



*Università degli Studi di Firenze*

**Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche**

**Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Applicata**

**XXV Ciclo**

*Coordinatore del Dottorato: Prof.ssa Donatella Degl'Innocenti*

**Modulazione a livello epigenetico del programma EMT  
attivato dal TGF- $\beta$ 1 in cellule MCF-10A**

*Candidato*

*Tutor*

**Dott. Stefano Stinziani**

**Prof. Giovanni Raugei**

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: BIO/10**

**ANNI 2010/2012**

# SOMMARIO

<b>SOMMARIO .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>La transizione epitelio mesenchima.....</b>	<b>5</b>
La EMT di tipo 1.....	7
La EMT di tipo 2.....	9
La EMT di tipo 3.....	12
Le caratteristiche peculiari della EMT.....	15
<b>Le vie di segnalazione alla base della EMT .....</b>	<b>23</b>
Le citochine della famiglia del TGF- $\beta$ : i principali induttori di EMT .....	25
Le proteine Smad attivate dai ligandi del TGF- $\beta$ .....	29
Le vie alternative che attivano le proteine Smad.....	37
La segnalazione Smad-indipendente, attivata dal TGF- $\beta$ .....	40
Le vie alternative al TGF- $\beta$ che inducono EMT .....	46
<b>L'attivazione trascrizionale indotta dai ligandi del TGF-<math>\beta</math>.....</b>	<b>48</b>
I geni che prendono parte al programma EMT indotto dal TGF- $\beta$ .....	50
<b>La regolazione epigenetica.....</b>	<b>59</b>
Le proteine ad azione demetilasi: LSD1 e JMJD2A .....	60
<b>Le specie reattive dell'ossigeno.....</b>	<b>72</b>

Il ruolo dei ROS nella segnalazione cellulare.....	77
Tirosina cinasi e tirosina fosfatasi .....	78
Serina-treonina cinasi .....	81
Attivazione di Ras.....	82
Metabolismo dei fosfolipidi.....	83
Segnalazione attraverso il calcio .....	83
La regolazione redox dei fattori di trascrizione .....	84
Danni indotti dai ROS.....	86
<b>FIGURE INTRODUZIONE .....</b>	<b>90</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>98</b>
Soluzioni di uso frequente:.....	98
Materiali: .....	98
Colture cellulari.....	101
Stimolazione, dosaggio ed elettroforesi di proteine.....	101
Elettroforesi di proteine e Western Blot.....	102
Immunofluorescenza .....	103
PCR Real-Time .....	104
TEST oxyDNA .....	105
Misura dei ROS intracellulari.....	105
ChIP .....	106
Silenziamento genico.....	108
Coimmunoprecipitazione .....	108
<b>RISULTATI.....</b>	<b>110</b>

La stimolazione con TGF- $\beta$ 1 induce un accumulo di ROS nella cellula.....	111
Il NAC e la Catalasi riducono l'accumulo di ROS indotto dal TGF- $\beta$ 1 .....	111
Il TGF- $\beta$ 1 induce EMT in modo ROS dipendente .....	112
Analisi morfologica della EMT e dipendenza dai ROS .....	113
Il fattore trascrizionale Snail viene indotto dal TGF- $\beta$ 1.....	114
La stimolazione con TGF- $\beta$ 1 genera un danno ossidativo al DNA .....	115
LSD1 e JMJD2A si legano al complesso Smad2/3.....	117
LSD1 è responsabile del danno ossidativo al DNA .....	119
LSD1 e JMJD2A hanno un ruolo opposto nella regolazione della EMT.....	120
LSD1 e JMJD2A regolano la EMT .....	123
LSD1 e JMJD2A agiscono rispettivamente sulla H3K4me2 e sulla H3K9me3 .....	124
<b>IMMAGINI RISULTATI .....</b>	<b>127</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>134</b>
Modello proposto.....	137
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>140</b>
<b>APPENDICE .....</b>	<b>157</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>157</b>
La fase ossidativa della PPP .....	158
La fase non ossidativa della PPP.....	160
La risposta antiossidante .....	160
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>163</b>

Colture cellulari.....	163
Terreno condizionato .....	163
Saggio di proliferazione al citofluorimetro .....	163
Saggio enzimatico della attività della G6PD .....	164
Dosaggio del NADPH.....	164
Silenziamento stabile.....	165
Estrazione nucleare.....	165
<b>RISULTATI.....</b>	<b>167</b>
Il CM-PCa-AF induce un accumulo di ROS transitorio nelle PC3.....	167
Caratterizzazione della linea cellulare silenziata per la G6PD .....	168
Le PC3 G6PD - , sotto stimoli pro-ossidanti, sono in grado di eliminare i ROS.....	170
Le cellule PC3 utilizzano il NADPH per difendersi da stimoli pro-ossidanti.....	172
Nelle cellule G6PD - si assiste ad una maggiore traslocazione nucleare di Nrf2.....	173
<b>IMMAGINI RISULTATI .....</b>	<b>175</b>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>180</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>183</b>

## INTRODUZIONE

### **La transizione epitelio mesenchima**

La transizione epitelio mesenchima è un processo estremamente complesso attraverso il quale una cellula epiteliale altamente polarizzata acquisisce caratteristiche morfologiche e funzionali assimilabili a quelle presenti in cellule di natura mesenchimale come i fibroblasti. Questo processo è stato evidenziato e caratterizzato in tre fondamentali situazioni: nello sviluppo embrionale, nella riparazione delle ferite, e a livello patologico durante lo sviluppo tumorale e la fibrosi{1, 2, 3}.

Le cellule epiteliali formano un monolayer che compone la pelle e le parti interne dell'organismo come i dotti aerei e quelli gastrointestinali. Il monolayer fa così da barriera per l'organismo difendendolo dagli agenti esterni. Le cellule epiteliali sono collegate le une alle altre attraverso numerosi complessi che si formano fra cellula e cellula. Fra questi complessi i più importanti sono i desmosomi, le giunzioni aderenti, le giunzioni strette e le giunzioni gap{4}.

Tutte assieme queste strutture giunzionali forniscono alle cellule una propria polarità apico-basale ed una architettura citoscheletrica costituita da fibre di actina corticale. Al contrario, le cellule mesenchimali mancano

di queste strutture giunzionali. La mancanza di queste giunzioni porta tali cellule ad avere una morfologia non polarizzata, simile a quella dei fibroblasti ed avere inoltre una forte capacità migratoria attraverso la matrice extracellulare.

Le cellule che vanno incontro alla transizione epitelio mesenchima perdono l'espressione e l'attività della E-caderina, con conseguente accumulo a livello nucleare della  $\beta$ -catenina. Il processo è caratterizzato da un sostanziale rimodellamento del citoscheletro, con formazione di fibre di stress di actina, presenti in cellule ad elevata capacità migratoria{1, 2, 3} (Fig 1).

Alla luce di quanto detto possiamo dire che la transizione epitelio mesenchima è la conseguenza di numerosi eventi che avvengono nella cellula epiteliale a livello genetico, ed epigenetico portando alla perdita di marker epiteliali come E-caderina,  $\beta$ 4-integrina e ZO-1 ed alla acquisizione di marker mesenchimali come N-caderina,  $\alpha$ -SMA, vimentina.

Il processo di transizione epitelio mesenchima non è irreversibile e le cellule sono in grado, una volta completata la EMT, di ritornare al loro stato epiteliale originario (MET){5, 26}.

Questi passaggi generali a cui le cellule epiteliali vanno incontro avvengono sia a livello fisiologico sia a livello patologico. Recentemente la EMT è stata suddivisa in tre sottotipi: la EMT che avviene durante lo sviluppo embrionale (tipo 1), la EMT che avviene durante la rigenerazione

delle ferite e quindi la fibrosi (tipo 2) e quella che avviene durante lo sviluppo tumorale (tipo 3){2}.

### **La EMT di tipo 1**

La EMT di tipo 1, come detto in precedenza, è associata allo sviluppo embrionale accompagnando l'organogenesi e la morfogenesi dei tessuti. A questa tipologia di EMT è associata la MET durante la formazione di nuove strutture epiteliali. Differentemente alle altre tipologie di EMT (tipo 2,3) la EMT di tipo 1 è necessaria per la produzione di cellule mesenchimali multipotenti e non è associata alla fibrosi e infiammazione dei tessuti o alla migrazione aberrante di cellule cancerose (Fig 2).

I membri della superfamiglia dei TGF- $\beta$  giocano un particolare ruolo regolatorio all'interno della EMT di tipo 1, la quale si verifica durante la gastrulazione, la fusione del palato, la formazione della cresta neurale e dell'endocardio {27}.

Questa tipologia di EMT, infatti ha un ruolo estremamente importante nel promuovere la gastrulazione, la quale porta poi alla formazione di ectoderma, mesoderma ed endoderma dal foglietto primitivo {2, 4}.

Tale processo ha bisogno di stimoli provenienti dalla segnalazione di Wnt per rendere le cellule del foglietto primitivo capaci di entrare nel programma EMT indotto dai membri della famiglia del TGF- $\beta$ . La EMT di tipo 1 avviene durante la neurulazione ed è necessaria per la formazione

del tubo neurale, per mezzo del quale prende forma la spina dorsale e il cervello. Inoltre la EMT si verifica nelle cellule della cresta neurale per renderle capaci di migrare all'interno dell'embrione. Queste cellule generano così numerosi tessuti specializzati come la midollare del surrene, il sistema nervoso periferico ed il sistema scheletrico {4, 6}.

Le proteine morfogeniche dell'osso appartengono alla superfamiglia del TGF- $\beta$  e sono essenziali per l'induzione della EMT durante la neurulazione{28,29}.

Analogamente, la segnalazione del TGF- $\beta$  è di notevole importanza e guida le ultime fasi della formazione del cuore e del palato{4, 23}.

Le cellule miocardiali, per esempio, secernono attivamente matrice extracellulare (ECM) che separa il miocardio dall'endocardio; inoltre queste cellule inducono EMT nelle cellule dell'endocardio, le quali poi migrano nei cuscinetti endocardici, permettendo così la formazione della valvola atrioventricolare{4}.

Gli esperimenti eseguiti in pulcini e topi hanno dimostrato un ruolo importante di tutte e tre le isoforme del TGF- $\beta$  durante lo sviluppo. Fra queste isoforme la 2 sembra avere un ruolo dominante nella stimolazione della EMT in cellule endocardiali{30, 31, 32}.

Analogamente, il TGF- $\beta$ 3 media la formazione secondaria del palato, in cui sono richieste cellule epiteliali disposte nella linea mediana. Queste cellule, in seguito ad EMT indotta da TGF- $\beta$ 3, chiudono il palato,

completando la sua formazione{33, 41}.

In numerosi studi è stato osservato che l'espressione del T $\beta$ R-3 è estremamente importante affinché avvenga la EMT e quindi la formazione del cuore e del palato{38, 42}.

Per quanto riguarda la formazione della ghiandola mammaria, deve esser ancora dimostrato un ruolo attivo della EMT di tipo 1. Ci sono però delle evidenze che dimostrano la capacità delle cellule epiteliali mammarie di perdere la loro polarità, acquistando così caratteristiche mesenchimali. Ciò porterebbe a pensare che la EMT possa avere una notevole importanza nello sviluppo della ghiandola mammaria{43, 44}.

In altri studi è stato osservato la riattivazione di programmi embrionali di EMT di tipo 1 durante lo sviluppo di tumori mammari{27}.

### **La EMT di tipo 2**

La EMT di tipo 2 è di estrema importanza per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. Essa ha un ruolo attivo durante la riparazione delle ferite e nel rimodellamento tissutale in risposta a danni. Un importante distinzione fra la EMT di tipo 1 e quella di tipo 2 sta nel fatto che quella di tipo 2 è governata dalle reazioni infiammatorie, mentre la 1 avviene, come detto in precedenza, durante lo sviluppo embrionale{2}.

(Fig 3)

Durante l'infiammazione cronica si assiste ad uno stato di fibrosi di organi

e tessuti, con conseguente danneggiamento degli stessi. Il processo di riparazione delle ferite prevede una attività orchestrata di numerosi tipi cellulari diversi, necessari per riepitelizzare aree danneggiate{10}.

Sia la stimolazione da parte del TGF- $\beta$ , sia l'azione della matrice extracellulare (ECM), infatti, sono estremamente importanti per promuovere la attivazione e differenziazione dei miofibroblasti. Tali cellule sono coinvolte attivamente nella riparazione di epitelii danneggiati e nella formazione di cicatrici{10}.

I miofibroblasti attivati lavorano insieme a cellule epiteliali ed endoteliali e secernono metalloproteasi di matrice (MMPs), le quali digeriscono i tessuti feriti facilitando così la sintesi di una matrice extracellulare provvisoria{45, 46}.

Questa matrice provvisoria, appena sintetizzata, induce degranolazione piastrinica e angiogenesi. Inoltre, i miofibroblasti sono responsabili della contrazione della ferita nelle ultime fasi di riepitelizzazione{10, 45, 80}.

Normalmente, una volta che la ferita guarisce e la reazione infiammatoria si spegne, con essa si spegne anche la EMT di tipo 2. Inoltre, lo spegnimento dello stimolo infiammatorio porta a morte per apoptosi i miofibroblasti{46}.

Tuttavia, durante l'infiammazione cronica, si assiste ad una marcata attivazione dei miofibroblasti con il conseguente instaurarsi di disordini fibrotici causati da reazioni di EMT di tipo 2 continuative; in questo caso

tali reazioni non vengono mai spente{10, 45}.

I miofibroblasti rappresentano un tipo cellulare specializzato con tratti simili a cellule di muscolo liscio. In particolare, queste cellule esprimono l'actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA){48, 49}.

In generale i miofibroblasti possono derivare dai fibroblasti, da progenitori circolanti o da cellule epiteliali, che completando la EMT diventano  $\alpha$ -SMA positive{1}.

Una espressione abnorme di  $\alpha$ -SMA nelle cellule indica uno stato fibrotico e disordini fibroproliferativi{20, 50, 51}.

A livello del tumore una alta espressione di  $\alpha$ -SMA va di pari passo ad un aumentata invasività ed ad una conseguente riduzione della sopravvivenza dei pazienti{52}.

L'espressione della  $\alpha$ -SMA è indotta dal TGF- $\beta$  e dalle proteine che si trovano a valle, come il complesso Smad2/3, RhoA/Rock e ERK1/2{53,54,55,56}.

Oltre alla attivazione del recettore del TGF- $\beta$ , anche l'attivazione del recettore integrinico da parte di laminina, fibronectina e collagene porta alla EMT ed alla attivazione dei miofibroblasti. Questi due segnali, provenienti dalla attivazione di recettori diversi, cooperano nell'indurre il programma EMT e portano alla formazione del complesso di segnalazione  $\beta$ -catenina:Smad2{21, 36, 57}.

Alla luce di quanto detto possiamo dire che una stimolazione continua da

parte del TGF- $\beta$  porta alla cronicizzazione della reazione infiammatoria, con conseguente instaurarsi di disturbi fibroproliferativi.

Prendendo ad esempio il tumore al seno, ancora non è stata descritta la presenza di una forte correlazione fra fibrosi e tumorigenesi. È stato osservato però che tessuti mammari con uno stato fibrotico avanzato hanno una maggiore suscettibilità allo sviluppo di un tumore{58,59}.

È stato inoltre osservato che il trattamento del cancro al seno con radioterapia porta a fibrosi del tessuto, dovuta ad una marcata attivazione del programma EMT da parte del TGF- $\beta$ {60,61}.

Possiamo quindi dire che il TGF- $\beta$  ha una notevole importanza a livello fisiologico durante l'organogenesi e la riparazione delle ferite, ma è anche la citochina responsabile della fibrosi del tessuto e il regolatore della EMT di tipo 3 durante lo sviluppo tumorale{37}. A livello terapeutico riuscire a bloccare la EMT indotta dal TGF- $\beta$  potrebbe rallentare lo sviluppo del tumore al seno e dei carcinomi in generale. Così facendo verrebbe bloccata la EMT patologica che porta alla fibrosi (EMT di tipo 2) e allo sviluppo tumorale (EMT di tipo 1).

### **La EMT di tipo 3**

La EMT di tipo 3 è indispensabile per facilitare la progressione e la diffusione metastatica del cancro{1, 2}(Fig 4).

La EMT di tipo 3 viene distinta da quella di tipo 2 o di tipo 1 in base al

contesto cellulare in cui si verifica. La EMT di tipo 3 avviene in cellule trasformate, le quali possiedono innumerevoli mutazioni genetiche ed epigenetiche che cooperano con le cascate segnalatorie che portano alla EMT e quindi alla disseminazione metastatica.

Le tre tipologie di EMT appena descritte hanno una cosa in comune: si assiste sempre alla perdita di marker epiteliali, in particolare la E-caderina, accompagnata ad una up-regolazione di marker mesenchimali come vimentina, fibronectina, N-caderina,  $\alpha$ -SMA. L'acquisizione di tali caratteristiche dona alle cellule siano esse embrionali, miofibroblasti o cellule tumorali, la capacità di attraversare la matrice extracellulare e muoversi all'interno dei tessuti. Per quanto riguarda il cancro, è stato osservato che la EMT avviene in qualsiasi tipologia di tumore epiteliale, come, ad esempio, nel cancro al seno{62}, all'ovaio{63}, al colon{64} ed in modelli di cancro all'esofago {11}. Quando una cellula tumorale viene commissionata ad entrare in EMT, perde la propria polarità apicobasale {65}, vengono disintegrate le giunzioni strette e quelle aderenti {66}, subisce cambiamenti citoscheletrici, e vede repressa la citocheratina ed attivata la vimentina{67}. In questo modo le cellule tumorali, come anche le cellule deputate allo sviluppo dell'individuo, sono in grado di muoversi e di invadere. Quanto detto porta ad ipotizzare che durante lo sviluppo tumorale si assiste ad una vera e propria riattivazione di un programma di differenziamento cellulare utilizzato precedentemente dalle cellule

embrionali per formare l'individuo e si osserva infatti che molte citochine che prendono parte alla EMT di tipo 1, (quella responsabile dello sviluppo a livello embrionale), sono le stesse che espresse o regolate in modo inappropriato governano la EMT di tipo 3. La EMT di tipo 3, se pur governata dalle stesse citochine che regolano la EMT di tipo 1 o 2, è un evento molto disordinato e poco coordinato rispetto alla EMT che avviene durante lo sviluppo embrionale{68}.

Vi sono numerosi induttori di EMT nel cancro, come citochine della famiglia del TGF- $\beta$ {69}, Wnt{70}, Snail/Slug{71,72}e six1{73,74}. Questi induttori sono estremamente importanti durante la EMT che avviene durante lo sviluppo embrionale{75,76,77,78}.

Nei carcinomi la EMT consente alle cellule tumorali di lasciare il sito del tumore primario e invadere in tessuti vicini attraverso i vasi sanguigni, generando così metastasi (Fig 5). Pertanto, la EMT contribuisce attivamente allo sviluppo tumorale, come suggerito da numerose evidenze cliniche che associano la presenza di marker di EMT nel tumore ad una prognosi infausta dei pazienti{79,80}. Il contesto in cui si verifica la EMT nei tumori è ben diverso da quello che si presenta all'interno dell'embrione o durante uno stato infiammatorio. In un tumore è presente una popolazione eterogenea di cellule mutate in continua evoluzione, con cambiamenti genetici imprevedibili. Studiare la EMT in una popolazione di cellule tutte diverse fra loro immerse in un microambiente in continuo

cambiamento è molto difficoltoso. È stato osservato che non tutte le cellule tumorali vanno incontro alla EMT per migrare dal sito del tumore primario. Nel carcinoma del colon, ad esempio, considerando la massa tumorale in toto soltanto le cellule che si trovano sulla parte esterna della massa tumorale vanno in EMT perché sono le prime che risentono dei cambiamenti del microambiente e così anche delle citochine che promuovono la transizione{64}.

### **Le caratteristiche peculiari della EMT**

La principale caratteristica della EMT è la disintegrazione e disassemblamento delle giunzioni fra cellula e cellula. Si assiste infatti alla degradazione delle tight junction, dei desmosomi, delle giunzioni aderenti e delle giunzioni gap. Tutte queste giunzioni sono invece presenti nelle cellule epiteliali. Il loro ruolo è di formare una barriera contro l'esterno e permettere che avvenga la segnalazione iuxtacrina fra cellule vicine. Le tight junction sono situate lateralmente sulla parte apicale delle cellule (Fig 6). Queste giunzioni formano uno spazio intercellulare necessario a permettere il passaggio di sostanze fra cellule adiacenti. Tali giunzioni sono formate da proteine trans membrana come la claudina, occludina e scaffold proteici come ZO1 (TJP1) che si associano al citoscheletro di actina della cellula e a complessi segnalatori. Durante la EMT le tight junction vengono disassemblate e le proteine che ne fanno parte vengono repressate.

Par6 è un componente chiave per il mantenimento della polarità della cellula poiché regola l'assemblaggio di tali giunzioni{34}.

Il legame del TGF- $\beta$  al suo recettore TGF- $\beta$ II, legato alle tight junction tramite l'occludina, porta alla fosforilazione di Par6 {65}. L'interazione proteica che permette tale fosforilazione è diretta e non dipende dalle proteine Smad{65}.

Par6 fosforilato recluta una E3 ubiquitina ligasi, smurf1, il quale porta a degradazione RhoA{65}, una piccola proteina della famiglia delle GTPasi responsabile della formazione delle fibre di stress e del mantenimento di una polarità apico-basale e stabilità delle giunzioni {81}. Il TGF- $\beta$ , quindi, è in grado di alterare la struttura dei complessi proteici sulla superficie della cellula indipendentemente dalla attivazione trascrizionale dei geni chiave che governano la EMT.

Le giunzioni aderenti sono formate da interazioni omotipiche di domini extracellulari di E-caderina (Fig 6). I domini intracellulari collegano tale proteina al citoscheletro per mezzo della  $\alpha$  e  $\beta$  catenina. Numerosi studi hanno caratterizzato il meccanismo di distruzione delle giunzioni aderenti, in cui si assiste ad una redistribuzione e repressione della E-caderina.

La repressione trascrizionale della E-caderina è mediata dai membri della famiglia di repressori trascrizionali di Snail/Slug. Il loro ruolo cruciale nella EMT è dimostrato in esperimenti in cui veniva rilevato lo sviluppo,

pressoché assente in topi deleti per il gene che codifica per Snail {82}. Sono stati identificati anche altri repressori del gene della E-Caderina come Slug, SIP1, Twist, LIV1, MTA3 o  $\delta$ EF.

Lo smantellamento delle giunzioni aderenti è mediato da un processo proteolitico della E-Caderina a carico della presenilina-1 (PS-1/ $\gamma$ -secretasi) {83}. Il trattamento con inibitori della  $\gamma$ -secretasi blocca la EMT indotta da TGF- $\beta$  {84}. La disaderina, una glicoproteina associata alla membrana, è stata descritta come un nuovo regolatore dei livelli di E-caderina. Una sua elevata espressione è associata ad aumento della capacità metastatica{9, 13}.

La modulazione dei livelli di E-caderina è perciò un tema estremamente importante nella EMT non-oncogenica e oncogenica.

I desmosomi supportano l'integrità di strutture epiteliali e di adesioni cellula-cellula costituite da molecole di caderina (desmogleina e desmocollina) e permettono la formazione dei legami fra molecole di adesione e le fibre di citocheratina attraverso placche desmosomiali come la desmoplachina e placoglobina{85}(Fig 6).

In alcuni studi è stato dimostrato che, se viene eliminata la desmoplachina nella epidermide di topo, non si ha formazione dei foglietti epiteliali {86}.

Lo smantellamento dei desmosomi durante le prime fasi della EMT indotta da citochine è a carico di Slug, un repressore trascrizionale a dita di zinco che inibisce il gene della desmoplachina e desmogleina,

favorendo la progressione della transizione {72}. Una volta che le giunzioni vengono distrutte, le cellule che prima erano legate le une alle altre si staccano, perdendo la propria polarità. I marker di polarità cellulare come la mucina-1, proteina transmembrana che lega l'actina, vengono sia ridistribuiti all'interno della cellula che portati a degradazione {87}. Inoltre, l'integrina  $\alpha6\beta4$  necessaria al legame della cellula alla lamina basale viene sostituita dalla integrina mesenchimale  $\alpha5\beta1$  {88}.

Le cellule epiteliali polarizzate sono caratterizzate da fasci di filamenti di actina corticale che sono connessi ai domini iuxtamembranari delle giunzioni aderenti. La perdita di polarità e la dissociazione delle giunzioni cellulari avvengono in concomitanza del rimodellamento del citoscheletro di actina, con distribuzione corticale. Si assiste quindi alla formazione di fibre di stress presenti appunto in cellule mesenchimali e cellule dotate di motilità {89,90,91,92}.

Gli eventi indotti dal TGF- $\beta$  che si verificano durante la EMT stimolano l'attività di fattori di scambio per la guanina (GEFs), i quali attivano le GTPasi della famiglia di Rho. Queste proteine regolano il rimodellamento del citoscheletro, permettendo alla cellula di acquisire capacità migratorie {93,94}. L'attivazione di Rho porta alla neo-formazione di fibre di stress composte da filamenti di F-actina polimerizzata e impacchettata a filamenti di miosina II. La struttura citoscheletrica che si viene a formare è

dotata di capacità contrattile {95,96}. Inoltre l'attivazione di Rho porta alla formazione di adesioni focali in cui sono presenti strutture proteiche specifiche ed integrine necessarie a permettere la comunicazione fra cellule fibroblastoidi e matrice extracellulare (ECM) {95}. L'attivazione di altri membri appartenenti alla famiglia delle Rho GTPasi come Cdc42 e Rac, inducono polimerizzazione dei filamenti di actina formando filopodi oppure rispettivamente lamellipodi e pieghettature della membrana (ruffles) {40,95}. Attraverso le proteine della famiglia di Rho, la cellula è in grado di fuggire dall'epitelio e raggiungere così lo stroma.

Oltre al rimodellamento del citoscheletro, RhoA è coinvolta nella clusterizzazione della E-caderina durante la formazione delle giunzioni aderenti mentre Rac1 e Cdc42 controllano l'interazione delle giunzioni aderenti e dei filamenti di actina {97}.

Le GTPasi della famiglia di Rho e le loro proteine regolatorie (GEFs e GAPs) esercitano quindi ruoli molteplici ed estremamente importanti per quanto riguarda la plasticità cellulare. Inoltre, tali proteine sono dei veri e propri effettori della EMT indotta da TGF- $\beta$  e da altre citochine.

Le cellule che intraprendono la EMT, per dissociarsi dalle cellule epiteliali di cui facevano parte, devono staccare i contatti alla lamina basale mediati dalle integrine e digerire la matrice extracellulare limitrofa. La lamina basale è una struttura specializzata della matrice extracellulare (ECM) ed è composta da collagene di tipo IV, laminina e nidogeno. Il rimodellamento

dei contatti fra cellula e lamina basale richiede l'attivazione da parte del TGF- $\beta$  o del FGF2, di enzimi proteolitici come MMP2 e MMP9 {16, 98}. L'aumento della sintesi e della attivazione della MMP2 e MMP9 (gelatinasi A e gelatinasi B) in risposta al TGF- $\beta$  porta alla degradazione del collagene di tipo IV. Una cosa molto interessante è che in cellule epiteliali renali di topo è sufficiente inibire l'assemblamento del collagene di tipo IV per indurre in tali cellule la EMT in vitro {99}. L'attività della MMP2 è allo stesso modo richiesta per indurre la EMT del tubulo renale {101}. In modelli di cancro al colon è stato osservato che l'espressione di specifiche integrine come la  $\alpha\beta6$  in seguito alla EMT permette alle cellule invasive di interagire con la matrice interstiziale, sostenendo così la attivazione da parte del TGF- $\beta$  {100}. Inoltre, il grado di espressione della integrina  $\alpha\beta6$  è un marker di cellule che hanno intrapreso la EMT ed è associato a tumori estremamente aggressivi che progrediranno alla fase terminale molto rapidamente {100}. Il TGF- $\beta$  induce la proteina adattatrice Dab2 contemporaneamente alla EMT. Dab2 si lega alla integrina  $\beta1$  ed è necessaria per l'attivazione di tale integrina da parte del TGF- $\beta$ . Il blocco di Dab2 inibisce l'attivazione dell'integrina e porta le cellule in apoptosi, bloccando così la EMT {102}.

Dopo che le cellule tumorali hanno concluso il programma EMT e si sono così distaccate dal sito del tumore primario, devono attivare una serie di proteine che regolano la motilità cellulare. I segnali promigratori derivano

dall'ambiente e precisamente dalla ECM e dai fattori di crescita. I segnali pro-migratori guidano la migrazione cellulare, in cui è possibile evidenziare tre eventi che si succedono ciclicamente, come protrusione, adesione e contrazione. Per prima cosa la cellula tumorale si polarizza stabilendo un fronte anteriore che dirige il fronte migratorio, e uno posteriore. Anteriormente, in seguito alla contrazione della actina corticale e al suo assemblamento in fasci, si ha la formazione di pseudopodi attraverso cui la cellula si spinge in avanti. Durante la formazione degli pseudopodi si vengono a creare nuovi punti di contatto alla ECM attraverso le integrine. Questi punti di ancoraggio vengono utilizzati dalla cellula durante la fase di traslocazione, in cui si ha retrazione del fronte posteriore verso quello anteriore. Le metalloproteasi, che sono overesprese in molti tumori, sono reclutate sul fronte anteriore della cellula in modo da distruggere la ECM e generare così un cammino. I filamenti contrattili di actina-miosina generano propulsione in avanti del fronte anteriore, mentre quello posteriore si distacca dai contatti alla matrice e si retrae. Si viene così a creare un movimento coordinato della cellula nella direzione di migrazione {103} (Fig 7).

Gli eventi che si verificano durante la migrazione cellulare sono simili a quelli che si verificano nelle ultime fasi della EMT. Una cellula che sta completando la EMT oltrepassa la lamina basale fino a raggiungere lo stroma, utilizzando lo stesso macchinario proteico che utilizzano le cellule

durante la migrazione. Il macchinario di locomozione è governato inizialmente da Cdc42 e Rac, responsabili della polimerizzazione della actina sul fronte anteriore della cellula, in modo da generare una attiva protrusione del corpo cellulare. Successivamente interviene RhoA, responsabile della contrazione delle fibre di actina-miosina, generando forza di trazione. PIP3, prodotto dalla PI3K sul fronte anteriore, attiva Cdc42 e Rac in un meccanismo a feedback positivo che limita queste molecole al fronte migratorio anteriore. Le proteine WASP/WAVE sono il bersaglio di Cdc42 e Rac e stimolano il complesso Arp2/3 ad indurre polimerizzazione di filamenti di actina, formando così delle vere e proprie protrusioni. La serina-treonina chinasi PAK è un altro bersaglio a valle di Cdc42/Rac, che è in grado di fosforilare ed attivare LIMK. Successivamente LIMK fosforila e inattiva la cofilina, responsabile della depolimerizzazione dei fasci di actina.

Rho è responsabile della contrazione cellulare e della retrazione del fronte posteriore attraverso l'attivazione della chinasi ROCK. Questa chinasi stimola la formazione dei filamenti actomiosinici con conseguente contrazione della cellula. In maniera simile a PAK, la chinasi ROCK fosforila e attiva LIMK, con conseguente stabilizzazione dei filamenti di actina. Inoltre, ROCK fosforila e inattiva la fosfatasi MLC. Ciò porta all'aumento dei livelli di fosfo-miosina che, legandosi ai filamenti di actina, genera contrazione [22, 104].

## Le vie di segnalazione alla base della EMT

Le citochine che maggiormente governano la EMT sono quelle appartenenti alla grande famiglia del TGF- $\beta$ . Queste proteine regolano la crescita, la sopravvivenza, la differenziazione e la migrazione delle cellule e rivestono inoltre rivestono un ruolo estremamente importante durante lo sviluppo embrionale e nel controllo dell'omeostasi del tessuto {105,106}. Queste citochine facenti parte della famiglia del TGF- $\beta$  sono implicate in numerose malattie, come la fibrosi del tessuto, le patologie autoimmuni e il cancro {107}. Durante la carcinogenesi il TGF- $\beta$  ha un doppio ruolo. Inizialmente esso sopprime la tumorigenesi, inducendo arresto della crescita e l'apoptosi. Tuttavia, in tumori allo stadio avanzato, dove il TGF- $\beta$  viene overespresso {25}, esso promuove la tumorigenesi, inducendo la transizione epitelio-mesenchima (EMT). Attraverso la EMT le cellule tumorali divengono più aggressive e capaci di generare metastasi {108}. L'azione pro-tumorale del TGF- $\beta$  si esplica anche su cellule del microambiente e del sistema di sorveglianza immunitaria (Fig 8).

Il TGF- $\beta$  infatti sopprime il sistema immunitario, promuove l'angiogenesi e recluta cellule infiammatorie che secernono citochine che agiscono poi sulle cellule tumorali.

Il TGF- $\beta$ , come detto in precedenza, mantiene l'omeostasi del tessuto e

previene l'instaurarsi di tumori, regolando la proliferazione cellulare, la differenziazione, la sopravvivenza e l'adesione ma anche influenzando il microambiente cellulare. Le cellule tumorali sono una entità geneticamente instabile e purtroppo sono capaci di eludere i segnali soppressori di arresto della crescita indotti dal TGF- $\beta$ . La via di segnalazione del TGF- $\beta$ , in forme patologiche, promuove la crescita tumorale, l'invasione e l'evasione della sorveglianza immunitaria, portando poi alla disseminazione metastatica.

Le cellule tumorali possono eludere gli effetti soppressivi del TGF- $\beta$  sia attraverso l'inattivazione di componenti chiave della via di segnalazione, come i recettori per il TGF- $\beta$ , sia attraverso alterazioni di proteine a valle che destabilizzano l'effetto di soppressione tumorale della via di segnalazione attivata dal TGF- $\beta$  (Fig 9). Nel caso in cui le cellule tumorali utilizzino la seconda modalità, rimangono poi così in grado di utilizzare liberamente la rimanente funzione regolatoria del TGF- $\beta$  a proprio vantaggio, acquistando capacità invasive, producendo mitogeni in modo autocrino o rilasciando citochine prometastatiche. Quindi, il blocco della via di segnalazione del TGF- $\beta$  attraverso l'inattivazione del recettore può eliminare la soppressione tumorale, mentre nel caso in cui sia la via a valle (quella che induce arresto della crescita) ad essere interamente bloccata, si assiste sia alla elusione dell'effetto soppressorio sul tumore sia alla genesi di un potenziale aggiuntivo per la tumorigenesi. Inoltre, è molto

interessante l'effetto del TGF- $\beta$  sullo stroma. Il TGF- $\beta$  è l'induttore principale dell'immuno tolleranza, e i tumori che producono alti livelli di questa citochina possono così proteggersi dagli attacchi del sistema immunitario. Questa citochina prodotta dalle cellule tumorali, oltre a tenere lontano i componenti del sistema immunitario, recluta cellule stromali come i miofibroblati (nel fronte migratorio del tumore) e gli osteoclasti (nella metastasi alle ossa), sostenendo la disseminazione del tumore {106}.

### **Le citochine della famiglia del TGF- $\beta$ : i principali induttori di EMT**

La superfamiglia dei fattori di crescita del TGF- $\beta$  è costituita da almeno 30 geni nei mammiferi. Ne fanno parte 3 isoforme del TGF- $\beta$ , 4 attivine a catena  $\beta$ , la proteina nodal, 10 proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) e 11 fattori di crescita e differenziazione (GDFs) (Fig 10). Tutti questi ligandi sono sintetizzati come pre-proteine dimeriche {109}. La dimerizzazione richiede la presenza dei pro-domini e perciò avviene a livello intracellulare, prima che avvenga il taglio proteolitico da parte della proteasi SPC {111, 112}. Successivamente il fattore di crescita in forma di dimero viene totalmente processato e secreto. Differentemente dagli altri ligandi, il precursore nodal non ha bisogno di essere processato per legare ed attivare il recettore {113}.

I ligandi GDF8, GDF11, come anche il TGF- $\beta$ , vengono secreti in una

forma latente con attaccato, in maniera non-covalente, il proprio propeptide. Questi ligandi richiedono una successiva attivazione per diventare attivi. La proteina coinvolta nella loro attivazione è la BMP1 [7].

Una caratteristica peculiare dei ligandi della famiglia del TGF- $\beta$  è la presenza del nodo di cisteine, un motivo strutturale presente nella proteina matura. Questo motivo strutturale prende forma da tre ponti disolfuro intramolecolari fra sei residui di cisteina altamente conservati. Eccetto il GDF3, GDF9 e BMP15, tutti i ligandi presentano un residuo di cisteina addizionale che utilizzano per formare dei ponti disolfuro intermolecolari, stabilizzando così i dimeri. Sebbene gli omodimeri siano la forma prevalente, possono formarsi anche eterodimeri. Ad esempio, si possono formare eterodimeri fra l'activina  $\beta_A$ - $\beta_B$ , fra la proteina nodal-BMP4 e la nodal-BMP7 [110].

I recettori che legano i ligandi della famiglia del TGF- $\beta$  possiedono domini ricchi in cisteina, un dominio transmembrana a singolo passaggio ed un dominio intracellulare altamente conservato con attività serina/treonina cinasica [114]. Esistono due classi di recettori di tipo I e di tipo II, codificati rispettivamente da 5 e 7 geni nell'essere umano (Fig 11).

In assenza del ligando, i recettori di tipo I e quelli di tipo II rimangono sulla membrana cellulare sottoforma di omodimeri. Il TGF- $\beta$ 1, il TGF- $\beta$ 3 e l'activine legano i loro recettori di tipo II senza il bisogno del recettore di tipo I, mentre per quanto riguarda BMP-2, BMP-4 e BMP-7 si legano

soprattutto ai loro recettori di tipo I, BMP-RIA e BMP-RIB, sebbene vi sia una più alta affinità verso il complesso tetramerico formato dagli omodimeri di tipo I e omodimeri di tipo II {115}.

Alcuni ligandi come il TGF- $\beta$ 2 interagiscono soltanto con i complessi già formati da recettori di tipo II e di tipo I. Ciò suggerisce che tali complessi si formino in assenza del ligando e che recettori di tipo II manifestino una innata affinità per recettori di tipo I {115, 116}. Perciò la bassa affinità di legame fra i vari recettori del complesso fornisce una superficie di attacco per i ligandi, il cui legame porta alla stabilizzazione del complesso ligando-recettore. Il solo legame del ligando al proprio complesso recettoriale non è sufficiente a far partire la cascata segnalatoria. Per l'attivazione della cinasi del recettore di tipo I e la successiva cascata segnalatoria è necessario che la cinasi venga fosforilata dal recettore di tipo II sul suo dominio GS {115, 117}. Anche se il legame di ligandi al recettore di tipo II porta alla sua autofosforilazione, la segnalazione non parte senza che vi siano i recettori di tipo I. In risposta allo stesso ligando si possono formare complessi recettoriali diversi. Ciò porta ad una diversificazione della risposta allo stesso ligando {115}. Una combinazione di recettori lega più ligandi ed i pattern di ligandi e recettori espressi indicano quali recettori sono attivati.

Per esempio, i recettori di tipo II ActRII e ActRIIB possono associarsi ai recettori di tipo I ActRIB/ALK4 e mediare la segnalazione dell'activina. Se

invece gli stessi recettori di tipo II si associano a BMP-RIA o BMP-RIB, mediando invece la segnalazione di BMP. I recettori BMP di tipo II, BMP-RII, possono associarsi con tre recettori di tipo I ovvero BMP-RIA, BMP-RIB e ActRI/ALK2, al fine di mediare il segnale di diverse proteine BMP.

Un ligando può indurre differenti risposte in base al complesso recettoriale a cui si lega. Per esempio, il T $\beta$ RII interagisce non solo con il classico recettore di tipo I, T $\beta$ RI/ALK5, portando alla attivazione di Smad2 e 3, ma si lega anche ad ALK1, attivando così Smad1 e 5. Una diversa espressione di questi recettori in cellule endoteliali porta ad una diversa risposta cellulare al TGF- $\beta$ , suggerendo che la loro espressione controlla lo stato dell'endotelio [118]. L'attivazione del complesso recettoriale ActRI/ALK2 da parte del TGF- $\beta$  è responsabile della differenziazione epitelio-mesenchima indotta da esso [119, 120]. Un'ulteriore complessità è data dalla presenza di ligandi, Inibina e BMPs eteromeriche, secreti come eterodimeri. Questi ligandi potrebbero aver bisogno di legarsi a combinazioni eterodimeriche di recettori di tipo I o di tipo II. Inoltre, esistono proteine accessorie che possono incrementare o modificare la specificità di legame dei vari ligandi. La proteina Nodal si lega ad ActRIIB e ActRIB/ALK4, attivando Smad2, ma per un legame saldo è necessaria la associazione di Cripto fucosilata, una proteina transmembrana simile al TGF- $\alpha$ . Inoltre, anche i betaglicani e le endogline sono necessarie per il potenziamento del legame del TGF- $\beta$  ai propri recettori. Perciò,

l'espressione sulla superficie cellulare dei betaglicani può regolare la risposta cellulare al TGF- $\beta$  {121}; inoltre, una alterata funzionalità della endogлина porta ad una inefficace segnalazione del TGF- $\beta$ , causando anomalità dei vasi {122}.

### **Le proteine Smad attivate dai ligandi del TGF- $\beta$**

Esistono otto tipologie di proteine della famiglia Smad: Smad 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Smad 2 e 3 vengono attivate dalla fosforilazione sull'estremità carbossilica dal recettore del TGF- $\beta$  e dalla Activina (T $\beta$ RI e ActRIB). Smad1, Smad5 e Smad8, invece, sono attivati da ALK-1, ALK-2, BMP-RIA/ALK-3 e BMP-RIB/ALK-6 in risposta a BMP {14, 115, 117, 123} o altri ligandi. Le proteine Smad attivate dal recettore (R-Smad) si distaccano da esso e formano un complesso eterotrimerico con due R-Smad e una proteina a comune, Smad4. Il complesso eterotrimerico migra poi nel nucleo (Fig 12).

