

## EFFECTES DEL TGF- $\beta$ SOBRE EL CREIXEMENT I LA COMPOSICIO DE LA MATRIU EXTRACEL.LULAR EN CEL.LULES D'ORIGEN NEUROECTODERMIC.

Villena, J., Trillo, P., Heredia, A. i Bassols, A.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Telf: 581 10 42. FAX: 581 20 06.

El factor de transformació  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) és un factor polipeptídic produït que actua com un potent regulador de la proliferació i/o de la diferenciació en nombrosos tipus cel.lulars (Massagué, 1990). El seu paper depèn en gran mesura del tipus de cèl.lula diana sobre la qual actua. Així, és un potent inhibidor del creixement de cèl.lules d'origen epitelial, endotelial, fibroblasts, neuronal, limfoide i hematopoietic, mentre que no afecta el creixement de preadipòcits i mioblastes i estimula la proliferació de certs tipus de fibroblasts i osteoblastes, almenys "in-vitro". També regula la diferenciació de nombrosos sistemes. Per exemple, promou la diferenciació de condroblastes, osteoblastes i algunes cèl.lules epitelials, mentre que inhibeix la diferenciació de preadipòcits, mioblastes i cèl.lules hematopoietiques. En el sistema nerviós, pot jugar un paper en la supervivència i diferenciació de les neurones, ja que s'ha descrit que el TGF- $\beta$  incrementa el temps de supervivència de les motoneurones d'embrí de rata i manté la seva activitat acetilcolintransferasa (Martinou et al., 1990).

Un dels principals efectes fenotípics del TGF- $\beta$  és la regulació de la composició i estructura de la matriu extracel.lular (MEC). Així, és un potent inductor de diversos dels seus components: fibronectina, col.làgens i proteoglicans, així com d'inhibidors de proteases de la MEC, com l'inhibidor de l'activador del plasminògen (PAI-1) i l'inhibidor de metaloproteinases (TIMP). El resultat és una inducció global de la MEC que rodeja les cèl.lules.

S'ha proposat que aquests efectes del TGF- $\beta$  sobre la MEC poden mediar, almenys en part, el paper del TGF- $\beta$  sobre la proliferació o diferenciació de les cèl.lules. Així, s'ha descrit que la inhibició del creixement de cèl.lules normals de ronyó de rata per TGF- $\beta$  és mediada pel col.làgen (Nugent i Newman, 1989) i que la inhibició de la diferenciació dels mioblastes per TGF- $\beta$  és bloquejada per pèptids que contenen la seqüència RGD, característica dels receptors tipus integrina (Igotz et al., 1987).

De fet, està ampliament descrit que la matriu extracel.lular pot influenciar la proliferació i diferenciació de diferents tipus cel.lulars, incloent la de cèl.lules d'origen neural (Perris et al., 1988; Kidowaki et al., 1991).

El nostre grup ha estat estudiant els efectes del TGF- $\beta$  sobre les cèl.lules de melanoma humà, un tumor de cèl.lules pigmentades d'origen neuroectodèrmic. El propòsit del present treball ha estat determinar els efectes del factor sobre la capacitat proliferativa de cèl.lules d'origen neuroectodèrmic (melanoma, neuroblastoma, astrocitoma) i correlacionar-lo amb els seus efectes sobre diversos components de la MEC.

### METODES

#### *Cultiu cel.lular i marcatge metabòlic:*

Les línies de melanoma humà SK-mel-131 (cl 1.36-1-5), SK-mel-131 (cl 3.44) i SK-mel-23, descrites per Houghton et al. (1987), i les línies de neuroblastoma SK-NSH i d'astrocitoma U251 van ésser amablement cedides per el Dr. F.X. Real (I.M.I.M., Barcelona). Les cèl.lules es van creixer en atmosfera humidificada a 37°C amb el 5%CO<sub>2</sub> en medi RPMI 1640 suplementat amb el 10% FCS, 100 UI/ml de penicilina i 100 µg/ml d'estreptomicina.

Cultius subconfluents es van deixar en medi sense sèrum durant 8 h i aleshores les cèl.lules es van tractar amb 100 pM TGF- $\beta$  i simultàniament es van marcar amb 100 µCi/ml de <sup>35</sup>S-sulfat, 50 µCi/ml de <sup>3</sup>H-glucosamina o 20 µCi

de  $^{35}\text{S}$ - metionina. Després de la incubació, els medis es van recollir, se'ls hi va afegir 1 mM PMSF i es van analitzar mitjançant SDS-PAGE i fluorografia. En alguns casos, es va purificar parcialment la fracció de proteoglicans mitjançant cromatografia en DE-cel·lulosa. En altres, les mostres van ésser digerides amb enzims específics per eliminar les cadenes de glicosaminoglicans. Les digestions es van fer a 37 °C durant 16 h amb condroitinasa ABC (50 mU/ml), condroitinasa AC (50 mU/ml) o heparitinasa (10 mU/ml).

