión* de células tumorales mamarias murinas.
- Hemos estudiado por primera vez, según nuestro conocimiento, la función de CD44 durante el proceso de *spreading* de células tumorales, analizando además la cinética de localización de este receptor a lo largo de dicho proceso.
- El hallazgo de una *vinculación espacial y funcional* entre CD44 y el uPA, también contribuye de manera novedosa al conocimiento de la biología de la progresión tumoral.
- También hemos aportado nuevos conocimientos acerca de las *vías de señalización* que estarían regulando la expresión de esta molécula en células tumorales mamarias murinas.
- Finalmente, en un trabajo colaborativo con el Hospital Italiano, hemos evaluado la expresión de CD44 en tumores humanos primarios del SNC. Nuestro aporte al conocimiento de la expresión y función de CD44s en tumores de origen glial, indicaría una evidente asociación entre la alta expresión de CD44s y el grado de malignidad en estos tumores, sugiriendo la participación de CD44 en la *progresión maligna* de los mismos.

Referencias

Agrez, M., Bates, R., Boyd, A. and Barns, G. (1991). Arg-Gly-Asp containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts. Implications for wound healing. *Cell Regul.* 12,1035-1044.

Aguirre Ghiso, J., Farías, E., Alonso, D., Arregui, C. and Bal de Kier Joffé, E. (1997a). A phospholipase D and protein kinase C inhibitor blocks the spreading of murine mammary adenocarcinoma cells altering f-actin and $\beta 1$ -integrin point contact distribution. *Int. J. Cancer.* 71; 881-890.

Aguirre Ghiso, J., Alonso, D., Farías, E. and Bal de Kier Joffé, E. (1997b). Overproduction of urokinase-type plasminogen activator is regulated by phospholipase D- and protein kinase C-dependent pathways in murine mammary adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1356,171-184.

Aguirre Ghiso, J., Diament, M., Delia, I., Bal de Kier Joffé, E., Klein, S. (1997c). Effects of in vivo culture of murine mammary adenocarcinoma cells on tumor and metastatic growth. *Tumor Biology* 18,41-52.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. (1994). *The molecular biology of the cell*, N.Y. and London (3rd. ed.).

Alho, A. and Underhill, C. (1989) The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cell. *J. Cell Biol.* 108,1557-1565.

Alonso, D., Fariás, E. and Bal de Kier Joffé, E. (1994). Urokinase-type plasminogen activator activity released by clonal tumor cell populations isolated during the growth of a murine mammary adenocarcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 13(3), 211-216.

Alonso, D., Fariás, E., Urtreger, A., Ladedá, V., Vidal, M. and Bal de Kier Joffé, E. (1996) Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J. Surg. Oncology*, 62, 288-297.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. and Seed, B. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, 61, 1303-1313.

Asha Nair, S., Kannan, S., Lakshmi, M., Krishnan Nair, M. and Radharkrishna Pillai, M. (1994). The basement membrane and its role in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 13,195-204.

Asher, R., Perides, G., Vanderhaeghen, J. (1991). Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of an hyaluronate-protein complex. *J. Neurosci. Res.* 28,410-421.

Bal de Kier Joffé, E., Puricelli, L., Vidal, M. and Sacerdote de Lustig, E. (1983). Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2,151-160.

Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. and Stamenkovic, I. (1994). Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp. Med.* 180, 53-66.

Beck, H., Hunter, I. and Engel, J.(1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4,148-160.

Behrens, J. (1993). The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res. and Treatment* 24, 175-184.

Belloni, P. and Tressler, R. (1989/90). Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells. *Cancer Metas. Rev.* 8, 353-389.

Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M., Spring, J., Gallo, R. and Lose, E. (1992). Biology of syndescans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8,365-393.

Bertolotto, A., Gabriella, R. and Schiffer, D. (1990). Chondroitin 4-sulfate proteoglycan forms an extracellular network in human and rat central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 100,113-123.

Bignami, A. and Asher, R. (1992). Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 10,45-57.

Bigner, S. and Vogelstein, B. (1990). Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastomas. *Brain Pathol.* 1,12.

Birch, M., Mitchell, S. and Hart, Y. (1991). Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res.* 51, 6660-6667.

Bizik, J., Stephens, R., Grofova, M. and Vaheri, A. (1993). Binding of tissue-type plasminogen activator to human melanoma cells. *J. Cell Biochem.* 51,326-335.

Blasi, F., Conese, L., Moller, N., Pedersen, U., Cavallaro, M., Cubellis, M., Soria, M., Stopelli, D., Tallarico, T., Teesalu. (1994). The urokinase receptor: structure, regulation and inhibitor-mediated internalization. *Fibrinolysis* 8,182-188.

Blobe, G., Obeid, M. and Hannun, Y. (1994). Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer and Metastasis Rev.* 13,411-431.

Blood, C. and Zetter, B. (1990) Tumore interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 89-118.

Boike, G., Lah, T., Sloane, B., Rozhin, J., Honn, K., Guirguis, R., Stracke, M., Liotta, L. and Schiffman, E. (1991). A possible role for cysteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumor cells. *Melanoma Res.* 1. 333-340.

Bohuslav, J., Horejsí, V., Hansmann, C., Stockl, J., Weidle, U., Majdic, O., Bartke, I., Knapp, W. and Stockinger, H. (1995). Urokinase plasminogen activator receptor, β 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J. Exp. Med.* 181,1381-1390.

Bourguignon, L., Kalomiris, E. and Lokeshwar, V. (1991). Acylation of the lymphoma transmembrane glycoprotein, GP85, may be required for GP85-ankyrin interaction. *J. Biol. Chem.* 266,11761-11765.

Bourguignon, L.Y.W., Jin, H., Iida, N., Brandt, N.R., and Zhang, S.H. (1993) The involvement of ankyrin in the regulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated internal Ca^{2+} release from Ca^{2+} storage vesicles in mouse T-lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 7290-7297.