Sebbene Smad4 sia coinvolto in ogni attivazione trascrizionale indotta da Smad, non è essenziale per la attivazione della risposta al TGF- $\beta$ .

Alcune risposte al TGF- $\beta$  avvengono in assenza di Smad4 mentre esistono risposte in cui Smad4 è necessario per garantire una risposta ottimale alla citochina {124}. Smad6 e Smad7 hanno una struttura diversa rispetto alle altre proteine ed è stato dimostrato avere un ruolo inibitorio sulla

segnalazione {14, 117, 123}. Le proteine R-Smad e Smad4 presentano un dominio conservato MH1 e un dominio C-Terminale MH2 che fiancheggiano un segmento "linker" {14, 117, 123}. Le proteine Smad inibitorie invece mancano del dominio MH1, ma presentano il dominio MH2. Il dominio MH2 è simile al dominio FHA che lega i fosfopeptidi {125}. Sia i domini MH1 sia i domini MH2 possono interagire con specifici fattori trascrizionali, mentre la parte C-Terminale delle proteine R-Smad recluta ed interagisce con proteine coattivatrici che legano CREB (CBP) e p300. Ad eccezione di Smad2, i domini MH1 delle proteine Smad possono legare il DNA, mentre i domini MH2 mediano l'oligomerizzazione e l'interazione con i recettori (Fig 13).

L'espressione delle proteine R-Smad e Smad4 è altamente controllata durante lo sviluppo. Tuttavia, queste proteine sono espresse praticamente in qualsiasi tipo cellulare. Diversamente, l'espressione delle proteine inibitorie Smad6 e Smad7 è altamente regolata da segnali extracellulari. L'induzione di Smad 6 e 7 da parte del TGF- $\beta$  e BMP rappresenta un meccanismo di autoinibizione per la segnalazione indotta da queste proteine {14, 117, 123}. Infatti, la repressione dell'espressione di Smad6 e 7 durante la differenziazione degli adipociti può causare la perdita della segnalazione autocrina del TGF- $\beta$  e BMP{191}. L'attivazione dell'EGFr, come di altri recettori a tirosin cinasi, la segnalazione attraverso STAT dell'interferone- $\gamma$ , e l'attivazione di NF-kB da parte del TNF- $\alpha$  inducono

l'espressione di Smad7, inibendo così la segnalazione del TGF- $\beta$  {14, 117, 123}.

La degradazione ubiquitina-proteasoma controlla i livelli di Smad a livello post-traduzionale. Smurf1 e Smurf2 sono due ubiquitina E3 ligasi appartenenti alla famiglia HECT. Queste proteine degradano le R-Smad, opponendosi alla segnalazione del TGF- $\beta$  {127}. La degradazione delle proteine R-Smad da parte di Smurf regola i livelli di R-Smad nella cellula e quindi la sensibilità della stessa agli stimoli citochinici.

Smurf1 interagisce con Smad1 e Smad5, ostacolando così la segnalazione di BMP {39}, mentre Smurf2 interagisce con molte altre proteine R-Smad, regolando negativamente la segnalazione del TGF- $\beta$ /BMP e della attivina {127, 128, 129}. La degradazione al proteasoma regola i livelli delle proteine R-Smad anche dopo la loro traslocazione nel nucleo. Perciò le porzioni C-Terminali di Smad2 fosforilate possono essere ubiquitinate. Inoltre, il blocco del proteasoma porta ad un accumulo maggiore di R-Smad nel nucleo {130}. Smad3, fosforilato una volta che si trova nel nucleo, interagisce con una proteina anulare Roc1, permettendo così che avvenga l'associazione al complesso dell'ubiquitina ligasi SCF. Questo complesso è costituito da Roc1, Skp1, Cullina e  $\beta$ TRCP1/Fbwla. Esso una volta formatosi, porta fuori dal nucleo Smad3, permettendo che venga degradato dal proteasoma nel citoplasma {15}. C'è da dire che, in presenza o assenza del TGF- $\beta$ , solo una piccola porzione di Smad2 e Smad 3 è

ubiquitinata. Sotto stimolazione del TGF- $\beta$ , Smad2/3 fosforilati possono formare un complesso stabile con Smurf2. Perciò il complesso non viene degradato ma una volta che viene defosforilato ritorna nel citoplasma {131, 132}. Tuttavia, diversamente dalle proteine R-Smad, Smad4 non viene ubiquitinato. Infatti la sumoilazione di Smad4 ne incrementa la stabilità {133}. Comunque, in alcuni tumori sono state rilevate mutazioni che portano ad ubiquitinazione o ad una minore stabilità di Smad4.

L'interazione delle proteine R-Smad con i recettori di tipo I attivati porta ad una diretta fosforilazione da parte della cinasi del recettore di tipo I di due serine situate sull'estremità C-terminale. Questa interazione è specificata dalle sequenze presenti sia nel recettore che in Smad. Il dominio del recettore di tipo I costituito dal *loop* di nove aminoacidi (L45) è importante per la segnalazione e per la specificità di legame a Smad. Tale dominio interagisce direttamente con il *loop* L3 presente nel dominio MH2 delle proteine R-Smad. Le sequenze di aminoacidi successive al *loop* L3 contribuiscono alla specificità di legame per i vari recettori. La sequenza GS dei recettori di tipo I, in seguito alla fosforilazione in serina da parte dei recettori di tipo II, si interfaccia con le sequenze successive al *loop* L3. In questo modo stabilizza l'attacco di Smad, contribuendo alla specificità di legame sul recettore {117, 134}.

I ligandi della famiglia del TGF- $\beta$  inducono l'internalizzazione del recettore in endosomi, processo necessario per una efficiente segnalazione

del TGF- $\beta$  attraverso Smad {19, 135}. La composizione eteromerică dei recettori e l'interazione di essi con co-recettori, non solo determinano la specificità di legame dei ligandi ma possono anche conferire una via alternativa nella cellula, regolando così la segnalazione. Infatti, le proteine che si associano ai recettori possono avere un ruolo nella regolazione del traffico vescicolare come anche facilitare l'internalizzazione del recettore e il reclutamento di Smad su di esso {19, 135}. Per esempio, SARA e Dab2, che sono altamente presenti sugli endosomi e sulle vescicole ricoperte di clatrina, si legano sia al recettore che alle proteine R-Smad, promuovendo la fosforilazione di Smad e quindi la segnalazione del TGF- $\beta$  {136, 137}. I recettori del TGF- $\beta$  possono associarsi pure alla caveolina. La caveolina è una proteina presente nelle invaginazioni della membrana plasmatica chiamate caveole {12}. I raft di membrana contenenti le caveole sono estremamente importanti per il turnover del recettore. Le caveole regolano inoltre la disponibilità del recettore per i ligandi {136}.

Le numerose proteine che interagiscono con i recettori quindi, controllano sia la localizzazione subcellulare sia l'espressione sulla superficie cellulare dei recettori. Tutte queste proteine che interagiscono con i recettori controllano la durata della attivazione delle proteine Smad e quindi il loro stato fosforilato. Ogni via di segnalazione può essere regolata da numerose proteine, consentendo una diversificazione della risposta in base ai vari stimoli.

Le proteine citoscheletriche giocano un ruolo estremamente importante riguardo la localizzazione e la segnalazione delle proteine Smad. Le proteine Smad2 e Smad3 non fosforilate legano i microtubuli e la stimolazione da parte del TGF- $\beta$  ne induce il distacco. La distruzione dei microtubuli con nocodazolo provoca il distacco delle proteine Smad dai microtubuli e la loro successiva fosforilazione e attivazione {138}. Le proteine Smad interagiscono inoltre con la filamina, uno scaffold, legato alla actina, per le proteine deputate alla segnalazione intracellulare. Le cellule che mancano della filamina non sono in grado di attivare la via di segnalazione indotta dal TGF- $\beta$ . Infatti in mancanza di filamina non avviene la fosforilazione di Smad2. Se la filamina viene aggiunta ectopicamente tutto torna a funzionare {139}. Infine il TGF- $\beta$  induce la fosforilazione di ELF, una  $\beta$ -spectrina, permettendo l'associazione con Smad3 e Smad4. La mancanza di ELF porta ad una errata localizzazione di Smad3/4, causando la perdita della segnalazione indotta da TGF- $\beta$  {140}.

Smad6 e Smad7 regolano l'attivazione delle proteine R-Smad {14, 117, 123}. Smad6 e Smad7 si legano attraverso i loro domini MH2 ai recettori di tipo I. Il loro legame impedisce ai recettori di tipo I di fosforilare le proteine effettrici Smad, inibendo così la segnalazione {14, 117, 123}. Inoltre Smad6 interferisce con la formazione del legame fra le proteine Smad con Smad4, prevenendo così la formazione del complesso attivo. Il

reclutamento di un complesso formato da Smad7 e Smurf1 o Smurf2 sul recettore di tipo I ne causa ubiquitinazione e successiva degradazione {141,142}. Le proteine deputate alla ubiquitinazione sono le proteine Smurf. La degradazione del recettore di tipo I, situato probabilmente alle caveole {136}, porta anch'essa alla inibizione della segnalazione del TGF- $\beta$ . In seguito alla fosforilazione in posizione C-terminale, le proteine R-Smad si distaccano dal recettore di tipo I. Probabilmente ciò avviene perché la fosforilazione porta a dei cambiamenti conformazionali e alla formazione di un complesso oligomerico. Le proteine R-Smad attivate formano un complesso oligomerico. La regione C-terminale fosforilata si unisce alle vicine proteine R-Smad o Smad4 per mezzo della loro regione *loop* L3 in cui è presente una tasca legante le fosfoserine. Le proteine R-Smad possono combinarsi in due modi. Possono formare eterodimeri oppure eterotrimeri costituiti da due R-Smad e un solo Smad4 {143, 144}. Sia gli eterodimeri che gli eterotrimeri possono far parte di un complesso trascrizionale. La loro attività a livello trascrizionale dipende da quale fattore trascrizionale vi si lega. Ad esempio, i complessi che si legano a Fast-1 o Fast-3 sono costituiti da due proteine Smad2 e una proteina Smad4, mentre nel promotore di c-Jun si legano eterodimeri costituiti da Smad3 e Smad4 {145}. In molte risposte al TGF- $\beta$  si assiste alla formazione di complessi costituiti da due proteine Smad3 e da una Smad4, mentre in risposta alla activina i complessi sono formati da due proteine Smad2 e

una proteina Smad4. Tuttavia, in alcune risposte al TGF- $\beta$ , come l'induzione di espressione di p15<sup>Ink4B</sup>, è necessaria la concomitante presenza di Smad2, Smad3 e Smad4 {146}.

I recettori del TGF- $\beta$  rimangono attivi per circa 3-4 ore dalla loro stimolazione, permettendo così che le proteine Smad rimangano nel nucleo ed attivino la trascrizione genica {131}. L'importazione nucleare delle proteine Smad segue il paradigma classico descritto per tutte le altre proteine che migrano nel nucleo. In assenza di stimolazione, le proteine R-Smad rimangono localizzate nel citoplasma mentre Smad4 si trova sia nel nucleo che nel citoplasma {131, 147, 148}. L'importazione nucleare delle proteine R-Smad non richiede il legame di Smad4, anche se esso cotrasloca con le proteine R-Smad. L'importazione nucleare di Smad1 e Smad3 avviene per mezzo di una sequenza ricca in lisine (NLS) presente nel dominio MH1 di tutte le proteine R-Smad {148}. La fosforilazione C-terminale nel dominio MH2 causa, come detto in precedenza, un cambiamento conformazionale nella proteina Smad e ne espone così le sequenze NLS alla importina- $\beta$  {149, 150}. Differentemente da Smad3, l'importazione nucleare di Smad2 può non dipendere dalla importina- $\beta$ . Ciò è dovuto ad una inserzione nel dominio MH1 di Smad2 e la sua importazione nucleare può essere a carico del dominio MH2 {131, 132, 148, 150}. Nel nucleo le proteine R-Smad sono costantemente defosforilate e rispedite così nel citoplasma come proteine inattive {131, 132}. Smad2

entra nel nucleo per mezzo del legame che si instaura fra il suo dominio MH2 e la nucleoporina CAN/Nup214 e Nup153 {132}. Le proteine R-Smad entrano nel nucleo soltanto in seguito a stimolazione. Smad4 invece entra ed esce continuamente dal nucleo a causa della continua attività della regione NLS nel dominio MH1 e della regione di esportazione nucleare (NES) presente nel dominio linker regolata dal recettore di trasporto nucleare CRM1 {131, 147}.

La sequenza NES può non essere esposta quando Smad4 è legato alle proteine R-Smad. Ciò permette che i complessi formati rimangano nel nucleo.

Smad6 e Smad7, in assenza di stimolazione, sono localizzate nel nucleo {151, 152}. Il TGF- $\beta$  induce l'esportazione di Smad7 mentre BMP induce l'esportazione di Smad6 {151, 152}. L'esportazione di Smad7 può richiedere che vi sia un'interazione con Smurf1 o Smurf2 {152}, mentre Smad6, una volta uscito dal nucleo rimane ancorato ad una proteina di ritenzione per mantenersi nel citosol {151}.

### **Le vie alternative che attivano le proteine Smad**

La fosforilazione in posizione C-terminale ad opera del recettore di tipo I è un evento chiave della attivazione di Smad {14, 117, 123}. Esistono comunque altre proteine ad azione cinasica che regolano ulteriormente

l'attivazione delle proteine Smad. Infatti, è stato osservato un complesso pattern di fosforilazione a carico di queste proteine. La fosforilazione di Smad2 in risposta all'EGF e HGF, mediata da recettori a tirosin cinasi, sfata il mito che solo i ligandi del TGF- $\beta$  sono in grado di attivare e fosforilare Smad2 {154}. La via di segnalazione di Erk, stimolata dalla attivazione di recettori a tirosin cinasi o da Ras, ha come bersaglio le proteine R-Smad. Tali cinasi, infatti fosforilano il dominio MH1 di Smad2 e i segmenti linker di Smad1, Smad2 e Smad3 {155, 156}. L'attivazione di recettori a tirosin cinasi e dell'oncogene Ras inibiscono la traslocazione nucleare delle proteine Smad attivate dai ligandi del TGF- $\beta$ . Ciò poteva spiegare il motivo per il quale in cellule con Ras iperattivato la segnalazione del TGF- $\beta$  è compromessa. Altri studi invece non hanno trovato una traslocazione nucleare di Smad compromessa in cellule con Ras iperattivato o in cellule con MAP cinasi attiva {154, 156, 157}. Inoltre, la cooperazione tra la segnalazione Erk/MAPK e la segnalazione del TGF- $\beta$  nel comportamento delle cellule tumorali non sembra essere compatibile con la segnalazione difettiva di Smad in cellule Ras-trasformate {158}. Altre cinasi possono fosforilare i siti di Erk/MAPK, come suggerito dalla fosforilazione di questi siti in Smad2, ma non Smad1, durante lo sviluppo {159}.

La fosforilazione delle proteine Smad può avvenire in seguito alla attivazione della MAPK/Erk cinasi cinasi 1 (MEKK1). MEKK1 agisce a

valle di Ras ma a monte della cinasi Erk attivata dai fattori di crescita.

L'attivazione di MEKK1 potenzia la fosforilazione di Smad2, il legame a Smad4, la migrazione nel nucleo e l'attività trascrizionale indotta da esso {8}. JNK fosforila Smad3 in siti distanti dal dominio SSXS, in posizione C-terminale e ne potenzia così la traslocazione nucleare e l'attività trascrizionale indotta dal TGF- $\beta$  {157}. L'induzione della via di segnalazione delle MAPK e di JNK da parte del TGF- $\beta$  è in grado di regolare la segnalazione di Smad.

L'attivazione della Ca<sup>2+</sup>/proteina cinasi II dipendente dalla calmodulina (CamKII) porta alla fosforilazione di Smad2, Smad3 e Smad4, impedendo la formazione del complesso. CamKII fosforila Smad2 sulla regione linker e sul dominio MH1 {160}. La fosforilazione sui domini MH1 di Smad2 e Smad3 da parte della PKC ostacola in legame di tali proteine al DNA. Ciò suggerisce che la PKC abbia un ruolo regolatorio sulla attivazione trascrizionale mediata dalle proteine Smad {161}. Diversamente dalle proteine R-Smad, Smad4 non viene regolato da fosforilazione. Smad6 e Smad7 sono quasi sempre fosforilate indipendentemente dalla stimolazione con TGF- $\beta$ . Una mutazione di Smad7 a carico di una serina, bersaglio di fosforilazione, è di notevole effetto. Tale mutazione impedisce a Smad7 di attivare la trascrizione genica quando si trova fuso ad un dominio legante il DNA {143}.

### **La segnalazione Smad-indipendente, attivata dal TGF- $\beta$**

La segnalazione indotta dal TGF- $\beta$  coinvolge anche altre vie di segnalazione che normalmente vengono attivate da recettori a tirosin cinasi in risposta a ligandi diversi dal TGF- $\beta$ . La rapida attivazione di queste vie di segnalazione Smad indipendenti in risposta al TGF- $\beta$  segue spesso una cinetica assimilabile a quella della via di segnalazione in cui è coinvolto Smad (Fig 14).

L'attenuazione della via di segnalazione Smad dipendente generalmente non ha effetto sulla attivazione di queste cascate segnalatorie Smad indipendenti. L'attivazione per via diretta di queste vie di segnalazione avviene attraverso l'interazione di mediatori. Tra le risposte segnalatorie indipendenti da Smad, l'attivazione della MAPK Erk, della GTPasi Rho e della via di segnalazione di PI3/Akt in risposta al TGF- $\beta$  sono state associate al processo EMT. Queste vie di segnalazione indotte dal TGF- $\beta$  regolano processi distinti come l'organizzazione del citoscheletro, la crescita cellulare, la sopravvivenza, la migrazione e l'invasione [169, 170].

Il trattamento delle cellule con inibitori selettivi per una o più di queste vie Smad-indipendenti provoca un blocco del programma EMT. Ciò suggerisce che siano necessarie entrambe le vie di segnalazione per indurre la EMT. La segnalazione indotta dai fattori di crescita attraverso i recettori a tirosin cinasi attiva la cascata delle MAPK. È stato dimostrato che la cascata delle MAPK regola Smad attivato dal legame del TGF- $\beta$  al

suo recettore. La MAPK Erk fosforila le R-Smad nella loro regione di legame, impedendo in questo modo la loro traslocazione nel nucleo e riducendo così la loro attività [171]. Il TGF- $\beta$ , in seguito al legame ai suoi recettori classici, è in grado di attivare direttamente la cascata della MAPK. C'è da dire però che i livelli di attivazione delle MAPK indotte con questo sistema sono più bassi rispetto ai livelli di attivazione di queste cinasi indotte dai recettori a tirosin cinasi classici.

L'attivazione delle MAP cinasi Erk1 e Erk2 in risposta al TGF- $\beta$  è innescata da Ras, che a sua volta attiva Raf e la cinasi MEK1/2, seguendo una cascata di attivazione simile a quella che verrebbe indotta dai fattori di crescita [170, 172]. Questa via di segnalazione è collegata al complesso recettoriale dalla proteina ShcA. In risposta al TGF- $\beta$ , ShcA si associa alla subunità I del recettore e da esso viene fosforilata; in questo modo si viene a creare un sito di reclutamento per Grb2 e Sos. Questo complesso appena formato è in grado di dare il via alla cascata segnalatoria, attivando direttamente la piccola GTPasi Ras [172]. In aggiunta al ruolo di ShcA sopra descritto, l'interazione della integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  con la subunità II del recettore del TGF- $\beta$  ne induce fosforilazione da parte di Src. Una volta che il recettore è stato fosforilato, vengono reclutati ShcA e Grb2 [173].

Varie osservazioni supportano l'idea che esista una cooperazione fra la cascata segnalatoria mediata da Ras-Erk MAPK e quella classica indotta dal TGF- $\beta$  nell'induzione della EMT. L'aumento della via di segnalazione

di Ras-Erk MAP in seguito a stimolazione di fattori di crescita, incrementa la via di segnalazione del TGF- $\beta$  e quindi della EMT {158, 174, 175, 176}. In alcuni studi è stato osservato che l'inibizione di MEK1/2 blocca la EMT indotta dal TGF- $\beta$  {177}. L'attivazione di MEK/Erk MAP cinasi amplifica la risposta al TGF- $\beta$ , provocando la riduzione di espressione della E-caderina, l'espressione della N-caderina e della MMP {175, 176}. Inoltre, l'attivazione della MAPK Erk5, che può avvenire in risposta al TGF- $\beta$ , stabilizza l'espressione di Snail1 {178}.

La stimolazione con TGF- $\beta$  può attivare anche la p38 MAP cinasi. Infatti è stato osservato che il TGF- $\beta$ 1 è in grado di indurre la fosforilazione della p38 {179, 180}. L'osservazione che il trattamento con inibitori della p38 ostacola l'induzione della EMT da parte del TGF- $\beta$ 1, fa capire come essa abbia un ruolo all'interno del meccanismo di attivazione della transizione {179, 180}. Ciò può essere spiegato grazie alla attivazione del fattore trascrizionale ATF-2 ad opera della p38, poiché questo fattore media le risposte trascrizionali indotte dal TGF- $\beta$ 1 {181}. L'attivazione delle JNK MAP cinasi, che si verifica in risposta al TGF- $\beta$ 1 in molti sistemi cellulari, è stato visto essere necessaria alla EMT indotta dal TGF- $\beta$ 1. Infatti, cellule epiteliali deficienti per l'espressione della JNK1 e cheratinociti trattati con un oligonucleotide antisense per JNK e trattate con TGF- $\beta$ 1 sono incapaci di portare avanti il programma EMT {182, 183}. Spesso, inibitori chimici di JNK bloccano sia la up-regolazione della fibronectina, della vimentina e

della  $\alpha$ -SMA sia la down-espressione della E-caderina, eventi chiave del processo di transizione {183, 184}. Questo requisito si può riflettere sul ruolo della JNK nella organizzazione citoscheletrica, nella migrazione cellulare e nell'invasione attraverso la regolazione dell'espressione della MMP {185}. JNK, inoltre, attiva c-Jun, componente del complesso di trascrizione AP-1 che coopera con Smad per indurre alcune delle risposte trascrizionali indotte dal TGF- $\beta$ 1, come ad esempio l'espressione di uPA {183}. Il TGF- $\beta$ 1 induce la fosforilazione della p38. Fosforila inoltre le cinasi a monte che mediano l'attivazione della p38 come ad esempio MKK3 e MKK6 e anche TAK1, che è in grado di attivare le stesse MKK3 e MKK6 {182, 183}. Inoltre TAK1 è stato visto essere necessario per l'attivazione di JNK in risposta al TGF- $\beta$ 1 per mezzo di MKK4 {35, 186}. L'attivazione di TAK1 richiede l'interazione della ubiquitina ligasi TRAF6 con il recettore del TGF- $\beta$ 1; in questo modo TRAF6 può attivare direttamente TAK1 {187, 188}. Le GTPasi simili a Rho, comprese le sottofamiglie di proteine Rho, Rac e Cdc42, sono dei regolatori chiave della organizzazione citoscheletrica, della migrazione cellulare e della regolazione genica. È stato visto che il TGF- $\beta$ 1 è in grado di indurre la attivazione di Rho, Rac e Cdc42 in vari sistemi cellulari. Numerosi studi si sono focalizzati sul ruolo di RhoA e del suo effettore ROCK nella EMT indotta dal TGF- $\beta$ 1. L'attivazione di RhoA in risposta al TGF- $\beta$ 1 induce l'attivazione di ROCK, il quale a sua volta è responsabile della formazione

delle fibre di stress {189}. Inoltre il TGF- $\beta$ 1 attiva la cinasi LIM, un target a valle di ROCK, la quale inattiva la cofilina; fattore di depolimerizzazione della actina. La down-regolazione della espressione della cinasi LIM attraverso l'utilizzo di un siRNA specifico inibisce la riorganizzazione citoscheletrica in risposta al TGF- $\beta$ 1 nei fibroblasti {190}. In seguito alla inibizione della attività di ROCK è possibile osservare l'inibizione della riorganizzazione della actina e della espressione della  $\alpha$ -SMA indotta dal TGF- $\beta$ 1, senza però alcun blocco sulla attivazione di Smad {191, 192, 193}.

In modo complementare con queste osservazioni, il TGF- $\beta$ 1 regola l'attività di RhoA alle tight junction nelle cellule epiteliali. A livello di queste giunzioni, è stato visto che PAR6 interagisce con la sub unità I del recettore per il TGF- $\beta$ 1. Successivamente, il legame del TGF- $\beta$ 1 induce la associazione della subunità II con il complesso costituito dalla subunità I e da PAR6. In seguito a questa associazione la subunità II è in grado di fosforilare PAR6 su uno specifico residuo di serina {65}. In seguito a questo evento viene reclutata l'E3 ubiquitina ligasi Smurf1, responsabile della degradazione di RhoA e quindi della degradazione delle tight junction. Il TGF- $\beta$ 1 è in grado, in maniera simile a tutti gli altri fattori di crescita, di attivare la PI3 cinasi e attivare così la cinasi Akt in molti sistemi cellulari {91, 194, 195, 196, 197}. In accordo con questa osservazione è stato visto che la subunità regolatoria della PI3 cinasi interagisce con i recettori di classe I e II. Inoltre, in seguito al legame del TGF- $\beta$ 1, l'attività della PI3

cinasi aumenta. Akt è un regolatore centrale di numerosi pathway che coinvolgono la sopravvivenza cellulare, il controllo del volume e della migrazione cellulare. A valle di Akt vi è l'attivazione di mTOR il quale a sua volta attiva l'S6 cinasi 1 responsabile del controllo del macchinario trascrizionale e del volume della cellula [198]. L'attivazione della via di segnalazione PI3 cinasi/Akt in risposta al TGF- $\beta$ 1 gioca un ruolo importante nel processo EMT. L'utilizzo di inibitori di PI3 o di Akt blocca i cambiamenti morfologici indotti dal TGF- $\beta$ 1 [91, 199]. Il TGF- $\beta$ 1 induce un aumento della sintesi proteica grazie alla attivazione della via di mTOR/S6 cinasi 1 attraverso Akt e PI3. Perlopiù, utilizzando la rapamicina, un inibitore di mTOR, blocca l'incremento della migrazione e della invasione cellulare, mentre non blocca la manifestazione dei cambiamenti morfologici indotti dal TGF- $\beta$ 1 [200]. Durante il processo EMT, l'attivazione di S6 cinasi 1 è richiesta per la induzione della espressione di Snail1, mentre non è necessaria per l'espressione di Snail2 [201]. Come è possibile notare, la S6 cinasi 1 regola sia l'espressione genica sia la traduzione proteica. È quindi necessario caratterizzare maggiormente tale meccanismo. In un modello di EMT di cellule epiteliali di cristallino, è stato mostrato l'espressione di Snail1 attivata da Smad è richiesta per la attivazione di Akt da parte della PI3 cinasi [202]. Inoltre, bloccando il pathway PI3 cinasi/Akt si ha l'inibizione della fosforilazione di Smad2 ma non di Smad3 in una linea cellulare di ghiandola mammaria. Ciò dimostra

l'esistenza di un crosstalk e di un feedback tra la via di segnalazione di Smad e PI3 cinasi/Akt, che non è ancora ben stato delucidato {91, 200}.

### **Le vie alternative al TGF- $\beta$ che inducono EMT**

Il TGF- $\beta$  coopera con altre vie di segnalazione attivate da altri ligandi per indurre EMT. Tali vie vengono attivate da Notch, Wnt e le Integrine.

La segnalazione a valle di Wnt è in grado di indurre EMT attraverso l'inibizione della Glicogeno sintasi 3 $\beta$  cinasi (GSK3 $\beta$ ). La GSK3 $\beta$  può venire inibita anche dalla PI3K attivata da RTKs o Ras.

La GSK3 $\beta$ , quando è attiva, fosforila e degrada continuamente la  $\beta$ -catenina presente nel citoplasma. Se la GSK3 $\beta$  viene inibita, si ha un accumulo di  $\beta$ -catenina nel citoplasma in grado poi di migrare nel nucleo.

La  $\beta$ -catenina nel nucleo, grazie al legame a fattori trascrizionali, attiva geni necessari a portare avanti il programma EMT {203}. Questo evento appena descritto non è sufficiente da solo ad indurre EMT. Vi sono molti tumori in cui si evidenzia un accumulo di  $\beta$ -catenina senza che ci sia EMT {204}. La via di Wnt, benché necessaria in certe cellule, da sola non è in grado di attivare geni chiave per l'induzione di EMT. È stato osservato un incremento della via di segnalazione di Wnt in tumori colon-rettali (Fig 15).

La via di segnalazione di Notch ha un ruolo cruciale nella induzione e nella regolazione del processo EMT sia a livello embrionale sia a livello

tumorale {205}. La via di segnalazione di Notch è molto complessa a causa del notevole numero di mediatori, recettori e ligandi coinvolti. Inoltre gli effetti dell'attivazione di Notch variano da tipo cellulare a tipo cellulare ed è stato osservato che può avere sia un ruolo oncogenico sia un ruolo soppressivo nei confronti del tumore {205}. Notch può indurre EMT attraverso l'attivazione della via di segnalazione attivata da NF-kB {206}, oppure modulando l'attività del TGF- $\beta$  (Fig 16).

Notch è in grado di attivare, in cooperazione al TGF- $\beta$ , i geni che codificano per i repressori trascrizionali della E-caderina come Snail e Hey1 {84, 207}. Sia i ligandi che i recettori si trovano legati alla membrana. Esistono quattro recettori (Notch1,2,3,4) e due famiglie di ligandi, Delta e Jagged. Una volta che il ligando si lega al recettore, Notch ne induce due tagli proteolitici. Il primo taglio è a carico di TACE, una proteasi della famiglia ADAM, il secondo da parte di una  $\gamma$ -secretasi, necessario a liberare il dominio NIC dalla membrana. NIC va poi nel nucleo ed attiva numerosi geni necessari alla EMT.

La via di segnalazione mediata da Hedgehog è anch'essa implicata nel processo EMT e nello sviluppo di metastasi {205}(Fig 17).

## **L'attivazione trascrizionale indotta dai ligandi del TGF- $\beta$**

Le proteine della famiglia del TGF- $\beta$  attivano la trascrizione genica attraverso interazioni fisiche e funzionali che si verificano fra le proteine Smad e specifici fattori trascrizionali, fra i quali specifici coattivatori come CPB e p300. Le proteine R-Smad, eccetto Smad2, e Smad4, legano specifiche sequenze di DNA con una affinità bassa. Altri fattori trascrizionali legano in DNA con una affinità nettamente superiore. Nonostante che le proteine Smad leghino il DNA con bassa affinità, sono essenziali per la attivazione genica. I fattori trascrizionali che sono capaci di legare ed interagire con le proteine Smad sono molteplici {14, 117, 123}. Tutte queste interazioni sono regolate da numerose vie di segnalazione. Inoltre, i coattivatori essenziali CPB e p300, insieme ad altri coattivatori o corepressori che legano Smad definiscono il grado di attivazione genica. Smad4 agisce come un coattivatore chiave che induce un aumento della attivazione genica, stabilizzando il legame tra le proteine R-Smad al DNA ed ai coattivatori CPB e p300.

Molti sono i geni che vengono attivati in risposta al TGF- $\beta$ , mentre altri vengono repressi. I corepressori delle proteine Smad, che inibiscono l'attivazione genica indotta da tali proteine, non sono implicati nella repressione genica indotta dal TGF- $\beta$ . Il TGF- $\beta$  inibisce il ciclo cellulare

regolando i livelli di espressione di geni regolatori del ciclo. Fra questi regolatori, C-Myc e Id vengono regolati negativamente dal TGF- $\beta$  {162, 163}. C-Myc viene represso per mezzo di Smad3 e di proteine ad attività repressoria come E2F4, E2F5 e p107. Questo complesso si forma nel citoplasma, migra nel nucleo dove si lega a Smad4. Smad4 consente al complesso di interagire con il sito E2F sul DNA, situato nel promotore di C-Myc, reprimendone la trascrizione {162}. Id invece viene represso con questa modalità: il legame del TGF- $\beta$  attiva Smad3, che porta alla espressione di ATF3. Queste due proteine formano poi un complesso che va a reprimere direttamente il promotore di Id {163}. In maniera simile l'induzione di espressione di SIP1 da parte del TGF- $\beta$  porta alla repressione del gene della E-caderina {164}.

Oltre a reprimere in molte linee cellulari, geni facenti parte della famiglia di Id il TGF- $\beta$  inibisce la differenziazione di mioblasti, osteoblasti e adipociti, inducendo l'espressione di repressori che vanno a bloccare la trascrizione di geni deputati alla guida dei processi differenziativi.

Smad3 reprime la trascrizione di Runx2/CBFA1, inibendo la differenziazione degli osteoblasti {165}, di MyoD e di altri fattori trascrizionali bHLH nei mioblasti {166}, di CCAAT e di C/EBPs negli adipociti {167}.

Smad3 reprime la funzione di MyoD interagendo con il suo dominio HLH. MyoD non è così in grado di dimerizzare con E12/E47 e di attivare

così l'espressione genica responsabile del differenziamento miogenico {166}. Smad3 non ostacola l'interazione al DNA di Runx2 o C/EBPs ma ne reprime la funzione trascrizionale {165, 167}.

Se le proteine Smad reprimono o attivano la trascrizione genica dipende sostanzialmente dal tipo cellulare e dalla sequenza del promotore. Smad3 coopera con le proteine Runx per attivare la trascrizione in cellule epiteliali, mentre, sempre sullo stesso promotore ma in cellule mesenchimali, induce repressione genica.

Inoltre, il dominio MH1 di Smad3 può interagire con le istone deacetilasi {168}. In conclusione possiamo dire che è in base al contesto cellulare e ai fattori trascrizionali che interagiscono con Smad che viene regolata l'attività repressoria o attivatoria di tali proteine.

### **I geni che prendono parte al programma EMT indotto dal TGF- $\beta$**

Le proteine Smad sono estremamente importanti per la risposta al TGF- $\beta$ .

Durante la EMT la perdita di marker epiteliali e l'acquisizione di marker mesenchimali sono a carico di una complessa rete di fattori trascrizionali.

Nel programma EMT prendono parte tre famiglie di fattori trascrizionali ovvero la famiglia Snail, ZEB e bHLH (Fig 18).

L'espressione di questi geni, codificanti fattori trascrizionali, viene attivata in risposta al TGF- $\beta$ , sia attraverso un meccanismo diretto dipendente dalle proteine Smad sia in modo indiretto attraverso altri fattori

trascrizionali. Una volta che tali fattori vengono trascritti, hanno un attività repressoria sui geni dei marker epiteliali e contemporaneamente attivano i geni codificanti marker mesenchimali.

I fattori trascrizionali della famiglia di Snail sono molto simili fra loro. Mostrano un classico dominio C-terminale con quattro dita di zinco, capace di legare il DNA sulle E-box {208}. Nei vertebrati sono state identificate tre proteine che fanno parte della famiglia di Snail: Snail1, Snail2 (Slug) e Snail3. Queste proteine si comportano da repressori trascrizionali e la loro attività dipende dal dominio a dita di zinco e dal dominio SNAG sull'N-terminale. In numerosi studi riguardanti la EMT, è stata registrata una notevole induzione di Snail1 {208, 209}. Un' alta espressione di Snail1 è stata evidenziata in tumori aggressivi in stadio avanzato {210, 211}. Snail2 è più ampiamente espresso rispetto a Snail1 e la sua espressione non sempre è correlata a processi di EMT {209, 212}. Nella EMT indotta dal TGF- $\beta$  entrambi i geni vengono espressi. Tuttavia il TGF- $\beta$  induce l'espressione di Snail1 durante lo sviluppo della pelle {213} e del palato {214}, e viene espresso in cellule mesoteliali nei processi fibrotici {215}, negli epatociti in coltura {216}, in numerose linee cellulari in coltura {217} e durante lo sviluppo del cuore {218}.

L'induzione di Snail1 da parte del TGF- $\beta$  è mediata da Smad3. Smad3 si lega al promotore di Snail e ne attiva la trascrizione {219, 220}.

Cellule epiteliali renali che mancano di Smad3 non attivano Snail1 in

risposta al TGF- $\beta$  {223}; stessa cosa succede se viene a mancare Smad4 {216, 221, 222}. In cellule renali di cane (MDCK), Smad3 attiva Snail2 legandosi al suo promotore per mezzo di fattori trascrizionali quali le miocardine {224}. L'induzione della EMT per mezzo dell'HGF{328}, FGF o EGF porta alla attivazione della via di Ras/MAPK o di PI3K-Akt e conseguentemente attiva Snail1 {209}. Inoltre, la via di segnalazione TGF- $\beta$ /Smad coopera con la via di segnalazione di Ras, Notch e Wnt nella induzione di espressione di Snail1 durante lo sviluppo e nelle metastasi {209}. Vi sono poi delle modifiche post-traduzionali responsabili della localizzazione subcellulare di Snail, della stabilità e della attività trascrizionale {209, 231}.

In numerosi lavori scientifici è emerso un ruolo estremamente importante di Snail1 e Snail2 nel programma EMT {210, 211}. L'espressione ectopica di Snail1 o Snail2 sopprime l'espressione della E-caderina e della placoglobina. Contemporaneamente vi è l'attivazione della vimentina e della fibronectina portando così al completamento della EMT. Il silenziamento di Snail1 reverte tutto il processo {210, 314, 226, 227, 228}.

Snail1 e Snail2 reprimono il gene epiteliale CDH1 che codifica per la E-caderina. Snail1 si lega sull'E-box del promotore della E-caderina e recluta a se un complesso costituito da HDAC1,HDAC2 e mSin3A, portando a repressione il gene {210, 211, 228}. Snail2 reprime il gene della E-caderina in maniera simile. Si lega sempre alla E-box del promotore ma recluta

proteine diverse come ad esempio l'HDAC1/3 e CTBP {212, 227, 228}.

Le proteine Snail, come è logico pensare, non hanno come unico bersaglio il gene CDH1. Le proteine Snail reprimono uno spettro di geni codificanti per proteine necessarie al mantenimento del fenotipo epiteliale. Fra questi geni repressi da Snail possiamo citare il gene per la claudina e occludina, codificanti per proteine responsabili della formazione delle tight junction.

Snail1 reprime l'espressione della claudina-3,-4 e -7, mentre Snail1 e Snail2 reprimono insieme l'espressione della claudina-1 e dell'occludina {229, 230}. Al contrario, Snail1 non induce un decremento delle proteine citosoliche delle tight junction come ZO-1 e p120 {229}. Le proteine Snail regolano però l'espressione di proteine desmosomiali.

L'espressione ectopica di Snail induce un decremento della desmoplachina e della placofilina, portando ad una errata distribuzione della placoglobina {210, 232, 233, 234}. Inoltre Snail si oppone al mantenimento della polarità cellulare reprimendo l'espressione di Crumbs3. Questa proteina forma un complesso con altre due proteine, PALS1 e PATJ, necessario al mantenimento della polarità cellulare {235}. Tuttavia Snail1 non ha effetto sul complesso Par, anch'esso necessario al mantenimento della polarità cellulare {235}. Snail induce il decremento della citocheratina 17,18,19 e 20 modellando l'organizzazione citoscheletrica.

Le proteine Snail, oltre a reprimere la trascrizione genica, inducono espressione di geni codificanti per proteine mesenchimali come

fibronectina {210, 226}, vitronectina {210, 226} e N-caderina {236}, collagene di tipo III e V {236}. Inoltre, le proteine Snail inducono espressione di proteine coinvolte nella migrazione e nella invasione, come RhoB, l'inibitore-I dell'attivatore del plasminogeno e le metalloproteasi di matrice {209, 226}. Tali effetti di Snail possono essere indiretti e coinvolgere ulteriori fattori trascrizionali come Ets-1, necessario alla induzione della MMP-2 {237}, oppure insieme a Sp-1 up-regola la MMP-9 {238}. Snail regola numerose proteine deputate alla modulazione della actina. In questo modo esso è responsabile della formazione delle fibre di stress ancorate alle adesioni focali {232}. Snail come detto in precedenza è in grado di attivare l'espressione di altri fattori trascrizionali regolatori della EMT come TWIST, ZEB1, ZEB2. Snail attiva TWIST in cellule MDCK {236} e ZEB1 e ZEB2 in cellule di carcinoma squamoso {237, 239}.

Snail è anche in grado di regolare geni deputati alla sopravvivenza cellulare {209}.

Nei vertebrati sono noti due fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia di ZEB: ZEB1, chiamato anche  $\delta$ EF1 o EREB6, e ZEB2, conosciuto come proteina che interagisce con Smad (SIP1). Questi fattori trascrizionali hanno alle due estremità due cluster a dita di zinco che legano simultaneamente l'E-box. Centralmente contengono un dominio di interazione a Smad, un omeodominio ed un dominio legante CTBP. L'attività repressoria delle proteine ZEB è mediata dal motivo repressorio

posto sull'omeodominio e dal reclutamento di CTBP come corepressore.

Comunque, l'interazione di ZEB1 con proteine coattivatrici come PCAF e p300 consentono a ZEB1 di passare da una attività prettamente repressoria ad una attività promuovente la trascrizione genica {231, 240}. Le proteine ZEB sono espresse da molti tessuti durante lo sviluppo di molti organi come cuore, sistema nervoso centrale, muscolo scheletrico e cellule emopoietiche.