#### Immunoprecipitació i western blot:

Per les reaccions d'immunoprecipitació, el medi condicionat per cèl·lules control i tractades amb TGF- $\beta$  marcades amb l'isòtop indicat a cada figura es va immunoprecipiar amb l'anticòs monoclonal B5, que reconeix el proteoglicà específic de melanoma mel-CSPG.

Per l'anàlisi mitjançant western blot, alíquotes de medi condicionat per cèl·lules control o tractades amb TGF- $\beta$  es van analitzar en gels de SDS-PAGE, transferir a membranes Immobilon-P (Millipore) i incubar amb anticòs corresponents a fibronectina (Sigma), PG-I, PG-II (cedits amablement per el DR.L. Fisher, NIH; USA), versicà (Dr. E. Ruoslahti, La Jolla, USA) i PG-100 (Dr. H. Kresse, Munster, Alemanya).

### RESULTATS I DISCUSSIO

#### Efectes del TGF- $\beta$ sobre la capacitat de proliferació

La capacitat d'inhibició del creixement cel·lular depenia del tipus cel·lular de que es tractés, segons s'observa a la figura 1. En el cas de les cèl·lules de melanoma, hi va haver clarament una correlació inversa amb el grau de diferenciació cel·lular, ja que les cèl·lules més indiferenciades (SK-mel-1.36-1-5) van ser fortament inhibides per el factor, mentre que les més diferenciades (SK-mel-23) no eren afectades i les de grau intermig (SK-mel-3.44) eren també afectades en un terme mig. Les cèl·lules de neuroblastoma i astrocitoma, també d'origen neuroectodèrmic, eren també inhibides per el factor, encara que les SK-NSH ho eren més fortament.

En el cas de les cèl·lules de melanoma, aquesta inhibició de la proliferació es detectava també en un assaig de formació de colònies en agar semisòlid, que es considera indicatiu de la capacitat tumorigènica de les cèl·lules. També en aquest cas, l'efecte del TGF- $\beta$  era més notable en les cèl·lules més indiferenciades. La manca de resposta de la línia SK-mel-23 no és deguda a manca de receptors per TGF- $\beta$ , ja que aquestes cèl·lules responen al factor amb una sobreproducció de proteïnes de secreció. La incapacitat de formar colònies suggereix que el TGF- $\beta$  pot tenir un paper en el desenvolupament i metastasi d'aquests tipus de tumors.

#### Efectes del TGF- $\beta$ sobre la producció de proteïnes de matriu extracel·lular

Els efectes del TGF- $\beta$  sobre la producció de proteïnes extracel·lulars es va avaluar en primer lloc mitjançant marcatge metabòlic de les cèl·lules amb  $^3\text{H}$ -glucosamina (precursor de les cadenes de carbohidrats de les glicoproteïnes),  $^{35}\text{S}$ -sulfat (que marca específicament les cadenes de glicosaminoglicans dels proteoglicans sulfatats) o  $^{35}\text{S}$ -metionina. Com s'observa a les figures 2 i 3, el TGF- $\beta$  indueix un increment en la producció d'algunes proteïnes de la matriu extracel·lular en cèl·lules de melanoma SK-mel-1.36-1-5 i SK-mel-3.44, així com especialment en les cèl·lules de neuroblastoma SK-NSH. En aquestes últimes, hi ha un marcat increment d'una banda de 250 kDa, que es va identificar posteriorment com a fibronectina i d'aprox. 180 kDa, que es van identificar com a col·lagens. Tant en les cèl·lules SK-NSH com en les U251 (astrocitoma) es va detectar un marcat

increment en una banda de 47 kDa, que correspon a l'inhibidor de l'activador del plasminògen PAI-1.

La identificació d'aquests components es va realitzar mitjançant western blot amb anticossos específics en el cas de la fibronectina i del PAI-1 (fig.4). En ambdós casos, es va detectar un increment en la quantitat de proteïna secretada en el cas de cèl.lules tractades amb TGF- $\beta$ . La identificació del col.lagen es va fer tractant les mostres de medi condicionat de cèl.lules marcades amb  $^{35}$ S-metionina amb col.lagenases específiques d'alta puresa, que degraden únicament aquestes proteïnes. Com s'observa a la fig. 5, en el medi digerit amb col.lagenasa desapareixen únicament les bandes corresponents a col.lagen, que eren induïdes per TGF- $\beta$ .

Però els components induïts de forma més general van ésser el proteoglicans, detectats en cèl.lules marcades amb  $^{35}$ S-sulfat. Com s'observa a la figura 2, en el cas de cèl.lules de melanoma ens tornem a trobar que els efectes són molt notables en les línies SK-mel-1.36-1-5 i SK-mel-3.44, mentre que les SK-mel-23 no responen a la presència del factor. El patró de PGs en aquestes cèl.lules és molt diferent, ja que les cèl.lules poc diferenciades tenen dos PGs d'alt pes molecular, que són induïts per TGF- $\beta$ , mentre que les SK-mel-23 presenten un patró de PGs secretats de pes molecular més baix i que no són modificats per el factor. En quant a les cèl.lules SK-NSH i U251 (fig. 6), el patró de PGs de secreció és similar al de les cèl.lules de melanoma poc diferenciades, amb un PG d'alt pes molecular, que resta al gel de "stacking" en una electroforesi de poliacrilamida.