Bourguignon, L.Y.W., Lokeshwar, B, Chen, X. and Kerrik, G. (1993) Hyaluronic acid (HA)-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP84/CD44)-cytoskeleton interaction. *J. Immunol.* 151, 6634-6644.

Boyd, D., Florent, G., Childress-Fields, K. and Brattain, M. (1988). Alteration in the behavior of a colon carcinoma cell line by extracellular matrix components. *Cancer Lett.* 41,81-90.

Brodts, P. (1996) Adhesion receptors and proteolytic mechanisms in cancer invasion and metastasis. In: P. Brodts (ed), *Cell adhesion and invasion in cancer metastasis*, pp.167-242. Landes, Austin and Springer, Berlin.

Brown, T., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E. and Carter, W. (1991). Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J. Cell Biol.* 113(1), 207-221.

Burgering, B. and Bos, J. (1995). Regulation of Ras-mediated signaling: more than one way to skin a cat. *TIBS* 20,18-22.

Burridge, K., Turner, C. and Romer, L. (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol.* 119,893-903.

Busso, N., Masur, S., Lazega, D., Waxman, S. and Ossowski, L. (1994). Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J. Cell Biol.* 126,259-270.

Cajot, J., Kruithof, E., Sordat, B., Bachmann, F. (1986). Plasminogen activators, plasminogen activator inhibitors and procoagulant analysed in twenty human tumour cell lines. *Int. J. Cancer* 38, 719-727.

Cairncross, J., Macdonald, D. and Ramsay, D. (1992). Aggressive oligodendroglioma: a chemosensitive tumor. *Neurosurgery* 31,78.

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257,7847-7851.

Chaudhry, A., Gobl, A., Eriksson, B., Skogseid, B. and Oberg, K. (1994) Different splice variants of CD44 are expressed in gastrinomas but not in other subtypes of endocrine pancreatic tumors. *Cancer Res.* 54,981-986.

Chen, L. and Bissell. (1987). Transferrin mRNA level in the mouse mammary gland is regulated by pregnancy and extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 262,17247-17250.

Christiansen, H., Sahin, K., Berthold, F., Hero, B., Terpe, H. and Lampert. (1995). Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer.* 31A (4),541-544.

Colombo, L., Bonaparte, Y., Klein, S. and Stillitani D'Elia, I. (1980). Selección in vivo de una línea tumoral con alta incidencia de metástasis pulmonares. *Medicina (Buenos Aires)* 40, 827-828.

Combaret, V., Lasset, C., Frappaz, D., Bouvier, R., Thiesse, P., Rebillard, A., Philip, R. and Favrot, M. (1995). Evaluation of CD44 prognostic value in neuroblastoma: comparison with the other prognostic factors. *Eur. J. Cancer* 31A(4), 545-549.

Culty, M., Miyake, K., Kincade,P., Silorski, E., Butcher, E.C. and Underhill, C. (1990). The Hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J.Cell Biol.* 111, 2765-2774.

Dano, K., Andreasen, P., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. and Skriver, L. (1985). Plasminogen activation, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44, 139-266.

David, G. (1993). Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *FASEB J.* 7,1023-1030.

De Clerck, Y. and Imren, S. (1994) Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer.* 30A, 2170-2180.

Denhardt, D., Feng, B., Edwards, D., Cocuzzi, E. and Maluankar, U. (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol. Ther.* 59, 329-341.

De Vita, V., Hellman, S. and Rosenberg, S. (1997). Cancer: principles and practice of oncology (5th.ed). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Di Persio, C., Jackson, D. and Zaret, D. (1991). The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. Cell Biol.* 11,4405-4414.

Dougherty, G., Cooper, D., Memory, J., and Chiu, R. (1994) Ligand binding specificity of alternatively spliced CD44 isoforms. *J. Biol. Chem.* 269,9074-9078.

Duggan, C., Maguire, T., McDermott, Ohiggins N., Fennely, J. and Duffy, M. (1995). uPA and uPAR in breast cancer. *Int. J. Cancer*. 61,597-600.

Dumont, J., Jones, W. and Bitonti, A. (1992). Inhibition of experimental metastasis and cell adhesion of B16F1 melanoma cells by inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res*. 52,1195-1200.

Elenius, K. and Jalkanen, M. (1994). Function of the syndecans: a family of cell surface proteoglycans. *J. Cell Sci*. 107,2975-2982.

Ellis, V., Behrendt, N., Dano, K. (1991) Plasminogen activation by receptor-bound urokinase: a kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J. Biol. Chem*. 266, 12752-12758.

Esko, J. (1991). Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Current. Biol*. 3,805-816.

Estreicher, A., Muhlhauser, J., Carpentier, J., Orci, L. and Vasalli, J. (1990). The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J. Cell Biol*. 111,783-792.

Ewing, J. (1928). *A Treatise on Tumors*, 3rd. edn. W.B.Saunders, Philadelphia.

Exton, J. (1994). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1212,26-42.

Faasen, A.E., Schrager, 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, I. and Hart, Y. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science.* 217, 998-1003.

Figdor, C., Van Kooyk, Y. and Keizer, G. (1990). On the mode of action of LFA-1. *Immunol. Today* 11,277-280.

Flanagan, B., Dalchau, R., Allen, A. (1989). Chemical composition and tissue distribution of the human CD44 glycoprotein. *Immunology* 67,167-175.

Foster, D. (1993) Intracellular signaling mediated by protein-tyrosine kinases: networking through phospholipid metabolism. *Cell Signaling* 5,389-399.

Fox, S., Fawcett, J., Jackson, D., Collins, I., Gatter, K., Harris, A., Gearing, A. and Simmons, D. (1994). Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res.* 54,4539-4546.

Francke, U., Foellmer, B. and Haynes, B. (1983). Chromosome mapping of human cell surface molecules: monoclonal anti-human lymphocyte antibodies 4F2, A3D8 and A1G3 define antigens controlled by different regions of chromosome 11. *Somatic Cell Mol.Genet.* 9,333.