Il TGF- $\beta$  induce l'espressione delle proteine ZEB durante la EMT in maniera indiretta attraverso Ets-1 {241}. Le proteine ZEB possono poi interagire con Smad3 e reprimere, con l'aiuto di CTBP, direttamente i geni dei marker epiteliali {240, 242}. ZEB1 viene indotto dal TGF- $\beta$  durante la differenziazione del muscolo liscio. ZEB1 interagisce in maniera sinergica con Smad3 e SRF per attivare i geni che codificano per la  $\alpha$ -SMA e per la catena pesante della miosina {243}. Come le proteine Snail anche le proteine ZEB non sono attivate soltanto dal TGF- $\beta$ . Infatti sono attivate anche da altri fattori di crescita capaci di attivare la via Ras/MAPK e dalla via di segnalazione di Wnt/ $\beta$ -catenina {231}. L'espressione di ZEB è anche repressa da alcuni microRNA come il miR-200 e miR-205 {244, 245, 246}. Tali microRNA sono repressi in cellule che intraprendono il programma EMT, consentendo a ZEB di esprimersi. Quindi la riespressione di questi microRNA è sufficiente a bloccare la EMT indotta da TGF- $\beta$  {244, 245, 246}. Inoltre, ZEB2 è regolato a livello post-traduzionale; la sumoilazione

da parte di Pc2 ne ostacola la attività repressoria {247}.

L'induzione di proteine ZEB è necessaria per la modulazione negativa della E-caderina e per l'induzione di migrazione cellulare {241, 248, 249, 250}. In cellule mammarie di topo ZEB è in grado di reprimere direttamente il gene della E-caderina, indipendentemente dalla attività di Snail {241, 250}. Contemporaneamente è in grado di indurre delocalizzazione della  $\beta$ -catenina con conseguente induzione di migrazione {248, 251}. ZEB2 è inoltre in grado di reprimere direttamente l'espressione di proteine appartenenti alle tight junction come la claudina-4 e ZO-3{354}. ZEB2 reprime inoltre la proteina desmosomiale placofilina-2 {251}, ed induce l'espressione della vimentina {251}, della N-caderina {251} e della MMP-2 {237}. Entrambe le proteine della famiglia ZEB inducono migrazione ed invasione cellulare {248, 251, 252}. ZEB1 è implicato nella repressione di Crumbs3; la mancanza di ZEB1 porta alla riespressione del complesso di Crumbs3 responsabile del mantenimento della polarità cellulare {252, 253}. ZEB1 reprime anche la mucina-1{239}.

La famiglia dei fattori trascrizionali elica-giro-elica (HLH) è molto ampia e controlla un ampio spettro di geni deputati al controllo dello sviluppo dell'organismo e di processi patologici. La struttura base di questi fattori trascrizionali è costituita da due domini  $\alpha$ -elica paralleli, collegati da un'ansa, necessari alla dimerizzazione. I fattori HLH si dividono in sette categorie basate sulla loro distribuzione a livello dei tessuti, sulla capacità

di dimerizzare e sulla specificità di legame al DNA {254}. Fra queste, le proteine di classe I, E12 ed E47, le proteine di classe II, come Twist, e le proteine di classe V Ids sono tutte regolatori della EMT. Le proteine di classe I E12 ed E47 formano omodimeri o etero dimeri con le proteine di classe II mentre le proteine di classe II Twist spesso formano etero dimeri con le proteine di classe I. Diversamente da queste proteine, quelle di classe V come Id1, Id2, Id3 e Id4, mancano del dominio basico e sono incapaci di legare il DNA. Hanno una funzione di dominanti negativi attraverso la loro forte affinità di legame per le proteine di classe I {231, 254}. E12 ed E47 sono codificati per splicing alternativo del gene E2A {231, 254}. Essi reprimono direttamente il gene della E-caderina interagendo con la sequenza E-box posta sul promotore. L'espressione ectopica di E12 ed E47 reprime il gene della E-caderina e della placca globina, induce espressione della vimentina e della fibronectina e promuove migrazione ed invasione cellulare {227, 255, 256}.

Non è ancora chiaro se questi due fattori trascrizionali formano omodimeri fra loro oppure etero dimeri con altri fattori per reprimere la E-caderina. Comunque, la repressione della E-caderina può essere bloccata dai fattori Id capaci di interagire con le proteine E2A {256}. Sotto stimolazione con TGF- $\beta$  le proteine Id1, Id2 e Id3 sono represses. Infatti, in seguito al legame del TGF- $\beta$  al recettore, viene indotta l'espressione di ATF3 con conseguente formazione del complesso ATF3/Smad3/Smad4.

Tale complesso va sul promotore di Id1 e ne reprime l'espressione {257, 258}. Di conseguenza la perdita di espressione delle proteine Id correla con il decremento di espressione della E-caderina. L'espressione ectopica di Id2 o Id3 è in grado di bloccare la repressione della E-caderina, impedire la delocalizzazione di ZO-1 e di bloccare l'espressione della  $\alpha$ -SMA {256, 257}. Oltre alla E-caderina, E47 reprime l'espressione della desmoplachina ed induce l'espressione della N-caderina, di SPARC e della  $\alpha$ 5-integrina {236}.

La mutazione del gene che codifica per Twist1 è associato con la sindrome di Saethre-Chotzen caratterizzata da uno spacco sul palato causato da una EMT incompleta {259, 260}. Al contrario nei tumori, sia Twist1 che Twist2 sono iper-espressi {261}. L'espressione ectopica di queste due proteine induce decremento della E-caderina, dell'occludina e della claudina-7, mentre induce espressione della N-caderina e della vimentina, promovendo la migrazione e la invasione {263, 264}.

HMGA2 (gruppo ad alta mobilità A2) è un altro effettore a valle della segnalazione del TGF- $\beta$  durante la EMT. HMGA2 proviene da un gruppo di fattori trascrizionali che legano le regioni di DNA ricche in AT per formare complessi nucleo proteici. HMGA2 viene espresso ad alti livelli durante l'embriogenesi ed a bassi livelli in età adulta. Inoltre ha una espressione aberrante in cellule cancerose. Il TGF- $\beta$  induce un forte incremento di HMGA2 attraverso un meccanismo dipendente da

Smad3/4. L'espressione ectopica di HMGA2 è capace di indurre espressione di Snail1/2 e di Twist1 {262}.

## **La regolazione epigenetica**

Le molecole di DNA a doppio filamento che formano i cromosomi delle cellule eucariotiche possono avere una lunghezza dell'ordine del metro. Quindi, affinché questa gran quantità di materiale genetico sia contenuto all'interno del nucleo è necessaria una efficiente condensazione della macromolecola.

La formazione del nucleosoma ovvero 147 paia di basi di DNA avvolte all'ottamero di proteine istoniche, è il primo elemento che sottolinea la condensazione del DNA {265}. In aggiunta al loro ruolo nella condensazione del DNA, le proteine istoniche svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della espressione genica.

Le proteine istoniche infatti sono soggette a modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione, la acetilazione, la metilazione, la sumoilazione, l'ubiquitinazione e la ribosilazione. Tali modifiche regolano l'attività genica senza alterare la sequenza del DNA.

Questi marcatori epigenetici sono aggiunti o rimossi selettivamente da proteine estremamente regolate e selettive per la cromatina {266}.

Numerosi residui di lisina presenti sugli istoni (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 e H4K20) sono soggetti a mono-, bi- o trimetilazione. È

importante sottolineare che ogni metilazione su un particolare residuo di lisina rappresenta uno specifico marker epigenetico con un significato biologico preciso. Si viene quindi a creare un vero e proprio codice istonico rappresentato dallo stato di metilazione delle lisine presenti sulla coda dell'istone H3, capace di regolare finemente la attivazione genica. Le proteine che si occupano dello stato di metilazione delle lisine istoniche sono le DNA metil-trasferasi e le istone demetilasi. Le prime aggiungono i gruppi metile le seconde lo tolgono. Entrambi gli eventi sono di cruciale importanza per la regolazione genica. Il TGF- $\beta$  attiva, nella via Smad dipendente [267], la DNMT1. Tale proteina controlla a livello epigenetico la EMT. Modificazioni post-traduzionali dell'istone H3 regolano la conformazione e la condensazione della cromatina in specifiche regioni cromosomiche, inducendo la EMT. Infatti è stato osservato che il TGF- $\beta$  induce modificazioni post-traduzionali sugli istoni presenti sui promotori di numerosi geni attivati da esso. Ad esempio, la stimolazione con TGF- $\beta$ , mette in moto proteine capaci di demetilare i residui di lisina metilata sulla coda degli istoni H3, come, ad esempio, LSD1 [268].

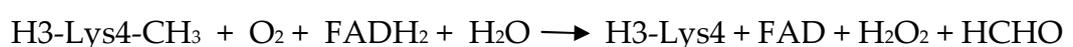
### **Le proteine ad azione demetilasi: LSD1 e JMJD2A**

Sono conosciute due classi di istone demetilasi. Esse differiscono nel meccanismo chimico di reazione, nei coenzimi usati e nel prodotto di

reazione [268, 267]. Le istone demetilasi flavin-dipendenti effettuano una demetilazione sui residui mono o dimetilati delle lisine e producono H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mentre le istone demetilasi contenenti il dominio Jumonji sono enzimi ferro dipendenti ed agiscono sui residui mono-, di- e trimetilati delle lisine. Inoltre questa classe di enzimi è in grado di demetilare anche i residui di arginina. La prima demetilasi istonica scoperta fu la LSD1.

L'LSD1 è una molecola asimmetrica costituita dalla associazione di tre differenti domini. Il dominio N-terminale SWIRM ed il dominio C-terminale ammino-ossidasi legante il FAD sono vicini a formare il core della proteina, mentre il dominio torre a elica-giro-elica responsabile del legame al DNA si protrude al di fuori del core della proteina. L'interazione con la proteina CoREST è a carico del dominio a elica, formando in questo modo un avvolgimento di eliche intramolecolare. La coda dell'istone H3 si inserisce all'interno del core della proteina, a contatto con il dominio ammino-ossidasi responsabile della demetilazione FAD dipendente (*Fig 19*).

Questa proteina rimuove la mono o dimetilazione dell'H3K4 attraverso un meccanismo flavino dipendente (*Fig 20*).



La metilazione di H3K4 è un marker di attivazione genica [269], e la LSD1

fu originariamente identificata come componente dei complessi di repressione trascrizionale [270, 114]. L'LSD1 è tipicamente associata a corepressori (Cor-EST) e alla Istone deacetilasi (HDAC) 1 o 2, formando un subcomplesso stabile reclutato da molti complessi multi proteici responsabili del rimodellamento della cromatina [273, 272, 271, 270, 114]. Comunque la LSD1 è anche coinvolta in processi di attivazione genica, sottolineando perciò la sua molteplice funzione nella regolazione della cromatina [275, 274]. La LSD1 partecipa a molte vie di segnalazione che promuovono la crescita e i livelli di questa proteina sono stati trovati incrementati in certi tumori ad alto rischio [277, 276]. Il potenziale collegamento fra cancro ed attività della LSD1 è dovuto dal fatto che la perdita della metilazione del H3K4 e l'incremento della metilazione di H3K9 sono associate a varie tipologie di tumore [277]. Infatti, nell'ambito delle terapie epigenetiche, esiste un notevole interesse riguardo al potenziale utilizzo della LSD1 come target farmacologico per la cura dei tumori [278]. L'iniziale caratterizzazione della funzione del complesso LSD1-CoREST-HDAC proviene dagli studi del meccanismo molecolare del fattore trascrizionale REST. Esso media una repressione a lungo termine dei geni neuronali in cellule non-neuronali e in precursori neuronali [280, 279, 270]. La repressione dei geni target di REST avviene attraverso il reclutamento di LSD1-CoREST-HDAC, con successiva deacetilazione delle lisine sull'istone H3 e H4 e demetilazione di H3K4.

Il blocco di questi eventi provoca l'arresto della repressione mediata da REST con conseguente riattivazione ectopica dei geni neuronali {281}. In particolare, il silenziamento della LSD1 causa la ricomparsa di metilazione del H3K4 in prossimità dei promotori dei geni target di REST {278}. Il core del complesso LSD1-CoREST-HDAC è funzionalmente e strutturalmente conservato attraverso i phila {282}. In particolare, in *Drosophila melanogaster* l'omologo del complesso LSD1-CoREST-HDAC è implicato nella regolazione del fenotipo neuronale mediato da Tramtrakk88, un omologo di REST {283}. Ciò sottolinea l'importanza di questo complesso nella regolazione dello sviluppo neuronale. L'ematopoiesi è un altro processo di sviluppo molto importante in cui è coinvolto il complesso LSD1-CoREST-HDAC nel ruolo di corepressore trascrizionale {284}. In questo caso il complesso LSD1-CoREST-HDAC lavora in associazione con due repressori a dita di zinco: Gfi-1 e Gfi-1b {284}. È stato dimostrato il significato funzionale riguardo la associazione fra Gfi-1b e LSD1-CoREST-H. Fu osservata infatti la loro concomitanza nei promotori target di Gfi-1b e, cosa molto importante, è stato osservato una differenziazione dei progenitori ematopoietici in vitro in seguito alla deplezione della LSD1 e/o di CoREST. L'attività della LSD1 e di CoREST nel ruolo di corepressori trascrizionali dei geni target di Gfi-1b e Gfi-1 è stata dimostrata in cellule non esprimenti la LSD1. Infatti in queste cellule è stato osservato un incremento nella trascrizione dei geni target di Gfi-1b e Gfi-1. La

derepressione trascrizionale è accompagnata dall'incremento dei livelli di metilazione di H3K4. Ciò indica che la repressione mediata da Gfi-1b e Gfi-1 richiede la demetilazione ad opera della LSD1 di H3K4.

Un'altra importante indicazione a favore del ruolo di corepressore trascrizionale della LSD1 è stata data da una recente scoperta. È stato dimostrato infatti che il regolatore di metilazione del DNA DNMT3L riconosce la coda H3 degli istoni che non presentano la lisina 4 metilata [285]. Questa scoperta dà ulteriormente credito all'idea che la demetilazione dell'H3K4 mediata dalla LSD1 sia essenziale per la metilazione *de novo* del DNA. Questa metilazione *de novo* è utile per la formazione e propagazione della eterocromatina. Questo ruolo di regolatore della eterocromatina si accompagna al ruolo di corepressore trascrizionale sopracitato. Il ruolo della LSD1 come corepressore trascrizionale è stato ben definito e caratterizzato. Tuttavia recentemente è stato dimostrato il ruolo della LSD1 come attivatore della trascrizione. Questa funzione fu descritta per la prima volta da Metzger et al. Egli dimostrò che l'attivazione dei geni target del recettore per gli androgeni richiedeva la demetilazione da parte della LSD1 dell'H3K9. In particolare fu dimostrato che, in seguito al trattamento con l'ormone, si ha la colocalizzazione del recettore per gli androgeni e della LSD1 sul promotore del gene target. Questa colocalizzazione stimola la demetilazione della H3K9 lasciando metilata la H3K4. In accordo con il

ruolo di attivatore trascrizionale, il knockdown della LSD1 provoca un decremento della attivazione dei geni target per il recettore degli androgeni.

L'attività della LSD1 può verificarsi in seguito a un cambiamento conformazionale indotto da una interazione proteina-proteina o in seguito a modificazioni post-traduzionali della proteina. Alternativamente la demetilazione della H3K9 può essere effettuata non direttamente dalla LSD1 ma anche da una proteina specifica per la H3K9 reclutata dalla LSD1 o da una proteina ad essa associata. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che alcuni complessi di rimodellamento della cromatina sono costituiti sia da LSD1 sia dalla demetilasi H3K9 [286].

Un esempio del doppio ruolo di attivatore e repressore che gioca la LSD1 è dimostrato dalla fine regolazione dell'espressione genica durante lo sviluppo della ipofisi [274]. L'ormone della crescita è espresso soltanto nelle prime fasi dello sviluppo e per un tempo ben preciso. Al contrario, la LSD1 è espressa ed è continuamente presente sul promotore del gene del GH per tutte le fasi di sviluppo della ipofisi. L'attivazione del gene che codifica per il GH è mediata da Pit-1 durante le prime fasi di sviluppo. Pit-1 richiama il complesso di coattivazione MLL1, contenente la LSD1. Pit-1, successivamente, viene sostituito dal repressore trascrizionale ZEB1. ZEB1 a sua volta richiama il complesso di repressione formato da CtBP, CoREST e LSD1, spengendo così la trascrizione del gene del GH. Quindi è possibile

notare come la LSD1 partecipi ad entrambi i complessi di attivazione e di repressione del gene del GH.

Come accennato in precedenza, questa demetilazione produce  $H_2O_2$  e quindi specie reattive dell'ossigeno all'interno del nucleo. Lavori recenti hanno dimostrato che l'  $H_2O_2$  che viene prodotta ha un ruolo importante nell'attivazione della trascrizione genica. Infatti, essendo l'  $H_2O_2$  una specie chimica molto reattiva, ossida il DNA formando l'8-oxoguanina. Questo danno al DNA che avviene in seguito al reclutamento della LSD1 sulla coda dell'istone H3 recluta la OGG1, responsabile della riparazione del danno. In seguito al reclutamento della OGG1 viene richiamata anche la topoisomerasi II.

Essa facilita l'apertura della doppia elica ed il successivo legame di tutte le proteine responsabili della trascrizione genica. Questo meccanismo è stato dimostrato da Avvedimento EV. {287} attraverso uno studio pubblicato nel gennaio 2008 e condotto su cellule di cancro alla mammella umano MCF-7. In questo lavoro è stato dimostrato che la stimolazione di queste cellule con gli estrogeni attiva la trascrizione genica tramite la comparsa di un danno localizzato al DNA in grado di reclutare la topoisomerasi II e tutte le proteine responsabili della trascrizione. Questo meccanismo ampiamente dimostrato e molto interessante potrebbe essere un meccanismo generale applicabile anche ad altri contesti.

Poco dopo la scoperta dell'LSD1 fu individuata un'altra HDM, JHDM1A

(anche conosciuta come FBXL11 e KDM2A) in grado di demetilare H3K36me<sub>1/2</sub> {391}. Diversamente dall'LSD1, JHDM1 possiede un dominio catalitico JmjC implicato nelle funzioni cromatina-dipendenti {289}. Successivamente sono stati identificati altri enzimi JmjC, i quali possiedono la capacità di demetilare le lisine con diversa specificità per siti e stati di metilazione, come JHDM2 (H3K9me<sub>1/2</sub>) {290}, JMJD2/JHDM3 (H3K9me<sub>2/3</sub> con alcuni omologhi con specificità per H3K36me<sub>2/3</sub>) {294, 293, 292, 291}. Molte di queste proteine sono contenute e conservate dai lieviti fino agli uomini ed è stato dimostrato che regolano lo stato di metilazione della cromatina e lo stato di trascrizione dei geni, definendo questi enzimi JmjC come una nuova classe di demetilasi. All'inizio si ipotizzò che gli enzimi JmjC avessero attività di demetilasi per l'omologia della loro sequenza con l'enzima AlkB con attività di riparazione del DNA, il quale catalizza la demetilazione delle basi di DNA alchilate {398, 391}. Entrambi AlkB e le JmjC HDM sono membri della superfamiglia delle ossigenasi mononucleari Fe(II)-dipendenti, le quali catalizzano l'idrossilazione ed altre reazioni redox {17}. Diversamente dall'LSD1, il meccanismo basato sull'idrossilazione delle JmjC HDM non richiede la presenza di un gruppo " -amino protonabile, rendendo in grado tali enzimi di demetilare le trimetil-lisine come anche le mono- e dimetil-lisine.

Il dominio JmjC è conservato in diversi organismi ed è un motivo catalitico dei metalloenzimi. Più di 100 enzimi contenenti il dominio

catalitico JmjC sono stati identificati.

Si distinguono tre sottofamiglie contenenti tale dominio le quali mediano la reazione di demetilazione degli istoni e sono le JHDM1, JHDM2 e JMJD2. I meccanismi catalitici delle proteine contenenti il dominio JmjC sono tutte reazioni di idrossilazione. Solamente JHDM1 demetila le mono- o dimetil-lisine nel sito H3K36. È stato dimostrato che JHDM1 è una diossigenasi 2-oxoglutarato (2-OG)-Fe(II)-dipendente. Diversamente dall'LSD1, JHDM1 dipende dal Fe(II) e dall' $\alpha$ -ketoglutarato come cofattori per mediare la demetilazione basata sull'idrossilazione e perciò non richiede l'azoto protonato (Fig 22). Comunque non è ben chiaro come mai JHDM1 non sia in grado di demetilare gli istoni trimetilati.

Ciò potrebbe essere una conseguenza di un riconoscimento limitato dei substrati o di un ristretto potenziale della tasca catalitica, non in grado di permettere l'accesso alla lisina trimetilata. La seconda demetilasi contenente il dominio JmjC, JHDM2, è stata purificata e se ne è vista la capacità di demetilare H3K9 (me<sup>1/2</sup>). JHDM2 è associata al recettore androgenico e contribuisce all'attivazione dei geni AR-dipendenti, probabilmente mantenendo il promotore libero da metilazioni H3K9. Quindi JHDM1 collega la sua funzione all'attivazione trascrizionale ormone dipendente. La sottofamiglia JMJD2 è specificamente una trimetil-lisina demetilasi. Tale classe è formata da quattro membri: JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C e JMJD2D. I membri della famiglia JMJD2 contengono il

dominio N-terminale, il dominio JmjN, il dominio JmjC, il *plant homeodomain* (PHD), ed il dominio Tudor (Fig 23) [288]. La regione del *core* catalitico della JMJD2 è principalmente costituita dai domini JmjN e JmjC. Il dominio PHD è costituito da 60 residui aminoacidici e appartiene alla classe delle *zinc-finger C4HC3-type*. Studi recenti hanno dimostrato che il dominio PHD può riconoscere specificatamente H3K4me3. Differenti caratteristiche strutturali delle *PHD finger* sono cruciali per la specificità del riconoscimento.

Il dominio Tudor è un motivo di 60 aminoacidi: alcuni studi hanno dimostrato che tale dominio di JMJD2A può legare H3K4me, H3K9me3, H3K36me3, e H4K20me2/3. Si pensa perciò che entrambi i domini PHD e Tudor abbiano la funzione di riconoscere e legare gli istoni metilati. JMJD2A (anche chiamata JHDM3A e KIAA0677) è una demetilasi specifica per la trimetil-lisina degli istoni, la quale catalizza la demetilazione del H3K9me3 e H3K36-me3, convertendo il H3K36-me3 in H3K36-me2, ma non il H3K36-me1, in lisina non modificata [296]. JMJD2A reprime la trascrizione attraverso l'interazione con l'onco-soppressore Rb, con l'istone deacetilasi (HADCs), ed con il co-repressore N-CoR. Vista l'importanza di Rb nella regolazione del ciclo cellulare, JMJD2A può avere un ruolo importante nella proliferazione cellulare e nell'oncogenesi. Similmente ad altre proteine contenenti il dominio JmjC, la demetilazione effettuata dalla JMJD2A richiede la presenza del Fe(II) e dell' $\alpha$ -

chetoglutarato come cofattori. L'assenza dell' $\alpha$ -chetogluarato o la presenza di chelanti del ferro inibiscono l'attività catalitica [297]. Il dominio N-terminale della JMJD2A, che include i domini JmjC e JmjN, rappresenta la prima struttura del *core* catalitico di una istone demetilasi. Il dominio catalitico della JMJD2A ha la classica struttura *jelly roll* composta da *beta*-foglietti antiparalleli conservati tra le diossigenasi 2-oxoglutarato(2-OG)-Fe(II)- dipendenti. Il ferro è legato dai residui His188, Glu190, e His276, i quali sono conservati in tutti gli enzimi di tale classe. Si è visto che il dominio JmjN ha numerose interazioni con il *core catalitico* JmjC e fornisce integrità strutturale. Analisi strutturali hanno permesso l'identificazione di un motivo *zinc-finger* situato alla fine del dominio JmjC. La sequenza C-terminale del dominio JmjC, essenziale per la funzione catalitica. Tali caratteristiche strutturali identificano una nuova sottofamiglia di diossigenasi rappresentate da JMJD2A. La struttura cristallografica e le mutazioni sito-specifiche hanno permesso l'identificazione di una tasca in grado di legare il gruppo metilico e di determinati residui aminoacidici associati alla specificità del legame con il gruppo metilico [297]. Nel meccanismo proposto per la JHDM un complesso quaternario contenente il 2-oxoglutarato, il Fe(II) ed il substrato, la lisina metilata, reagisce con l'ossigeno molecolare. Nel sito attivo, i residui conservati His188, Glu190 e His276 chelano il Fe(II) [301, 300, 296]. Nel primo passaggio chimico, un elettrone è trasferito dal Fe(II) all'ossigeno molecolare generando un

radicale superossido e Fe(III) {302, 299}. Si ipotizza che il sito attivo idrofobico aiuti la formazione di un superiore stato di ossidazione del ferro {299}. L'attacco nucleofilo dell'ossigeno attivato al carbonio del chetone dell' $\alpha$ -chetoglutarato risulta in un intermedio Fe(IV) perossiemichetale biciclico{17}. Successivamente la decarbossilazione produce succinato, CO<sub>2</sub>, ed un intermedio Fe(IV)-oxo. Tale intermedio ossida il carbonio del gruppo metile della lisina metilata producendo un intermedio emiaminico, rigenerando il Fe(II). Come avviene con la LSD1, si pensa che l'emiamina si scomponga spontaneamente nella lisina demetilata e formaldeide.

Diversamente dall'LSD1, il meccanismo sfruttato dagli enzimi JHDM non richiede una coppia di elettroni solitaria sull'azoto in  $\epsilon$  della lisina metilata, permettendo la demetilazione delle trimetil-lisine. Nella JMJD2A la tasca che lega il metil-ammonio è composta dall'ossigeno carbonilico della Gly170 e dalle catene laterali di Tyr177, Glu190, Ser288 e Asn290. Si ipotizza che tali residui partecipino nel legame a idrogeno C - H . . . O {298} con il gruppo metilico polarizzato delle lisine metilate {296}. Quando il substrato è trimetilato, tali legami a idrogeno posizionano uno dei gruppi metili verso il sito dove si trova il ferro, là dove tale gruppo metile può subire l'ossidazione. Al contrario, coerentemente con la bassa velocità di demetilazione da parte della JMJD2A delle mono- e dimetil-lisine rispetto a quella della trimetil-lisine, tali legami a idrogeno direzionano il

gruppo metile delle mono- e dimetil-lisine lontano dalla regione con il Fe(II). Inoltre, si pensa che la Ser288 nella JMJD2A, la quale è spesso sostituita da un'alanina negli altri membri della famiglia JHDM, moduli la specificità di determinate demetilasi per le trimetil-lisine rispetto alle mono- o dimetil-lisine {296}.

### **Le specie reattive dell'ossigeno**

Recentemente è stato proposto che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) siano altamente coinvolte nello sviluppo di metastasi e quindi anche nella EMT, nella migrazione, nella invasione tumorale e nella angiogenesi attorno al tumore. L'espressione dei geni implicati nella EMT può essere regolati dai ROS. Per esempio, la via di segnalazione indotta dal TGF- $\beta$ 1, responsabile della inibizione della E-caderina, coinvolge la formazione di ROS {303}.

Attraverso il complesso sistema della segnalazione cellulare, tutti gli stimoli extracellulari inducono una varietà di risposte nella cellula, come la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'adesione e l'entrata nel programma apoptotico. Il legame dei fattori di crescita ai rispettivi recettori porta alla attivazione del dominio a tirosin cinasi di tali recettori. In seguito alla attivazione del recettore, esso è in grado fosforilare e quindi di attivare le proteine a valle che fanno parte del meccanismo di

segnalazione. Un esempio di queste proteine attivate è rappresentato dalle MAP cinasi, dalla PLC $\gamma$  e dal fosfatidilinositolo 3-cinasi. Tutti questi passaggi biochimici alla fine raggiungono il nucleo ed inducono l'espressione genica attraverso l'attivazione di precisi fattori trascrizionali. Studi recenti hanno dimostrato che le vie di segnalazione cellulari sono regolate dallo stato redox intracellulare. La generazione di specie reattive, come l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provoca l'attivazione di proteine a tirosin cinasi e la conseguente attivazione di proteine a valle come la MAP cinasi e la PLC $\gamma$ . L'attivazione della PLC $\gamma$  da parte dei radicali dell'ossigeno eleva i livelli di Ca<sup>2+</sup> intracellulare con successiva attivazione della PKC [304, 18].

Le specie reattive dell'ossigeno, come l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e il radicale idrossile (OH $\cdot$ ), sono generati da numerose vie all'interno della cellula. Il metabolismo energetico della cellula è basato sulla produzione di ATP attraverso la catene di trasporto degli elettroni. Il mitocondrio è uno dei principali siti di produzione dei ROS in vivo. Durante la fosforilazione ossidativa, che avviene sulla membrana mitocondriale interna, gli elettroni vengono trasferiti dal NADH o dal FADH<sub>2</sub> all'ossigeno, attraverso una catena composta da tre complessi enzimatici transmembrana ("catena respiratoria"); questo trasporto di elettroni determina la formazione di un gradiente protonico capace di guidare la formazione della molecola di ATP da ADP e Pi. L'ossigeno molecolare, che funziona da accettore finale di elettroni e protoni nella catena

respiratoria, si riduce ad H<sub>2</sub>O. L'efficienza di tale reazione è molto alta e quasi tutto l'O<sub>2</sub> viene consumato. La reazione può però essere cortocircuitata con il passaggio di un singolo elettrone all'O<sub>2</sub> e la formazione dello ione superossido, un composto estremamente tossico. Questo avviene per circa l'1-2% degli elettroni che passano attraverso la catena respiratoria, i quali vengono perduti durante la reazione che viene mediata dal coenzima Q e dai suoi complessi (305) (Fig 12).

Un altro sito di produzione dei ROS è il reticolo endoplasmatico, dove tali specie si possono generare in seguito alla perdita di elettroni da parte della NADPH citocromo p450 reduttasi (306). Lo ione superossido viene generato anche dalla ipoxantina/xantina ossidasi, dalla lipossigenasi e dalla ciclossigenasi. I ROS possono infine essere prodotti in vivo dai raggi UV e dai raggi  $\gamma$  che colpiscono la materia vivente.

Tra tutte le specie ossidanti, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lo ione superossido presentano solo una moderata reattività nei confronti delle altre molecole. Queste specie vengono però rapidamente convertite nel radicale ossidrile tramite la reazione di Fenton o di Haber-Weiss:



Questa reazione, in condizioni normali è molto lenta. Questa reazione è catalizzata da catalizzatori metallici come il ferro e il rame, presenti comunemente nell'ambiente cellulare. Il radicale ossidrile, prodotto della

reazione, è estremamente reattivo e quindi estremamente pericoloso per la cellula. La capacità di chelare gli ioni ferro e rame, indispensabili per la reazione di Haber-Weiss, da parte di proteine come la ferritina, la transferrina, la lattoferrina e la ceruloplasmina è quindi importante per tenere sotto controllo i danni provocati dallo stress ossidativo.

Come protezione contro l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno, detto stress ossidativo, le cellule possiedono molecole antiossidanti o riducenti il cui compito è mantenere l'ambiente redox intracellulare in uno stato altamente ridotto. La superossido dismutasi (SOD) converte l' $O_2^-$  in  $H_2O_2$ . Successivamente l' $H_2O_2$  così prodotta viene eliminata da ulteriori enzimi cellulari. Il Glutatione (GSH) è il principale riducente trovato in tutti le cellule eucariote [24]. L' $H_2O_2$  prodotta nell'ambiente intracellulare viene infatti principalmente rimossa, al pari di molti perossidi, dalla glutatione perossidasi, un enzima che contiene selenio e che usa il glutatione ridotto (GSH) come donatore di elettroni. Questa reazione determina l'eliminazione delle molecole di  $H_2O_2$ , che vengono rapidamente ridotte ad  $H_2O$ , con conseguente formazione di glutatione ossidato (GSSG); il glutatione viene poi nuovamente convertito dalla forma ossidata a quella ridotta, ad opera della glutatione reduttasi, un enzima che usa NADPH come donatore di potere riducente. Un'altro sistema cellulare che interviene nei processi di ossidoriduzione si basa sull'azione della tioredoxina (TRX), una proteina multifunzionale di 12

kDa che contiene nel sito attivo un gruppo tiolico capace, ossidandosi, di mediare i processi di riduzione a carico dei substrati. È stato osservato che la tioredoxina è capace non solo di ridurre direttamente le specie ossidanti come l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , ma anche di agire su substrati ossidati, mediando ad esempio il refolding di proteine che abbiano subito una destrutturazione in seguito all'ossidazione {307}.

Una volta ossidata, la tioredoxina viene riportata nello stato ridotto grazie all'intervento della tioredoxina reduttasi, un'enzima che riduce il gruppo tiolico presente nel sito attivo della molecola, sfruttando il NADPH come donatore di elettroni. Fra i sistemi di smaltimento dei ROS non dimentichiamo la catalasi. Questo enzima è coinvolto nel mantenimento del potenziale redox della cellula e nella protezione dai danni ossidativi, grazie alla sua capacità di degradare l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , scindendola in  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . È stato evidenziato che lo stato redox della cellula gioca un ruolo essenziale non solo nella sopravvivenza cellulare ma anche nel sistema di segnalazione (regolazione redox) {308, 309, 310}. Il target primario della regolazione redox sono i gruppi sulfidrilici (RSH) sui residui di cisteina i quali vengono facilmente ossidati a formare un ponte disolfuro (RSSR), acido sulfenico (RSOH), acido sulfinico ( $\text{RSO}_2\text{H}$ ) o acido sulfonico ( $\text{RSO}_3\text{H}$ ). Gli stimoli extracellulari trasducono i segnali attraverso una varietà di vie di segnalazione e di molecole come le proteine a tirosin chinasi (PTK), le serin/treonin chinasi, le fosfolipasi, e il  $\text{Ca}^{++}$ . Quando le

cellule vengono stimulate con i ROS, si attivano le stesse vie di segnalazione che si attiverrebbero in seguito alla stimolazione con fattori di crescita. Gli ossidanti attivano le proteine a tirosin cinasi e quindi anche i componenti a valle come le MAP cinasi, PKC, PLC $\gamma$  e Ca<sup>++</sup>. Un gran numero di PTK si attivano nelle cellule in seguito alla stimolazione con i fattori di crescita. Queste reazioni portano alla attivazione di cascate segnalatorie come quella delle MAP cinasi, PLC $\gamma$  e PI 3-cinasi [311].

### **Il ruolo dei ROS nella segnalazione cellulare**

Le vie di segnalazione che si innescano in conseguenza di uno stimolo, coinvolgono varie molecole segnalatorie, tra cui tirosina e serina/treonina cinasi e fosfatasi, fosfolipasi, proteine G. In questo contesto i ROS agiscono da secondi messaggeri, interagendo con queste molecole ed inducendone un'alterazione dello stato redox ed una conseguente modulazione dello stato di attività.

Ci sono però anche evidenze che suggeriscono la capacità dei ROS di attivare vie di segnalazione uniche e distinte. Infatti, è stato ad esempio dimostrato che i ROS hanno la capacità di attivare alcuni membri della famiglia delle PKC senza l'intervento di co-fattori lipidici, discostandosi quindi dalla classica via di attivazione di questa cinasi mediata dalla stimolazione recettoriale. Di seguito verranno riassunte le principali

molecole di segnalazione, che risultano soggette ad una modulazione funzionale dipendente dall'azione dei ROS [312].

### **Tirosina cinasi e tirosina fosfatasi**

Molte tirosina cinasi vengono attivate in seguito a stimolazione delle cellule con fattori di crescita. Questa stimolazione provoca l'attivazione di molecole effettrici come le MAPK, la fosfatidil-inositolo-3 cinasi (PI3K) e la fosfolipasi C gamma (PLC $\gamma$ ).

La somministrazione di ossidanti come l' $H_2O_2$  induce uno stimolo che mima quello generato dai fattori di crescita. L' $H_2O_2$ , le radiazioni ultraviolette e gli agenti alchilanti come la iodoacetamide (IAA), stimolano la fosforilazione e l'attivazione dei recettori a tirosina cinasi, come ad esempio il PDGF-r e l'EGF-r[416]. L' $H_2O_2$  facilita inoltre l'associazione del complesso Shc/Grb2/Sos sull'EGF-r, favorendo l'attivazione delle vie segnalatorie a valle, come quella delle MAPK.

Gli ossidanti sono capaci di attivare anche tirosina cinasi non recettoriali, come c-Src, c-Lck, c-Fyn e Zap70, inducendo un aumento nel livello di fosforilazione tirosinica dei substrati specifici. Non ci sono comunque evidenze di attivazione diretta di Zap70. Prove di ossidazione non hanno infatti mostrato nessun aumento di attività enzimatica di questa cinasi. Le cinasi della famiglia di Src sono coinvolte nel controllo della

organizzazione citoscheletrica e nella generazione di risposte segnalatorie mediate dalle integrine nei fibroblasti. Esse inducono la fosforilazione in tirosina di molte proteine citoscheletriche {314}. L'attività delle cinasi della famiglia di Src è controllata da una fosforilazione inibitoria sulla Tyr527. Questa fosforilazione induce una conformazione chiusa che rende la proteina inattiva. L'attivazione di Src è mediata dalla rimozione del fosfato sulla Tyr527 {315}. Dopo la defosforilazione della Tyr527, il cambiamento conformazionale promuove la autofosforilazione della Tyr416, la quale porta ad un incremento della attività catalitica di Src {317, 316}. L'interazione del dominio SH3 con il linker provoca il legame di SH2 con il dominio catalitico portando ad un controllo negativo della attività di Src {318}. Src è regolata anche da un meccanismo redox. Durante lo *spreading* cellulare la produzione di ROS da parte delle integrine ossida Src inducendone una attivazione. La regolazione redox di Src è una caratteristica chiave delle proprietà oncogeniche di questa cinasi: sia l'invasività che la proliferazione cellulare sono dipendenti dalla produzione di ROS i quali attivano Src {319}. L'ossidazione di Src coinvolge due gruppi sulfidrilici Cys245 nel dominio SH2 e Cys487 nel dominio cinasico. La regolazione redox di Src è una caratteristica importante nella sua funzione in risposta al contatto della cellula con la matrice. Infatti, il trattamento con antiossidanti impedisce l'attivazione di Src {319}.

È stato ipotizzato che il maggior stato di fosforilazione proteica sia in realtà da attribuire non tanto all'aumento dell'attività delle tirosina cinasi, quanto all'inibizione delle fosfotirosina fosfatasi. Quest'ultime contengono infatti una cisteina nel loro sito catalitico che può essere il bersaglio diretto degli ossidanti {320}. Quando questa cisteina viene ossidata l'attività catalitica dell'enzima viene inibita. Il livello di fosforilazione proteica è il risultato del bilancio tra l'azione delle tirosina cinasi e delle fosfotirosina fosfatasi. L'inibizione di quest'ultime porta ad uno sbilanciamento e, in ultima analisi, ad un incremento dei livelli di fosforilazione tirosinica. In letteratura è riportato che un aumento dei ROS all'interno della cellula inattiva le PTP con successiva attivazione costitutiva dei recettori a tirosin cinasi ed incremento della proliferazione cellulare {321}. Inoltre, è stato dimostrato che la ossidazione e quindi l'inattivazione delle PTP da parte dei ROS è necessaria per l'adesione dei fibroblasti alla matrice extracellulare {324}. I ROS sono importanti anche per la sopravvivenza cellulare. In lavori recenti è stato dimostrato che i ROS prodotti in seguito alla attivazione delle integrine trasducono segnali di sopravvivenza all'interno della cellula, con conseguente uscita dal programma dell'*anoikis* {322}.

## Serina-treonina cinasi

I recettori a tirosina cinasi stimolano la cascata delle MAPK, una famiglia di serina-treonina cinasi, attraverso l'attivazione di Ras. Evidenze sperimentali hanno rivelato che anche la somministrazione di concentrazioni non letali di  $H_2O_2$  sono in grado di attivare alcuni membri delle MAPK, come ad esempio la p38MAPK, la BMK1 o "Big MAPkinase1" e JNK ("c-Jun N-terminal kinase") {325, 323}. In accordo con questi dati, è stato inoltre osservato che l'attivazione sia della p38MAPK che di JNK, in seguito all'interazione ligando-recettore, risulta inibita dal trattamento con antiossidanti chimici o enzimatici {326}.

Le specie ossidanti inducono l'attivazione anche di un'altra serina-treonina cinasi, la proteina Akt, la quale risulta normalmente attivata dai fosfolipidi generati dalla fosfatidil-inositolo-3 cinasi.

Inoltre, anche l'attività della PKC viene modulata dai ROS. La PKC, generalmente, viene attivata dal  $Ca^{2+}$  e dal diacilglicerolo. Le specie reattive dell'ossigeno attivano la PKC sia mediante ossidazione diretta sia indirettamente tramite l'ossidazione del diacilglicerolo, che, in forma ossidata, induce una maggiore stimolazione della cinasi. Recentemente è stato dimostrato che il trattamento con  $H_2O_2$  induce una fosforilazione tirosinica della PKC, con conseguente incremento della sua attività catalitica. Questo è quindi un ulteriore meccanismo con cui i ROS mediano un'attivazione diretta della PKC {327}.

Anche l'attività delle serina-treonina fosfatasi può essere modulata mediante regolazione redox. La fosfatasi a doppia specificità CL100 ad esempio, che partecipa alla defosforilazione e quindi allo spegnimento delle MAPK, presenta un'espressione incrementata di almeno due ordini di grandezza durante lo stress ossidativo [328]. La cellula sembra quindi possedere un sistema di regolazione negativa dell'attivazione delle MAPK indotta dai ROS.

La calcineurina, che contiene Fe e Zn nel sito attivo, se viene ossidata risulta inibita. Quindi per garantire il funzionamento dell'enzima, la superossido dismutasi (SOD) interagisce con la calcineurina, proteggendola così da danni ossidativi.

### **Attivazione di Ras**

È stato dimostrato che la piccola GTPasi Ras, capace di trasdurre il segnale mitotico dai recettori attivati fino alla cascata delle MAPK, può essere attivata tramite ossidazione. Lander e collaboratori (1997) hanno infatti dimostrato che il monossido di azoto (NO) è in grado di interagire direttamente con la cisteina 118 esposta sulla superficie di Ras, inducendo lo scambio GDP-GTP e la conseguente attivazione della proteina. Questa proteina rappresenta perciò uno dei mediatori della segnalazione redox cellulare.