#### Identificació dels proteoglicans produïts per les cèl.lules de melanoma, astrocitoma i neuroblastoma.

Les cèl.lules de melanoma presenten un proteoglicà específic anomenat mel-PG (Harper i reifeld, 1987). Es tracta d'un PG del tipus condroitin-dermatan sulfat, de pes molecular entre 400-1000 kDa, amb una proteïna nucli de 250 kDa i que es troba tant integrat en la membrana plasmàtica com secretat al medi. És específic de melanoma, ja que només es troba en aquests tumors i en alguns neuroblastomes i astrocitomes, mentre que està absent de melanòcits adults i altres tipus de tumors.

Tots els PGs secretats per les cèl.lules estudiades en aquest treball són del tipus condroitin-dermatan sulfat, ja que són degradats per la condroitinasa ABC. Es va identificar mel-PG mitjançant immunoprecipitació o western blot de medis tractats o no amb condroitinasa ABC amb l'anticòs monoclonal B5. Aquest PG es va identificar, confirmant els resultats descrits per Houghton et al. (1987), en cèl.lules SK-mel-1.36-1-5 i SK-mel-3.44, mentre que es troba absent en cèl.lules SK-mel-23. Les cèl.lules SK-NSH i U251 (fig. 7) tampoc expressen aquest PG ni associat a les cèl.lules ni secretat al medi, en contra dels resultats esperats, ja que s'ha descrit que aquests tipus de tumors poden contenir mel-PG.

La banda de pes molecular més alt, present tant en cèl.lules de melanoma com de neuroblastoma i astrocitoma, correspon a un nou PG no descrit anteriorment, que hem anomenat PG-L. Aquest PG és del tipus condroitin sulfat i té una proteïna nucli formada per dues bandes de pes molecular 360 i 400 kDa, tal com s'observa en mostres marcades amb  $^{35}$ S-metionina i tractades amb condroitinasa ABC (fig. 8). Aquest pes molecular no correspon a cap dels PG de tipus CS/DS descrits. A més, experiments de western blot amb anticossos dirigits contra els disacàrids components de les cadenes GAG, demostren l'existència de dues bandes diferents en cèl.lules de melanoma, corresponents a mel-PG i PG-L.

S'ha estudiat també la presència d'altres PGs del tipus CS/DS (PG-I, PG-II, PG-100, versicà) mitjançant tècniques de western blot.

#### CONCLUSIONS

Com a resultat d'aquest treball, podem concloure que:

- Els efectes del TGF- $\beta$  poden dependre del grau de diferenciació de les cèl.lules sobre les que actua, així en línees cel.lulars de melanoma humà, el TGF- $\beta$  inhibeix potentment la proliferació de cèl.lules poc diferenciades, mentre que no té efecte sobre les més diferenciades. També inhibeix el creixement de les cèl.lules de neuroblastoma i astrocitoma.

- El tractament amb TGF- $\beta$  provoca importants canvis en la composició de la MEC. Així, s'indueix la producció de fibronectina, col.lagens, PAI-1 i PGs del tipus CS/DS. El grau d'inducció depèn en gran mesura del tipus cel.lular. L'únic tipus cel.lular que pràcticament no és afectat per TGF- $\beta$  són les cèl.lules de melanoma en un estat avançat de diferenciació.

- Les cèl.lules de melanoma poc diferenciades produeixen mel-PG, el PG específic de melanoma, el qual és induït per TGF- $\beta$ . Les cèl.lules de melanoma ben diferenciades, així com les de neuroblastoma i astrocitoma, no produeixen aquest PG, i aquest no és induït per TGF- $\beta$ .

- Les cèl.lules de melanoma poc diferenciades, neuroblastoma i astrocitoma contenen un nou PG, no descrit anteriorment a la literatura, que hem anomenat PG-L, i que és també induït per TGF- $\beta$ .

#### REFERENCIES

- Harper, J.H. i Reisfeld, R.A. (1987) "Biology of Proteoglycans". Ed. Wight, T.N. Academic Press, Inc.
- Houghton, A.N. et al. (1987) J. Exp. Med. 164, 812-829.
- Ignotz, R.A. et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 6443-46.
- Kidowaki, T. et al. (1991) Pathobiology 59, 316-323.
- Martinou, JC et al. (1990) Dev. Brain Res. 52, 175-181.
- Massagué, J. (1990) Ann. Rev. Cell. Biol. 6, 1-70.
- Nugent, M.A. i Newman, M.J. (1989) J. Biol. Chem. 264, 18060-67.
- Perris, R. et al (1988) Science 241, 86-89.