Frank, S., Rihs, H., Stocker, W., Muller, J., Dumont, B., Baur, X., Schackert, H. and Schackert, G. (1996). Combined Detection of CD44 isoforms by exon-specific RT-PCR and immunohistochemistry in primary human brain tumors and brain metastases. *Biochem. Biophys. Res.* 222,794-801.

Friedl, P., Maaser, K., Klein, E., Niggemann, B., Krohne, G. and Zanker, K. (1997). Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrins and CD44. *Cancer Res.* 57,2061-2070.

Friedrichs, K., Franke, F., Lisboa, B., Kugler, G., Gille, I., Terpe, H., Holzels, F., Maass, H. and Gunthert, U. (1995). CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 55,5424-5433.

Frisch, S. and Werb, Z. (1989). Molecular biology of collagen degradation. In: Olsen, B., Nimni, M. (eds) *Collagen: molecular biology, vol IV*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 85-105.

Gao, A., Lou, W., Dong, J. and Isaacs, J. (1997). CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res.* 57,846-849.

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

Goldstein, L., Zhou, D., Picker, L., Minty, C., Bargatze, R., Ding, J. and Butcher, E. (1989). A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56, 1063-1072.

Goodfellow, P., Banting, G., Wiles, M., Tunnacliffe, A., Parker, M., Solomon, E., Dalchau, R. and Fabre, J. (1982). The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10-44-2, is on human chromosome 11. *Eur. J. Immunol.* 12, 659-663.

Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G., Kleinman, H., Robey, F. and Yamada, Y. (1987). Identification of an amino acid sequence in laminin modulating cell attachment, chemotaxis and receptor binding. *Cell* 48,989-996.

Griffioen, A., Coenen, M., Damen, C., Hellwig, S., van Weering, D., Vooy, W., Blijham, G. and Groenewegen, G. (1997). CD44 is involved in tumor angiogenesis: an activation antigen on human endothelial cells. *Blood* 90(3),1150-1159.

Gross, J., Moscatelli, D., Jaffe, E. and Rifkin, D. (1982). Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95, 974-981.

Gumbiner, B. (1993). Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11,551-564.

Gumbiner, B. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84,345-357.

Gunthert, V., Jofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Hausmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich P. (1991) A new variant glycoprotein of CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24.

Guo, Y., Liu, G., Wang, X., Jin, D., Wu, M., Ma, J. and Sy, M. (1994). Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res.* 54,422-426.

Guriec, N., Gairard, B., Marcellin, L., Caldéroni, H., Renaud, R., Wilk, A., Bergerat, J. and Oberling, F. (1997). Are CD44 spliced variants involved in human breast cancer metastasis? *Oncology Reports* 4,769-774.

Ha, K., Yeo, E. and Exton, J. (1994). Lysophosphatidic acid activation of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D and actin polymerization by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Biochem. J.* 303,55-59.

Haggerty, J., Bretton, R. and Milstone, M. (1992). Identification and characterization of a cell surface proteoglycan on keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 99,374-380.

Hao Lo, S. and Bo Chen, L. (1994) Focal adhesion as a signal transduction organelle. *Cancer Metast. Rev.* 13, 9-24.

Harn, H., Isola, N. and Cooper, D. (1991). The multispecific cell adhesion molecule CD44 is represented in reticulocyte cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1127-1134.

Hart, I., Goode, N. and Wilson, R. (1989) Molecular aspects of metastatic spread. *Biochem. Biophys. Acta* 989, 65-84.

Hascall, V., Calabro, A., Midura, R. and Yanashigita, M. (1994). Isolation and characterization of proteoglycans. *Meth. Enzym.* 230,390-417.

Hay, E. (1981). (Ed.) Cell Biology of extracellular matrix. New York: Plenum Press.

He, Q., Lesley, J., Hyman, R., Ishihara, K. and Kincade, P. (1992). Molecular isoforms of murine CD44 and evidence that the membrane proximal domain is not critical for hyaluronate recognition. *J. Cell Biol.* 119,1711-1719.

Henson, J., Schnitker, V., Correa, K., von Deimling, A., Fassbender, F., Xu, H., Benedict, W., Yandell, D. and Louis, D. (1994). The

retinoblastoma susceptibility (Rb) gene is involved in malignant progression of human astrocytomas. *Ann. Neurol.* 36,714.

Herbert, J. and Baffrand, J. (1991). Tumor cell adherence to cultured capillary endothelial cells is promoted by activators of protein kinase C. *Biochem. Pharmacol.* 42,163-170.

Herrlich, P., Zoller, M., Pals, S. and Ponta, H. (1993) CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol. Today* 14, 395-399.

Hobarth, K., Maier, U. and Marberger, M. (1992). Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer by mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. *Eur. Urol.* 21,206-210.

Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich, P., and Gunthert, U. (1991) CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.*, 51, 5292-5297.

Hofmann, M., Rudy, W., Gunthert, U., Zimmer, S., Zawadzki, V., Zoller, M., Lichtner, R., Herrlich, P. and Ponta, H. (1993). A link between ras and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastatic-specific variants of CD44 in CREF cells. *Cancer Res.* 53,1516-1521.

Holmgren, L., O'Reilly, M. and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* 1,149-153.

Horowitz, A., Duggan, K., Buck C. and Beckerle, M. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. *Nature* 320,531-533.

Horst, E., Meijer, C., Radaszkiewicz, T. and Pals, S. (1990) Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large cell lymphoma: expression of a lymphocytic homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/CD18), and ICAM-1 (CD54). *Leukemia*, 4, 595-599.

Humphries, M., Olden, K. and Yamada, K. (1986). A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233, 467-470.

Iida, N., Gunja-Smith, Z., Zhu, H., Young, L., Cardiff, R. and Bourguignon, L. (1997) CD44v3 containing isoform is responsible for vascular endothelial growth factors (VEGF) binding, membrane-cytoskeleton interaction, and matrix metalloproteinases (MMP-9) activation in metastatic breast tumor cells. *Proc. of the AACR* 38,532.