## **Metabolismo dei fosfolipidi**

La PLC $\gamma$ , i cui prodotti, IP $_3$  e DAG, derivanti dall'idrolisi dell'inositolo-4,5-bisfosfato, inducono rispettivamente la mobilizzazione del Ca $^{2+}$  e l'attivazione della PKC, risulta fosforilata ed attivata dal trattamento con H $_2$ O $_2$  e pervanadato. Anche la fosfolipasi A $_2$  (PLA $_2$ ) e la fosfolipasi D (PLD) vengono attivate dallo stress ossidativi; queste idrolasi lipidiche risultano infatti iperfosforilate in tirosina in conseguenza della somministrazione di ossidanti. Anche se il meccanismo di attivazione della PLA $_2$  ad opera dei ROS non sia ancora molto chiaro, sembra che questo sia mediato dall'azione della PKC o di Ras. Le tirosina chinasi e il Ca $^{2+}$  sembrano invece probabilmente implicate nell'attivazione ROS-dipendente della PLD.

## **Segnalazione attraverso il calcio**

L'inositolo trifosfato (IP $_3$ ), prodotto dalla PLC $\gamma$ , si lega al recettore specifico presente sul reticolo endoplasmatico, inducendone l'attivazione, ossia l'apertura del canale del Ca $^{2+}$ ; questo consente la fuoriuscita di questi ioni dal reticolo, con conseguente incremento della concentrazione citosolica di Ca $^{2+}$  [329]. Dopo la mobilitazione di Ca $^{2+}$  dalle riserve intracellulari, si ha un ingresso di questo ione anche dallo spazio extracellulare.

Lo stress ossidativo, agendo sulla PLC $\gamma$ , e quindi promovendo la produzione di IP $_3$ , determina, in ultima analisi, un aumento dei livelli di Ca $^{2+}$ . È stato recentemente dimostrato che il recettore per l'IP $_3$ , al pari del recettore rianodinico, della Ca $^{2+}$ ATPasi e dello scambiatore Na $^{+}$ -Ca $^{2+}$ , può anche essere direttamente modulato mediante ossidazione. Quindi lo stato redox della cellula è in grado di regolare i livelli intracellulari di Ca $^{2+}$ , e gli effetti che ne conseguono, attraverso la modulazione diretta o indiretta di canali e trasportatori.

### **La regolazione redox dei fattori di trascrizione**

Lo stress ossidativo induce l'espressione di molti geni precoci ("immediate early genes") come *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*. Questa espressione può essere indotta dall'attivazione ROS-dipendente delle vie di segnalazione a monte. È stato infatti dimostrato che il trattamento delle cellule con H $_2$ O $_2$  è in grado di attivare l'espressione di fattori di trascrizione chiave, quali NF- $\kappa$ B e AP1. Molti fattori di trascrizione possono comunque anche essere direttamente regolati dallo stato redox, indipendentemente dall'aumento dei livelli di espressione. Questo è possibile in quanto tutti i fattori di trascrizione possiedono un dominio legante il DNA, dove sono presenti una o più cisteine la cui ossidazione induce un incremento dell'attività di questi fattori.

L'attività di AP1, un complesso formato dall'eterodimerizzazione Jun/Fos o dall'omodimerizzazione Jun/Jun e prevalentemente coinvolto nei fenomeni di attivazione della crescita cellulare, risulta ad esempio soggetto ad una regolazione redox, diretta su un residuo conservato di cisteina presente nel dominio di legame al DNA sia di Fos che di Jun. La modificazione di questo residuo mediante agenti che si legano al gruppo sulfidrilico (ad esempio la N-etilmaleimide o NEM) inibisce infatti l'attività di AP1, mentre il trattamento con riducenti come il ditiotreitolo (DTT) ne incrementa la capacità di legame al DNA. È interessante osservare che la sostituzione della cisteina presente nel dominio legante il DNA in serina, è normalmente presente nei corrispettivi virali di *c-fos* e *c-jun* (*v-fos* e *v-jun*), suggerendo che la regolazione redox di AP1 possa giocare un ruolo chiave nella trasformazione tumorale.

Anche NF-κB, un fattore coinvolto in numerosi fenomeni quali la risposta immunitaria, la risposta allo stress e la crescita cellulare, risulta soggetto ad una simile regolazione. In particolare, la cisteina 62 sembra essere la diretta responsabile dell'inattivazione di questo fattore trascrizionale: l'ossidazione di tale residuo, nonché la sua sostituzione con un residuo di serina, decrementa notevolmente la capacità di legame al DNA di NF-κB.

Myb, un fattore fondamentale per l'attivazione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, possiede anch'esso un residuo conservato di cisteina, il cui stato di riduzione è essenziale per garantire la capacità di

legame al DNA.

Anche altri fattori trascrizionali, come NF-Y (“nuclear factor-Y”), GR (recettore per i glucocorticoidi) o CREB (“cAMP-responsive element binding protein”), risultano inattivati dalla formazione di ponti disolfuro intramolecolari, indotti dalla presenza di specie ossidanti.

### **Danni indotti dai ROS**

Le specie reattive dell’ossigeno e ossidanti di altra natura, possono provocare ingenti danni ai componenti cellulari, soprattutto a carico delle proteine, dei lipidi di membrana e del DNA.

Durante l’invecchiamento cellulare, lo stress ossidativo ed in particolari condizioni patologiche, si assiste ad un notevole accumulo di proteine in forma ossidata [330].

L’ossidazione dello scheletro carbonioso porta immediatamente alla perdita di struttura ed indirizza la proteina verso i sistemi cellulari di proteolisi.

Inoltre, nelle proteine possiamo assistere alla ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi. Tutti i residui sono suscettibili all’ossidazione anche se, per alcuni, i prodotti di ossidazione non risultano ancora ben definiti.

La metionina e la cisteina sono due residui estremamente reattivi, i cui

prodotti di ossidazione sono stati ormai ben caratterizzati.

Per ciò che riguarda la metionina, la sua catena laterale è sensibile all'ossidazione da parte di una notevole varietà di ROS come il superossido, l'acqua ossigenata, il radicale ossidrile, il perossinitrito, l'acido ipocloroso e le cloroammine. L'ossidazione può risultare nell'aggiunta di uno o due atomi di ossigeno allo zolfo, con conseguente formazione di sulfossidi o solfoni, rispettivamente {331}. L'unica specie trovata nei sistemi biologici è la metionina sulfossido (MeSOX). La modificazione di questo residuo sembra inibire la funzionalità di molte proteine; ad esempio, l'ossidazione della Met 358 nel PI1 ("proteinase-inhibitor-1") sembra inattivare la sua funzione sull'elastasi ed in tal modo svolgere un ruolo preminente nell'insorgenza dell'enfisema {332}. L'ossidazione di questo residuo svolge anche un ruolo protettivo; ad esempio nella glutamina sintetasi di *E.Coli*, le otto metionine che circondano il sito catalitico funzionano da "scavengers" dei ROS, prevenendo così l'ossidazione dei metalli del sito catalitico {333}. Nella cellula esistono comunque delle metionina-sulfossido reduttasi, capaci di convertire di nuovo la forma ossidata della metionina nella forma ridotta.

Per quanto riguarda la cisteina, come precedentemente accennato, il gruppo sulfidrilico di questo residuo è molto reattivo e può raggiungere tre diversi gradi di ossidazione (da acido sulfenico, a sulfonico, a sulfonico). In condizioni di ossidazione blanda, i residui di cisteina

possono dar luogo alla formazione, oltre che del gruppo sulfenico, di gruppi disolfuro, funzionando così da efficienti “scavenger” dei ROS intracellulari. Anche in questo caso esistono delle disolfuro reduttasi che sono in grado di riportare la molecola nella sua forma ridotta.

Un’altro effetto indotto da condizioni di stress ossidativo è un’estesa nitratura delle proteine; tale fenomeno è dovuto alla diffusione di perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un composto molto reattivo che si forma a partire da ossido nitrico (NO) e ioni  $\text{O}_2^-$  {340, 334}. I residui maggiormente interessati da questo tipo di modificazione sono il triptofano e la tirosina. In particolare, la nitratura delle tirosine può avere importanti conseguenze sulle vie di trasduzione del segnale; infatti questa modificazione previene la fosforilazione di tali residui ad opera delle tirosina chinasi, compromettendo così uno dei più importanti meccanismi di regolazione cellulare {335}.

Le proteine che risultano ossidate tramite uno dei meccanismi precedentemente discussi vengono normalmente degradate dai sistemi di proteolisi; la loro eliminazione è inoltre favorita dal fatto che queste proteine tendono a denaturarsi in conseguenza dell’ossidazione, rendendosi perciò meglio attaccabili dai sistemi di degradazione {336}.

La mancata eliminazione delle proteine ossidate ed il loro accumulo all’interno della cellula sembra invece associato all’invecchiamento cellulare e ad altre malattie come il diabete, l’aterosclerosi e malattie

neurodegenerative.

I doppi legami presenti nella catena dei lipidi poliinsaturi sono un sito preferenziale per l'attacco dei radicali liberi. Le specie radicaliche possono quindi determinare un'estesa perossidazione lipidica che può diventare molto dannosa per canali ionici, proteine di trasporto ed enzimi oppure comportare la distruzione dello stesso doppio strato lipidico della membrana, portando la cellula alla morte.

I fenomeni di ossidazione indotti dai ROS possono coinvolgere anche le basi azotate del DNA. Fra queste, la guanina rappresenta un marcatore molto sensibile per stabilire il grado di danno provocato al DNA in seguito allo stress ossidativo. Attualmente metodi analitici hanno stabilito che il numero di residui di idrossi-deossiguanosina, in condizioni normali, si attesti attorno a valori di 100-1000 {337}. Questo rappresenta il livello basale, comunque presente, che viene mantenuto sotto controllo grazie ai sistemi di riparazione che rimuovono le basi modificate {338}. Se tali modificazioni avvengono però su siti critici o non vengono riparate, possono provocare problemi funzionali; per questo l'ossidazione delle basi azotate viene considerata un evento importante durante la carcinogenesi chimica {339}.

Il DNA ossidato possiede inoltre una maggiore propensione a cambi di conformazione ed a mutazioni geniche, queste ultime indotte da una minor fedeltà con cui la DNA polimerasi replica il DNA stampo.

# FIGURE INTRODUZIONE

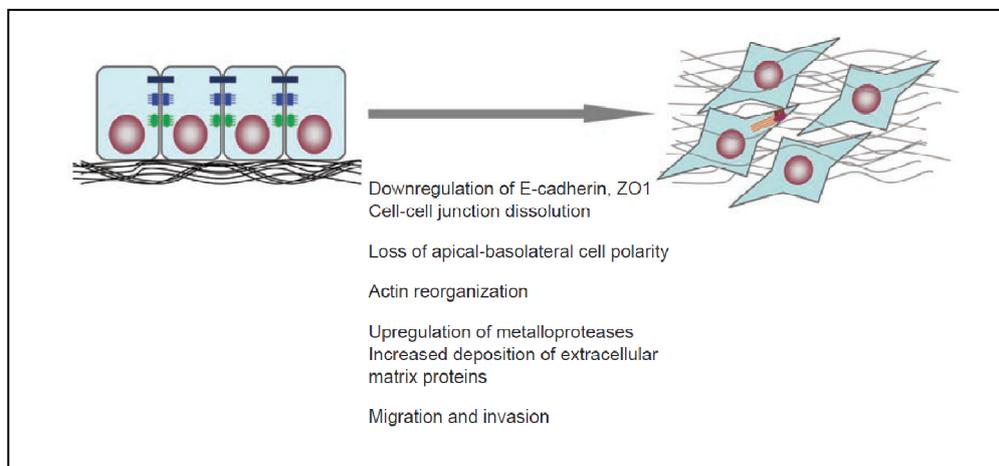


Fig 1: Caratteristiche della EMT

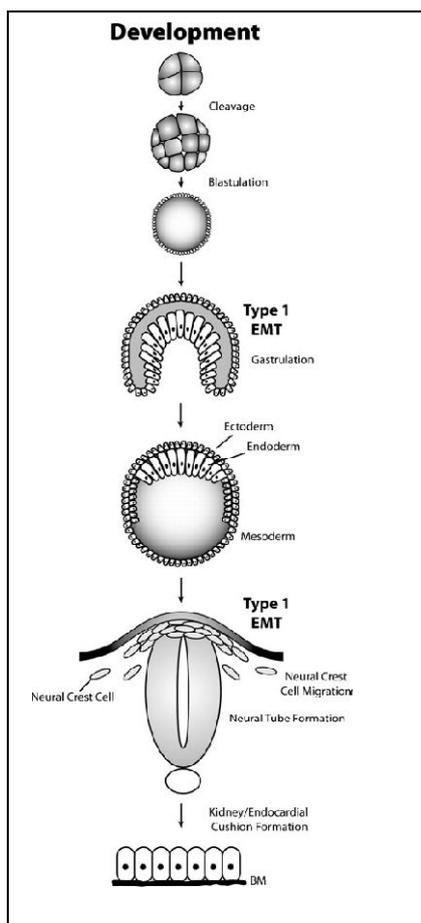


Fig 2: La EMT di Tipo 1

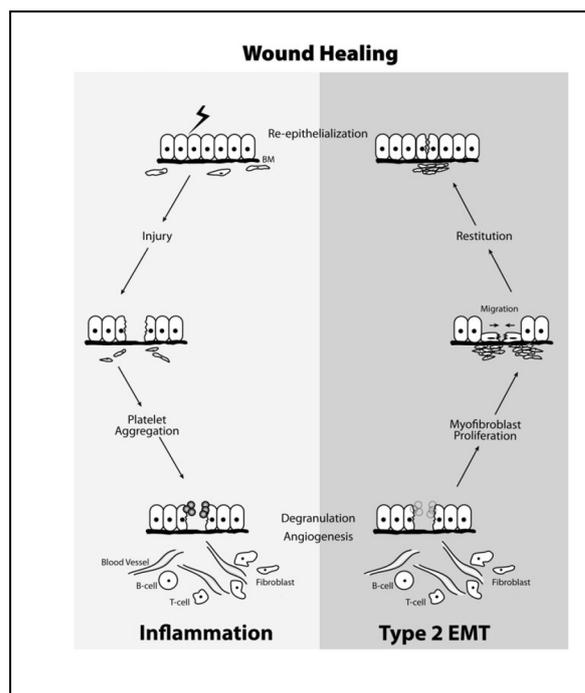


Fig 3: La EMT di Tipo 2

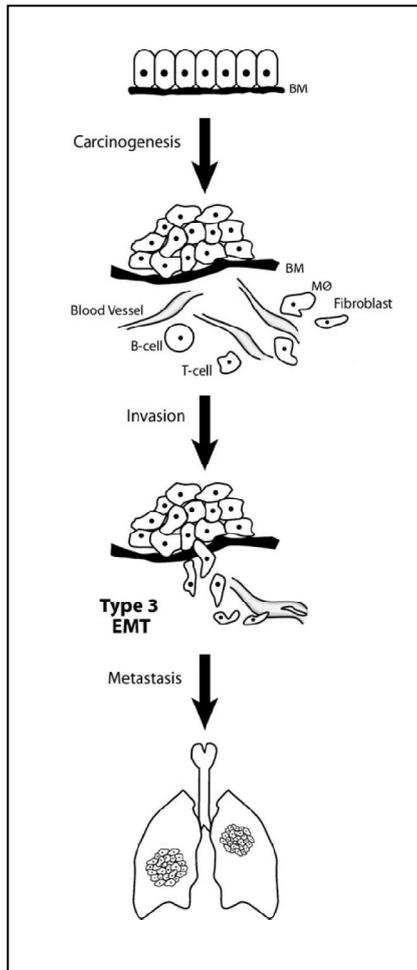


Fig 4: La EMT di tipo 3

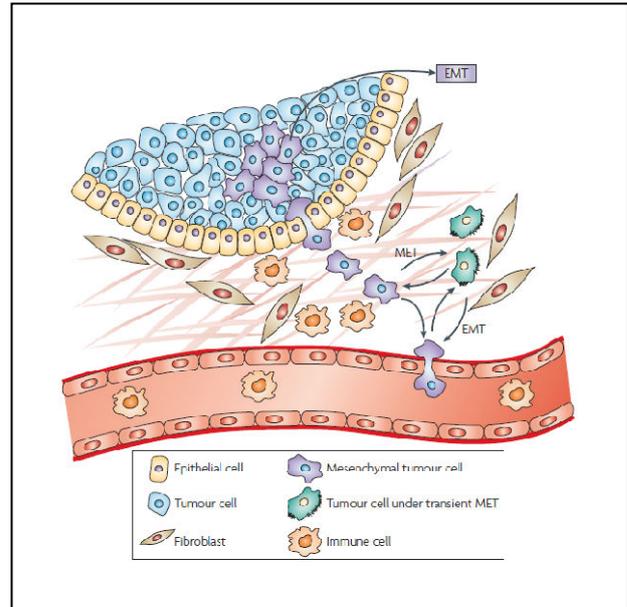


Fig 5: Il microambiente tumorale

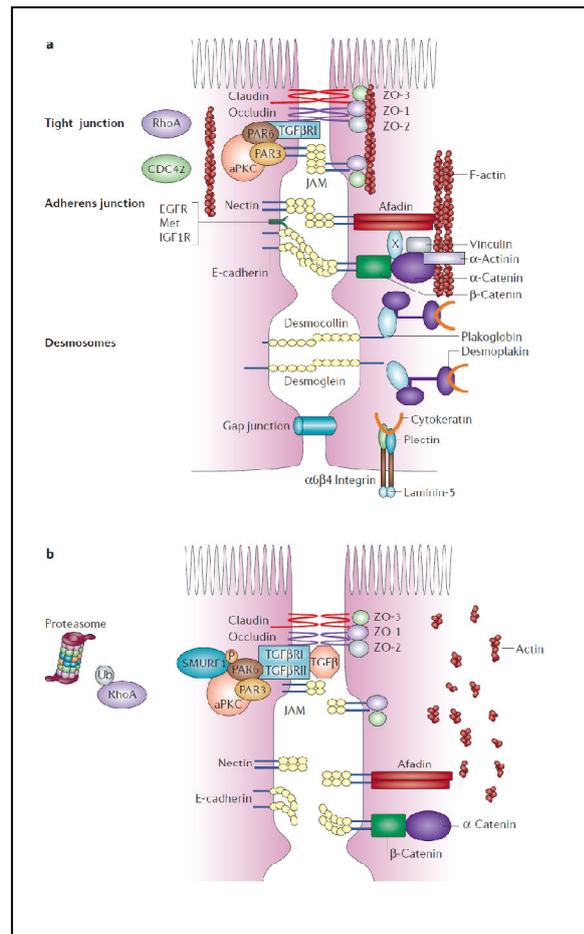


Fig 6: Le Giunzioni cellulari fra cellule epiteliali

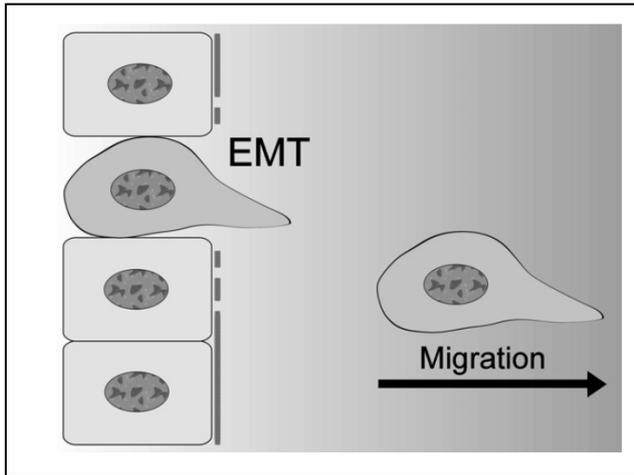


Fig 7: Collegamento fra EMT e acquisizione di capacità migratorie da parte delle cellule

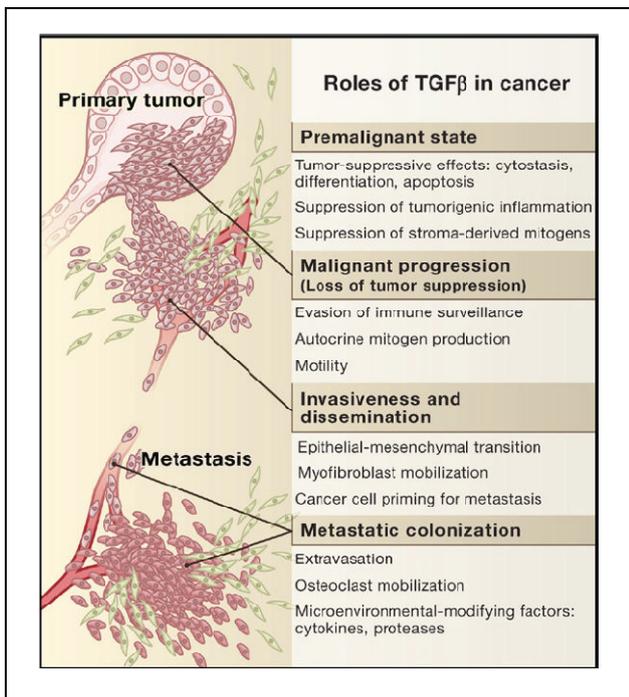


Fig 8: Il ruolo del TGF-β nel cancro

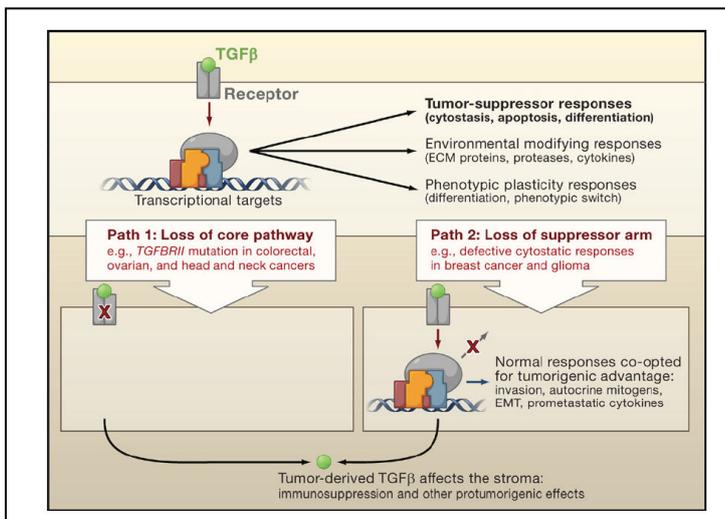


Fig 9: Meccanismi con cui le cellule tumorali eludono gli effetti del TGF-β su di esse.

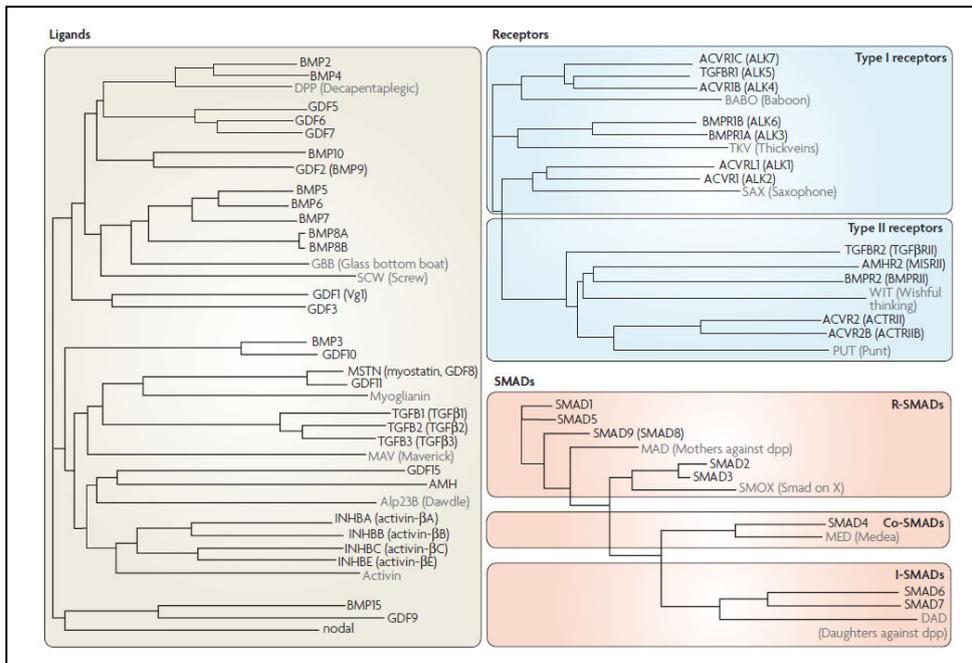


Fig 10: I ligandi della famiglia del TGF-β, i recettori di tipo I e II e le proteine Smad

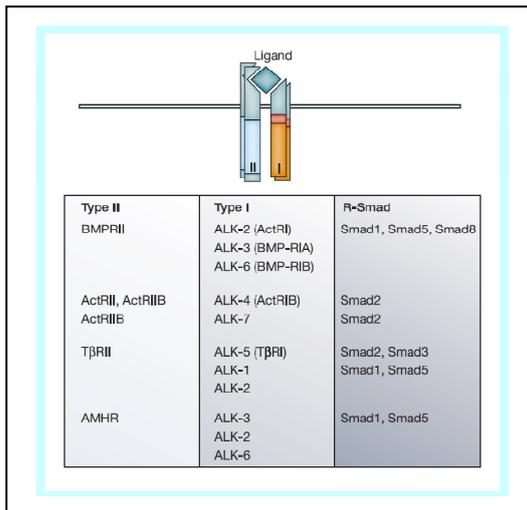


Fig 11: Interazione fra recettori di tipo I, recettori di tipo II e proteine R-Smad

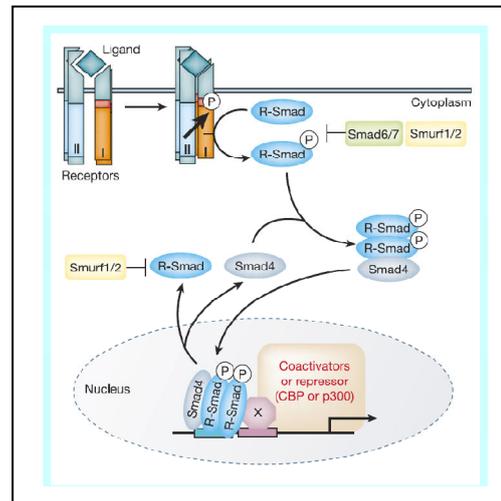


Fig 12: Schema di attivazione della via Smad dipendente

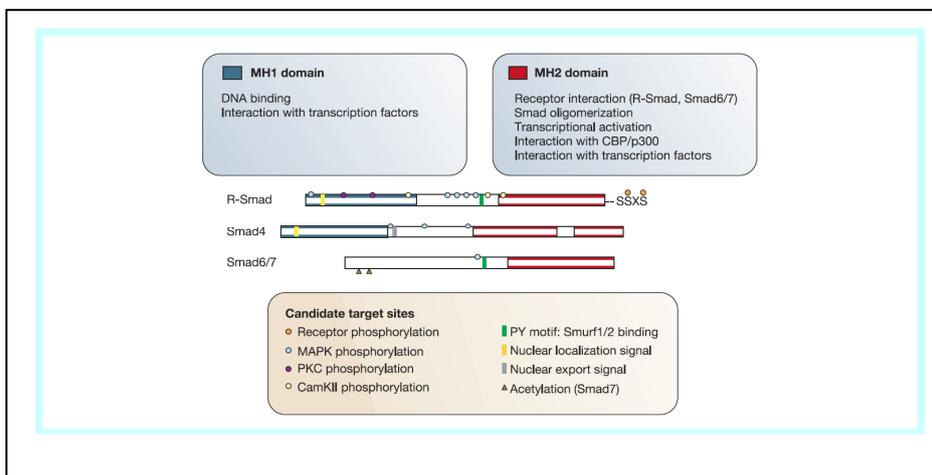


Fig 13: Schema dei domini delle proteine R-Smad, Smad4 e Smad 6/7

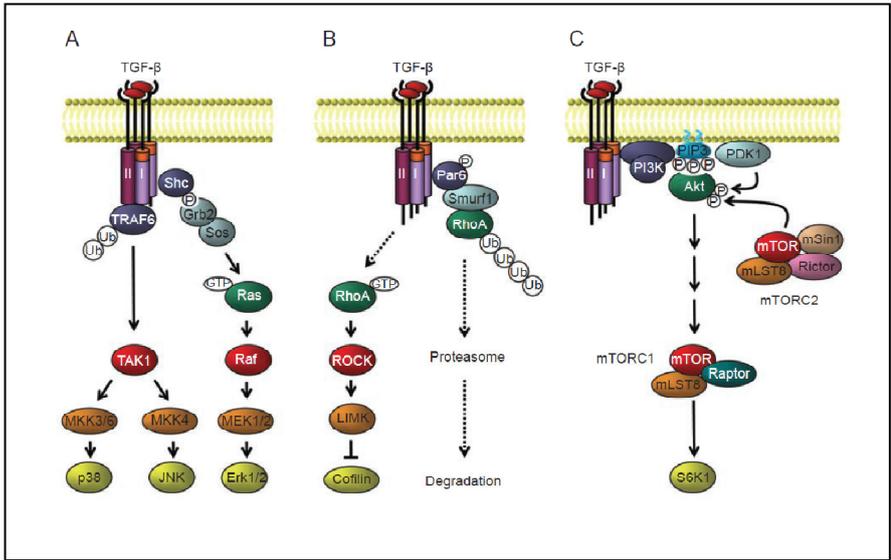


Fig 14: Le vie Smad indipendenti attivate dal TGF-β

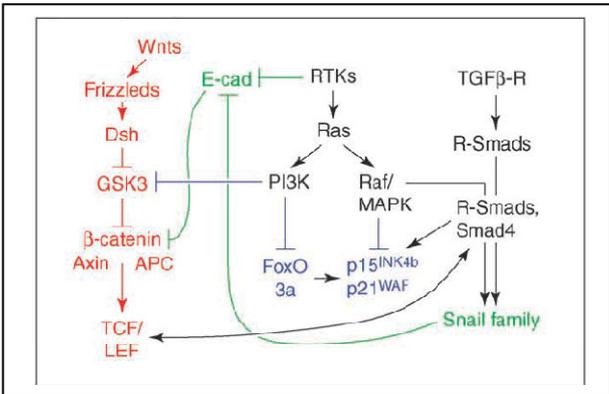


Fig 15: La via di segnalazione di Wnt

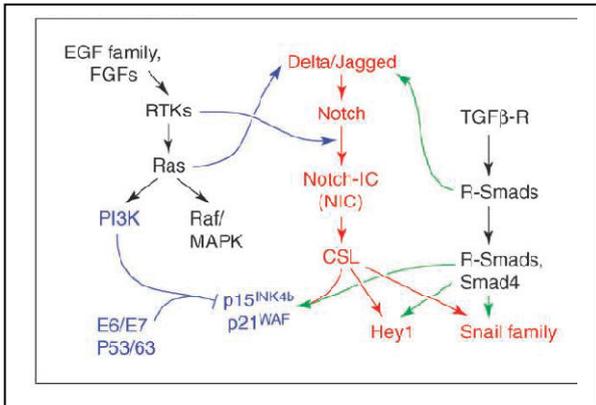


Fig 16: La via di segnalazione di Notch

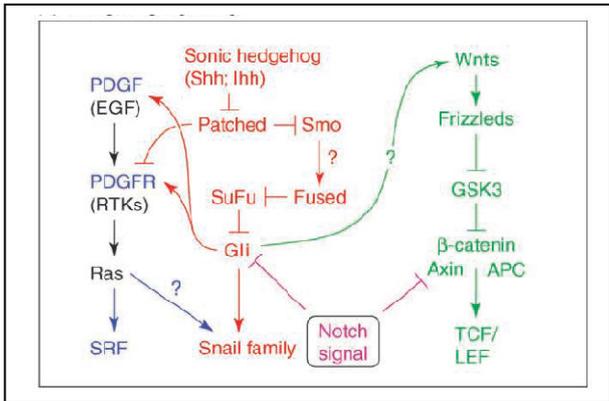


Fig 17: La via di segnalazione di Hedgehog

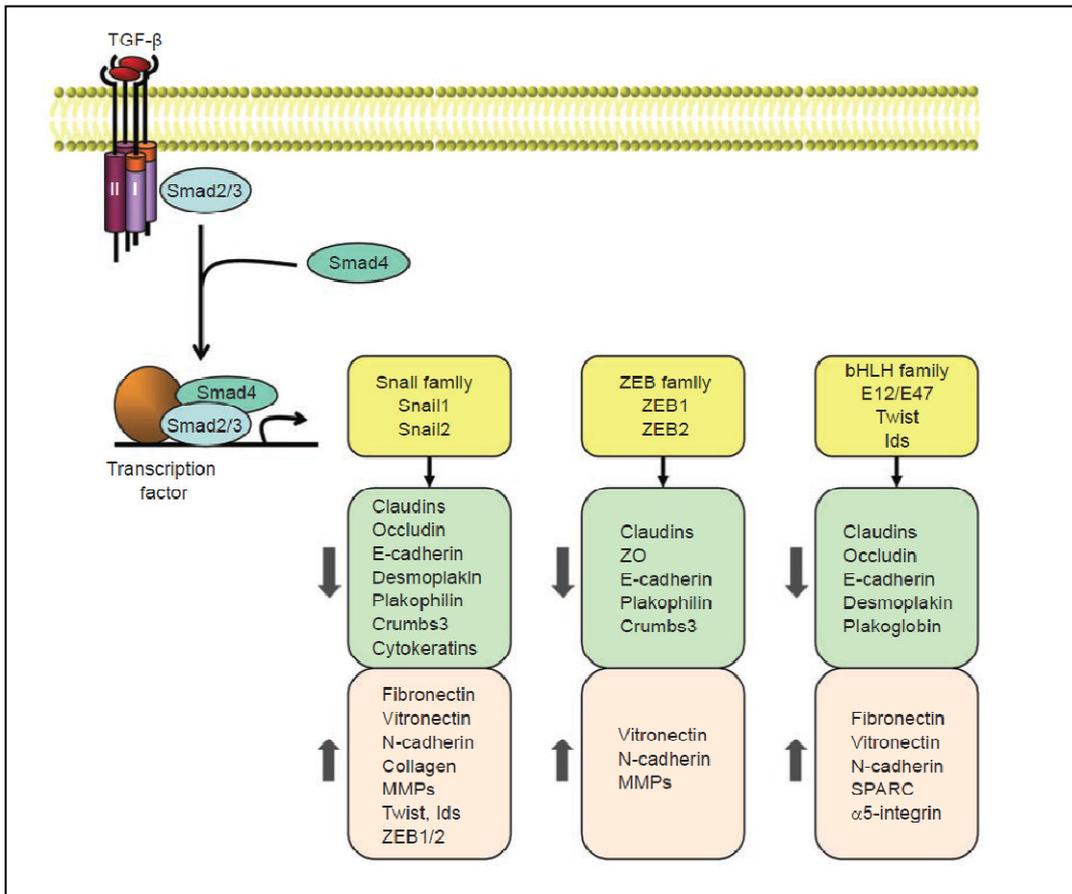


Fig 18: I geni attivati dal TGF- $\beta$  che inducono EMT

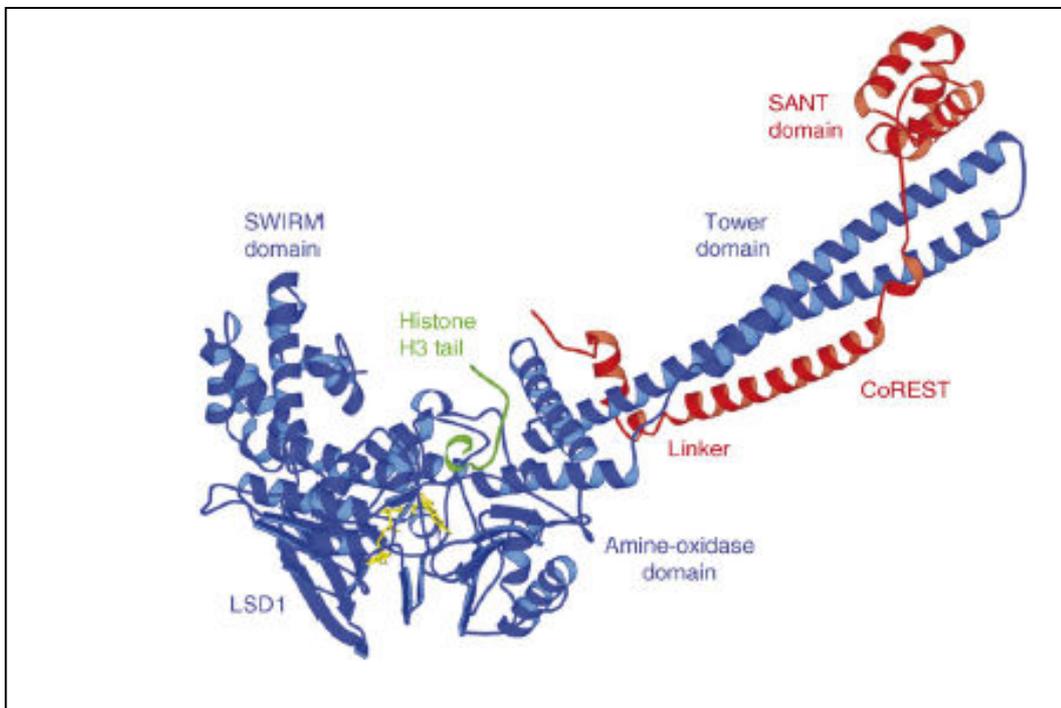


Fig 19: Ricostruzione tridimensionale della LSD1 in cui vengono rappresentati i domini importanti della proteina descritti nel testo.

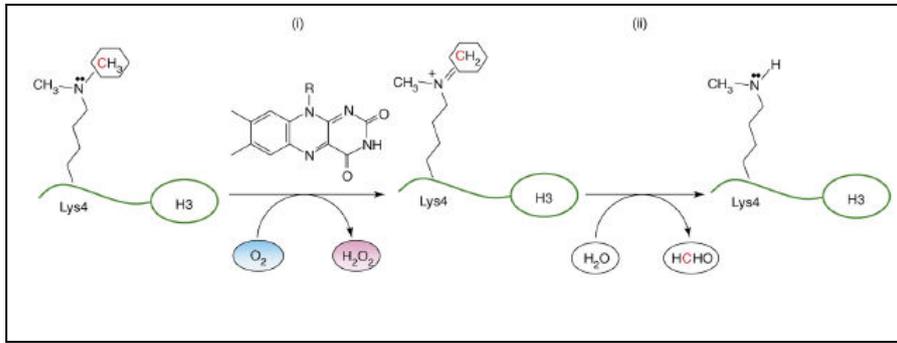


Fig 20: Meccanismo di reazione della LSD1 in cui viene prodotta  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

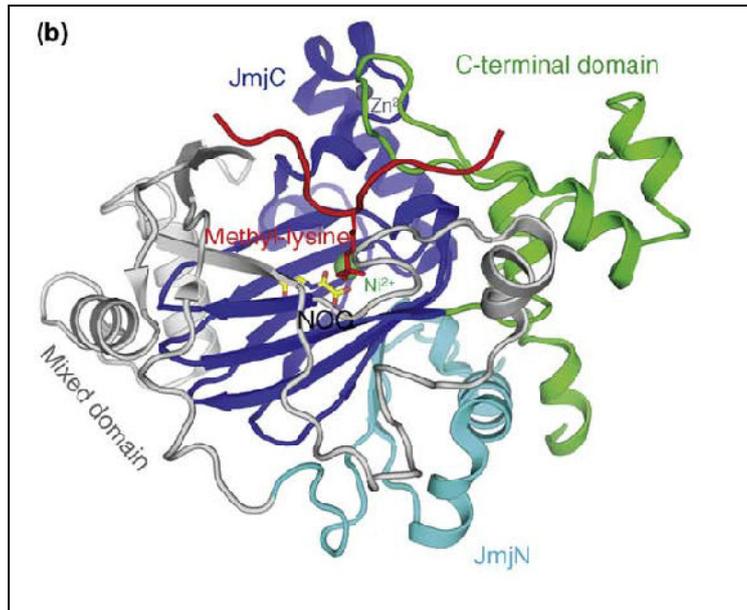


Fig 21: Ricostruzione tridimensionale della KDM4A (JMJD2A) in cui vengono rappresentati i domini importanti della proteina descritti nel testo.