Jackson, D., Buckley, J. and Bell, J. (1992) Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 267, 4732-4739.

Jalnik, K., Hordijk, P., Moolenaar, W. (1994). Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochem. Biophys. Acta* 1198, 185-196.

Jamal, H., Cano-Gauchi, D., Buick R. and Filmus, J. (1994). Activated ras and src induce CD44 overexpression in rat intestinal epithelial cells. *Oncogene* 9, 417-423.

James, C., He, J., Carlblom, E., Mikkelsen, T., Ridderheim, P., Cavenee, W. and Collins, V. (1990). Loss of genetic information in central nervous system tumors common to children and young adults. *Genes Chromosom. Cancer* 2,94.

Janicke, F., Schmidt, M., Hollrieder, A., Babic, R., Ulm, K., Gossner, W. and Graeff, H. (1990). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 4, 69-78.

Jiang, Y., Song, J., Zang, Q. and Foster, D. (1994). Phosphatidylcholine-specific phospholipase D activity is elevated in v-Fps- transformed cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 203(2),1195-1203.

Jiang, H., Lu, Z., Luo, J., Wolfman, A. and Foster, D. (1995) Ras mediates the activation of phospholipase D by v-src. *J. Biol. Chem.* 270; 6006-6009.

Jiang, H., Lu, Z., Zang, Q. and Foster, D. (1996). Regulation of phosphatidic acid phosphohydrolase by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 271,29529-29532.

John-Challiss, R., Wikes, L., Patel, V., Purkiss, J. and Boarder, M. (1993). Phospholipase D activation regulates endothelin-1 stimulation of

phosphoinositide-specific phospholipase C in Sk-N-MC cells. *FASEB Lett.* 2,157-160.

Jones, L., Ella, K., Bradshaw, C., Gause, K., Dey, M., Wisheart-Johnson, A., Spivey, E. and Meier, K. (1994) Activation of mitogen-activated protein kinases and phospholipase D in A7r5 vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269,23790-23799.

Juliano, R. (1994) Signal transduction by integrins and its role in the regulation of tumor growth. *Cancer Metast. Rev.* 13, 25-30.

Kalomiris, E.L., and Bourguignon, L.Y.W. (1989) Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein, GP85 and may function in GP85-ankyrin binding. *J. Biol. Chem.* 264, 8113-8119.

Kanemoto, T., Reich, R., Royce, L., Grotorex, D., Adler, S., Shiraishi, N., Martin, G., Yamada, Y. and Kleinman, H. (1990). Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87,2279-2283.

Kaufmann, M., Heider, K., Sinn, H., von Minckwitz, G., Ponta, H. and Herrlich, P. (1995). CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 345,615-619.

Keren, Z. and Le Grue, S. (1988). Identification of cell surface cathepsin B-like activity on murine melanomas and fibrosarcomas: modulation by butanol treatment. *Cancer Res.* 48,1416-1421.

Kibbey, M., Grant, D. and Kleinman, H. (1992). Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: an in vivo Matrigel model. *J. Natl. Cancer Inst.* 84,1633-1638.

Kindzelskii, A., Laska, A., Todd, R. and Petty, H. (1996). Urokinase-type plasminogen activator receptor reversibly dissociates from complement receptor type 3 (α m β 2, CD11b/CD18) during neutrophil polarization. *J. Immunol.* 156,297-309.

Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255,2273-2276.

Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60,443-475.

Knudson, W., Biswas, C. and Toole, P. (1984) Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6767-6771.

Knudson, W., Biswas, C., Li, X., Nemeč, R. and Toole, B. (1989). The role and regulation of tumour-associated hyaluronan. The biology of hyaluronan. *Ciba Found. Symp.* 143, 150-169.

Knudson, W., Bartnick, E. and Knudson, C. (1993). Assembly of pericellular matrices by COS-7 cells transfected with CD44 lymphocyte-homing receptors genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,4003-4007.

Kogerman, P., Sy, M. and Culp, L. (1996) Oncogene dependent expression of CD44 in Balb/c 3T3 derivatives: correlation with metastatic competence. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 73-82.

Koopman, G., van Kooyk, Y., de Graaf, M., Meyer, C, Figdor, C. and Pals, S. (1990). Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J. Immunol.* 145,3589

Koopman, G., Heider, K., Horst, E., Adolf, G., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S. (1993) Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177,897-904.

Kramer, R., Vogel, K. and Nicolson, G. (1982). Solubilization and degradation of subendothelial matrix glycoproteins and proteoglycans by metastatic tumor cells. *J. Biol. Chem.* 257, 2678-2686.

Kraus, J., Koopman, J., Kaskel, P., Maintz, D., Brandner, S., Louis, D., Wiestler, O. and von Deimling, A. (1995). Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54,91.

Kugelman, L., Ganguly, S., Haggerty, J., Weissman, S. and Milstone, L. (1992). The core protein of Epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. *J. Invest. Dermatol.* 99, 381-385.

Kuppner, M., Van Meir, E., Gauthier, T., Hamou, M. and Tribolet, N. (1992). Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumors. *Int. J. Cancer* 50,572-577.

Kwon-Soo, H., Yeo, E. and Exton J. (1994). Lysophosphatidic acid activation of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D and actin polymerization by a pertussis-toxin-sensitive mechanism. *Biochem. J.* 303,55-59.

Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laiho, M. and Keski-Oja, J. (1989). Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res.* 49, 2533-2553.

Lauffenburger, D. and Horwitz, A. (1996). Cell Migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84,359-369.

Laurent, T. and Fraser, J. (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* 6,2397-2404.

Leppa, S., Mali, M., Miettinen, H. and Jalkanen, M. (1992). Syndecan expression regulates cell morphology and growth of mouse mammary epithelial tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,932-936.

Lesley, J. and Trowbridge, I. (1982). Genetic characterization of a polymorphic murine cell surface glycoprotein. *Immunogenetics* 15, 313-320.

cytoplasmic domain and activation by antibody. *J. Exp. Med.* 175,257-266.

Lesley, J., Kincade, P. and Hyman, R. (1993). Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding of antibody. *Eur. J. Immunol.* 23,1902-1909.

Li, M., Aggeler, J., Farson, D., Hatler, C., Hassell, J. and Bissell, M. (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84,136-140.

Liao, H., Levesque, M., Patton, K., Bergamo, B., Jones, D., Moody, M., Telen, M. and Haynes, B. (1993). Regulation of human CD44H and CD44E isoform binding to hyaluronan by phorbol myristate acetate and anti-CD44 monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 151,6490-6499.

Liotta, L., Goldfarb, R., Brundage, R., Siegal, G., Terranova, V. and Garbisa, S. (1981). Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* 41, 4629-4636.

Liotta, L. and Stetler-Stevenson, W. (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 51, 50545-50595.

Lokeshwar, V.B. and Bourguignon, L.Y.W. (1992). The lymphoma transmembrane glycoprotein GP85 (CD44) is a novel guanine nucleotide-binding protein which regulates GP85 (CD44)-ankyrin interaction. *J.Biol. Chem.* 267, 22073-22078.

Lokeshwar, V.B., Fregien, N. and Bourguignon, L.Y.W. (1994) Ankyrin binding domain of CD44 (GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J.Cell Biol* 126, 1099-1109.

Lokeshwar, B., Lokeshwar, V. and Block, N. (1995). Expression of CD44 in prostate cancer cells: association with cell proliferation and invasive potential. *Anticancer Res.* 15, 1191-1198.

Lokeshwar, V., Obek, C., Soloway, M. and Block, N. (1997). Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res.* 57, 773-777.

Louis, D. (1994). The p53 gene and protein in human brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 11.

Mackay, C., Terpe, H., Stauder, R., Marston, W., Stark, H. and Gunthert, U. (1994). *J. Cell Biol.* 124, 71-82.

Matrisian, L. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14, 455-463.

Merzak, A., Koocheckpour, S. and Pilkington, G. (1994). CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res.* 54, 3988-3992.

Mignatti, P. and Rifkin, D. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73, 161-195.

Miyake, K., Medina, K.L., Hayashi, S.I., Ono, S., Hamaoka, T. and Kincade, P.W. (1990) Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lymphohemopoiesis in long term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 171, 477-488.

Mizuno, K., Noda, K., Ueda, Y., Hanaki, H., Saido, T., Ikuta, T., Kuroki, T., Tamaoki, T., Hirai, S., Osada, S. and Ohno, S. (1995). UCN-01, an antitumor drug is a selective inhibitor of conventional PKC subfamily. *FEBS Lett.* 359, 259-261.

Moller, L. (1993). Structure and function of the urokinase receptor. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 4, 293-303.

Moretto, G., Xu, R. and Kim, S. (1993) . *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 419-423.

Mosher, D. (1984). Physiology of fibronectin. *Ann. Rev. Med.* 35, 561-575

Mueller, B. (1996). Different roles for plasminogen activators and metalloproteinases in melanoma metastasis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 213 (1),65-80.

Mulder, J., Kruyt, P., Sewnath, M., Oosting, J., Seldenrijk, C., Weidema, W., Offerhaus, G. and Pals, S. (1994). Colorectal cancer prognosis and expression of exon v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 344,1470-1472.

Muro, A., Puricelli, L., Kornblihtt, A. and Bal de Kier Joffé, E. (1991). Inverse correlation between fibronectin mRNA levels and the metastatic potentials of two murine mammary adenocarcinomas. *Invas. Metast.* 11,281-287.

Murphy, G., Willenbrock, F., Crabbe, T., O Shea, M., Ward, R., Atkinson, S., O Connell, J. and Reynolds, J. (1994). Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann. NY Acad. Sci.* 732, 31-41.

Nagasaka, S., Tanabe, K., Bruner, J., Saya, H., Sawaya, R. and Morrison, R. (1995). Alternative RNA splicing of the hyaluronic acid receptor CD44 in the normal human brain and in brain tumors. *J. Neurosurg.* 82,858-863.

Nakajima, M., Irimura, T. and Nicolson, G. (1988). Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell Biochem.* 36, 157-167.

Neame, S. and Isaake, C. (1992). Phosphorilation of CD44 in vivo requires both ser323 and ser325, but does not regulate membrane

localization or cytoskeletal interaction in epithelial cells. *EMBO J.* 11, 4733-4738.

Nicholson G. (1993). Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp. Cell Res.* 204,171.

Niedel, J., Kuhn, L. and Vandembark, G. (1983). Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80,36-40.

Nielsen, L., Kellerman, G, Behrendt, N., Dano, P. and Blasi, F. (1988). A 55,000-60,000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 236, 2358-2363.

Nobes, C. and Hall, A. (1995). Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* 81,53-62.

Ohgaki, H., Eibl, R., Wiestler, O., Yasargil, M., Newcomb, E. and Kleihues, P. (1991). p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res.* 51,6202.

Okada, H., Yoshida, J., Sokabe, M., Wakabayashi, T. and Hagiwara, M. (1996). Suppression of CD44 expression decreases migration and invasion of human glioma cells. *Int. J. Cancer* 66, 255-260.

Ossowski, L. and Reich, E. (1983). Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell.* 35, 611-619.

Ossowski, L., Clunie, G., Masucci, M. and Blasi, F. (1991). In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumour invasion. *J. Cell Biol.* 115,1107-1112.

Ota, T., Matsui, T., Kohno, H., Maeda, M., Tanino, M. and Odashima, S. (1995). CD44 participates in tumor cell adhesion to endothelial cells in the experimental metastatic process in B16BL6 melanoma cells. *Anticancer Res* 15,1215-1220.

O'Toole, T., Loftus, J., Du, X., Glass, A., Ruggeri, Z., Shattil, S., Plow, E. and Ginsberg, M. (1990). Affinity modulation of the alpha IIB beta 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1,883-893.

Paget, S. (1889). Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1, 571-573.