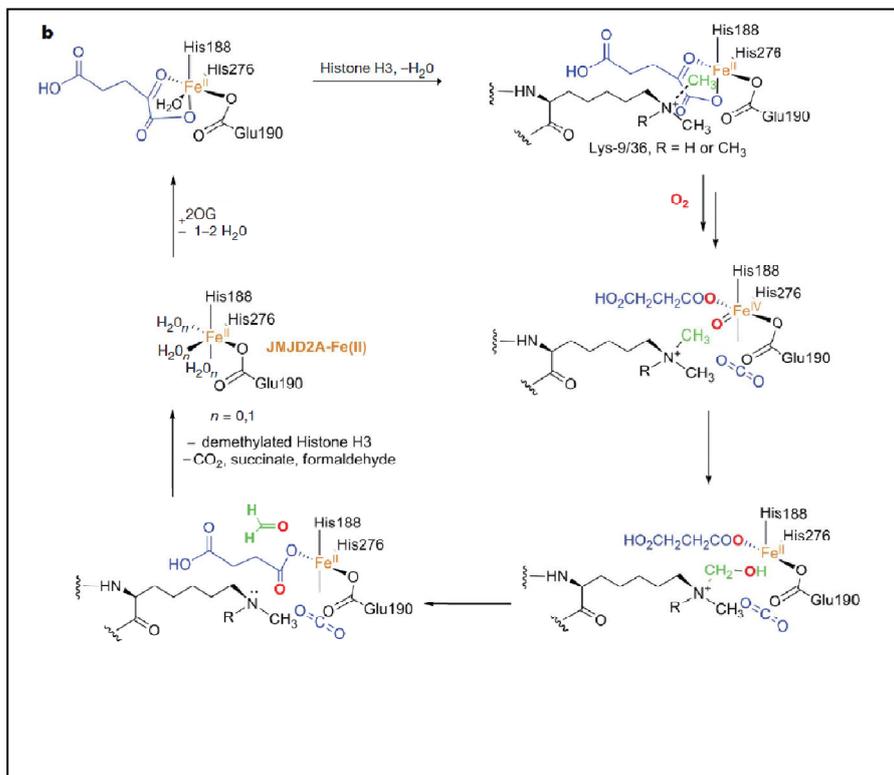


Fig 22: Meccanismo di azione di JMJD2A

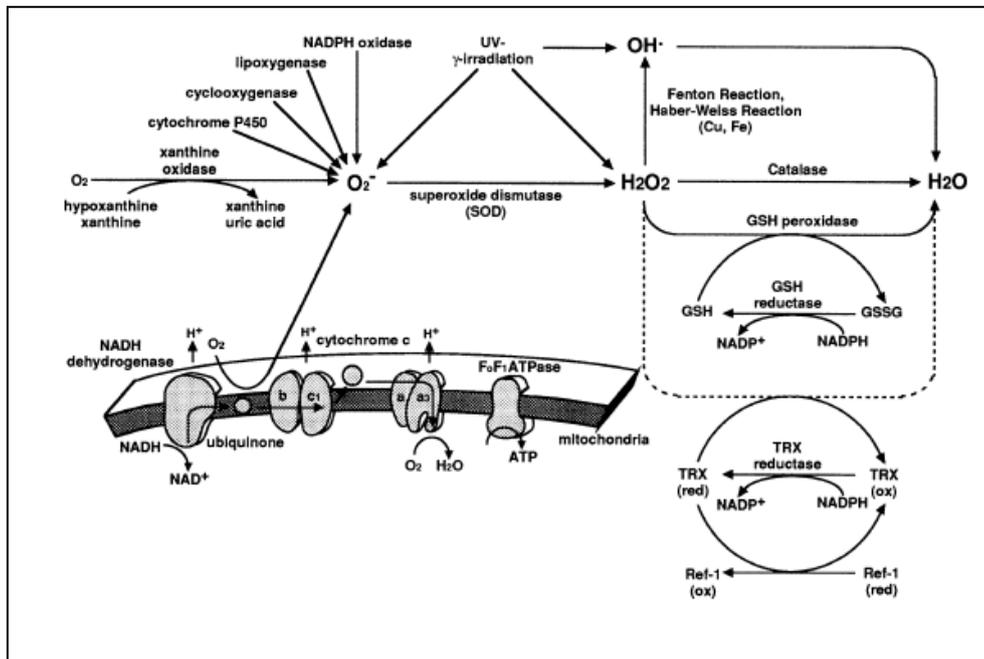


Fig 23: Principali meccanismi di produzione e di inattivazione dei ROS

## MATERIALI E METODI

### Soluzioni di uso frequente:

- PBS (Phosphate buffered saline), dosi per un litro: 0.2 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g di  $\text{KCl}$ , 0.8 g di  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4.
- Colorante di corsa per elettroforesi di proteine (Sample Buffer), dosi per 100 ml: 0.01 g di Blu di Bromofenolo, 1.52 g Tris Base, 20 ml di glicerolo, 2 g di SDS, 20 ml di 2- $\beta$ -mercaptoetanololo.
- Tampone di corsa per elettroforesi di proteine: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% (W/V) SDS, pH 8.3.
- Tampone di trasferimento per Western blot : 25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3, 10% metanolo.
- Tampone di lisi RIPA: 0.1% di SDS, 0.5% di deossicolato, 50mM di Tris-Hcl a pH 7.5, 150 mM di  $\text{NaCl}$ , 1% di Nonidet P-40, 2 mM di EGTA, 1mM di ortovanadato di sodio, 1 mM di fenil-metasulfonil-fluoride (PMSF) e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di aprotinina e leupeptina.
- Soluzione di lavaggio per Western blot: Tween 0.1% in PBS.
- Soluzione di incubazione degli anticorpi primari e secondari: latte al 2 % / tween 0.1 % in PBS.

### Materiali:

- I sali normalmente usati sono stati acquistati alla Merck.

- Le cellule MCF10A provengono dall'ATCC (American Type Culture Collection).
- Tutti i reagenti usati per il mantenimento in coltura delle cellule eucariotiche provengono dalla Sigma.
- Il fattore Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) proviene dalla Peprotech.
- La catalasi e gli anticorpi anti-SMA sono della Sigma.
- Il reattivo BCA per il dosaggio delle proteine è della Pierce.
- Il materiale per la corsa ed il trasferimento del gel di poliacrilammide è della Biorad.
- La membrana di PVDF utilizzata nell'western-blot proviene dalla Millipore.
- Gli anticorpi anti-E-caderina, anti-N-caderina sono stati comprati alla Santa Cruz Biotechnology.
- Gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (HRP) per la rivelazione in chemiluminescenza sono della Santacruz
- La diclorofluoresceina-diacetato (DCF-DA) e il sistema Dyna beads sono della Invitrogen.
- Il kit per la rivelazione dei ROS nucleari è stato acquistato alla Biotrin.
- Il kit per la rivelazione in chemiluminescenza e la nitrocellulosa HybondN<sup>+</sup> sono della Amersham Pharmacia.

- Le lastre fotografiche sono della Kodak.
- Gli anticorpi secondari per la rivelazione in immunofluorescenza Alexa Fluor™488 sono della Molecular Probes.
- I primer sono della Invitrogen mentre le mix per la PCR sono della Qiagen
- Gli anticorpi contro la H3K4me2, H3K9me3, PolIII e IgG sono della Ab-Cam

### **Colture cellulari**

Le cellule di epitelio mammario umano MCF-10A sono state coltivate in un terreno così costituito: in un volume finale di 500 ml, 50% DMEM, 50% HAM'S F12, 5% siero di cavallo, 1% penicillina/streptomicina, 1% glutammina, 100 µg/ml normocina, 20 ng/ml EGF, 0,5 µg/ml idrocortisone, 10 µg/ml insulina, 100 ng/ml tossina del colera. Vengono mantenute in incubatore ad una temperatura di 37 C° ed in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Queste cellule crescono in monostrato e, una volta raggiunta la confluenza, vengono propagate mediante trattamento con una soluzione contenente tripsina, previo lavaggio con soluzione salina isotonica PBS (Phosphate Buffered Saline), e successivamente piastrate a bassa densità nel terreno di coltura appropriato.

### **Stimolazione, dosaggio ed elettroforesi di proteine**

Le cellule MCF-10A, a un livello di confluenza in piastra del 70% circa, sono state stimulate con TGF-β alla concentrazione di 10 ng/ml per 72h. Inoltre, le cellule sono state pretrattate con NAC alla concentrazione di 5 mM per 20 min. I campioni vengono successivamente lisati per 10 minuti in ghiaccio, impiegando il buffer di lisi RIPA completo, addizionato di SDS 0.1%, deossicolato 0.5%, Tris-Hcl 50mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 1% Nonidet P-40, 2 mM EGTA, 1mM ortovanadato di sodio, 1 mM fenil-

metasulfonil-fluoride (PMSF) e 10 µg/ml aprotinina e leupeptina. I lisati così ottenuti sono poi stati centrifugati per 10' a 13000 rpm. Il supernatante è stato recuperato ed utilizzato per il dosaggio proteico tramite saggio Bradford. Il contenuto proteico totale, espresso in µg/µl, è stato valutato impiegando il Bradford, colorante che presenta picco massimo di assorbimento a una lunghezza d'onda di 595 nm; legandosi preferenzialmente ai residui basici e aromatici delle proteine, determinerà una colorazione del campione tanto più intensa quanto maggiore è la concentrazione proteica.

### **Elettroforesi di proteine e Western Blot**

I campioni proteici sono stati inizialmente bolliti per 5' in un tampone (Sample Buffer) contenente SDS (un detergente anionico) e 2-beta-mercaptoetanololo. Una volta terminato il caricamento dei campioni così preparati nel gel di impaccamento (stacking gel), è stata applicata al gel un potenziale di 200 V per 1 h. Una volta terminata la corsa elettroforetica, il gel di poliacrilammide viene posto per 5' nel tampone di trasferimento . Le proteine sono state poi trasferite dal gel alla membrana di PVDF mediante elettroblotting a 100 V per 1 h. Dopo il trasferimento, la membrana è stata nuovamente posta in metanolo per 30'' e lasciata asciugare in carta assorbente per circa 15'-20'. La membrana è stata quindi

incubata con gli anticorpi primari specifici in una soluzione di latte 2% e Tween 0.1%. L'incubazione è stata effettuata a temperatura ambiente in agitazione per tutta la notte. Il giorno successivo, dopo tre lavaggi in apposito tampone di lavaggio, la membrana è stata trattata con gli appositi anticorpi secondari per 1h in agitazione a temperatura ambiente. La rivelazione in chemiluminescenza è operata impiegando i reagenti del kit ECL-Amersham Pharmacia® secondo le istruzioni del fornitore.

### **Immunofluorescenza**

Le cellule MCF-10A sono piastrate su vetrino in terreno di crescita, stimulate con TGF- $\beta$  10ng/ml per 72h e pretrattate con NAC 5 mM per 20 min. Successivamente, le cellule vengono lavate in PBS e fissate in paraformaldeide al 3% in PBS per 20 minuti a 4 °C. Dopo essere state così trattate, le cellule sono permeabilizzate con tre lavaggi successivi in TBST (50 mM TrisHCl pH 7.4, 150mM NaCl e 0.1% Triton X-100), bloccate per 1h a temperatura ambiente con TBST contenente siero di cavallo 5.5% e poi incubate per tutta la notte a 4 °C con gli anticorpi primari specifici diluiti 1:100 in TBS (50 mM TrisHCl pH 7.4, 150mM NaCl). Il giorno dopo le cellule sono lavate una volta con TBST per 15' e una volta con TBST contenente BSA 0.1% per 15' e poi incubate con gli appropriati anticorpi secondari coniugati a specifici fluorocromi, diluiti 1:100 in TBST

contenente BSA 3%, per 1 h a temperatura ambiente. Dopo una serie di ulteriori lavaggi in TBST, il vetrino è montato su vetrino portaoggetti ed osservato al microscopio confocale (Leica TCS SP5) fornito di software per l'acquisizione delle immagini.

### **PCR Real-Time**

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit RNeasy minikit della Qiagen. Dell'RNA totale viene prelevato 1 µg e retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit Quantitech Reverse Transcription Kit della Qiagen. Le condizioni usate per la RT-PCR sono 2 min a 42°C per il primo step poi per il secondo step 15 min a 42°C e 3 min a 95°C. Per misurare il livello di espressione di Snail è stata effettuata la PCR-Real Time utilizzando la 7500 fast real-time PCR System della Applied Biosystem ed i kit della Qiagen Quantifast SYBR Green PCR. Sono stati usati 2 µl di cDNA per la real-time PCR in triplicato. I cicli di real-time sono: 5 min a 95°C e poi 40 cicli di 10 sec a 95°C e 30 sec a 60°C. Sono stati utilizzati i primer seguenti:

SNAIL Reverse: GACACATCGGTCAGACCAG

SNAIL Forward: GAGGCGGTGGCAGACTAG

β2-microglobulina Reverse: GATGCTGCTTACATGTCTCG

$\beta$ 2-microglobulina Forward: CCAGCAGAGAATGGAAAGTC

La  $\beta$ 2-microglobulina è stata utilizzata come gene Housekeeping. I valori sono espressi come incremento relativo rispetto al campione di riferimento (non trattato).

### **TEST oxyDNA**

Le cellule MCF-10A vengono piastrate su vetrino e il giorno successivo stimulate per 30 min con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml, previo trattamento con NAC 5mM. Successivamente passato il tempo di stimolazione vengono fissate in paraformaldeide al 3% e permeabilizzate con una soluzione contenente Triton X-100. Successivamente vengono lavate con la soluzione di lavaggio fornita dal Kit per 10 min, incubate per 1h a 35-39°C con la soluzione di bloccaggio, lavate di nuovo, aggiunta la proteina marcata legante la 8-oxo-guanina, lavate e montati i vetrini nella maniera standard. I vetrini vengono osservati al microscopio confocale. Maggiore è la fluorescenza osservata maggiore è il danno al DNA che si è verificato. Il Kit utilizzato si chiama Biotrin OxyDNA Test prodotto dalla Biotrin.

### **Misura dei ROS intracellulari**

Le cellule MCF-10A vengono stimulate con TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml a varie

tempistiche e pretrattate con NAC 5mM e con catalasi 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Per il saggio in vitro della produzione di ROS viene usata la 2',7' - diclorofluoresceina-diacetato (DCF-DA), un colorante fluorescente sensibile alla ossidazione. Il DCF-DA è sciolto in DMSO (dimetilsolfossido) al momento dell'uso e mantenuto al buio, in quanto molto instabile alla luce. Le cellule vengono trattate come da stimolazione e, a 3 minuti dalla fine della stimolazione, viene aggiunto il DCF-DA (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), a 37°C. Al termine dell'esperimento le cellule vengono bloccate con un lavaggio in PBS e ciascun campione viene lisato in 1 ml di tampone RIPA, contenente gli inibitori di proteasi. Le cellule vengono mantenute 1 min a 4°C, recuperate in eppendorf, centrifugate 1 min a 13.000 rpm ed analizzate immediatamente al fluorimetro (eccitazione 488 nm; emissione 510 nm). I risultati vengono normalizzati sulla base del contenuto totale di proteine di ciascun campione.

## **ChIP**

Le cellule MCF-10A vengono fatte crescere in terreno completo fino alla confluenza del 95%. Per valutare lo stato di metilazione della H3K9, le cellule sono state stimolate per 90 min mentre per valutare lo stato di metilazione della H3K4 sono state stimolate per 30 min. Dopo l'opportuna stimolazione con TGF- $\beta$  le cellule sono lavate in PBS e fatto avvenire il

cross-link delle proteine con una soluzione all' 1% di formaldeide per 10 min a temperatura ambiente. Successivamente le cellule vengono lavate in PBS freddo contenente 1 mM ortovanadato. Sono poi risospese in Lysis Buffer (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8,1 + cocktail di inibitori di proteasi) e sonicate per 170 cicli (12 sec + 28 di riposo). Le cellule sono poi centrifugate per 10 min a 13000 rpm a 4°C. Il supernatante viene diluito in una soluzione contenente 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,1. Dal campione diluito viene prelevato una quota per l'input e una quota per i controlli negativi. La restante parte viene utilizzata per l'immunoprecipitazione delle proteine. Per immunoprecipitare vengono utilizzati anticorpi diretti contro la H3K9me3 e contro la H3K4me2. Per il controllo positivo di immunoprecipitazione vengono utilizzati anticorpi diretti contro la Polimerasi II. È stato utilizzato il sistema delle Dyna beads prodotto da Invitrogen. Dopo la precipitazione i campioni sono lavati per 10 min in una soluzione a basso sale (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl), 10 min in alto sale (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl), una soluzione contenente cloruro di litio (0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deossicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1), 2 lavaggi in TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Successivamente vengono eluiti con una soluzione 1 % SDS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>. I campioni eluiti vengono

immersi in acqua a 65 °C over-night per eliminare il cross-link delle proteine al DNA. I frammenti di DNA vengono poi purificati con il kit Qiagen (QIAquick Spin Kit). Utilizzando i primer per il promotore di Snail viene amplificato il DNA monitorando la reazione di amplificazione in PCR-RealTime.

### **Silenziamento genico**

Le cellule MCF-10A, ad una confluenza del 60%, vengono silenziate per il gene della LSD1 e per il gene della JMJD2A. I siRna sono stati acquistati da Santacruz per quanto riguarda JMJD2A e da Qiagen per quanto riguarda LSD1. Per inserire i siRna nelle cellule è stato utilizzato il kit della Qiagen Rna Infect. Seguendo il protocollo fornito dal kit sono stati silenziati tali geni ottenendo un abbattimento del 90% di espressione del trascritto primario. Sono stati trasfettati anche dei plasmidi codificanti per forme mutate della LSD1. A tale scopo viene usato la Lipofectamina della Invitrogen seguendo il protocollo di trasfezione fornito dal produttore.

### **Coimmunoprecipitazione**

Le cellule sono stimulate con il TGF- $\beta$  5 ng/ml rispettivamente per 90 min, 60 min, 30 min. Vengono poi lisate in C-Ripa contenente 1% SDS. Viene poi dosato i campioni ed effettuata la immunoprecipitazione con il Kit

della Invitrogen Dyna beads costituito da biglie magnetiche ancorate alla proteina G. Per immunoprecipitare viene utilizzato anticorpi Santacruz che riconoscono JMJD2A e Smad2/3. In Western Blot ho utilizzato Anticorpi diretti contro Smad2/3 e contro LSD1 rispettivamente. In questo modo è stato possibile osservare il binding fra Smad2/3 e JMJD2A ed il binding fra LSD1 e Smad2/3.

## RISULTATI

La transizione epitelio mesenchima è un processo estremamente complesso attraverso il quale una cellula epiteliale altamente polarizzata acquisisce caratteristiche morfologiche e funzionali assimilabili a quelle presenti in cellule di natura mesenchimale come i fibroblasti. Questo processo è stato evidenziato e caratterizzato in tre fondamentali situazioni: nello sviluppo embrionale, nella riparazione delle ferite, e, a livello patologico, durante lo sviluppo tumorale e la fibrosi {1, 2, 3}.

Lo scopo di questo studio è analizzare la EMT in cellule di epitelio mammario umano non tumorale MCF-10A.

Inizialmente mi sono occupato dello studio della via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1 e del possibile coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno.

Successivamente ho voluto approfondire la regolazione trascrizionale del gene Snail a livello epigenetico. Ho individuato due proteine ad azione demetilasi capaci di regolare finemente l'espressione di Snail e quindi la EMT indotta da TGF- $\beta$ 1. Queste due proteine sono LSD1 e JMJD2A, proteine ad azione demetilasi, diverse sia nel meccanismo d'azione che per i substrati con cui reagiscono.

### **La stimolazione con TGF- $\beta$ 1 induce un accumulo di ROS nella cellula**

In questo primo esperimento, vedi figura 1, sono state piastrate le cellule MCF-10A ad una confluenza del 60% e stimolate con TGF- $\beta$ 1 alla concentrazione di 10 ng/ml. Attraverso l'utilizzo di una sonda fluorescente è stato possibile registrare un aumento di ROS già a 5 minuti. L'aumento di segnale fornito dalla sonda, proporzionale alla quantità di ROS nella cellula, è progressivo e arriva ad un massimo fra i 30 e i 45 minuti dalla stimolazione. Da questo esperimento possiamo concludere che il TGF- $\beta$ 1, in termini di accumulo di ROS, ha un forte effetto già a 5 minuti, per poi avere un massimo a 30 minuti. Il TGF- $\beta$ 1, durante la fase segnalatoria, induce un aumento di ROS nella cellula.

### **Il NAC e la Catalasi riducono l'accumulo di ROS indotto dal TGF- $\beta$ 1**

In questo esperimento, vedi figura 2, ho valutato l'effetto di due antiossidanti: il NAC e la catalasi. Il NAC è uno scavenger generico delle specie reattive dell'ossigeno. Viene facilmente ossidato da qualsiasi specie ossidante, evitando così che vengano ossidate molecole biologiche. Se la via di segnalazione è redox-dipendente, la somministrazione di NAC è in grado di bloccarla. La catalasi è un enzima della classe delle ossidoreduttasi, capace di convertire l'  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Quindi, se il trattamento con catalasi riduce l'accumulo di ROS, potremmo avere una

informazione di quale specie ossidante sia presente all'interno della cellula. Le cellule sono state stimolate per 30 minuti con TGF- $\beta$ 1 alla concentrazione di 5 ng/ml. Prima della stimolazione, sono state pretrattate con NAC alla concentrazione di 5 mM e con catalasi 3  $\mu$ g/ml. Ho eseguito questo esperimento con un tempo di stimolazione di 30 minuti perché questa è la tempistica alla quale si riscontra l'accumulo massimo di ROS. Possiamo notare che entrambi gli antiossidanti hanno effetto. Ciò dimostra che il TGF- $\beta$ 1 a 30 minuti induce un aumento notevole di ROS nella cellula. Inoltre possiamo dire che la specie ossidante che viene prodotta a 30 minuti è prevalentemente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se la specie ossidante prodotta fosse diversa dall' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la catalasi non avrebbe alcun effetto.

### **Il TGF- $\beta$ 1 induce EMT in modo ROS dipendente**

In questo esperimento, vedi figura 3, ho valutato se le cellule MCF-10A, in seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1, andassero in EMT e se tale transizione dipendesse o meno dai ROS. Ho piastrato le cellule ad una confluenza del 50% e, dopo pretrattamento con NAC 5 mM, le ho stimulate con TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml, per 72 h. Per definire se le cellule in seguito a stimolazione fossero andate incontro alla EMT ho deciso di valutare il decremento della E-Caderina a favore della N-Caderina e l'aumento di espressione della  $\alpha$ -SMA. Come possiamo notare dalla immagine, in figura 3, le cellule MCF-

10A completano la EMT, mentre tale transizione è bloccata dal pretrattamento con NAC. Inoltre si assiste alla diminuzione della E-Caderina ed alla espressione della N-Caderina e della  $\alpha$ -SMA. Se pretrattiamo le cellule con NAC e le stimoliamo con TGF- $\beta$ 1 questi fenomeni sono bloccati.

All'interno della via di segnalazione, attivata da TGF- $\beta$ 1, vengono quindi generate delle specie reattive dell'ossigeno estremamente importanti per la transizione. Senza queste specie reattive la EMT non si verifica.

### **Analisi morfologica della EMT e dipendenza dai ROS**

Come è possibile notare dalle immagini, mostrate in figura 4, il dato molecolare è supportato dal dato morfologico. Prima di lisare le cellule dell'esperimento precedente le ho fotografate al microscopio a contrasto di fase. Il dato molecolare è in accordo con il cambiamento morfologico a cui le cellule sono andate incontro. Possiamo notare che le cellule MCF-10A, in seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1, assumono una forma affusolata, tipica delle cellule mesenchimali, distaccandosi così le une dalle altre. Le cellule pretrattate con NAC rimangono invece di forma epiteliale, segno che la segnalazione del TGF- $\beta$ 1 non si è attivata.

Lo stesso esperimento è stato eseguito in cellule piastrate su vetrino, per ottenere delle immagini in immunofluorescenza al microscopio confocale.

A questo scopo sono stati utilizzati anticorpi diretti contro la E-Caderina (Verde) e contro i filamenti di F-Actina (Rosso).

Possiamo notare in figura 5, che, dopo 72 h di stimolazione con TGF- $\beta$ 1, le cellule MCF-10A completano la EMT. Nella immagine di controllo la E-Caderina è distribuita uniformemente nei punti di contatto fra cellule. In cellule stimulate con TGF- $\beta$ 1 la E-Caderina scompare e si assiste ad un marcato cambiamento morfologico, con formazione di fibre di stress tipiche di cellule di natura mesenchimale. Il pretrattamento con NAC non consente alle cellule stimulate con TGF- $\beta$ 1 di completare il programma EMT.

Alla luce di tutti questi esperimenti possiamo concludere che la EMT indotta da TGF- $\beta$ 1 è un fenomeno ROS dipendente e che sono necessarie 72 h di stimolazione affinché le cellule possano completare la EMT.

### **Il fattore trascrizionale Snail viene indotto dal TGF- $\beta$ 1**

Il principale evento che si verifica in cellule che hanno completato il programma EMT è la perdita delle giunzioni cellula-cellula, in seguito alla repressione trascrizionale del gene della E-Caderina. Vi sono numerosi fattori trascrizionali in grado di agire sul promotore della E-Caderina e di reprimerne la trascrizione. Nel mio modello cellulare è Snail ad essere indotto ed è il fattore trascrizionale responsabile della EMT

indotta da TGF- $\beta$ 1.

Per poter affermare ciò, ho eseguito una PCR Real Time amplificando il gene che codifica per Snail. Quindi ho preventivamente pretrattato le cellule con NAC e le ho poi stimulate con TGF- $\beta$ 1 per 90 min. Ho scelto di bloccare la segnalazione del TGF- $\beta$ 1 a soli 90 min poichè da esperimenti precedenti è stato notato che a 90 min si registra un massimo di espressione di Snail.

Analizzando il grafico in figura 6 possiamo notare come, in seguito alla stimolazione con TGF- $\beta$ 1, si abbia un aumento dei livelli di trascritto di Snail di 7 volte. L'aumento di espressione cala a 3,5 volte in cellule pretrattate con NAC. L'aumento di espressione di Snail e la conseguente repressione del gene della E-caderina, sono un punto chiave della EMT ed indicano che la segnalazione del TGF- $\beta$ 1 è avvenuta con successo. Se la via di segnalazione viene ostacolata dal NAC e non si conclude quindi con successo non si verifica né l'induzione trascrizionale di Snail né tanto meno la EMT.

### **La stimolazione con TGF- $\beta$ 1 genera un danno ossidativo al DNA**

Con gli esperimenti precedenti abbiamo definito che la EMT è indotta da TGF- $\beta$ 1 e che questo è un processo ROS dipendente. A questo punto ho voluto studiare più da vicino gli eventi biochimici relativi all'attivazione

trascrizionale del gene chiave della EMT, ovvero Snail.

Leggendo la letteratura mi sono soffermato su un lavoro pubblicato dal gruppo del Prof. E.V. Avvedimento di Napoli. In questo lavoro è stato dimostrato che il danno ossidativo al DNA è un evento estremamente importante per la regolazione genica. La generazione di 8-OxoGuanosina rappresenta un danno al DNA con conseguente reclutamento di complessi atti a ripararlo. Insieme a questi complessi di riparazione vengono reclutati anche proteine in grado di aprire la doppia elica per poi attivare la trascrizione genica. Quindi il danno localizzato al DNA potrebbe avere la funzione di mettere in evidenza quale gene debba essere attivato. Ho trovato molto interessante questo meccanismo proposto e dimostrato da questo gruppo di ricerca ed ho ipotizzato che potesse accadere anche nel modello da me studiato.

In questo esperimento, mostrato in figura 7, ho voluto indagare la presenza o meno di un danno ossidativo al DNA, utilizzando una sonda fluorescente capace di riconoscere la forma ossidata della guanina (8-OxoG). Ho quindi piastrato le cellule sul vetrino e seguito le istruzioni del kit. Ho analizzato i preparati al microscopio confocale e ho potuto osservare che in effetti, in seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1, si genera un danno ossidativo al DNA. Da esperimenti pilota il massimo livello di danno al DNA si ha a 30 minuti di stimolazione.

Anche in questo esperimento ho usato il NAC ed ho potuto notare che

pretrattando con tale antiossidante, non vi è alcun danno di natura ossidativa al DNA in sua presenza. Il motivo risiede sicuramente nel fatto che il NAC impedisce la segnalazione del TGF- $\beta$ 1 e quindi anche tutti gli eventi che succedono a valle. Il fatto di aver registrato un danno al DNA a 30 minuti è in accordo con il primo esperimento effettuato, in cui proprio a tale tempo fu registrato un forte accumulo di ROS nella cellula. Probabilmente tali ROS, osservati grazie al semplice dosaggio con DCFDA, sono responsabili del danno al DNA.

### **LSD1 e JMJD2A si legano al complesso Smad2/3**

LSD1 e JMJD2A sono proteine ad azione demetilasi, diverse sia nel meccanismo d'azione che per i substrati con cui reagiscono.

Vi possono essere numerose modifiche sulla coda dell'istone H3. Una delle modifiche estremamente importanti per la regolazione genica riguarda la metilazione dei residui di lisina presenti sulla coda dell'istone H3. Numerosi residui possono alternativamente trovarsi in uno stato metilato o in uno stato demetilato. Lo stato in cui si vengono a trovare questi residui è in grado di regolare positivamente o negativamente la trascrizione genica. La metilazione di alcuni residui come H3K4me2 induce attivazione genica. La rimozione di tale bimetile porta a repressione trascrizionale. Vi sono numerose proteine in grado di

modulare lo stato di metilazione delle lisine situate sulla coda degli istoni H3. Fra queste LSD1 e le proteine della famiglia Jumonji. Entrambe sono proteine ad azione demetilasi e differiscono per i substrati e per il meccanismo di reazione.

In questo esperimento, in figura 8, ho voluto valutare se queste due proteine, estremamente importanti nella regolazione genica, fossero o meno coinvolte nella via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1. Come descritto nell'introduzione, all'interno della via segnalazione del TGF- $\beta$ 1 si forma un complesso costituito da Smad2/3 che, legandosi poi a Smad4 migra nel nucleo attivando i geni responsabili della EMT, fra cui Snail.

Per valutare il coinvolgimento di LSD1 e JMJD2A nella via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1, ho voluto indagare, attraverso un saggio di coimmunoprecipitazione, se in seguito alla stimolazione si osservi una associazione tra LSD1 e/o JMJD2A con Smad2/3.

Ho quindi stimolato le cellule con TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml a 30 min, 60 min, 90 min. Successivamente ho immunoprecipitato, nel primo caso, con anticorpi per Smad2/3 ed effettuato il Western Blot utilizzando anticorpi specifici per LSD1, mentre nel secondo caso ho immunoprecipitato con anticorpi per JMJD2A ed effettuato il Western Blot riconoscendo Smad2/3.

Come possiamo notare, entrambe le demetilasi si vengono a legare a Smad2/3, ma a tempi diversi. LSD1 si lega al complesso Smad2/3 già a 30 minuti dalla stimolazione, mentre JMJD2A vi si lega solo dopo 90 minuti.

Quindi possiamo concludere che queste due proteine partecipano alla via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1 e che probabilmente hanno un ruolo attivo nella regolazione della trascrizione di Snail.

### **LSD1 è responsabile del danno ossidativo al DNA**

Il fatto che LSD1 sia una proteina a localizzazione nucleare e che si leghi al complesso Smad2/3 a 30 minuti permette di ipotizzare che tale proteina possa essere responsabile della produzione dei ROS nucleari capaci poi di generare un danno ossidativo al DNA. Nel suo meccanismo di reazione, è prevista la produzione di perossido di idrogeno. Del resto, anche le proteine della famiglia Jumanji utilizzano l'ossigeno per demetilare le lisine degli istoni e potrebbero essere coinvolte anch'esse nel danno al DNA. Quindi, per capire quale fosse l'enzima capace di produrre specie ossidanti, ho utilizzato dei siRNA per JMJD2A e per LSD1 ed ho eseguito il test di valutazione del livello di 8-OxoG nel DNA. Per prima cosa, ho piastrato le cellule sui vetrini e le ho trasfettate con i due siRNA. Successivamente le ho stimulate per 30 minuti con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml e marcate con la sonda. Nell'esperimento ho anche utilizzato il NAC come controllo.

Come è possibile notare dall'immagine in figura 9, la stimolazione con TGF- $\beta$ 1 genera a 30 minuti un danno ossidativo al DNA (dato osservato

anche in precedenza) ed il trattamento con NAC, bloccando la segnalazione, impedisce che si generi il danno ossidativo a livello nucleare.

La stimolazione di cellule silenziate per LSD1, con TGF- $\beta$ 1, non porta alla generazione di danni ossidativi al DNA. A maggior ragione, se tratto queste cellule con NAC, non si verifica alcun danno.

Al contrario, il silenziamento di JMJD2A non ha alcun effetto in termini di danno ossidativo al DNA. Anche in assenza di JMJD2A il TGF- $\beta$ 1, a 30 min, induce ugualmente un aumento dei livelli di 8-OxoG.

Da questi dati possiamo concludere che la proteina responsabile del danno al DNA è LSD1, ma non JMJD2A.

### **LSD1 e JMJD2A hanno un ruolo opposto nella regolazione della EMT**

Appurato che queste due proteine ad azione demetilasi sono in grado di legarsi al complesso Smad2/3 e che solo LSD1 è responsabile del danno al DNA, ho voluto indagare se fossero in grado di regolare Snail a livello trascrizionale.

A tale scopo ho eseguito una PCR Real Time in campioni silenzianti per LSD1 e in campioni silenzianti per JMJD2A, amplificando l'mRNA di Snail. Dopo aver silenziato le cellule per 48h, le ho stimulate con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml per 90 min, eseguendo poi la procedura standard per la PCR Real Time.

Nel primo grafico di figura 10 sono mostrati i livelli di induzione di Snail in risposta al TGF- $\beta$ 1, sia in campioni di controllo che in campioni silenziati per LSD1. Possiamo notare che la stimolazione delle cellule silenziate per LSD1 ha un effetto maggiore: in tali campioni, infatti, si registra un livello di induzione di Snail doppio rispetto ai campioni di controllo.

Nel secondo grafico di figura 10 possiamo notare i livelli di induzione di Snail in risposta al TGF- $\beta$ 1 in campioni di controllo ed in campioni silenziati per JMJD2A. In questo caso la stimolazione con TGF- $\beta$ 1 non è in grado di incrementare la trascrizione di Snail. In assenza di JMJD2A Snail non viene trascritto e in assenza di Snail non si ha EMT.

Alla luce di questi due esperimenti possiamo ipotizzare che queste due proteine abbiano un ruolo opposto. In questo modello LSD1 si comporta da repressore di Snail, visto che, in assenza di LSD1, Snail viene maggiormente indotto. JMJD2A, invece si comporta da attivatore trascrizionale, tant'è vero che in sua assenza, Snail non viene trascritto. Possiamo perciò supporre che entrambe le proteine regolino la EMT, intervenendo sulla regolazione di Snail, anche se in tempi diversi e con ruoli diversi. LSD1 agisce prima di JMJD2A, agendo da repressore, è come se tenesse a freno la trascrizione di Snail. In assenza di LSD1 infatti, Snail viene indotto molto di più rispetto al controllo. Dopo LSD1 agisce JMJD2A, la cui presenza è essenziale per la trascrizione di Snail e

l'ingresso in EMT. Probabilmente, essendo Snail un gene estremamente importante, la sua trascrizione è finemente regolata già a livello epigenetico. Ho eseguito un ulteriore esperimento necessario per valutare l'attività repressoria di LSD1. Mi sono servito di 3 plasmidi forniti dal laboratorio del Prof. Avvedimento, codificanti per forme mutate di LSD1. Vi è una forma cataliticamente inattiva (mut ALA) che presenta una mutazione nel sito attivo in cui un aminoacido è sostituito in alanina. Vi è poi una forma costitutivamente attivata che presenta una mutazione in Aspartato (mut ASP). Il terzo plasmide codifica per la forma Wild Type (WT LSD1).

Ho quindi trasfettato le cellule con questi plasmidi e le ho poi stimulate con TGF- $\beta$ 1. Ho infine eseguito una PCR-Real Time per quantificare i livelli di espressione di Snail.

Osservando il grafico, in figura 11, possiamo notare che la stimolazione con TGF- $\beta$ 1 induce un aumento dei livelli di Snail. In cellule in cui vi è una over espressione di LSD1 (WT LSD1), l'induzione di Snail massimamente inibita. Stessa cosa accade in cellule trasfettate per la forma costitutivamente attivata (mut ASP). Un maggior quantitativo di LSD1 funzionante all'interno della cellula blocca la trascrizione di Snail. L'espressione di una forma dominante negativo di LSD1 (mut ALA) ha un effetto simile ad un silenziamento e pertanto non c'è alcun freno alla induzione di Snail.

## **LSD1 e JMJD2A regolano la EMT**

In questo esperimento, mostrato in figura 12, ho voluto indagare se LSD1 e JMJD2A avessero o meno un ruolo diretto sulla regolazione della EMT in toto. Negli esperimenti precedenti ho osservato che tali proteine sono in grado di modulare in maniera estremamente fine la trascrizione di Snail e probabilmente anche la EMT. Ho perciò deciso di realizzare dei vetrini per il microscopio confocale al fine di evidenziare i principali marcatori per EMT. A tale scopo ho marcato la E-Caderina in verde e la F-Actina in rosso.

Ho quindi piastrato le cellule e le ho silenziate per LSD1 e per JMJD2A. Successivamente le ho stimulate con TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml per 72h e le ho poi fissate e marcate. Come è possibile notare dalle immagini, in cellule silenziate per JMJD2A la EMT non avviene, ed infatti le cellule rimangono di forma epiteliale. La E-caderina rimane alla membrana e non si formano fibre di stress di F-Actina. Senza JMJD2A, Snail non viene indotto e, al contempo, non vi è EMT.

In cellule silenziate per LSD1 e stimulate quindi con TGF- $\beta$ 1, la EMT avviene completamente. In assenza di LSD1, infatti, si assiste ad una maggior espressione di Snail accompagnata da una EMT più marcata rispetto al controllo.

## **LSD1 e JMJD2A agiscono rispettivamente sulla H3K4me2 e sulla H3K9me3**

In questo esperimento, mostrato in figura 13, ho voluto indagare come cambia il codice istonico presente sul promotore di Snail. LSD1 e JMJD2A sono due proteine ad azione demetilasica ed hanno diversi substrati. LSD1 agisce principalmente sulla lisina in posizione 4, sulla coda dell'istone H3. Essa è in grado di rimuovere sia il gruppo bimetile sia il monometile. In letteratura è dimostrato che la demetilazione di tale residuo segnala per un blocco della trascrizione. JMJD2A ha anch'essa diversi substrati distinti da quelli di LSD1. Tale proteina va a rimuovere principalmente il gruppo trimetile che si trova legato alla lisina in posizione 9 della coda dell'istone H3. La rimozione di questo trimetile, come dimostrato in letteratura, consente l'avvio della trascrizione genica.

Con questo esperimento ho voluto analizzare se vi fosse un cambiamento nella metilazione di questi due residui di lisina appena descritti.

A tale scopo ho eseguito una ChIP, utilizzando anticorpi diretti contro la H3K4me2 e contro la H3K9me3. Nel primo caso, dato che tale lisina è un potenziale substrato di LSD1, ho stimolato le cellule per 30 minuti con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml. Nel secondo caso, dato che tale lisina trimetilata è bersaglio di JMJD2A, ho stimolato le cellule per 90 minuti con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml. Dopo i vari passaggi, descritti nei materiali e metodi, ho immuno precipitato il DNA con i due anticorpi e amplificato, per PCR quantitativa,

il promotore di Snail. In questo modo ho potuto analizzare come cambia lo stato di metilazione dei residui di lisina in seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1.

Nel primo grafico di figura 13, possiamo notare che in seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1 per 30 minuti vi è una riduzione della metilazione sul residuo di lisina 4 associata al promotore di Snail. Come mostrato in letteratura, tale lisina è bersaglio di LSD1. La rimozione della quota di H3K4me2 da parte di LSD1 avviene quindi a 30 minuti dalla stimolazione, modulando negativamente la trascrizione di Snail. Insieme alla riduzione di H3K4me2 vi è una riduzione della quota di Polimerasi II ancorata al promotore di Snail. Quindi, da un lato LSD1 reprime la trascrizione genica, togliendo il gruppo bimetile sulla lisina 4 e allo stesso tempo induce il distacco della Polimerasi II dal promotore di Snail.

Nel secondo grafico di figura 13 sono mostrati i livelli di H3K9me3 associati al promotore di Snail. Questa lisina, come mostrato in letteratura, è bersaglio di JMJD2A. Ho quindi stimolato le cellule per 90 minuti poiché a questo tempo JMJD2A è legata al complesso Smad2/3.

Possiamo notare che la stimolazione con TGF- $\beta$ 1 fa ridurre i livelli di H3K9me3 associata al promotore di Snail. La rimozione del trimetile da parte di JMJD2A induce attivazione trascrizionale e ciò avviene a 90 minuti dalla stimolazione. Snail, infatti, non viene trascritto fino a che questo blocco non viene rimosso da JMJD2A. Oltre alla rimozione di

H3K9me3 si assiste ad un aumento della quota di Polimerasi II legata al promotore di Snail. Possiamo quindi confermare il ruolo di JMJD2A come proteina capace di attivare la trascrizione genica.

Alla luce di tutti questi esperimenti è stato possibile tracciare un modello in cui sono mostrati i cambiamenti del codice istonico del promotore di Snail che si susseguono nel tempo. Tale modello è mostrato in discussione.

## IMMAGINI RISULTATI

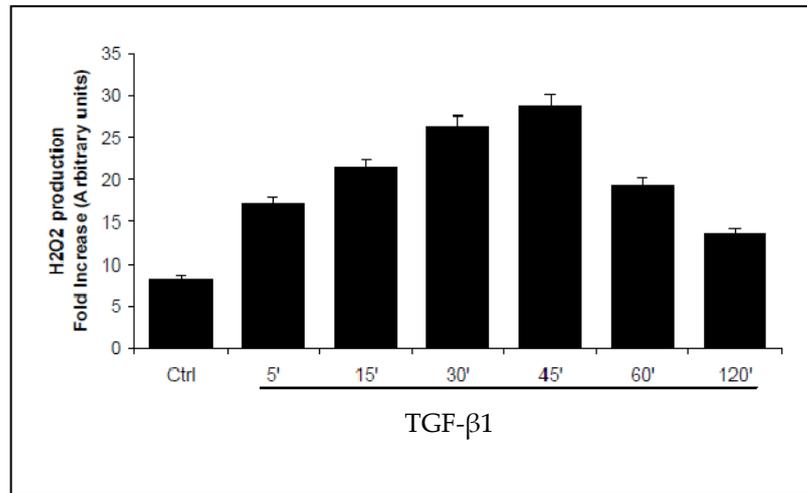


Fig 1: Dosaggio dei ROS con DCFDA. Stimolazione con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml.