Pauli, B. and Knudson, W. (1988) Tumor invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations. *Hum. Pathol.* 19, 628-639.

Paranjpe, M., Engel, L., Young, N. and Liotta, L. (1980). Activation of human breast carcinoma collagenase through plasminogen activator. *Life Sci.* 26, 1223-1231.

Pavelic, Z., Pavelic, L., Lower, E., Gapany, M., Gapany, S., Barker, E. and Preisler, H. (1992). c-myc, c-erbB2 and Ki-67 expression in normal

breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 52,2597-2602.

Penno, M., August, T., Baylin, S., Mabry, M., Linnoila, I., Lee, V., Croteau, D., Yang, X. and Rosada, C. (1994). Expression of CD44 in human lung tumors. *Cancer Res.* 54,1381-1387.

Pereyra-Alfonso, S., Haedo, A. and Bal de Kier Joffé, E. (1988). Correlation between urokinase-type plasminogen activator production and the metastasizing ability of two murine mammary adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 42,59-63.

Perletti, G. and Monti, E. (1996). PKCs: transducers of critical signals in cancer cells. *Int. Journ. Oncology* 9, 171-177.

Pershl, A., Lesley, J., English, N., Hyman, R. and Trowbridge, I. (1995). Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 108, 1033-1041.

Petersen, T., Thogersen, H., Skorstengaard, K., Vibepedersen, K., Sahl, P., Sottrup-Jensen, L. and Magnusson, S. (1983). Partial primary structure of bovine plasma fibronectin. Three different types of internal homology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80,137-141.

Picker, L., Nakache, M., Butcher, E. (1989) Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 109,927-937.

Pierschbacher, M., Hayman, E. and Ruoslahti, E. (1981). Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell* 26,259-267.

Pilkington, G., Akinwunmi, J Ognjenovic, N. and Rogers, J.(1993). Differential binding of CD44 on human gliomas in vitro. *Neuro Report* 4,259-262.

Pilkington, G. (1994). Tumor cell migration in the central nervous system. *Brain Pathol.* 4,157.

Plantefaber, L. and Hynes, R. (1989). Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 56, 281-290.

Plow, E., Freaney, D., Plescia, J., Miles, L. (1986) The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J. Cell Biol.* 103,2411-2420.

Ponta, H., Sleeman, J. and Herrlich, P. (1994). Tumor metastasis formation: cell-surface proteins confer metastasis-promoting or suppressing properties. *Bioch. Bioph. Acta* 1198,1-10.

Radinsky, R. (1993). Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 12,345.

Roldan, A., Cubellis, M., Masucci, M. (1990) Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central

molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 9,467-474.

Roman, J., La Chance, R., Broekelmann, T., Kennedy, J., Wayner, E., Carter, W. and McDonald, J. (1989). The fibronectin receptor is organized by extracellular matrix fibronectin: implications for oncogenic transformation and for cell recognition of fibronectin matrices. *J. Cell Biol.* 108,2529-2543.

Rosales, C., OBrien, V., Kornberg, L. and Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1242,77-98.

Ruoslahti, E. (1988). Structure and biology of proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4,229-255.

Ruoslahti, E. (1989). Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 264, 13369-13373.

Ruoslahti, E. y Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factors activities. *Cell* 64, 867-869.

Rusciano, D. and Burger, M. (1993) Mechanisms of metastasis. *Molecular Genetics of Nervous System Tumors*, 357-369.

Sadano, H., Inoue, M. and Tanicguchi, S. (1992). Differential expression of vinculin between weakly and highly metastatic B16-melanoma cell lines. *Jap. J. Cancer Res.* 83,625-630.

Saiki, Y., Iida, J., Muranta, J., Ogawa, R., Nishi, N., Sugimura, K., Tokura, S. and Azuma I. (1989a). Inhibition of the metastasis of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptides containing core sequence of cell adhesive molecules. *Cancer Res.* 49,3815-3822.

Saiki, Y., Muranta, J., Iida, J., Sakurai, T., Nishi, N., Matsuno, K. and Azuma, I. (1989b). Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences. *Br. J. Cancer* 60, 722-728.

Saiki, Y., Muranta, J., Makabe, T., Matsumoto, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Taguchi, Y., Shimojo, T., Kimizuka, F., Kato, I. and Azuma, I. (1990) Inhibition of lung metastasis by synthetic and recombinant fragments of human fibronectin with functional domains. *Jpn. J. Cancer Res.* 81,1003-1011.

Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P., Grenman, R., Kalimo, H. and Jalkanen, S. (1993). Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J. Cell Biol.* 122,431-442.

Schirrmacher, V. (1985). Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies. *Adv. Cancer Res.* 43, 1-73.

Schmitt, M., Janicke, F. and Graeff, H. (1992). Tumor associated proteases. *Fibrinolysis.* 6,3-26.

Roman, J., La Chance, R., Broekelmann, T., Kennedy, J., Wayner, E., Carter, W. and McDonald, J. (1989). The fibronectin receptor is organized by extracellular matrix fibronectin: implications for oncogenic transformation and for cell recognition of fibronectin matrices. *J. Cell Biol.* 108,2529-2543.

Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L. and Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1242,77-98.

Ruoslahti, E. (1988). Structure and biology of proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4,229-255.

Ruoslahti, E. (1989). Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 264, 13369-13373.

Ruoslahti, E. y Yamaguchi, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factors activities. *Cell* 64, 867-869.

Rusciano, D. and Burger, M. (1993) Mechanisms of metastasis. *Molecular Genetics of Nervous System Tumors*, 357-369.

Sadano, H., Inoue, M. and Taniguchi, S. (1992). Differential expression of vinculin between weakly and highly metastatic B16-melanoma cell lines. *Jap. J. Cancer Res.* 83,625-630.

Saiki, Y., Iida, J., Muranta, J., Ogawa, R., Nishi, N., Sugimura, K., Tokura, S. and Azuma I. (1989a). Inhibition of the metastasis of murine

malignant melanoma by syntetic polymeric peptides containing core sequence of cell adhesive molecules. *Cancer Res.* 49,3815-3822.