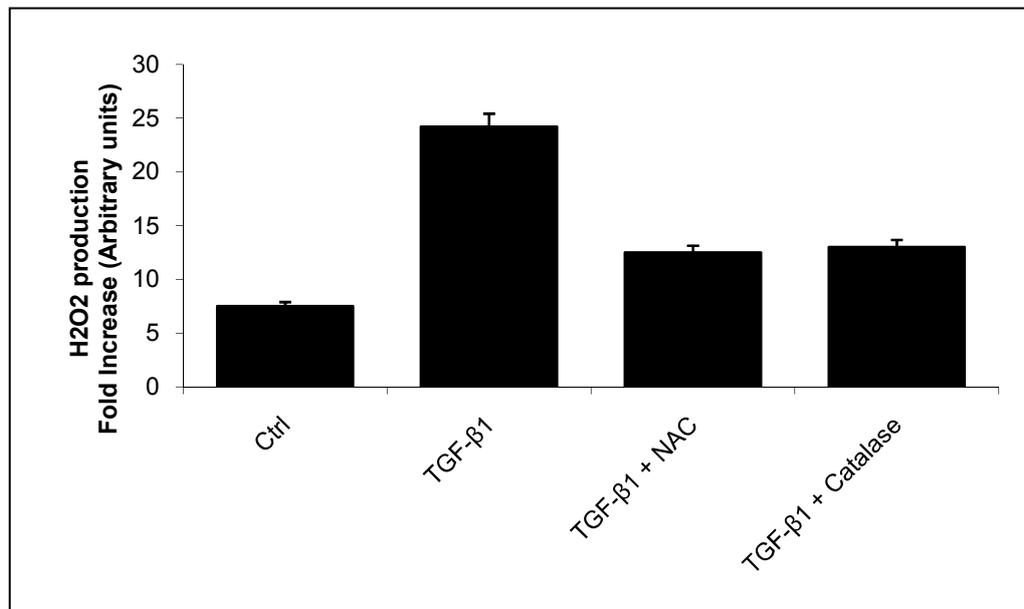


Fig 2 : Dosaggio dei ROS con DCFDA. Stimolazione con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml per 30 min. Pretrattamento con NAC 5mM e Catalasi 3  $\mu$ g/ml.

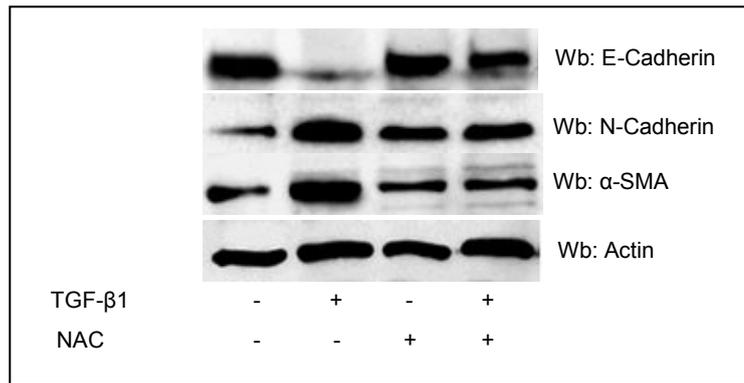


Fig 3: Analisi western dei marcatori di EMT. stimolazione con TGF-β1 10 ng/ml per 72 h. Pretrattamento con NAC 5mM.

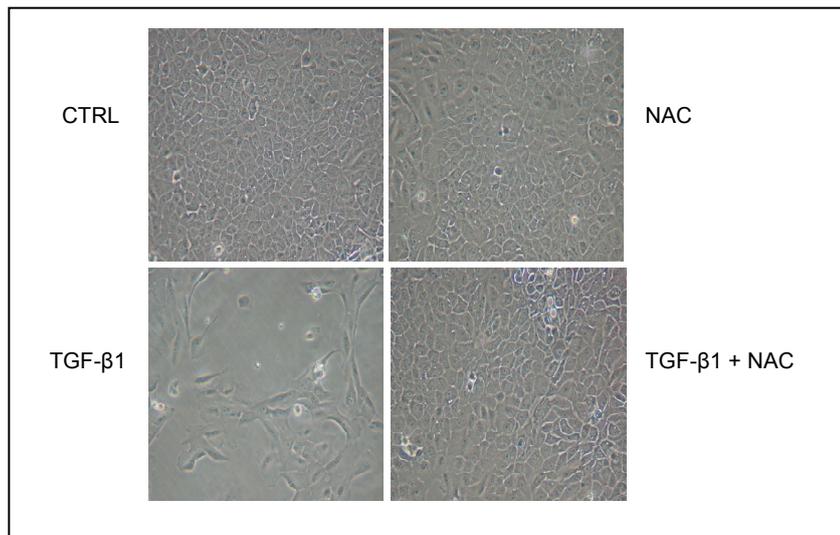


Fig 4: Analisi morfologica al microscopio a contrasto di fase. Cellule MCF-10A, stimolazione con TGF-β1 10 ng/ml per 72h. Pretrattamento con NAC 5mM.

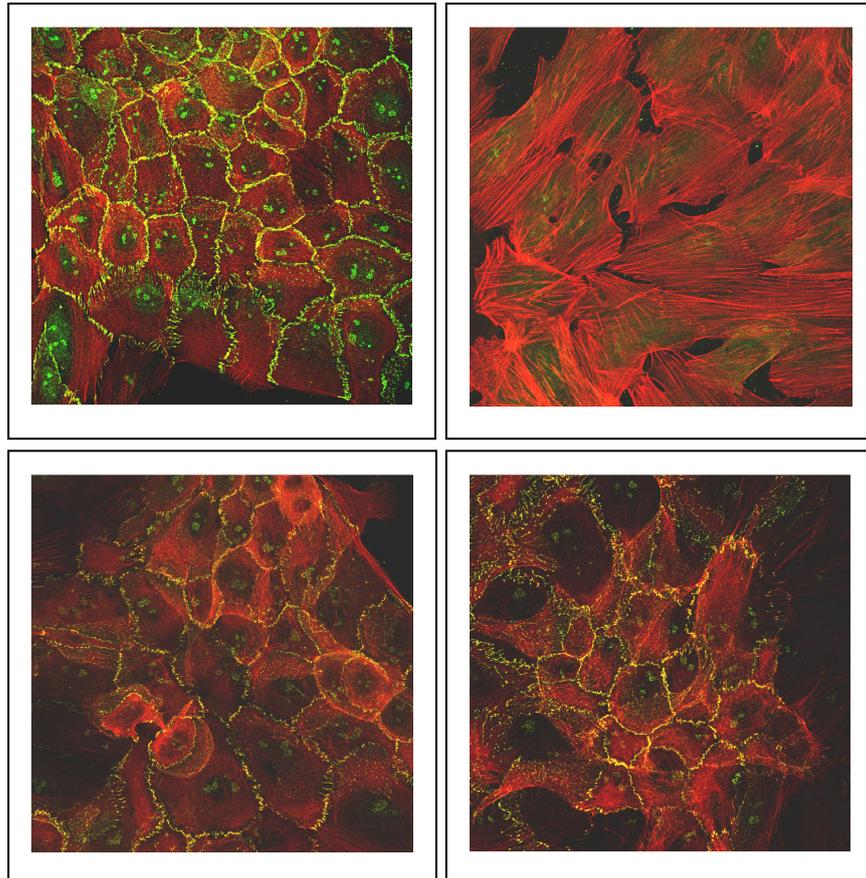


Fig 5: Analisi morfologica al microscopio confocale, utilizzando dei marcatori di EMT. In Rosso la F-Actina ed in Verde la E-Caderina. Stimolazione con TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml per 72h. Pretrattamento con NAC 5mM.

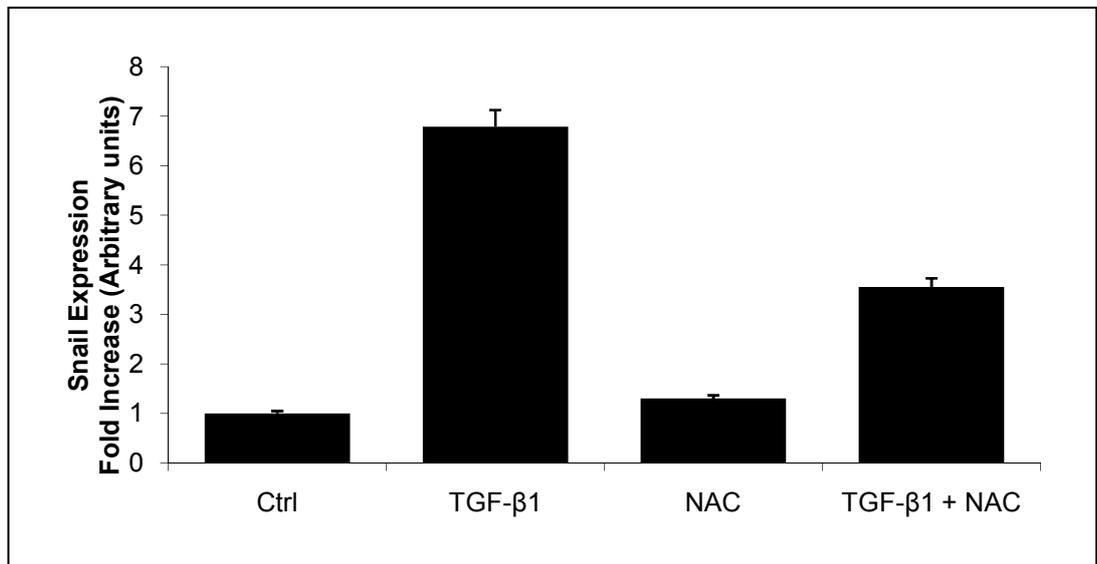


Fig 6: Analisi dell'espressione di Snail mediante PCR-Real Time. Cellule MCF-10A, stimolazione con TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml per 90 min. Pretrattamento con NAC 5mM.

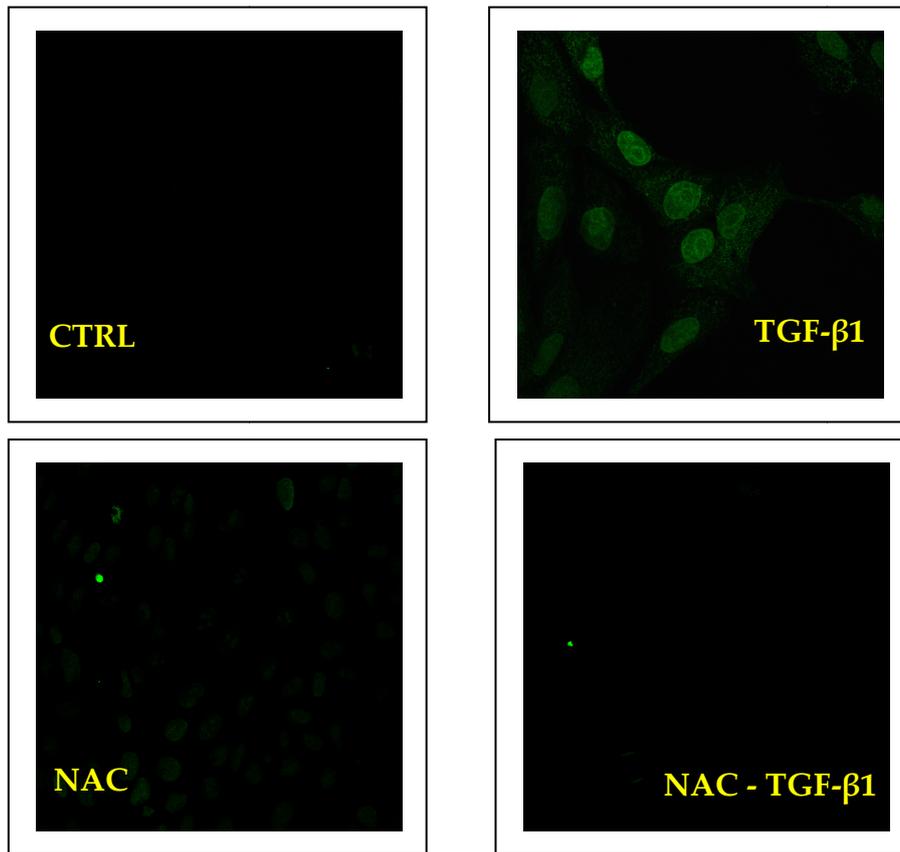


Fig 7: Analisi mediante microscopia confocale di 8-OxoG. Cellule MCF-10A, stimolazione con TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml per 30 min e pretrattamento con NAC 5 mM.

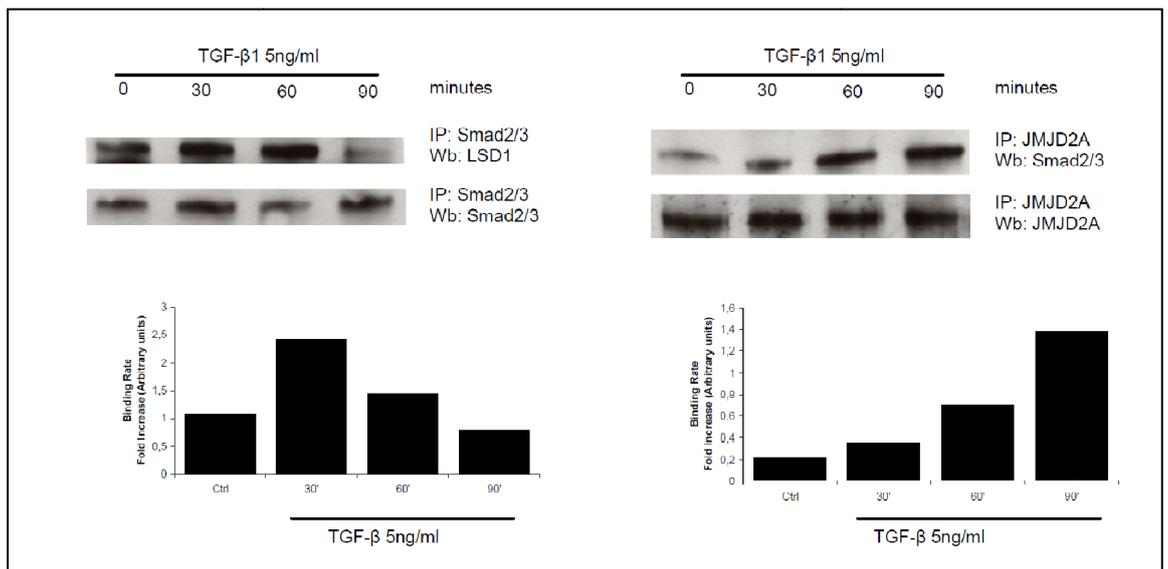


Fig 8: Coimmunoprecipitazione per valutare il legame fra Smad2/3 e LSD1 e fra JMJD2A e Smad2/3. Cellule MCF-10A, stimolazione con TGF- $\beta$ 1 5 ng/ml per 30,60,90 min.

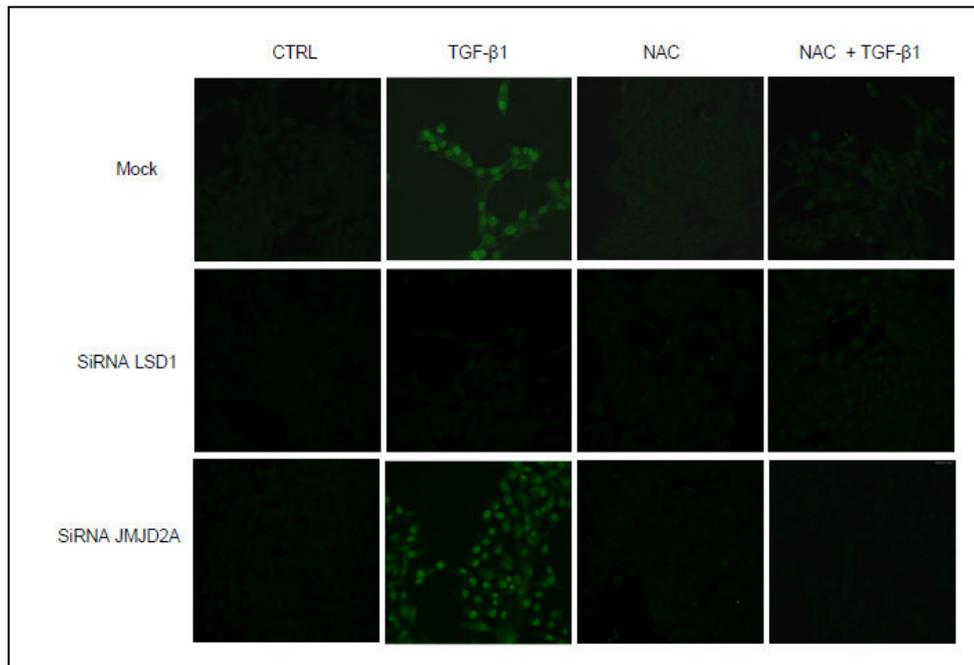


Fig 9: Analisi mediante microscopia confocale di 8-OxoG. Cellule MCF-10A silenziate per LSD1 e per JMJD2A. Stimolazione con TGF-β1 5 ng/ml per 30 min e pretrattamento con NAC 5 mM.

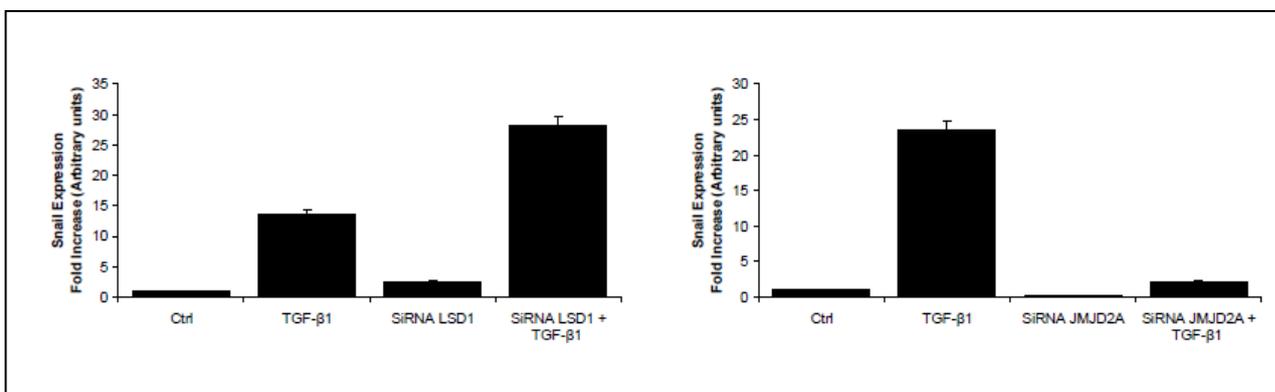


Fig 10: Analisi dell'espressione di Snail mediante PCR-Real Time. Cellule MCF-10A silenziate per LSD1 e per JMJD2, stimolazione con TGF-β1 5 ng/ml per 90 min e pretrattamento con NAC 5mM.

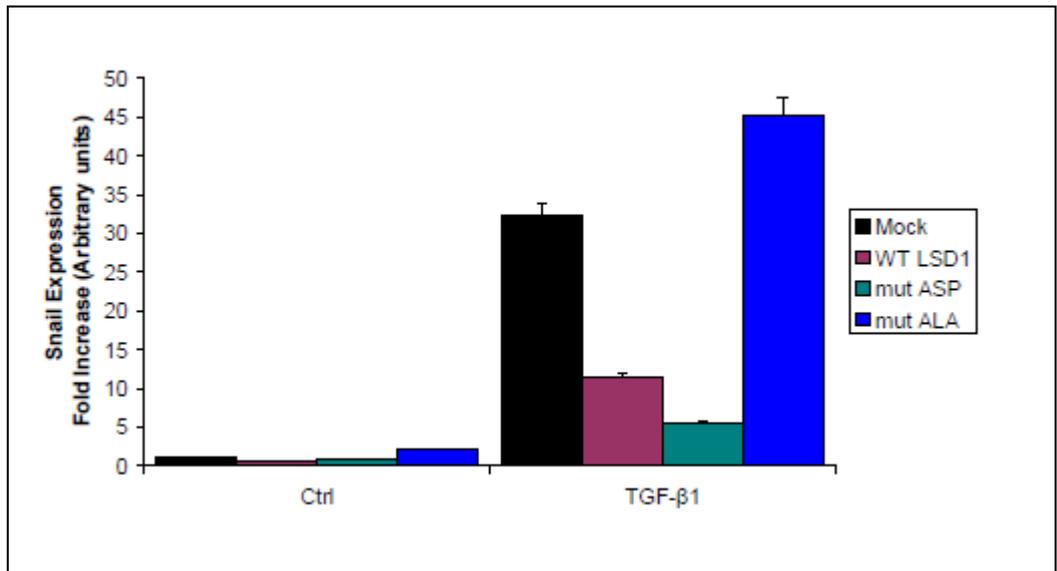


Fig 11: Analisi dell'espressione di Snail mediante PCR-Real Time. Cellule MCF-10A trasfettate con i plasmidi codificanti forme mutate di LSD1. Stimolazione con TGF-β1 5 ng/ml per 90 min.

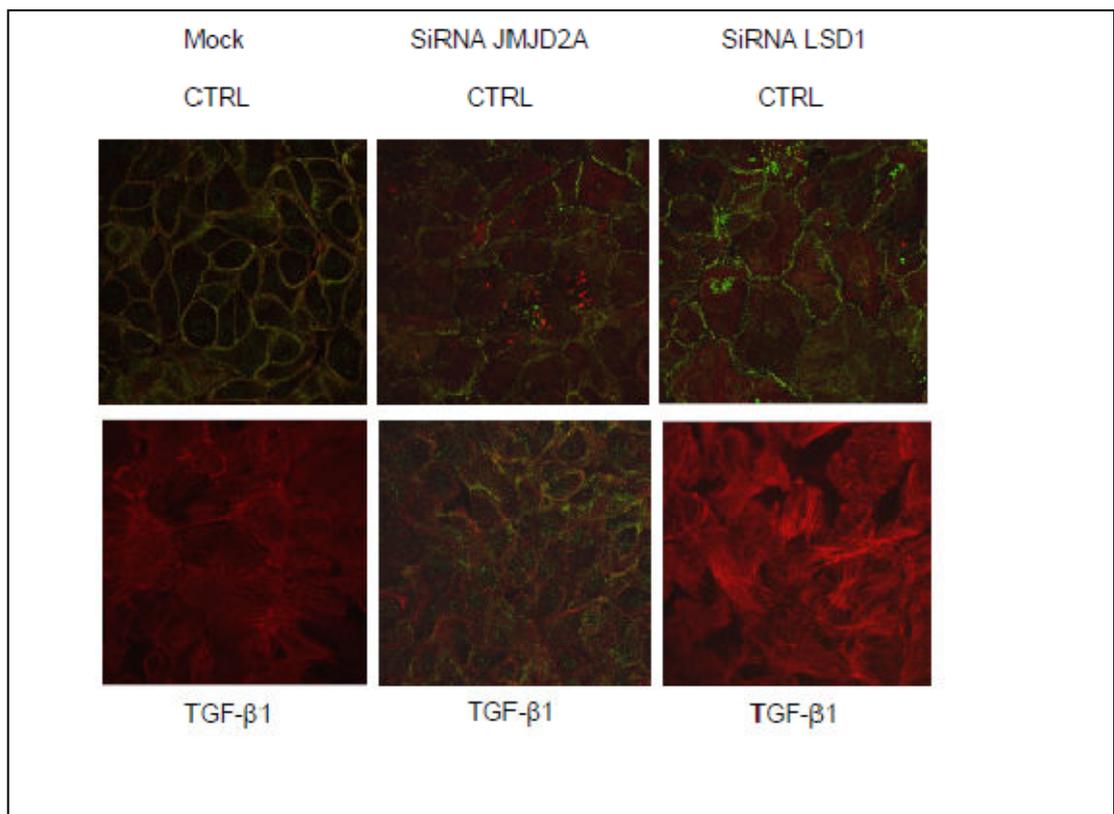


Fig 12: Analisi morfologica al microscopio confocale utilizzando marcatori di EMT. In Rosso la F-Actina ed in Verde la E-Caderina. Cellule MCF-10A silenziate per LSD1 e JMJD2A, stimolazione con TGF-β1 10 ng/ml per 72h e pretrattamento con NAC 5mM.

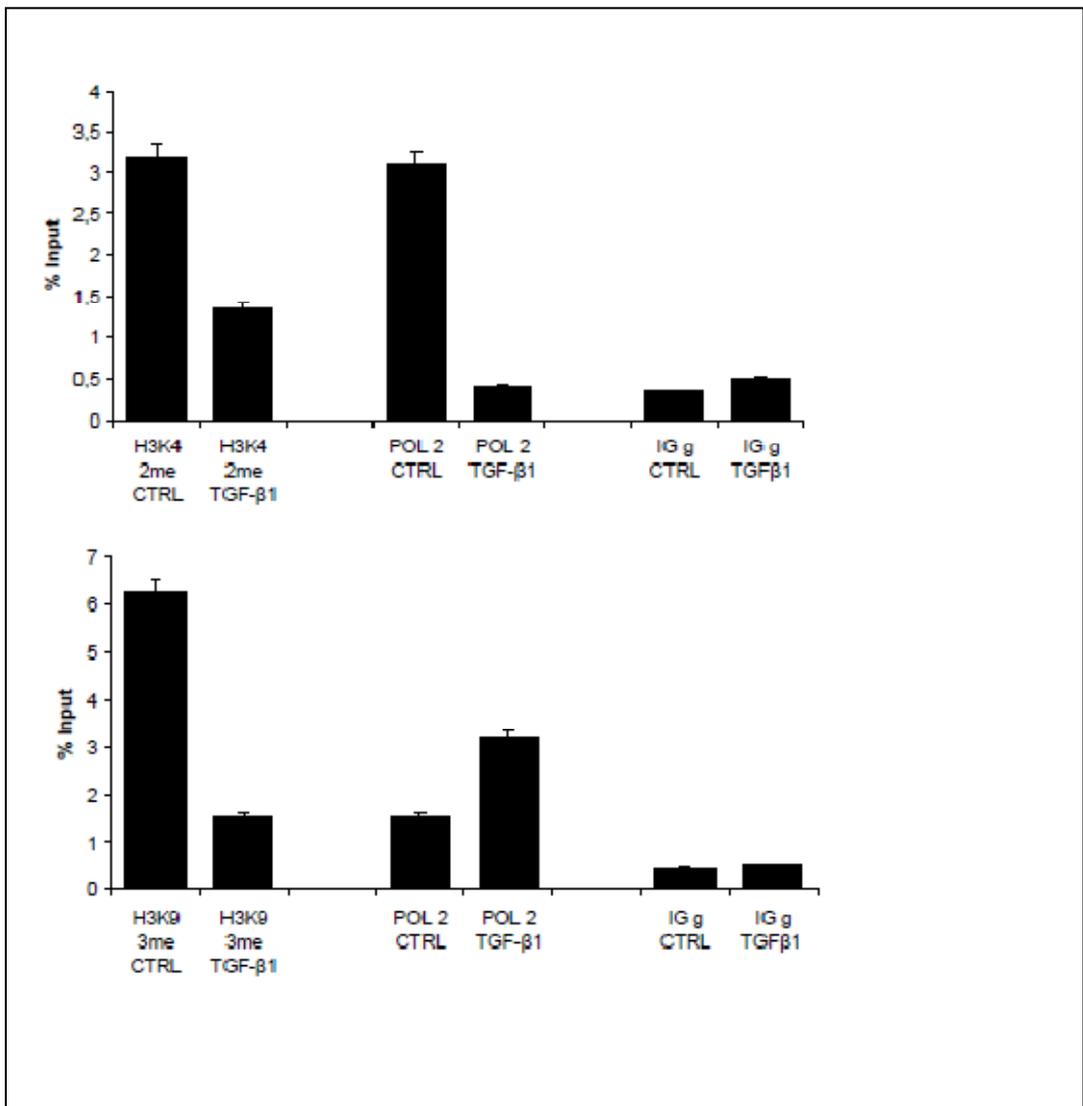


Fig 13: Analisi del codice istonico sul promotore di Snail mediante CHIP. Cellule MCF-10A, stimolazione con TGF-β1 5 ng/ml per 30 min (I grafico) e per 90 min (II grafico). Dati espressi come percentuale di arricchimento rispetto ai campioni di Input.

## DISCUSSIONE

La transizione epitelio-mesenchima (EMT) è uno punto chiave dello sviluppo embrionale e recentemente è stata associata allo sviluppo tumorale. È importante anche per la riparazione delle ferite e nella fibrosi del tessuto. La EMT, perciò, è per prima cosa un processo fisiologico necessario al corretto sviluppo dell'individuo ma, durante la fibrosi e nella progressione neoplastica si assiste ad una sua riattivazione. La EMT è un processo finemente regolato ed una sua deregolazione è associata a malattia.

L'induttore per eccellenza di EMT è il TGF- $\beta$ 1, che svolge un ruolo fondamentale sia nei processi ontogenici sia nella trasformazione neoplastica. È stato ampiamente dimostrato che l'attivazione della via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1 è dipendente dai ROS citosolici. Gli esperimenti di questa tesi sono finalizzati allo studio del processo di EMT e a verificare in che misura i ROS siano importanti per il completamento di questo processo. Dagli esperimenti da me effettuati emerge che i ROS prodotti in seguito al trattamento di cellule MCF-10A con TGF- $\beta$ 1 sono indispensabili per il processo di EMT. Ho notato che sono necessarie 72 h di stimolazione con TGF- $\beta$ 1 affinché le cellule concludano il programma di EMT. Dopo 72 h di stimolazione, le cellule MCF-10A si presentano più affusolate e

distaccate le une dalle altre. Si assiste alla perdita della E-caderina, acquistano la N-caderina e l' $\alpha$ -SMA. Tutti questi marcatori sono stati, inoltre, studiati in immunofluorescenza al microscopio confocale. In questo modo ho potuto apprezzare anche la riorganizzazione citoscheletrica a cui queste cellule vanno incontro durante il processo EMT. Ho infatti visto che si formano fibre di stress costituite da  $\alpha$ -SMA necessarie per la migrazione. Se queste cellule vengono trattate con il NAC, uno scavenger generico dei ROS, tutti questi cambiamenti morfologici sopraelencati non si verificano. L'eliminazione dei ROS, quindi, blocca la via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1 e di conseguenza tutta la cascata Smad-dipendente necessaria per lo sviluppo del processo EMT.

Successivamente ho eseguito degli esperimenti in PCR-Real Time. In questi esperimenti ho valutato l'effetto del NAC sul livello di espressione del principale fattore trascrizionale coinvolto nel processo EMT, ovvero Snail. Ho visto che in seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1 per 90 min Snail viene espresso ad alti livelli. Il trattamento col NAC riduce drasticamente l'induzione del TGF- $\beta$ 1. L'eliminazione dei ROS impedisce quindi che venga trascritto il fattore chiave del processo EMT. In loro assenza la EMT non può avvenire, poiché se non viene prodotto Snail la E-caderina non viene repressa. Da tutta questa serie di esperimenti possiamo concludere che la EMT indotta dal TGF- $\beta$ 1 è un processo dipendente dai ROS. Tuttavia rimane da chiarire quale sia la fonte di tali ROS. Questi ROS

potrebbero venir prodotti dalla NOX, dalla COX, dalla LOX oppure venir generati direttamente dal mitocondrio. Sappiamo solo che nel meccanismo di segnalazione, attivato dal TGF- $\beta$ 1, i ROS hanno un ruolo essenziale.

Dopo aver caratterizzato la EMT indotta dal TGF- $\beta$ 1, ho voluto soffermarmi sul gene Snail, ed in particolare su come viene regolato a livello trascrizionale.

Come dimostrato dagli esperimenti da me svolti, il gene Snail viene regolato a livello epigenetico da due proteine ad azione demetilasica: LSD1 e JMJD2A. Queste due proteine agiscono su residui di lisina diversi, posti sulla coda N-terminale dell'istone H3.

Ho dimostrato che entrambe le proteine fanno parte della via di segnalazione del TGF- $\beta$ 1 che porta alla attivazione trascrizionale di Snail.

LSD1 si trova legata al complesso Smad2/3 a 30 minuti ed è stato visto generare ROS nucleari responsabili del danno al DNA. Tale danno ossidativo è stato osservato proprio dopo 30 minuti di stimolazione con la citochina.

JMJD2A, invece, si lega a Smad2/3 più tardivamente, a circa 90 minuti dopo la stimolazione e non genera ROS. Ricordo che a 90 minuti dalla stimolazione era stato registrato il massimo livello di induzione di Snail.

Attraverso una analisi in PCR-Real Time ho potuto capire il ruolo di queste proteine nella regolazione di espressione di Snail. Ho infatti dimostrato che LSD1 ha una attività repressoria sul gene Snail. Essa va ad

agire sulla H3K4me2 e la trasforma in H3K4. Ciò fa allontanare la Polimerasi II dal promotore bloccando così la trascrizione di Snail. Come descritto in letteratura, la demetilazione di tale lisina è un segnale di repressione trascrizionale.

JMJD2A, in seguito a stimolazione, agisce più tardi sul gene Snail rispetto ad LSD1. Ha infatti una attività opposta e senza questa proteina Snail non viene trascritto. L'attività di JMJD2A è assolutamente necessaria, poiché agendo sulla H3K9me3 ne rimuove il gruppo trimetile. La rimozione di tale gruppo consente alla Polimerasi II di attaccarsi al promotore e dare avvio alla trascrizione genica.

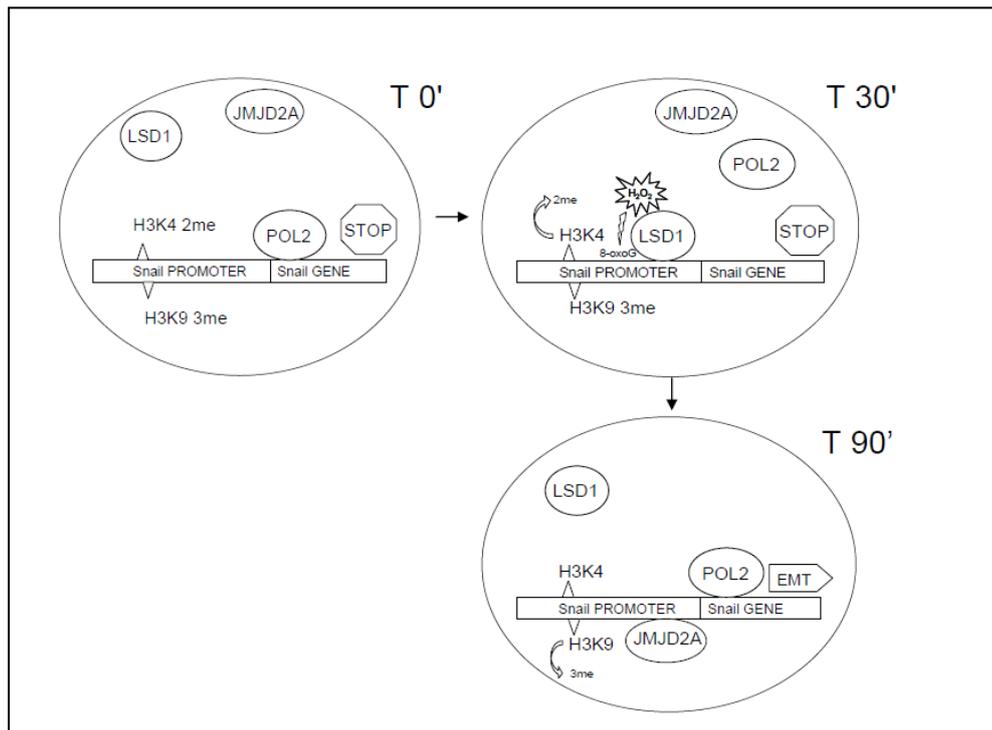
Con questo studio ho dimostrato che la trascrizione del gene Snail è regolata a livello epigenetico da LSD1 e JMJD2A. Queste due proteine hanno un ruolo opposto ma entrambe sono importanti. JMJD2A serve per attivare la trascrizione di Snail mentre LSD1 è un modulatore negativo. LSD1 rimuove un segnale pro-trascrizionale impedendo che vi sia una trascrizione precoce e non controllata di Snail.

### **Modello proposto**

Alla luce di questi esperimenti è mostrato un modello capace di spiegare l'attività di LSD1 e JMJD2A.

Al tempo 0 entrambe le lisine si trovano nello stato metilato e la

trascrizione di Snail non parte. A 30 minuti dalla stimolazione LSD1 si viene a legare a Smad2/3 e tale complesso si lega al promotore di Snail. LSD1, nel demetilare la H3K4me2, produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la quale va ad ossidare il DNA. La demetilazione di H3K4me2 impedisce a Snail di venir trascritto, poiché allontana la polimerasi II dal promotore. Passati 90 minuti dalla stimolazione con TGF-β<sub>1</sub>, Snail viene trascritto. LSD1 si distacca da Smad2/3, ed a questo punto vi si lega JMJD2A, la quale rimuove il gruppo trimetile dalla H3K9. La rimozione di questo freno consente alla Polimerasi II di riattaccarsi al promotore di Snail e di trascriverlo.



La EMT è un processo finemente regolato ed è necessario che lo sia proprio perché guida il destino delle cellule fin dalle prime fasi dello sviluppo dell'organismo ed è di vitale importanza che tutti gli eventi si susseguano nei tempi e nei modi corretti.

Questo studio ha permesso di capire la fine regolazione epigenetica che sta alla base della EMT in cellule non tumorali. Sarebbe molto interessante studiare la regolazione epigenetica della EMT in cellule tumorali. Probabilmente LSD1 o JMJD2A potrebbero esser mutate o magari agire su substrati diversi. In alcuni modelli cellulari diversi dal mio LSD1 è in grado di promuovere la trascrizione genica poiché agisce su substrati diversi dalla H3K4. Una over-espressione di LSD1, evento che può verificarsi in situazioni patologiche, può essere associato ad una marcata attivazione genica che in situazioni fisiologiche non dovrebbe verificarsi.

Ulteriori studi in merito potrebbero far luce sul ruolo del danno ossidativo al DNA da parte di LSD1. Il danno al DNA da un lato potrebbe esser semplicemente un prodotto della reazione catalizzata da LSD1 dall'altro lato potrebbe esser estremamente importante per il reclutamento di fattori trascrizionali ad attività repressoria sul promotore del gene coinvolto. Individuare un set di proteine che partecipa alla attività repressoria di LSD1 sul gene Snail sarebbe molto interessante e permetterebbe di capire meglio il ruolo della 8-OxoG.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 M. K. Wendt, T. M. Allington, and W. P. Schiemann, "Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta," *Future. Oncol.* **5**(8), 1145 (2009).  
Ref Type: Journal
- 2 R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition," *J. Clin. Invest* **119**(6), 1420 (2009).  
Ref Type: Journal
- 3 J. P. Thiery, *et al.*, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease," *Cell* **139**(5), 871 (2009).  
Ref Type: Journal
- 4 J. Yang and R. A. Weinberg, "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis," *Dev. Cell* **14**(6), 818 (2008).  
Ref Type: Journal
- 5 H. Hugo, *et al.*, "Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression," *J. Cell Physiol* **213**(2), 374 (2007).  
Ref Type: Journal
- 6 T. Sauka-Spengler and M. Bronner-Fraser, "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**(7), 557 (2008).  
Ref Type: Journal
- 7 G. Ge and D. S. Greenspan, "BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein," *J. Cell Biol.* **175**(1), 111 (2006).  
Ref Type: Journal
- 8 J. D. Brown, *et al.*, "MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells," *J. Biol. Chem.* **274**(13), 8797 (1999).  
Ref Type: Journal
- 9 Y. Ino, *et al.*, "Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**(1), 365 (2002).  
Ref Type: Journal
- 10 T. A. Wynn, "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis," *J. Pathol.* **214**(2), 199 (2008).  
Ref Type: Journal
- 11 Y. Usami, *et al.*, "Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression," *J. Pathol.* **215**(3), 330 (2008).  
Ref Type: Journal
- 12 B. Razani, *et al.*, "Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor," *J. Biol. Chem.* **276**(9), 6727 (2001).  
Ref Type: Journal
- 13 S. Hirohashi and Y. Kanai, "Cell adhesion system and human cancer morphogenesis," *Cancer Sci.* **94**(7), 575 (2003).  
Ref Type: Journal
- 14 S. Itoh, *et al.*, "Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins," *Eur. J. Biochem.* **267**(24), 6954 (2000).  
Ref Type: Journal
- 15 M. Fukuchi, *et al.*, "Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins," *Mol. Biol. Cell* **12**(5), 1431 (2001).  
Ref Type: Journal
- 16 Y. Li, *et al.*, "Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis," *J. Clin. Invest* **112**(4), 503 (2003).  
Ref Type: Journal
- 17 R. P. Hausinger, "FeII/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes," *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**(1), 21 (2004).  
Ref Type: Journal
- 18 S. G. Rhee and Y. S. Bae, "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes," *J. Biol. Chem.* **272**(24), 15045 (1997).  
Ref Type: Journal
- 19 S. Hayes, A. Chawla, and S. Corvera, "TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2," *J. Cell Biol.* **158**(7), 1239 (2002).  
Ref Type: Journal
- 20 K. Wallace, A. D. Burt, and M. C. Wright, "Liver fibrosis," *Biochem. J.* **411**(1), 1 (2008).  
Ref Type: Journal
- 21 L. R. White, *et al.*, "The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury," *Am. J. Physiol Renal Physiol* **292**(2), F567-F576 (2007).