Saiki, Y., Muranta, J., Iida, J., Sakurai, T., Nishi, N., Matsuno, K. and Azuma, I.(1989b). Antimetastatic effects of synthetic polypeptides containing repeated structures of the cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences. *Br. J. Cancer* 60, 722-728.

Saiki, Y., Muranta, J., Makabe, T., Matsumoto, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Taguchi, Y., Shimojo, T., Kimizuka, F., Kato, I. and Azuma, I. (1990) Inhibition of lung metastasis by synthetic and recombinant fragments of human fibronectin with functional domains. *Jpn. J. Cancer Res.* 81,1003-1011.

Salmi, M., Gron-Virta, K., Sointu, P., Grenman, R., Kalimo, H. and Jalkanen, S. (1993). Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J. Cell Biol.* 122,431-442.

Schirrmacher, V. (1985). Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies. *Adv. Cancer Res.* 43, 1-73.

Schmitt, M., Janicke, F. and Graeff, H. (1992). Tumor associated proteases. *Fibrinolysis.* 6,3-26.

Schnaper, W. and Kleinman, H. (1993). Regulation of cell function by extracellular matrix. *Pediatr. Nephrol.* 7,96-104.

Schnaper, W., Kleinman, H. and Grant, D. (1993). Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. *Kidney Int.* 43,20-25.

Schultz, R., Silberman, S., Persky, B., Bajkowski, A. and Carmichael, D. (1988). Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.* 48, 5539-5545.

Schwartz, G., Redwood, S., Ohnuma, T., Holland, J., Droller, M. and Liu, B. (1990). Inhibition of invasion of invasive human bladder carcinoma cells by protein kinase C inhibitor staurosporine. *JNCI* 82,1753-1756.

Schwartz, M., Schaller, M. and Ginsberg, M. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* “(in press)”

Screaton, G., Bell, M., Jackson, D., Cornelis, F., Gerth, U. and Bell, J. (1992) Genomic structure of DNA coding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89,12160-12164.

Seelentag, W., Gunthert, U., Saremaslani, P., Futo, E., Pfaltz, M., Heitz, P. and Roth, J. (1996). CD44 standard and variant isoform expression in human epidermal skin tumors is not correlated with tumor aggressiveness but down-regulated during proliferation and tumor de-differentiation. *Int. J. Cancer* 69,218-224.

Segall, J., Tyerech, S., Boselli, L., Masseling, S., Helft, J., Chan, A., Jones, J. and Condeelis, J. (1996). EGF stimulates lamellipoid extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism. *Clin. Exp. Metast.* 14,61-72.

Serrano, M., Hannon, G. and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366,704.

Sephel, G., Tashiro, K., Sasaki, M., Grotorex, D., Martin, G., Yamada, Y. and Kleinman, H. (1989). Laminin A chain synthetic peptide which supports neurite outgrowth. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 162,821-829.

Shtivelman, E. and Bishop, J. (1991) Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 5446-5453.

Sim, P., Stephens, R., Fayle, D. and Doe, W. (1988). Urokinase-type plasminogen activator in colorectal carcinomas and adenomatous polyps: quantitative expression of active and proenzyme. *Int. J. Cancer* 42, 483-488.

Sitrin R., Todd., R., Petty, H., Brock, T., Shollenberger, S., Albrecht, E. and Gyetko, M. (1996). The urokinase receptor (CD87) facilitates CD11b/CD18-mediated adhesion of human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97(8),1942-1951.

Sloane, B., Moin, K., Krepela, E. and Rozhin, J. (1990). Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 333-352.

Song, J. and Foster, D. (1993). v-Src activates a phospholipase D activity that is distinguishable from phospholipase D activity activated by protein kinase C. *Biochem. J.* 294,711-717.

Stack, S., Gray, R. and Pizzo, S. (1991). Modulation of plasminogen activation and type IV collagenase activity by a synthetic peptide derived from the laminin A chain. *Biochemistry* 30,2973-2977.

Stahl A. and Mueller B. (1997). Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int. J. Cancer.* 71(1), 116-122.

Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. and Seed, B. (1989). A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56, 1057-1062.

Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M. and Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronan-bearing cells. *EMBO J.* 10,343-348.

Stephens, R., Pollanen, J., Tapiovaara, H., Leung, K., Sim, P., Salonen, E., Ronne, E., Behrend, L., Dano, K. and Vaheri, A. (1989). Activation of pro-urokinase and plasminogen on human fibrosarcoma cells. A

proteolytic system with surface-bound reactants. *J. Cell Biol.* 108, 1987-1995.

Stetler-Stevenson, W., Aznavoorian, S. and Liotta, L. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9,541-573.

Streuli, C. and Bissell, M. (1990). Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J. Cell Biol.* 110,1405-1415.

Strobel, T., Swanson, L. and Cannistra, S. (1997) In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. *Cancer Res.* 57, 1228-1232.

Suzuki, A., Shinoda, J., Kanda, S., Oiso, Y. and Kozawa, O. (1996). Basic fibroblast growth factor stimulates phosphatidilcholine-hydrolyzing phospholipase D in osteoblasts-like cells. *J. Cell Biochem.* 63,491-499.

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.

Tanabe, K.K., Ellis, L.M., and Sayer, H. (1993) Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 341, 725-726.

Tawil, N., Gowri, V., Djoneidi, M., Nip, J., Carbonetto, S. and Brodt, P. (1996) Integrin $\alpha 2\beta 1$ can promote adhesion and spreading of metastatic

breast carcinoma cells on the lymph-node stroma. *Int. J. Cancer.* 66; 703-710.

Templeton, D. (1992). Proteoglycans in cell regulation. *Critical Rev. Clin. Lab. Sci.* 29,141-184.

Terpe, H., Christiansen, H., González, M., Berthold, F. and Lampert, F (1995). Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur. J. Cancer.* 31A,549-552.