- Ref Type: Journal
- 22 A. J. Ridley, *et al.*, "Cell migration: integrating signals from front to back," *Science* **302**(5651), 1704 (2003).  
Ref Type: Journal
- 23 M. Y. Wu and C. S. Hill, "Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis," *Dev. Cell* **16**(3), 329 (2009).  
Ref Type: Journal
- 24 A. Meister and M. E. Anderson, "Glutathione," *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711 (1983).  
Ref Type: Journal
- 25 L. Levy and C. S. Hill, "Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer," *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**(1-2), 41 (2006).  
Ref Type: Journal
- 26 A. Wells, C. Yates, and C. R. Shepard, "E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas," *Clin. Exp. Metastasis* **25**(6), 621 (2008).  
Ref Type: Journal
- 27 D. S. Micalizzi and H. L. Ford, "Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer," *Future. Oncol.* **5**(8), 1129 (2009).  
Ref Type: Journal
- 28 D. W. Raible, "Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways," *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**(6), 698 (2006).  
Ref Type: Journal
- 29 A. C. Correia, *et al.*, "Bmp2 is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse," *Dev. Dyn.* **236**(9), 2493 (2007).  
Ref Type: Journal
- 30 A. S. Boyer, *et al.*, "TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart," *Dev. Biol.* **208**(2), 530 (1999).  
Ref Type: Journal
- 31 M. E. Mercado-Pimentel, A. D. Hubbard, and R. B. Runyan, "Endoglin and Alk5 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation," *Dev. Biol.* **304**(1), 420 (2007).  
Ref Type: Journal
- 32 M. E. Mercado-Pimentel and R. B. Runyan, "Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart," *Cells Tissues. Organs* **185**(1-3), 146 (2007).  
Ref Type: Journal
- 33 V. Kaartinen, *et al.*, "Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction," *Nat. Genet.* **11**(4), 415 (1995).  
Ref Type: Journal
- 34 T. W. Hurd, *et al.*, "Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly," *Nat. Cell Biol.* **5**(2), 137 (2003).  
Ref Type: Journal
- 35 W. Wang, *et al.*, "Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction," *J. Biol. Chem.* **272**(36), 22771 (1997).  
Ref Type: Journal
- 36 K. K. Kim, *et al.*, "Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis," *J. Clin. Invest* **119**(1), 213 (2009).  
Ref Type: Journal
- 37 M. Tian and W. P. Schiemann, "The TGF-beta paradox in human cancer: an update," *Future. Oncol.* **5**(2), 259 (2009).  
Ref Type: Journal
- 38 A. Nakajima, *et al.*, "Functional role of transforming growth factor-beta type III receptor during palatal fusion," *Dev. Dyn.* **236**(3), 791 (2007).  
Ref Type: Journal
- 39 H. Zhu, *et al.*, "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation," *Nature* **400**(6745), 687 (1999).  
Ref Type: Journal
- 40 A. Hall, "Rho GTPases and the actin cytoskeleton," *Science* **279**(5350), 509 (1998).  
Ref Type: Journal
- 41 S. Ahmed, C. C. Liu, and A. Nawshad, "Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3," *Dev. Biol.* **309**(2), 193 (2007).  
Ref Type: Journal
- 42 C. B. Brown, *et al.*, "Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart," *Science* **283**(5410), 2080 (1999).  
Ref Type: Journal

- 43 C. M. Nelson, *et al.*, "Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures," *Science* **314**(5797), 298 (2006).  
Ref Type: Journal
- 44 A. J. Ewald, *et al.*, "Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis," *Dev. Cell* **14**(4), 570 (2008).  
Ref Type: Journal
- 45 T. A. Wynn, "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases," *J. Clin. Invest* **117**(3), 524 (2007).  
Ref Type: Journal
- 46 D. C. Radisky and J. A. Przybylo, "Matrix metalloproteinase-induced fibrosis and malignancy in breast and lung," *Proc. Am. Thorac. Soc.* **5**(3), 316 (2008).  
Ref Type: Journal
- 47 D. Pohlars, *et al.*, "TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints," *Biochim. Biophys. Acta* **1792**(8), 746 (2009).  
Ref Type: Journal
- 48 E. D. Hay, "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it," *Dev. Dyn.* **233**(3), 706 (2005).  
Ref Type: Journal
- 49 M. B. Vaughan, E. W. Howard, and J. J. Tomasek, "Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast," *Exp. Cell Res.* **257**(1), 180 (2000).  
Ref Type: Journal
- 50 M. T. Grande and J. M. Lopez-Novoa, "Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy," *Nat. Rev. Nephrol.* **5**(6), 319 (2009).  
Ref Type: Journal
- 51 M. Guarino, A. Tosoni, and M. Nebuloni, "Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition," *Hum. Pathol.* **40**(10), 1365 (2009).  
Ref Type: Journal
- 52 C. Yazhou, *et al.*, "Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast," *Tumour. Biol.* **25**(5-6), 290 (2004).  
Ref Type: Journal
- 53 A. Masszi, *et al.*, "Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition," *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284**(5), F911-F924 (2003).  
Ref Type: Journal
- 54 A. Akhmetshina, *et al.*, "Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts," *Arthritis Rheum.* **58**(8), 2553 (2008).  
Ref Type: Journal
- 55 L. Vardouli, *et al.*, "A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases," *FEBS J.* **275**(16), 4074 (2008).  
Ref Type: Journal
- 56 E. Vasilaki, *et al.*, "Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways," *FASEB J.* **24**(3), 891 (2010).  
Ref Type: Journal
- 57 Y. Kim, *et al.*, "Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts," *J. Cell Biol.* **184**(2), 309 (2009).  
Ref Type: Journal
- 58 N. F. Boyd, *et al.*, "Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer," *N. Engl. J. Med.* **347**(12), 886 (2002).  
Ref Type: Journal
- 59 N. F. Boyd, *et al.*, "Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer," *Lancet Oncol.* **6**(10), 798 (2005).  
Ref Type: Journal
- 60 Y. W. Choi, *et al.*, "Effects of radiation therapy on the lung: radiologic appearances and differential diagnosis," *Radiographics* **24**(4), 985 (2004).  
Ref Type: Journal
- 61 K. L. Andarawewa, *et al.*, "Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition," *Cancer Res.* **67**(18), 8662 (2007).  
Ref Type: Journal
- 62 A. J. Trimboli, *et al.*, "Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer," *Cancer Res.* **68**(3), 937 (2008).  
Ref Type: Journal
- 63 D. Vergara, *et al.*, "Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer," *Cancer Lett.* **291**(1), 59 (2010).  
Ref Type: Journal
- 64 T. Brabletz, *et al.*, "Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition,

- mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin," *Cells Tissues. Organs* **179**(1-2), 56 (2005).  
Ref Type: Journal
- 65 B. Ozdamar, *et al.*, "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity," *Science* **307**(5715), 1603 (2005).  
Ref Type: Journal
- 66 J. Ikenouchi, *et al.*, "Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail," *J. Cell Sci.* **116**(Pt 10), 1959 (2003).  
Ref Type: Journal
- 67 M. I. Kokkinos, *et al.*, "Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-- observations in vitro and in vivo," *Cells Tissues. Organs* **185**(1-3), 191 (2007).  
Ref Type: Journal
- 68 N. Gavert and A. Ben-Ze'ev, "Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors," *Trends Mol. Med.* **14**(5), 199 (2008).  
Ref Type: Journal
- 69 J. Zavadil and E. P. Bottinger, "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions," *Oncogene* **24**(37), 5764 (2005).  
Ref Type: Journal
- 70 K. Kim, Z. Lu, and E. D. Hay, "Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT," *Cell Biol. Int.* **26**(5), 463 (2002).  
Ref Type: Journal
- 71 M. A. Huber, N. Kraut, and H. Beug, "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression," *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**(5), 548 (2005).  
Ref Type: Journal
- 72 P. Savagner, K. M. Yamada, and J. P. Thiery, "The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition," *J. Cell Biol.* **137**(6), 1403 (1997).  
Ref Type: Journal
- 73 E. L. McCoy, *et al.*, "Expression of Six1 homeobox gene during development of the mouse submandibular salivary gland," *Oral Dis.* **15**(6), 407 (2009).  
Ref Type: Journal
- 74 D. S. Micalizzi, *et al.*, "The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling," *J. Clin. Invest* **119**(9), 2678 (2009).  
Ref Type: Journal
- 75 M. E. Mercado-Pimentel and R. B. Runyan, "Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart," *Cells Tissues. Organs* **185**(1-3), 146 (2007).  
Ref Type: Journal
- 76 C. Martinez-Alvarez, *et al.*, "Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates," *Dev. Biol.* **265**(1), 207 (2004).  
Ref Type: Journal
- 77 L. A. Taneyhill, E. G. Coles, and M. Bronner-Fraser, "Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest," *Development* **134**(8), 1481 (2007).  
Ref Type: Journal
- 78 R. Grifone, *et al.*, "Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo," *Development* **132**(9), 2235 (2005).  
Ref Type: Journal
- 79 C. P. Prasad, *et al.*, "Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast," *BMC. Cancer* **9**, 325 (2009).  
Ref Type: Journal
- 80 A. F. Logullo, *et al.*, "Concomitant expression of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in breast ductal carcinoma: association with progression," *Oncol. Rep.* **23**(2), 313 (2010).  
Ref Type: Journal
- 81 M. Perez-Moreno, C. Jamora, and E. Fuchs, "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions," *Cell* **112**(4), 535 (2003).  
Ref Type: Journal
- 82 E. A. Carver, *et al.*, "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition," *Mol. Cell Biol.* **21**(23), 8184 (2001).  
Ref Type: Journal
- 83 P. Marambaud, *et al.*, "A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions," *EMBO J.* **21**(8), 1948 (2002).  
Ref Type: Journal
- 84 J. Zavadil, *et al.*, "Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition," *EMBO J.* **23**(5), 1155 (2004).

- Ref Type: Journal
- 85 S. Getsios, *et al.*, "Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion," *Differentiation* **72**(8), 419 (2004).
- Ref Type: Journal
- 86 V. Vasioukhin, *et al.*, "Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation," *Nat. Cell Biol.* **3**(12), 1076 (2001).
- Ref Type: Journal
- 87 S. Guaita, *et al.*, "Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression," *J. Biol. Chem.* **277**(42), 39209 (2002).
- Ref Type: Journal
- 88 S. Maschler, *et al.*, "Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization," *Oncogene* **24**(12), 2032 (2005).
- Ref Type: Journal
- 89 P. J. Miettinen, *et al.*, "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors," *J. Cell Biol.* **127**(6 Pt 2), 2021 (1994).
- Ref Type: Journal
- 90 E. Piek, *et al.*, "TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells," *J. Cell Sci.* **112** ( Pt 24), 4557 (1999).
- Ref Type: Journal
- 91 A. V. Bakin, *et al.*, "Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration," *J. Biol. Chem.* **275**(47), 36803 (2000).
- Ref Type: Journal
- 92 J. Zavadil, *et al.*, "Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**(12), 6686 (2001).
- Ref Type: Journal
- 93 N. A. Bhowmick, *et al.*, "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism," *Mol. Biol. Cell* **12**(1), 27 (2001).
- Ref Type: Journal
- 94 X. Shen, *et al.*, "The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation," *J. Biol. Chem.* **276**(18), 15362 (2001).
- Ref Type: Journal
- 95 A. J. Ridley and A. Hall, "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors," *Cell* **70**(3), 389 (1992).
- Ref Type: Journal
- 96 K. Kimura, *et al.*, "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)," *Science* **273**(5272), 245 (1996).
- Ref Type: Journal
- 97 M. Fukata and K. Kaibuchi, "Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(12), 887 (2001).
- Ref Type: Journal
- 98 F. Strutz, *et al.*, "Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation," *Kidney Int.* **61**(5), 1714 (2002).
- Ref Type: Journal
- 99 M. Zeisberg, *et al.*, "Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation," *Am. J. Pathol.* **159**(4), 1313 (2001).
- Ref Type: Journal
- 100 R. C. Bates and A. M. Mercurio, "The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression," *Cancer Biol. Ther.* **4**(4), 365 (2005).
- Ref Type: Journal
- 101 S. Cheng and D. H. Lovett, "Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation," *Am. J. Pathol.* **162**(6), 1937 (2003).
- Ref Type: Journal
- 102 C. Prunier and P. H. Howe, "Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT)," *J. Biol. Chem.* **280**(17), 17540 (2005).
- Ref Type: Journal
- 103 P. Friedl and K. Wolf, "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms," *Nat. Rev. Cancer* **3**(5), 362 (2003).
- Ref Type: Journal
- 104 M. Raftopoulou and A. Hall, "Cell migration: Rho GTPases lead the way," *Dev. Biol.* **265**(1), 23 (2004).
- Ref Type: Journal
- 105 A. Moustakas and C. H. Heldin, "The regulation of TGFbeta signal transduction," *Development* **136**(22), 3699 (2009).
- Ref Type: Journal
- 106 J. Massague, "TGFbeta in Cancer," *Cell* **134**(2), 215 (2008).

- Ref Type: Journal
- 107 K. J. Gordon and G. C. Blobe, "Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease," *Biochim. Biophys. Acta* **1782**(4), 197 (2008).  
Ref Type: Journal
- 108 J. P. Thiery, *et al.*, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease," *Cell* **139**(5), 871 (2009).  
Ref Type: Journal
- 109 A. M. Gray and A. J. Mason, "Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly," *Science* **247**(4948), 1328 (1990).  
Ref Type: Journal
- 110 O. Shimmi, *et al.*, "Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the *Drosophila* blastoderm embryo," *Cell* **120**(6), 873 (2005).  
Ref Type: Journal
- 111 C. M. Dubois, *et al.*, "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase," *J. Biol. Chem.* **270**(18), 10618 (1995).  
Ref Type: Journal
- 112 D. B. Constam and E. J. Robertson, "Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases," *J. Cell Biol.* **144**(1), 139 (1999).  
Ref Type: Journal
- 113 N. Ben-Haim, *et al.*, "The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4," *Dev. Cell* **11**(3), 313 (2006).  
Ref Type: Journal
- 114 Y. Shi and J. Massague, "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus," *Cell* **113**(6), 685 (2003).  
Ref Type: Journal
- 115 R. Derynck and X. H. Feng, "TGF-beta receptor signaling," *Biochim. Biophys. Acta* **1333**(2), F105-F150 (1997).  
Ref Type: Journal
- 116 L. Gilboa, *et al.*, "Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors," *Mol. Biol. Cell* **11**(3), 1023 (2000).  
Ref Type: Journal
- 117 J. Massague, "How cells read TGF-beta signals," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**(3), 169 (2000).  
Ref Type: Journal
- 118 M. J. Goumans, *et al.*, "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors," *EMBO J.* **21**(7), 1743 (2002).  
Ref Type: Journal
- 119 P. J. Miettinen, *et al.*, "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors," *J. Cell Biol.* **127** (6 Pt 2), 2021 (1994).  
Ref Type: Journal
- 120 Y. T. Lai, *et al.*, "Activin receptor-like kinase 2 can mediate atrioventricular cushion transformation," *Dev. Biol.* **222**(1), 1 (2000).  
Ref Type: Journal
- 121 G. C. Blobe, *et al.*, "A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC," *J. Biol. Chem.* **276**(43), 39608 (2001).  
Ref Type: Journal
- 122 N. P. Barbara, J. L. Wrana, and M. Letarte, "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily," *J. Biol. Chem.* **274**(2), 584 (1999).  
Ref Type: Journal
- 123 A. Moustakas, S. Souchelnytskyi, and C. H. Heldin, "Smad regulation in TGF-beta signal transduction," *J. Cell Sci.* **114**(Pt 24), 4359 (2001).  
Ref Type: Journal
- 124 C. Sirard, *et al.*, "Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor beta-related signaling," *J. Biol. Chem.* **275**(3), 2063 (2000).  
Ref Type: Journal
- 125 D. Durocher, *et al.*, "The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms," *Mol. Cell* **6**(5), 1169 (2000).  
Ref Type: Journal
- 126 L. Choy, J. Skillington, and R. Derynck, "Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation," *J. Cell Biol.* **149**(3), 667 (2000).  
Ref Type: Journal
- 127 K. Arora and R. Warrior, "A new Smurf in the village," *Dev. Cell* **1**(4), 441 (2001).  
Ref Type: Journal
- 128 Y. Zhang, *et al.*, "Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase," *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A **98**(3), 974 (2001).  
Ref Type: Journal
- 129 S. Bonni, *et al.*, "TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation," *Nat. Cell Biol.* **3**(6), 587 (2001).  
Ref Type: Journal
- 130 R. S. Lo and J. Massague, "Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2," *Nat. Cell Biol.* **1**(8), 472 (1999).  
Ref Type: Journal
- 131 G. J. Inman, F. J. Nicolas, and C. S. Hill, "Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity," *Mol. Cell* **10**(2), 283 (2002).  
Ref Type: Journal
- 132 L. Xu, *et al.*, "Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus," *Mol. Cell* **10** (2), 271 (2002).  
Ref Type: Journal
- 133 P. S. Lee, *et al.*, "Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling," *J. Biol. Chem.* **278**(30), 27853 (2003).  
Ref Type: Journal
- 134 M. Huse, *et al.*, "The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch," *Mol. Cell* **8**(3), 671 (2001).  
Ref Type: Journal
- 135 S. G. Penheiter, *et al.*, "Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway," *Mol. Cell Biol.* **22**(13), 4750 (2002).  
Ref Type: Journal
- 136 G. M. Di Guglielmo, *et al.*, "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover," *Nat. Cell Biol.* **5**(5), 410 (2003).  
Ref Type: Journal
- 137 B. A. Hocevar, *et al.*, "The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway," *EMBO J.* **20**(11), 2789 (2001).  
Ref Type: Journal
- 138 C. Dong, *et al.*, "Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity," *Mol. Cell* **5**(1), 27 (2000).  
Ref Type: Journal
- 139 A. Sasaki, *et al.*, "Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling," *J. Biol. Chem.* **276**(21), 17871 (2001).  
Ref Type: Journal
- 140 Y. Tang, *et al.*, "Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice," *Science* **299**(5606), 574 (2003).  
Ref Type: Journal
- 141 P. Kavsak, *et al.*, "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation," *Mol. Cell* **6**(6), 1365 (2000).  
Ref Type: Journal
- 142 T. Ebisawa, *et al.*, "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation," *J. Biol. Chem.* **276**(16), 12477 (2001).  
Ref Type: Journal
- 143 J. W. Wu, *et al.*, "Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling," *Mol. Cell* **8**(6), 1277 (2001).  
Ref Type: Journal
- 144 B. M. Chacko, *et al.*, "The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization," *Nat. Struct. Biol.* **8**(3), 248 (2001).  
Ref Type: Journal
- 145 G. J. Inman and C. S. Hill, "Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA," *J. Biol. Chem.* **277**(52), 51008 (2002).  
Ref Type: Journal
- 146 X. H. Feng, X. Lin, and R. Derynck, "Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta," *EMBO J.* **19**(19), 5178 (2000).  
Ref Type: Journal
- 147 M. Watanabe, *et al.*, "Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal," *EMBO Rep.* **1**(2), 176 (2000).  
Ref Type: Journal
- 148 Z. Xiao, *et al.*, "Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals," *J. Biol. Chem.* **276**(42), 39404 (2001).  
Ref Type: Journal
- 149 L. Xu, Y. G. Chen, and J. Massague, "The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation," *Nat. Cell Biol.* **2**(8), 559 (2000).  
Ref Type: Journal

- 150 A. Kurisaki, *et al.*, "Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner," *Mol. Biol. Cell* **12**(4), 1079 (2001).  
Ref Type: Journal
- 151 F. Itoh, *et al.*, "Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads," *EMBO J.* **20**(15), 4132 (2001).  
Ref Type: Journal
- 152 A. Hanyu, *et al.*, "The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling," *J. Cell Biol.* **155**(6), 1017 (2001).  
Ref Type: Journal
- 153 L. Pulaski, *et al.*, "Phosphorylation of Smad7 at Ser-249 does not interfere with its inhibitory role in transforming growth factor-beta-dependent signaling but affects Smad7-dependent transcriptional activation," *J. Biol. Chem.* **276**(17), 14344 (2001).  
Ref Type: Journal
- 154 M. P. de Caestecker, *et al.*, "Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases," *Genes Dev.* **12**(11), 1587 (1998).  
Ref Type: Journal
- 155 M. Kretschmar, *et al.*, "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras," *Genes Dev.* **13**(7), 804 (1999).  
Ref Type: Journal
- 156 M. Funaba, C. M. Zimmerman, and L. S. Mathews, "Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase," *J. Biol. Chem.* **277**(44), 41361 (2002).  
Ref Type: Journal
- 157 M. E. Engel, *et al.*, "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription," *J. Biol. Chem.* **274**(52), 37413 (1999).  
Ref Type: Journal
- 158 E. Janda, *et al.*, "Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways," *J. Cell Biol.* **156**(2), 299 (2002).  
Ref Type: Journal
- 159 O. H. Grimm and J. B. Gurdon, "Nuclear exclusion of Smad2 is a mechanism leading to loss of competence," *Nat. Cell Biol.* **4**(7), 519 (2002).  
Ref Type: Journal
- 160 S. J. Wicks, *et al.*, "Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II," *Mol. Cell Biol.* **20**(21), 8103 (2000).  
Ref Type: Journal
- 161 I. Yakymovych, *et al.*, "Regulation of Smad signaling by protein kinase C," *FASEB J.* **15**(3), 553 (2001).  
Ref Type: Journal
- 162 C. R. Chen, *et al.*, "E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression," *Cell* **110**(1), 19 (2002).  
Ref Type: Journal
- 163 Y. Kang, C. R. Chen, and J. Massague, "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells," *Mol. Cell* **11**(4), 915 (2003).  
Ref Type: Journal
- 164 J. Comijn, *et al.*, "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion," *Mol. Cell* **7**(6), 1267 (2001).  
Ref Type: Journal
- 165 T. Alliston, *et al.*, "TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation," *EMBO J.* **20**(9), 2254 (2001).  
Ref Type: Journal
- 166 D. Liu, B. L. Black, and R. Derynck, "TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3," *Genes Dev.* **15**(22), 2950 (2001).  
Ref Type: Journal
- 167 L. Choy and R. Derynck, "Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function," *J. Biol. Chem.* **278**(11), 9609 (2003).  
Ref Type: Journal
- 168 N. T. Liberati, *et al.*, "An essential role for Mad homology domain 1 in the association of Smad3 with histone deacetylase activity\*," *J. Biol. Chem.* **276**(25), 22595 (2001).  
Ref Type: Journal
- 169 U. Valcourt, *et al.*, "TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition," *Mol. Biol. Cell* **16** (4), 1987 (2005).  
Ref Type: Journal
- 170 R. Derynck and Y. E. Zhang, "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling," *Nature* **425**(6958), 577 (2003).  
Ref Type: Journal

- 171 M. Kretschmar, *et al.*, "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras," *Genes Dev.* **13**(7), 804 (1999).  
Ref Type: Journal
- 172 M. K. Lee, *et al.*, "TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA," *EMBO J.* **26**(17), 3957 (2007).  
Ref Type: Journal
- 173 A. J. Galliher and W. P. Schiemann, "Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion," *Cancer Res.* **67**(8), 3752 (2007).  
Ref Type: Journal
- 174 K. Lehmann, *et al.*, "Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells," *Genes Dev.* **14**(20), 2610 (2000).  
Ref Type: Journal
- 175 M. Grande, *et al.*, "Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes," *J. Cell Sci.* **115**(Pt 22), 4227 (2002).  
Ref Type: Journal
- 176 S. Uttamsingh, *et al.*, "Synergistic effect between EGF and TGF-beta1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells," *Oncogene* **27**(18), 2626 (2008).  
Ref Type: Journal
- 177 L. Xie, *et al.*, "Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro," *Neoplasia.* **6**(5), 603 (2004).  
Ref Type: Journal
- 178 A. Marchetti, *et al.*, "ERK5/MAPK is activated by TGFbeta in hepatocytes and required for the GSK-3beta-mediated Snail protein stabilization," *Cell Signal.* **20**(11), 2113 (2008).  
Ref Type: Journal
- 179 A. V. Bakin, *et al.*, "p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration," *J. Cell Sci.* **115**(Pt 15), 3193 (2002).  
Ref Type: Journal
- 180 L. Yu, M. C. Hebert, and Y. E. Zhang, "TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses," *EMBO J.* **21**(14), 3749 (2002).  
Ref Type: Journal
- 181 Y. Sano, *et al.*, "ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling," *J. Biol. Chem.* **274**(13), 8949 (1999).  
Ref Type: Journal
- 182 J. F. Alcorn, *et al.*, "Jun N-terminal kinase 1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1," *J. Cell Sci.* **121**(Pt 7), 1036 (2008).  
Ref Type: Journal
- 183 J. F. Santibanez, "JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes," *FEBS Lett.* **580**(22), 5385 (2006).  
Ref Type: Journal
- 184 Q. Liu, *et al.*, "Transforming growth factor {beta}1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells," *Perit. Dial. Int.* **28 Suppl 3**, S88-S95 (2008).  
Ref Type: Journal
- 185 S. Han, *et al.*, "Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells," *J. Biol. Chem.* **281**(40), 29614 (2006).  
Ref Type: Journal
- 186 J. R. Delaney and M. Mlodzik, "TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity," *Cell Cycle* **5**(24), 2852 (2006).  
Ref Type: Journal
- 187 A. Sorrentino, *et al.*, "The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner," *Nat. Cell Biol.* **10**(10), 1199 (2008).  
Ref Type: Journal
- 188 M. Yamashita, *et al.*, "TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta," *Mol. Cell* **31**(6), 918 (2008).  
Ref Type: Journal
- 189 S. Pellegrin and H. Mellor, "Actin stress fibres," *J. Cell Sci.* **120**(Pt 20), 3491 (2007).  
Ref Type: Journal
- 190 L. Vardouli, A. Moustakas, and C. Stournaras, "LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta," *J. Biol. Chem.* **280** (12), 11448 (2005).  
Ref Type: Journal

- 191 N. A. Bhowmick, *et al.*, "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism," *Mol. Biol. Cell* **12**(1), 27 (2001).  
Ref Type: Journal
- 192 H. J. Cho and J. Yoo, "Rho activation is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells," *Cell Biol. Int.* **31**(10), 1225 (2007).  
Ref Type: Journal
- 193 A. L. Tavares, *et al.*, "TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart," *Dev. Dyn.* **235**(6), 1589 (2006).  
Ref Type: Journal
- 194 Y. I. Lee, Y. J. Kwon, and C. K. Joo, "Integrin-linked kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**(4), 997 (2004).  
Ref Type: Journal
- 195 S. C. Lien, *et al.*, "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in transforming growth factor-beta1-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells," *Cell Signal.* **18**(8), 1270 (2006).  
Ref Type: Journal
- 196 C. C. Lin, *et al.*, "Transforming growth factor-beta1 stimulates heme oxygenase-1 expression via the PI3K/Akt and NF-kappaB pathways in human lung epithelial cells," *Eur. J. Pharmacol.* **560**(2-3), 101 (2007).  
Ref Type: Journal
- 197 A. Rodriguez-Barbero, *et al.*, "TGF-beta1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells," *Kidney Int.* **70**(5), 901 (2006).  
Ref Type: Journal
- 198 D. D. Sarbassov, S. M. Ali, and D. M. Sabatini, "Growing roles for the mTOR pathway," *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**(6), 596 (2005).  
Ref Type: Journal
- 199 J. J. Kattla, *et al.*, "Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF-beta1-driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo," *Am. J. Physiol Renal Physiol* **295**(1), F215-F225 (2008).  
Ref Type: Journal
- 200 S. Lamouille and R. Derynck, "Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway," *J. Cell Biol.* **178**(3), 437 (2007).  
Ref Type: Journal
- 201 Y. L. Pon, *et al.*, "p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells," *Cancer Res.* **68**(16), 6524 (2008).  
Ref Type: Journal
- 202 H. J. Cho, *et al.*, "Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**(2), 337 (2007).  
Ref Type: Journal
- 203 E. Vincan and N. Barker, "The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression," *Clin. Exp. Metastasis* **25**(6), 657 (2008).  
Ref Type: Journal
- 204 B. Vogelstein and K. W. Kinzler, "Cancer genes and the pathways they control," *Nat. Med.* **10**(8), 789 (2004).  
Ref Type: Journal
- 205 J. M. Bailey, P. K. Singh, and M. A. Hollingsworth, "Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins," *J. Cell Biochem.* **102**(4), 829 (2007).  
Ref Type: Journal
- 206 Z. Wang, *et al.*, "Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells," *Cancer Res.* **66**(5), 2778 (2006).  
Ref Type: Journal
- 207 L. A. Timmerman, *et al.*, "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation," *Genes Dev.* **18**(1), 99 (2004).  
Ref Type: Journal
- 208 M. A. Nieto, "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(3), 155 (2002).  
Ref Type: Journal
- 209 A. Barrallo-Gimeno and M. A. Nieto, "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer," *Development* **132**(14), 3151 (2005).  
Ref Type: Journal
- 210 A. Cano, *et al.*, "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression," *Nat. Cell Biol.* **2**(2), 76 (2000).  
Ref Type: Journal

- 211 E. Batlle, *et al.*, "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells," *Nat. Cell Biol.* **2**(2), 84 (2000).  
Ref Type: Journal
- 212 K. Hemavathy, *et al.*, "Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription," *Mol. Cell Biol.* **20**(14), 5087 (2000).  
Ref Type: Journal
- 213 C. Jamora, *et al.*, "A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis," *PLoS Biol.* **3**(1), e11 (2005).  
Ref Type: Journal
- 214 C. Martinez-Alvarez, *et al.*, "Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates," *Dev. Biol.* **265**(1), 207 (2004).  
Ref Type: Journal
- 215 M. Yanez-Mo, *et al.*, "Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells," *N. Engl. J. Med.* **348**(5), 403 (2003).  
Ref Type: Journal
- 216 A. Kaimori, *et al.*, "Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro," *J. Biol. Chem.* **282**(30), 22089 (2007).  
Ref Type: Journal
- 217 H. Peinado, M. Quintanilla, and A. Cano, "Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions," *J. Biol. Chem.* **278**(23), 21113 (2003).  
Ref Type: Journal
- 218 L. A. Romano and R. B. Runyan, "Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart," *Dev. Biol.* **223**(1), 91 (2000).  
Ref Type: Journal
- 219 K. E. Hoot, *et al.*, "Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression," *J. Clin. Invest* **118**(8), 2722 (2008).  
Ref Type: Journal
- 220 H. J. Cho, *et al.*, "Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**(2), 337 (2007).  
Ref Type: Journal
- 221 S. Takano, *et al.*, "Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1," *J. Biochem.* **141**(3), 345 (2007).  
Ref Type: Journal
- 222 M. Deckers, *et al.*, "The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells," *Cancer Res.* **66**(4), 2202 (2006).  
Ref Type: Journal
- 223 M. Sato, *et al.*, "Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction," *J. Clin. Invest* **112**(10), 1486 (2003).  
Ref Type: Journal
- 224 T. Morita, T. Mayanagi, and K. Sobue, "Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling," *J. Cell Biol.* **179**(5), 1027 (2007).  
Ref Type: Journal
- 225 S. Grotegut, *et al.*, "Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail," *EMBO J.* **25**(15), 3534 (2006).  
Ref Type: Journal
- 226 D. Olmeda, *et al.*, "Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness," *Oncogene* **26**(13), 1862 (2007).  
Ref Type: Journal
- 227 V. Bolos, *et al.*, "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors," *J. Cell Sci.* **116**(Pt 3), 499 (2003).  
Ref Type: Journal
- 228 K. M. Hajra, D. Y. Chen, and E. R. Fearon, "The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer," *Cancer Res.* **62**(6), 1613 (2002).  
Ref Type: Journal
- 229 J. Ikenouchi, *et al.*, "Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail," *J. Cell Sci.* **116**(Pt 10), 1959 (2003).  
Ref Type: Journal
- 230 Z. Wang, *et al.*, "Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug," *Oncogene* **26**(8), 1222 (2007).  
Ref Type: Journal
- 231 H. Peinado, D. Olmeda, and A. Cano, "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance

- against the epithelial phenotype?," *Nat. Rev. Cancer* **7**(6), 415 (2007).  
Ref Type: Journal
- 232 Craene B. De, *et al.*, "The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program," *Cancer Res.* **65**(14), 6237 (2005).  
Ref Type: Journal
- 233 P. Savagner, K. M. Yamada, and J. P. Thiery, "The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition," *J. Cell Biol.* **137**(6), 1403 (1997).  
Ref Type: Journal
- 234 N. K. Kurrey, K A, and S. A. Bapat, "Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level," *Gynecol. Oncol.* **97**(1), 155 (2005).  
Ref Type: Journal
- 235 E. L. Whiteman, *et al.*, "The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes," *Oncogene* **27**(27), 3875 (2008).  
Ref Type: Journal
- 236 G. Moreno-Bueno, *et al.*, "Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition," *Cancer Res.* **66**(19), 9543 (2006).  
Ref Type: Journal
- 237 M. Taki, *et al.*, "Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells," *Int. J. Oncol.* **28**(2), 487 (2006).  
Ref Type: Journal
- 238 M. Jorda, *et al.*, "Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor," *J. Cell Sci.* **118**(Pt 15), 3371 (2005).  
Ref Type: Journal
- 239 S. Guaita, *et al.*, "Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression," *J. Biol. Chem.* **277** (42), 39209 (2002).  
Ref Type: Journal
- 240 A. A. Postigo, *et al.*, "Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins," *EMBO J.* **22**(10), 2453 (2003).  
Ref Type: Journal
- 241 T. Shirakihara, M. Saitoh, and K. Miyazono, "Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta," *Mol. Biol. Cell* **18**(9), 3533 (2007).  
Ref Type: Journal
- 242 A. A. Postigo, "Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway," *EMBO J.* **22**(10), 2443 (2003).  
Ref Type: Journal
- 243 G. Nishimura, *et al.*, "DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation," *Dev. Cell* **11**(1), 93 (2006).  
Ref Type: Journal
- 244 P. A. Gregory, *et al.*, "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1," *Nat. Cell Biol.* **10**(5), 593 (2008).  
Ref Type: Journal
- 245 S. M. Park, *et al.*, "The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2," *Genes Dev.* **22**(7), 894 (2008).  
Ref Type: Journal
- 246 M. Korpala, *et al.*, "The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2," *J. Biol. Chem.* **283**(22), 14910 (2008).  
Ref Type: Journal
- 247 J. Long, D. Zuo, and M. Park, "Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin," *J. Biol. Chem.* **280**(42), 35477 (2005).  
Ref Type: Journal
- 248 J. Comijn, *et al.*, "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion," *Mol. Cell* **7**(6), 1267 (2001).  
Ref Type: Journal
- 249 M. L. Grootclaes and S. M. Frisch, "Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis," *Oncogene* **19**(33), 3823 (2000).  
Ref Type: Journal
- 250 A. Eger, *et al.*, "DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells," *Oncogene* **24**(14), 2375 (2005).  
Ref Type: Journal
- 251 C. Vandewalle, *et al.*, "SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell

- junctions," *Nucleic Acids Res.* **33**(20), 6566 (2005).  
Ref Type: Journal
- 252 S. Spaderna, *et al.*, "The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer," *Cancer Res.* **68**(2), 537 (2008).  
Ref Type: Journal
- 253 K. Aigner, *et al.*, "The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity," *Oncogene* **26**(49), 6979 (2007).  
Ref Type: Journal
- 254 M. E. Massari and C. Murre, "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms," *Mol. Cell Biol.* **20**(2), 429 (2000).  
Ref Type: Journal
- 255 M. A. Perez-Moreno, *et al.*, "A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions," *J. Biol. Chem.* **276**(29), 27424 (2001).  
Ref Type: Journal
- 256 M. Kondo, *et al.*, "A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation," *Cell Death. Differ.* **11**(10), 1092 (2004).  
Ref Type: Journal
- 257 M. Kowanetz, *et al.*, "Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein," *Mol. Cell Biol.* **24**(10), 4241 (2004).  
Ref Type: Journal
- 258 Y. Kang, C. R. Chen, and J. Massague, "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells," *Mol. Cell* **11**(4), 915 (2003).  
Ref Type: Journal
- 259 Ghouzzi El, V, *et al.*, "Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome," *Nat. Genet.* **15**(1), 42 (1997).  
Ref Type: Journal
- 260 T. D. Howard, *et al.*, "Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome," *Nat. Genet.* **15**(1), 36 (1997).  
Ref Type: Journal
- 261 J. Yang, S. A. Mani, and R. A. Weinberg, "Exploring a new twist on tumor metastasis," *Cancer Res.* **66**(9), 4549 (2006).  
Ref Type: Journal
- 262 S. Thuaault, *et al.*, "Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition," *J. Cell Biol.* **174**(2), 175 (2006).  
Ref Type: Journal
- 263 J. Yang, *et al.*, "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis," *Cell* **117**(7), 927 (2004).  
Ref Type: Journal
- 264 S. Ansieau, *et al.*, "Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence," *Cancer Cell* **14**(1), 79 (2008).  
Ref Type: Journal
- 265 K. Luger, *et al.*, "Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria," *J. Mol. Biol.* **272**(3), 301 (1997).  
Ref Type: Journal
- 266 T. Kouzarides, "Chromatin modifications and their function," *Cell* **128**(4), 693 (2007).  
Ref Type: Journal
- 267 P. Papageorgis, *et al.*, "Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression," *Cancer Res.* **70**(3), 968 (2010).  
Ref Type: Journal
- 268 O. G. McDonald, *et al.*, "Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition," *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**(8), 867 (2011).  
Ref Type: Journal
- 269 R. J. Sims, III, K. Nishioka, and D. Reinberg, "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function," *Trends Genet.* **19**(11), 629 (2003).  
Ref Type: Journal
- 270 N. Ballas, *et al.*, "Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex," *Neuron* **31**(3), 353 (2001).  
Ref Type: Journal
- 271 M. A. Hakimi, *et al.*, "A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes," *Nature* **418**(6901), 994 (2002).  
Ref Type: Journal
- 272 G. W. Humphrey, *et al.*, "Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiiaa0071 and Mta-L1," *J. Biol. Chem.* **276**(9), 6817 (2001).  
Ref Type: Journal

- 273 A. You, *et al.*, "CoREST is an integral component of the Co," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**(4), 1454 (2001).  
Ref Type: Journal
- 274 I. Garcia-Bassets, *et al.*, "Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors," *Cell* **128**(3), 505 (2007).  
Ref Type: Journal
- 275 E. Metzger, *et al.*, "LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription," *Nature* **437**(7057), 436 (2005).  
Ref Type: Journal
- 276 P. Kahl, *et al.*, "Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence," *Cancer Res.* **66**(23), 11341 (2006).  
Ref Type: Journal
- 277 G. G. Wang, C. D. Allis, and P. Chi, "Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications," *Trends Mol. Med.* **13**(9), 363 (2007).  
Ref Type: Journal
- 278 Y. J. Shi, *et al.*, "Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors," *Mol. Cell* **19**(6), 857 (2005).  
Ref Type: Journal
- 279 N. Ballas, *et al.*, "REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis," *Cell* **121**(4), 645 (2005).  
Ref Type: Journal
- 280 E. Battaglioli, *et al.*, "REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex," *J. Biol. Chem.* **277**(43), 41038 (2002).  
Ref Type: Journal
- 281 V. V. Lunyak, *et al.*, "Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes," *Science* **298**(5599), 1747 (2002).  
Ref Type: Journal
- 282 B. Lakowski, I. Roelens, and S. Jacob, "CoREST-like complexes regulate chromatin modification and neuronal gene expression," *J. Mol. Neurosci.* **29**(3), 227 (2006).  
Ref Type: Journal
- 283 J. E. Dallman, *et al.*, "A conserved role but different partners for the transcriptional corepressor CoREST in fly and mammalian nervous system formation," *J. Neurosci.* **24**(32), 7186 (2004).  
Ref Type: Journal
- 284 S. Saleque, *et al.*, "Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1," *Mol. Cell* **27**(4), 562 (2007).  
Ref Type: Journal
- 285 S. K. Ooi, *et al.*, "DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA," *Nature* **448**(7154), 714 (2007).  
Ref Type: Journal
- 286 M. Wissmann, *et al.*, "Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression," *Nat. Cell Biol.* **9**(3), 347 (2007).  
Ref Type: Journal
- 287 B. Perillo, *et al.*, "DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression," *Science* **319**(5860), 202 (2008).  
Ref Type: Journal
- 288 Y. Tsukada, *et al.*, "Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins," *Nature* **439**(7078), 811 (2006).  
Ref Type: Journal
- 289 P. M. Clissold and C. P. Ponting, "JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta," *Trends Biochem. Sci.* **26**(1), 7 (2001).  
Ref Type: Journal
- 290 K. Yamane, *et al.*, "JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor," *Cell* **125**(3), 483 (2006).  
Ref Type: Journal
- 291 P. A. Cloos, *et al.*, "The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3," *Nature* **442**(7100), 307 (2006).  
Ref Type: Journal
- 292 B. D. Fodor, *et al.*, "Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells," *Genes Dev.* **20**(12), 1557 (2006).  
Ref Type: Journal
- 293 R. J. Klose, *et al.*, "The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36," *Nature* **442**(7100), 312 (2006).  
Ref Type: Journal
- 294 J. R. Whetstine, *et al.*, "Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases," *Cell* **125**(3), 467 (2006).