Thomas, L., Byers, R.H., Vink, J. and Stamenkovic, I. (1992). CD44H regulates tumor migration on hyaluronate-coated surfaces. *J.Cell. Biol.* 118, 971-977.

Thomas, L., Etoh, T., Stamenkovic, I., Mihm, M. and Byers, H. (1993). Migration of human melanoma cells on hyaluronate is related to CD44 expression. *J. Invest. Derm.* 100,115-120.

Tkach, T., Li, E., Bestagno, M. and Burrone, O. (1996). Expression of CD44 splice variants in metastatic and non-metastatic mouse tumor cell lines. *Immunol. Lett.* 52,81-87.

Tolg,C., Hofmann, M., Herrlich, P. and Ponta, H.(1993) Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res.* 21, 1225-1229.

Towle, M., Lee, A., Maduakor, E., Schwartz, E., Bridges, A. and Littlefield B. (1993) Inhibition of urokinase by 4-substituted benzo

[b]thiophene-2-carboxamidines: an important new class of selective synthetic urokinase inhibitor. *Cancer Res.* 53,2553-2559.

Turner, C. and Burridge, K. (1991). Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3,849-853.

Tsukita, S., Kumiki, O., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A. and Tsukita S. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126, 391-401.

Tyagi, J., Hirano, H., Merlino, G. and Pastan, I. (1983). Transcriptional control of the fibronectin gene in chick embryo fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 258,5787-5793.

Ueki, K., Rubio, M., Ramesh, V., Correa, K., Rutter, J., von Deimling A., Bucker, A., Gusella, J. and Louis, D. (1994). MTS1/CDKN2 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p. *Hum. Mol. Genet.* 3,1481.

Underhill, C., Chi-Rosso, G. and Toole, B. (1983). Effects of detergent solubilization on the hyaluronate-binding protein from membranes of simian virus 40-transformed 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 258,8086-8091.

Underhill, C., Thurn, A. and Lacy, B. (1985). Characterization and identification of the hyaluronate-binding site from membranes of SV-3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 260,8128

Urtreger, A., Ladedá V., Puricelli, L., Rivelli, A., Vidal, M., Lustig, E. and Bal de Kier Joffé, E. (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int. J. of Oncology* 11,489-496.

Vasalli, J., Baccino, D., Bellin, D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55000 form of the human plasminogen activator urokinase. *J. Cell Biol.* 100,86-92.

von Deimling, A., Louis, D., von Ammon, K., Petersen, I., Hoell, T., Chung, R., Martuza, R., Schoenfeld, D., Yasargil, M., Wiestler, O. and Seizinger, B. (1992). Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* 77,295.

Vuori, K. and Ruoslahti, E. (1993) Activation of protein kinase C precedes $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem.* 268, 21459-21462.

Wei, Y., Lukashev M., Simon, D., Bodary S., Rosemberg S., Doyle, M. and Chapman, H. (1996) Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* 273, 1551-1555.

West, D. and Kumar, S. (1989). Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found. Symp.* 143, 187-207.

Wielenga, V.J., Heider, K., Offerhau, G., Adolf, G., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. and Pals, S. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 53, 4754-4756.

Wight, T., Kinsella, M. and Qwarnstrom, E. (1992). The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Current Biol.* 4,793-801.

Wolffe, E., Cause, W., Pelfrey, C., Holland, S., Steinberg, A. and August, J. (1990). The cDNA sequence of mouse Pgp-1 and to human CD44 cell surface antigen and proteoglycan core-link proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 341-347.

Wright, J., Egan, S. and Greenberg, A. (1990). Genetic regulation of metastatic progression. *Anticancer Res.* 10,1247-1256.

Wu, J., Folkerth, R., Ye, Z. and Darras, B. (1993) Aggressive oligodendroglioma predicted by chromosome 10 restriction fragment length polymorphism analysis. Case study. *J. Neuro-Oncol.* 15,29.

Xue, W., Mizukami, I., Todd, R. and Petty, H. (1997). Urokinas-type plasminogen activator receptors associate with β 1 and β 3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components. *Cancer Res.* 57,1682-1689.

Yamada, Y. and Kleinman, H. (1992). Functional domains of cell adhesion molecules. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 4,819-823.

Young, S., Parker, P., Ulrich, A. and Stabel, S. (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244,711-717.

Yoshimura, M., Nishikawa, A., Nishiura, T., Ihara, Y., Kanayama, Y., Matsuzawa, Y. and Taniguchi, N. (1995). Cell spreading in Colo 201 by staurosporine is a $\alpha 3\beta 1$ integrin-mediated with tyrosine phosphorylation of src and tensin. *J. Biol. Chem.* 270,2298-2304.

Yu, H. and Schultz, R. (1990). Relationship between secreted urokinase plasminogen activator activity and metastatic potential in murine B16 cells transfected with human urokinase sense and antisense genes. *Cancer Res.* 50, 7623-7633.

Yu, H., Clarke, T., Rogers, J., Akinwunmi, J., Ognjenovic, N., Stern, R. and Pilkington, G. (1994). Expression and role of hyaluronic acid and its receptor in human brain tumours: an in vitro study. *British J. Neurosurg.* 8,258.

Yu, W., Kim, J. and Ossowski, L. (1997). Reduction in surface urokinase receptors forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *J. Cell Biol.* 137,767-777.

Zhang, M., Singh, R., Wang, M., Wells, A. and Siegal G. (1996) Epidermal growth factor modulates cell attachment to hyaluronic acid by the cell surface glycoprotein CD44. *Clin. Exp. Metastasis* 14, 268-276.

Zheng, Z., Katoh, S., He, Q., Miyake, K., Lesley, J., Hyman, R., Hamik, A., Parkhouse, M., Farr, A. and Kinkade, P. (1995). Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition. *J. Cell Biol.* 130,485-495.

Zhou, D., Ding, J., Picker, L., Bargatze, R., Bucher, E. and Goeddel, D. (1989). Molecular cloning and expression of Pgp-1: the mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.* 143,3390-3395.