- Ref Type: Journal
- 295 S. C. Treweek, P. J. McLaughlin, and R. C. Allshire, "Methylation: lost in hydroxylation?," *EMBO Rep.* **6**(4), 315 (2005).
- Ref Type: Journal
- 296 J. F. Couture, *et al.*, "Specificity and mechanism of JMJD2A, a trimethyllysine-specific histone demethylase," *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**(8), 689 (2007).
- Ref Type: Journal
- 297 Z. Chen, *et al.*, "Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members," *Cell* **125**(4), 691 (2006).
- Ref Type: Journal
- 298 C. D. Allis, *et al.*, "New nomenclature for chromatin-modifying enzymes," *Cell* **131**(4), 633 (2007).
- Ref Type: Journal
- 299 R. Anand and R. Marmorstein, "Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes," *J. Biol. Chem.* **282** (49), 35425 (2007).
- Ref Type: Journal
- 300 S. S. Ng, *et al.*, "Crystal structures of histone demethylase JMJD2A reveal basis for substrate specificity," *Nature* **448**(7149), 87 (2007).
- Ref Type: Journal
- 301 Z. Chen, *et al.*, "Structural basis of the recognition of a methylated histone tail by JMJD2A," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(26), 10818 (2007).
- Ref Type: Journal
- 302 Y. Shi and J. R. Whetstone, "Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases," *Mol. Cell* **25**(1), 1 (2007).
- Ref Type: Journal
- 303 W. S. Wu, "The signaling mechanism of ROS in tumor progression," *Cancer Metastasis Rev.* **25**(4), 695 (2006).
- Ref Type: Journal
- 304 G. Carpenter and Qs Ji, "Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element," *Exp. Cell Res.* **253**(1), 15 (1999).
- Ref Type: Journal
- 305 H. J. Forman, J. Nelson, and G. Harrison, "Hyperoxia alters effect of calcium on rat alveolar macrophage superoxide production," *J. Appl. Physiol* **60**(4), 1300 (1986).
- Ref Type: Journal
- 306 A. R. Cross and O. T. Jones, "Enzymic mechanisms of superoxide production," *Biochim. Biophys. Acta* **1057**(3), 281 (1991).
- Ref Type: Journal
- 307 A. Mitsui, T. Hirakawa, and J. Yodoi, "Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**(3), 1220 (1992).
- Ref Type: Journal
- 308 H. P. Monteiro and A. Stern, "Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways," *Free Radic. Biol. Med.* **21**(3), 323 (1996).
- Ref Type: Journal
- 309 H. Nakamura, K. Nakamura, and J. Yodoi, "Redox regulation of cellular activation," *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 351 (1997).
- Ref Type: Journal
- 310 G. Powis, M. Briehl, and J. Oblong, "Redox signalling and the control of cell growth and death," *Pharmacol. Ther.* **68**(1), 149 (1995).
- Ref Type: Journal
- 311 H. Sun and N. K. Tonks, "The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling," *Trends Biochem. Sci.* **19**(11), 480 (1994).
- Ref Type: Journal
- 312 H. Kamata and H. Hirata, "Redox regulation of cellular signalling," *Cell Signal.* **11**(1), 1 (1999).
- Ref Type: Journal
- 313 A. Knebel, *et al.*, "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents," *EMBO J.* **15**(19), 5314 (1996).
- Ref Type: Journal
- 314 A. G. Tatosyan and O. A. Mizenina, "Kinases of the Src family: structure and functions," *Biochemistry (Mosc.)* **65** (1), 49 (2000).
- Ref Type: Journal
- 315 J. A. Cooper and B. Howell, "The when and how of Src regulation," *Cell* **73**(6), 1051 (1993).
- Ref Type: Journal
- 316 M. T. Brown and J. A. Cooper, "Regulation, substrates and functions of src," *Biochim. Biophys. Acta* **1287**(2-3), 121 (1996).
- Ref Type: Journal

- 317 W. Xu, S. C. Harrison, and M. J. Eck, "Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src," *Nature* **385**(6617), 595 (1997).  
Ref Type: Journal
- 318 S. Gonfloni, *et al.*, "The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src," *EMBO J.* **16**(24), 7261 (1997).  
Ref Type: Journal
- 319 E. Giannoni, *et al.*, "Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth," *Mol. Cell Biol.* **25**(15), 6391 (2005).  
Ref Type: Journal
- 320 E. H. Fischer, H. Charbonneau, and N. K. Tonks, "Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes," *Science* **253**(5018), 401 (1991).  
Ref Type: Journal
- 321 P. Chiarugi and P. Cirri, "Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction," *Trends Biochem. Sci.* **28**(9), 509 (2003).  
Ref Type: Journal
- 322 E. Giannoni, *et al.*, "Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival," *Cell Death. Differ.* **15**(5), 867 (2008).  
Ref Type: Journal
- 323 K. Z. Guyton, *et al.*, "Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion," *Cancer Res.* **56**(15), 3480 (1996).  
Ref Type: Journal
- 324 P. Chiarugi, "Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion," *Ital. J. Biochem.* **52**(1), 28 (2003).  
Ref Type: Journal
- 325 M. A. Stevenson, *et al.*, "X-irradiation, phorbol esters, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates," *Cancer Res.* **54**(1), 12 (1994).  
Ref Type: Journal
- 326 H. Kamata, *et al.*, "Nerve growth factor and forskolin prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells by glutathione independent mechanism," *Neurosci. Lett.* **212**(3), 179 (1996).  
Ref Type: Journal
- 327 H. Konishi, *et al.*, "Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**(21), 11233 (1997).  
Ref Type: Journal
- 328 S. M. Keyse and E. A. Emslie, "Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase," *Nature* **359**(6396), 644 (1992).  
Ref Type: Journal
- 329 K. Mikoshiba, "The InsP<sub>3</sub> receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling," *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**(3), 339 (1997).  
Ref Type: Journal
- 330 B. S. Berlett and E. R. Stadtman, "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress," *J. Biol. Chem.* **272** (33), 20313 (1997).  
Ref Type: Journal
- 331 W. Vogt, "Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal," *Free Radic. Biol. Med.* **18**(1), 93 (1995).  
Ref Type: Journal
- 332 A. Janoff, *et al.*, "Lung injury induced by leukocytic proteases," *Am. J. Pathol.* **97**(1), 111 (1979).  
Ref Type: Journal
- 333 R. L. Levine, *et al.*, "Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(26), 15036 (1996).  
Ref Type: Journal
- 334 J. S. Beckman, "Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite," *Chem. Res. Toxicol.* **9**(5), 836 (1996).  
Ref Type: Journal
- 335 B. L. Martin, *et al.*, "Chemical influences on the specificity of tyrosine phosphorylation," *J. Biol. Chem.* **265**(13), 7108 (1990).  
Ref Type: Journal
- 336 T. Grune, T. Reinheckel, and K. J. Davies, "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells," *FASEB J.* **11**(7), 526 (1997).  
Ref Type: Journal
- 337 A. Klungland, *et al.*, "Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein," *Mol. Cell* **3**(1), 33 (1999).  
Ref Type: Journal
- 338 T. Lindahl and R. D. Wood, "Quality control by DNA repair," *Science* **286**(5446), 1897 (1999).  
Ref Type: Journal

- 339 J. E. Klaunig, *et al.*, "The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis," *Environ. Health Perspect.* **106 Suppl 1**, 289 (1998).  
Ref Type: Journal
- 340 A. G. Estevez, *et al.*, "Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase," *Science* **286**(5449), 2498 (1999).  
Ref Type: Journal

## APPENDICE

Durante il terzo anno di dottorato mi sono occupato di un nuovo progetto di ricerca riguardante il metabolismo tumorale. In particolar modo ho studiato il ruolo della via dei pentoso fosfati nel mantenimento del bilancio redox in cellule di carcinoma prostatico PC3.

## INTRODUZIONE

La via dei pentoso fosfati ha un ruolo essenziale nella produzione di precursori per gli acidi nucleici (ribosio 5P) e nella produzione di equivalenti riducenti sottoforma di NADPH.

La percentuale di glucosio metabolizzato dalla via dei pentoso fosfati (PPP) può variare dal 5% al 30% in base al tipo di tessuto considerato. La massima attività della PPP può essere raggiunta dai tessuti che sintetizzano lipidi e steroidi come il fegato, il tessuto adiposo bianco, le ghiandole del tessuto mammario, le ghiandole surrenali e le gonadi ma anche nei globuli rossi. In tutte le cellule comunque il livello basale della PPP può variare in dipendenza dai livelli di  $\text{NADP}^+$  e da altre condizioni cellulari che modificano il bilancio  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  [1]. Tali condizioni possono essere l'esposizione ad agenti pro-ossidanti, la proliferazione cellulare ecc.. .

In vivo molti enzimi della PPP come la G6PD, la 6PGD e la transaldolasi sono organizzate in un complesso situato vicino ai trasportatori del

glucosio. In questo modo l'ingresso del glucosio nella PPP è regolato in modo fine ed efficiente [2].

La PPP è convenzionalmente divisa in due parti: la parte ossidativa e la parte non-ossidativa.

### **La fase ossidativa della PPP**

Nella parte ossidativa il glucosio 6-fosfato è ossidato in 6-fosfogluconolattone dalla G6PD. Questa reazione produce NADPH con un rapporto stechiometrico di 1:1. Il 6-fosfogluconolattone è instabile e viene subito convertito in acido 6-fosfogluconico da una lattonasi. L'acido 6-fosfogluconico subisce una decarbossilazione ossidativa dalla 6PGD. In tale reazione si produce la seconda molecola di NADPH e CO<sub>2</sub>. Il ribulosio 5-fosfato appena formato può essere convertito in ribosio 5-fosfato ed utilizzato per la biosintesi dei nucleotidi.

Le cellule che hanno una alta velocità di crescita hanno un forte bisogno di pentosi fosfati. Le cellule tumorali, ad esempio, richiedono molti zuccheri pentosi e in tali cellule l'85% dei pentosi incorporati nel DNA proviene dalla PPP [3]. Quindi la prima condizione che induce un aumento di attività della PPP è il tasso di crescita.

La seconda condizione che provoca un' aumentata attività della PPP è il bisogno di NADPH nella cellula per poter sintetizzare nuove molecole

come acidi grassi, ormoni steroidei, colesterolo, ma anche per detossificare le sostanze tossiche. Ciò spiega la notevole attività della PPP presente nel tessuto epatico e in tessuti che sintetizzano lipidi. Il NADPH è il substrato limitante per la glutatione reduttasi (GSR), l'enzima che rigenera la forma ridotta del glutatione (GSH) da quella ossidata (GSSG); prodotto della reazione catalizzata dalla glutatione perossidasi (GSHPx). Un difetto in questi enzimi (G6PD, GSR, GSHPx) fa diventare le cellule maggiormente suscettibili allo stress ossidativo.

L'enzima chiave della PPP è la G6PD, che può essere attiva nelle cellule umane in forma di dimero o di tetramero (formato dalla associazione di due dimeri). Ogni monomero è formato da 515 aminoacidi [1].

L'accumulo di NADP<sup>+</sup> agisce sulla attività della G6PD in due modi. Nel primo caso l'attività dell'enzima è regolata dal rapporto fra NADP<sup>+</sup>/NADPH. Le cellule che consumano molto NADPH producono molto NADP<sup>+</sup>. Livelli alti di NADP<sup>+</sup> attivano maggiormente la G6PD per ristabilire il bilancio NADP<sup>+</sup>/NADPH. Inoltre il NADP<sup>+</sup> stabilizza l'enzima nella giusta conformazione [4]. Quando la concentrazione di NADPH, all'interno della cellula, si alza, alcune molecole di NADPH si possono legare alla G6PD, riducendone così l'attività.

### **La fase non ossidativa della PPP**

La prima reazione non ossidativa vede il ribosio-5-fosfato reagire con lo xilulosio-5-fosfato mediante l'azione dell'enzima transchetolasi che, a sua volta, è coadiuvato dalla tiamina. La reazione produce sedoeptulosio-7-fosfato e gliceraldeide 3 fosfato. Lo xilulosio-5-fosfato è l'epimero del ribulosio-5-fosfato.

La seconda reazione non ossidativa vede il sedoeptulosio-7-fosfato reagire con la gliceraldeide-3-fosfato, per mezzo dell'enzima transaldolasi. Si forma il fruttosio-6-fosfato e l'eritrosio-4-fosfato, mediante la reazione che, in quanto reversibile, può formare i reagenti di partenza ribulosio-5-fosfato.

L'ultima reazione della via dei pentoso fosfati vede gli zuccheri eritrosio-4-fosfato e xilulosio-5-fosfato interagire con l'enzima transchetolasi, che è coadiuvato dalla tiamina, per formare fruttosio-6-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato.

Il fruttosio 6-fosfato può essere trasformato in glucosio 6-fosfato ed essere così rimesso nel ciclo, oppure può essere ossidato per mezzo della glicolisi.

### **La risposta antiossidante**

Il fattore trascrizionale Nrf2 è un potente attivatore trascrizionale ed è un

gene chiave della risposta antiossidante all'interno della cellula. Nrf2 è in grado di attivare numerosi geni ad azione citoprotettiva in risposta a stimoli pro-ossidanti e stress elettrofilici [5,6]. I geni target di Nrf2 sono coinvolti nella sintesi del glutatione, nell'eliminazione dei ROS, nella eliminazione di xenobiotici e farmaci [7,8]. Keap1 è una proteina essenziale per la regolazione di Nrf2. In condizioni normali Nrf2 è costantemente degradato da Keap1 attraverso un meccanismo ubiquitina dipendente. In presenza di elettrofilici o ROS, Nrf2 cessa di essere degradato e si accumula nel nucleo. Una volta che si trova nel nucleo eterodimerizza con una piccola proteina Maf ed attiva geni target citoprotettivi. Per attivare questi geni, si lega agli elementi di risposta antiossidante (ARE) e agli elementi di risposta elettrofila (EpRE) [9].

Quindi i livelli di Nrf2 sono regolati da meccanismi degradativi e la stabilizzazione inducibile di Nrf2 è un punto chiave della risposta antiossidante nella cellula.

In Nrf2 sono stati identificati 6 domini Neh. Il dominio Neh2 è localizzato nella regione N-terminale di Nrf2 ed è estremamente importante affinché Keap1 possa degradarlo [10,11]. Questo dominio è direttamente associato alla struttura a botte  $\beta$  di Keap1 presente nel dominio DC. Keap1 si associa alla cullina 3 (Cul3) formando così una ubiquitina E3 ligasi in cui Keap1 ha una funzione di adattatore. Keap1-Cul3 (ubiquitina E3 ligasi) poliubiquitina Nrf2 e lo porta a degradazione nel proteasoma. In che

modo i ROS riescono a bloccare la continua degradazione di Nrf2?

Keap1 è una proteina ricca di gruppi tiolici e possiede molte cisteine reattive poste vicino ad aminoacidi basici. I gruppi tiolici reattivi sono eccellenti bersagli per elettrofili. È stato infatti visto che molti reagenti elettrofili possono modificare direttamente i gruppi tiolici [12,13,14,15]. Keap1, in seguito a tali modificazioni, perde affinità per la Cul3, staccandosi da essa impedendo così che venga degradato Nrf2. Keap1 è un sensore sensibile alla presenza di molecole elettrofile all'interno della cellula.

I geni target di Nrf2 sono coinvolti nella sintesi del glutathione (Gclc, Gclm), nell'eliminazione di ROS (Txnrd1, Prdx1) nella detossificazione degli xenobiotici (Gst, Nqo1) e nella estrusione dei farmaci dalla cellula (Mrp).

## **MATERIALI E METODI**

### **Colture cellulari**

Le cellule di tumore prostatico PC3 e i fibroblasti HPF isolati da espianati (fibroblasti del tessuto prostatico sano) sono fatti crescere in terreno completo DMEM 10% siero di bovino adulto.

### **Terreno condizionato**

Per ottenere il terreno condizionato delle PC3 e quello degli HPF, le cellule sono state fatte crescere in terreno di starvazione per 48 h.

Per ottenere il terreno condizionato dei PCa-AF gli HPF sono stati trattati per 24h con il CM-PC3 e per ulteriori 24h con terreno di starvazione.

### **Saggio di proliferazione al citofluorimetro**

L'indice di proliferazione cellulare è stato ricavato al citofluorimetro utilizzando la sonda fluorescente CFSE. Le cellule sono trattate con 10  $\mu$ M di CFSE per 15 min a 37 °C e poi sono state piastrate. L'analisi al citofluorimetro permette di valutare l'indice di proliferazione (numero medio di divisioni cellulari che una cellula della popolazione originale ha subito) sulla base della progressiva diminuzione della fluorescenza cellulare.

## **Saggio enzimatico della attività della G6PD**

Le cellule sono lavate in PBS freddo e poi sottoposte a shock termico in azoto liquido. Sono poi lisate a 4 °C in un buffer contenente 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM DTT e inibitori di proteasi. Dopo 30 min di incubazione in ghiaccio i campioni sono sonicati e centrifugati a 12000g a 4 °C per 30 min. Il supernatante viene quantificato con il metodo bradford. La reazione catalizzata dalla G6PD prevede l'ossidazione del glucosio6P a 6P glucono lattone. L'elemento ossidante è il NADP<sup>+</sup> che accetta 2 elettroni riducendosi a NADPH. Dato che nella sua forma ridotta il NADPH presenta un picco di assorbimento a 340 nm possiamo seguire l'andamento della reazione misurando la variazione di estinzione nel tempo a tale lunghezza d'onda.

La reazione viene fatta in cuvetta con 1 ml di volume. Nella cuvetta viene aggiunto Tampone Tris-HCl 100mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 300 mM, NADP<sup>+</sup> 25 mM, glucosio6P 66 mM.

## **Dosaggio del NADPH**

Il dosaggio del NADPH è stato eseguito con il Kit 72205 fornito dalla AnaSpec secondo le istruzioni fornite dalla azienda.

### **Silenziamento stabile**

Le cellule PC3 sono state trasfettate utilizzando il kit Lipofectamin 2000 prodotto dalla Invitrogen. Sono state trasfettate con un plasmide capace di silenziare la G6PD. Il plasmide fornito da SantaCruz una volta che si inserisce nel genoma della cellula conferisce resistenza alla puromicina. Le cellule contenenti il plasmide sono così selezionate con 1 µg/ml.

### **Estrazione nucleare**

Le piastre tenute 24 h in ipossia vengono lavate per 2 volte in PBS freddo. Successivamente ciascuna piastra viene screpata con 1,5 ml di PBS freddo e raccolta in eppendorf. I campioni contenuti in ciascuna eppendorf vengono centrifugati per 10 min a 4 °C a 10000 rpm. Il surnatante viene aspirato ed i pellet vengono risospesi in 1 ml di PBS freddo. Sono poi centrifugati per 1 min a 4 °C. Si aspira il surnatante e si risospende ciascun campione con 500 µl di Buffer A (15 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.6, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP-40 il tutto sciolto in H<sub>2</sub>O).

Vengono poi vortexati e lasciati in ghiaccio per 10 min. Successivamente sono centrifugati per 10 min a 10000 rpm. Il surnatante, ovvero la parte citosolica, viene recuperato in nuove eppendorf e tenuto in ghiaccio. Il pellet viene risospeso in 30 µl di Buffer B (2 mM KCl, 25 mM Hepes pH 7.6, EDTA 0.1 mM il tutto sciolto in H<sub>2</sub>O) e passati 5 min in ghiaccio viene

aggiunto a ciascun campione 30  $\mu$ l di Buffer C (25 mM, 25 mM Hepes pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 20% glicerolo il tutto sciolto in H<sub>2</sub>O . I campioni vengono lasciati in ghiaccio per 30 min e agitati ogni tanto. Successivamente sono centrifugati a 15000 rpm per 15 min a 4 °C. Il surnatante formato, in cui è presente la parte nucleare, viene raccolto in nuove eppendorf e lasciato in ghiaccio.

## RISULTATI

In questo progetto di ricerca, iniziato nel terzo anno di dottorato, ho studiato il ruolo della via dei pentoso fosfati nel mantenimento del bilancio redox in cellule di carcinoma prostatico PC3.

Come noto in letteratura, la via dei pentoso fosfati è estremamente importante per generare potere riducente sottoforma di NADPH e generare i ribosi necessari alla sintesi di acidi nucleici. Il potere riducente serve a sostenere i processi anabolici e a mantenere il glutathione allo stato ridotto. In questo modo la cellula è in grado di difendersi dai radicali liberi. Il glutathione allo stato ridotto viene ossidato dai radicali liberi, impedendo che essi vadano ad ossidare molecole importanti come i lipidi di membrana. L'ipotesi che sta alla base del progetto, mette le cellule tumorali e il microambiente in primo piano. In particolare, in questo progetto sto studiando, in cellule PC3, il ruolo della via dei pentoso fosfati nella risposta a stress ossidativi provenienti dal microambiente, ovvero dovuti all'ipossia e alla presenza dei fibroblasti attivati.

### **Il CM-PCa-AF induce un accumulo di ROS transitorio nelle PC3**

In questo esperimento, mostrato in figura 1, ho valutato i livelli di ROS in cellule PC3 messe a contatto con il terreno di fibroblasti attivati dal terreno delle PC3 stesse (CM-PCa-AF). Ho fermato l'esperimento a 24h e a 96h.

Come è possibile notare dal grafico, il CM-PCa-AF induce nelle PC3 un forte incremento di ROS a 24h. Tuttavia questo accumulo di ROS è transitorio poichè, come possiamo notare, a 96h i livelli di ROS tornano allo stato basale.

Dopo 96 h di trattamento con il CM-PCa-AF, terreno di starvazione e terreno di fibroblasti non attivati (HPF) si assiste ad una riduzione dei livelli di ROS in tutti e tre i casi. L'accumulo di ROS che avviene in maggior misura nelle cellule a contatto con il CM-PCa-AF viene rimosso, a 96 h, probabilmente grazie a sistemi cellulari deputati alla difesa dai radicali liberi. Probabilmente il contatto delle PC3 con il CM-PCa-AF induce una attivazione della via dei pentoso fosfati.

### **Caratterizzazione della linea cellulare silenziata per la G6PD**

Per poter studiare il ruolo della via dei pentoso fosfati nella rimozione dei ROS accumulati nelle PC3 in seguito al contatto con il CM-PCa-AF abbiamo realizzato una linea stabile silenziata per la G6PD. La G6PD è una enzima chiave della via dei pentoso fosfati. La reazione enzimatica che catalizza è irreversibile e limita la velocità della via. Questo enzima genera NADPH ossidando il glucosio 6-fosfato in 6 fosfogluco- $\delta$ -lattone. Come possiamo notare dal western in figura 2, i livelli di G6PD nelle cellule silenziata stabilmente sono di gran lunga inferiori al controllo.

Possiamo quindi dire di aver ottenuto un buon silenziamento della proteina.

Nell'esperimento in figura 3 ho valutato l'indice di proliferazione delle cellule silenziate rispetto al controllo. La via dei pentoso fosfati oltre a produrre NADPH genera anche zuccheri ribosi necessari alla formazione dei nucleotidi. Come è possibile notare dal grafico le cellule silenziate per la G6PD hanno una velocità di crescita inferiore rispetto alle cellule normali, poichè vengono a ridursi i ribosi necessari alla proliferazione cellulare. Le cellule silenziate proliferano quindi con più difficoltà.

Oltre a queste analisi di controllo necessarie a caratterizzare la linea appena ottenuta, ho deciso di valutare direttamente l'attività enzimatica della G6PD nelle cellule di controllo e nelle cellule silenziate, come ulteriore riprova dell'effettivo silenziamento.

Nel grafico in figura 4 possiamo notare che la differenza di attività enzimatica fra le cellule di controllo e le cellule silenziate è notevole. Il silenziamento della G6PD riduce l'attività enzimatica di circa il 50 %.

Successivamente ho dosato i livelli del NADPH all'interno della cellula. Ho, a questo scopo, starvato le cellule di controllo e quelle silenziate ed ho seguito le istruzioni fornite dal kit. Nel grafico in figura 5 possiamo notare che le cellule silenziate per la G6PD hanno un riduzione dei livelli intracellulari di NADPH di circa il 40%. Tale riduzione osservata è in linea con i livelli di attività enzimatica della G6PD.

Riassumendo, le cellule G6PD - hanno una velocità di crescita inferiore rispetto alle cellule di controllo, l'attività enzimatica della G6PD si è ridotta della metà come anche i livelli di NADPH. Le cellule silenziate dovrebbero, secondo le ipotesi, avere una difficoltà maggiore nel gestire i ROS. Probabilmente in esse si verifica un accumulo di ROS più marcato rispetto alle cellule di controllo.

### **Le PC3 G6PD - , sotto stimoli pro-ossidanti, sono in grado di eliminare i ROS**

In questo esperimento ho trattato le cellule di controllo e quelle silenziate con il CM-PCa-AF, con il terreno degli HPF e con semplice starvazione. Ho stimolato entrambe le linee per 24h e per 96h per poter valutare la capacità di rimozione dei ROS delle cellule G6PD -.

Ho quindi dosato i livelli di ROS nelle varie condizioni in entrambe le linee ed in figura 6 sono mostrati i risultati ottenuti.

Come possiamo notare, il CM-PCa-AF ha effetto, oltre che nelle cellule di controllo, anche nelle cellule silenziate per la G6PD. In entrambe le linee, in seguito al contatto per 24h con CM-PCa-AF, si registra un accumulo di ROS di pari entità. Data la notevole importanza della PPP nell'evitare un eccessivo accumulo di ROS nella cellula in seguito a stimoli pro-ossidanti, mi sarei aspettato che le cellule silenziate raggiungessero livelli di ROS

nettamente maggiori rispetto alle cellule di controllo.

Inoltre in condizioni normali, ovvero in presenza di sola starvazione, nelle cellule G6PD - si registra una quantità di ROS leggermente superiore rispetto alla controparte di controllo.

A 96h però i livelli di ROS tornano, in entrambe le linee, allo stato basale. I ROS accumulati a 24 h indotti dal CM-PCa-AF vengono rimossi anche con bassissimi livelli di G6PD nella cellula.

Ciò porterebbe a pensare che la via dei pentoso fosfati non sia di vitale importanza per la cellula per difendersi dai ROS. Probabilmente i bassi livelli di G6PD vengono compensati con altri meccanismi attivati dalla cellula per la difesa dai radicali liberi.

Oltre al CM-PCa-AF, come stimolo pro-ossidante, ho scelto l'ipossia. In numerosi lavori presenti in letteratura è ampiamente dimostrato che le cellule poste in ipossia accumulano una gran quantità di ROS.

Quindi ho voluto valutare il comportamento di entrambe le linee in risposta a questo stimolo pro-ossidante in termini di accumulo di ROS.

Come è possibile notare dal grafico in figura 7, in entrambe le linee si assiste ad un accumulo di ROS dopo 24h di ipossia.

Tale accumulo è però della stessa entità. Le cellule silenziate per la G6PD si comportano, in termini di accumulo di ROS, esattamente come le cellule normali.

Le cellule mancanti della G6PD utilizzano sicuramente altri sistemi per

sopperire alla mancanza dell'enzima e alla contemporanea riduzione del potere riducente sottoforma di NADPH.

**Le cellule PC3 utilizzano il NADPH per difendersi da stimoli pro-ossidanti**

Nell'esperimento di figura 8 ho voluto valutare come variano i livelli di NADPH all'interno della cellula dopo 24h di ipossia. Ho eseguito questo test sia nelle cellule silenziate per la G6PD sia in quelle normali di controllo.

Come visto anche in esperimenti precedenti le cellule silenziate hanno, giustamente, una quota minore di NADPH all'interno della cellula. Nonostante ciò riescono a non accumulare tanti più ROS di quanti ne accumulino quelle di controllo. Inoltre è interessante notare che, dopo 24 h di ipossia, nelle cellule normali si osserva una riduzione dei livelli di NADPH mentre nelle silenziate no. Questo esperimento dimostra come le due linee utilizzino meccanismi diversi per eliminare i ROS accumulati dopo 24 h di ipossia. Le cellule normali utilizzano il NADPH prodotto in larga misura dalla via dei pentoso fosfati. Le cellule silenziate non utilizzano le basse riserve di NADPH che si ritrovano ma altri sistemi indipendenti da esso. Possiamo quindi affermare che la via dei pentoso fosfati è importante per la rimozione dei ROS nella cellula ma non è

l'unica. Una riduzione dell'attività enzimatica della G6PD e quindi del potere riducente è sicuramente compensata da altri meccanismi che si attivano in situazioni di emergenza.

### **Nelle cellule G6PD - si assiste ad una maggiore traslocazione nucleare di Nrf2**

In questo esperimento ho voluto indagare uno dei possibili modo con cui le cellule G6PD - potrebbero difendersi dai ROS. Questa modalità di difesa dipende da due proteine Keap1 e Nrf2. Nrf2 normalmente si trova nel citoplasma, ancorato al citoscheletro attraverso Keap1. In condizioni di emergenza ed in condizioni pro-ossidanti Nrf2 si stacca da Keap1 e va nel nucleo. Una volta che si trova nel nucleo, attiva i geni della risposta antiossidante.

Ho quindi piastrato entrambe le linee e le ho messe in ipossia per 24h.

Successivamente le ho raccolte e ho separato i nuclei dal citoplasma.

Nel comparto nucleare ho eseguito un western contro Nrf2, come mostrato in figura 9.

Nelle cellule normali ho potuto osservare un leggero aumento di Nrf2 nel nucleo in ipossia rispetto al controllo in normossia. Quindi anche in presenza di G6PD - le cellule normali utilizzano questa via.

Nelle cellule silenziate, però, i livelli di Nrf2 nucleare sono nettamente

superiori rispetto alle cellule normali sia in mormossia che in ipossia.

Quindi in mancanza di G6PD vi è una forte risposta antiossidante mediata

dalla traslocazione nucleare di Nrf2.

## IMMAGINI RISULTATI

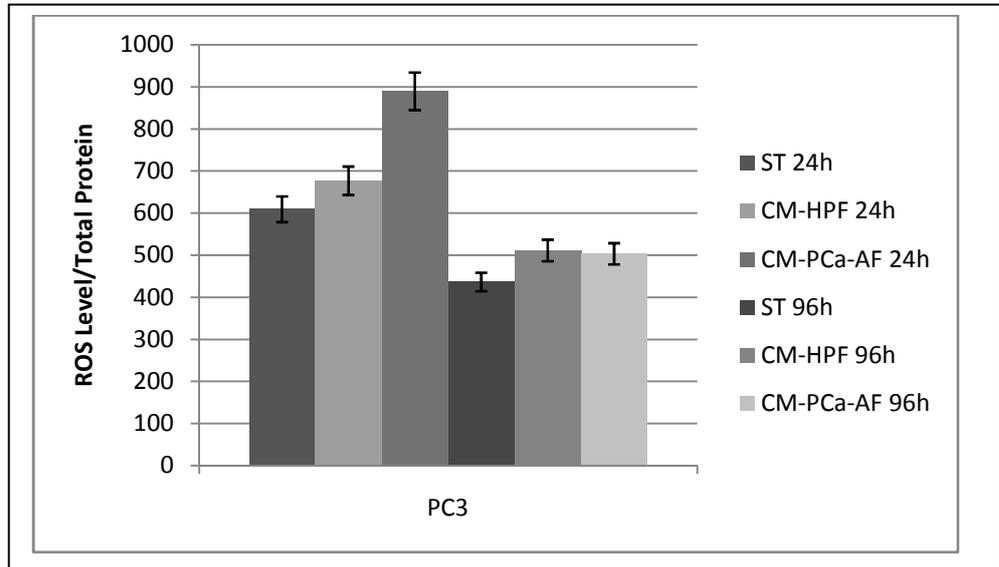


Fig 1: Cellule PC3 stimulate con il CM-PCa-AF, CM-HPF, starvazione per 24h e 96h. Misurazione dei livelli di ROS attraverso DCFDA.

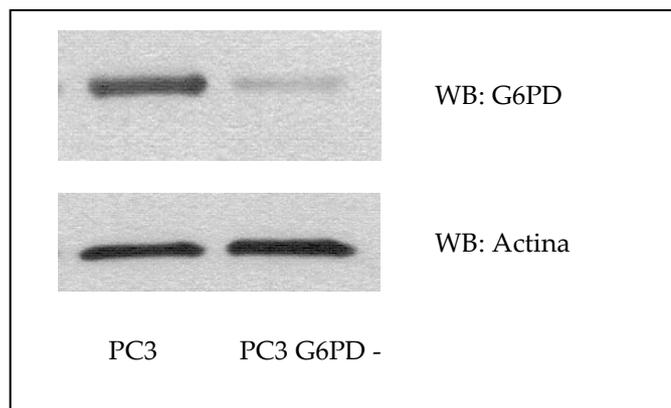


Fig 2: Analisi Western dei livelli di G6PD nella cellula dopo il silenziamento stabile della proteina.

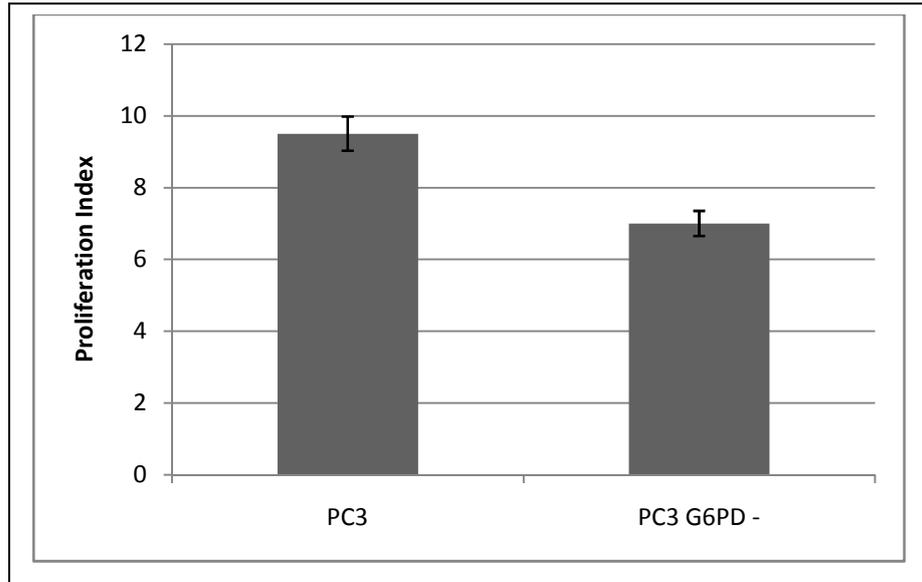


Fig 3: Indice di proliferazione valutato con la tecnica del CFSE al citofluorimetro. Le cellule silenziate per la G6PD hanno un rate di crescita inferiore rispetto alle cellule di controllo.

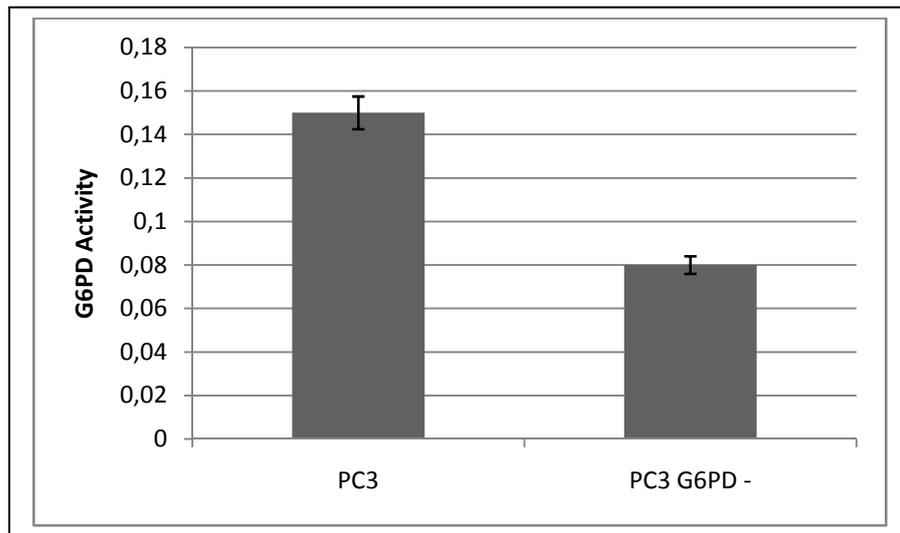


Fig 4: Saggio enzimatico per valutare l'attività enzimatica della G6PD in cellule PC3 normali e silenziate per essa.

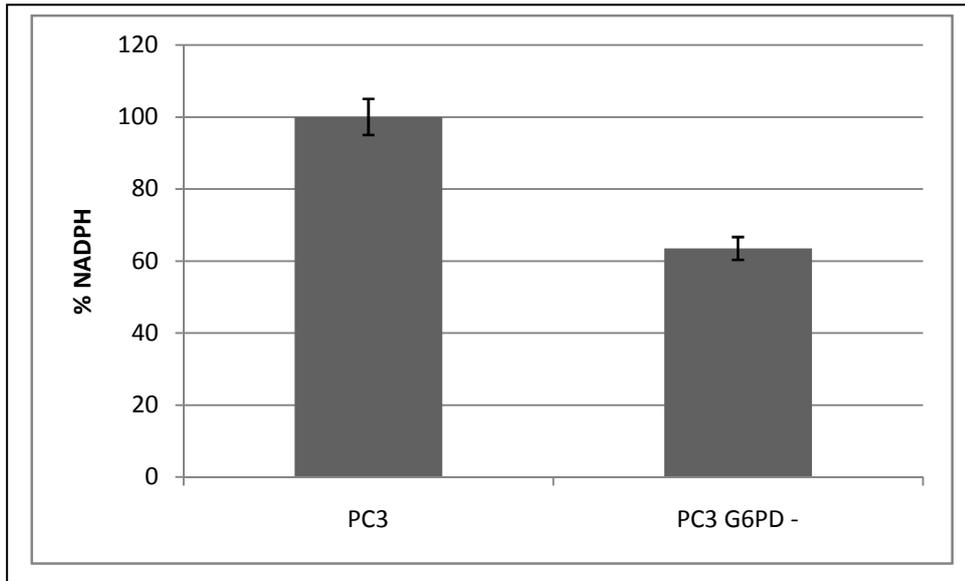


Fig 5: Dosaggio dei livelli di NADPH in cellule PC3 ed in cellule silenziate per la G6PD. Il valore percentuale è normalizzato al valore di NADPH rilevato nel controllo.

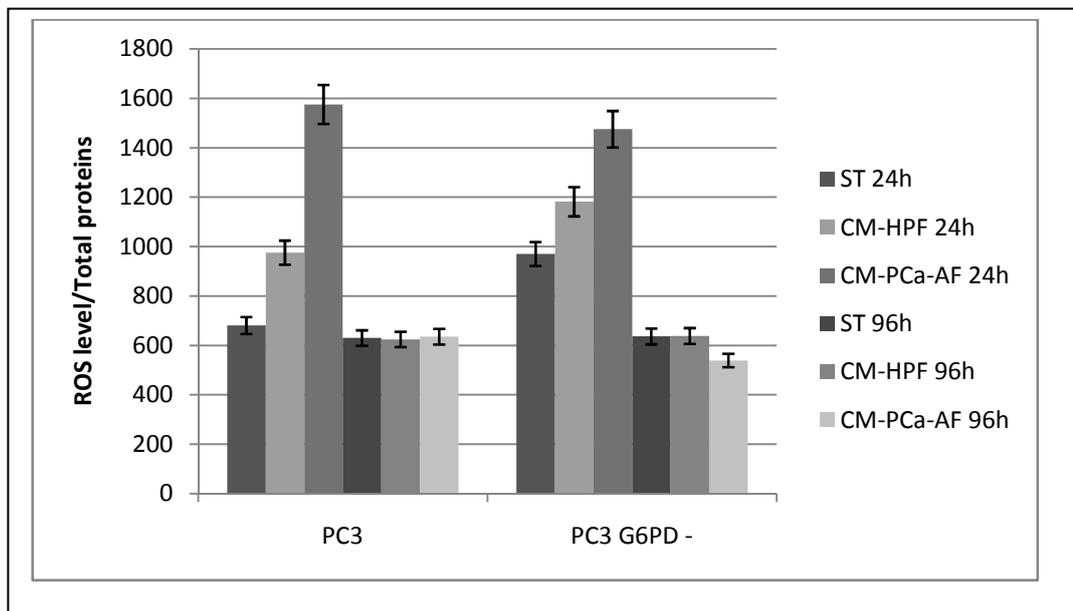


Fig 6: Cellule PC3 e cellule G6PD - stimulate con il CM-PCa-AF, CM-HP e Starvazione per 24 h e 96 h. Misurazione dei livelli di ROS attraverso DCFDA.

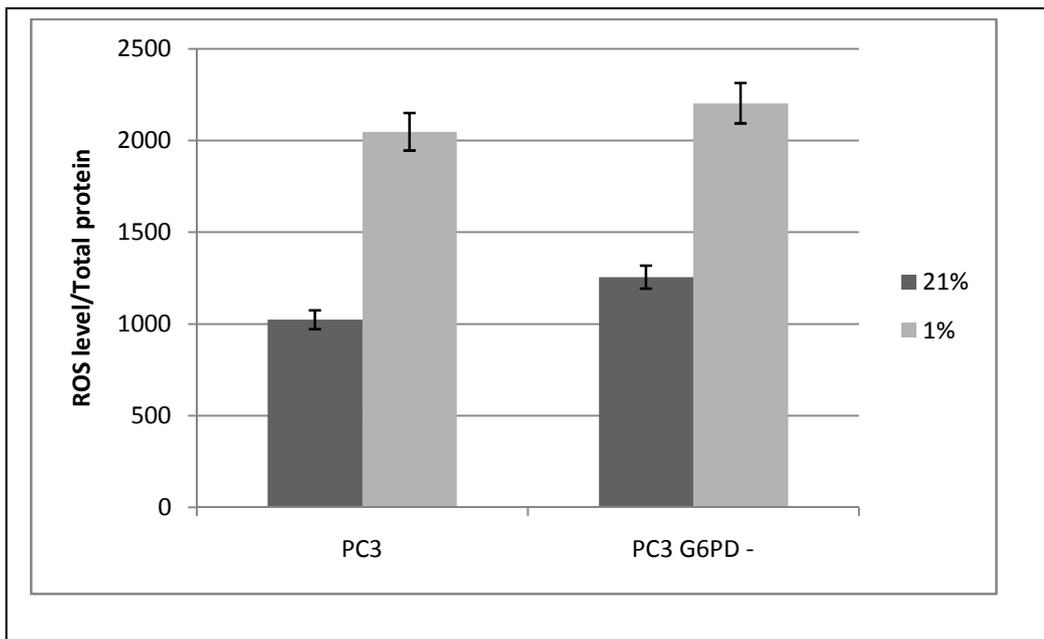


Fig 7: Livelli di ROS in cellule PC3 e G6PD -. Le cellule sono state messe per 24 h in ipossia per indurre un forte accumulo di ROS all'interno di esse.

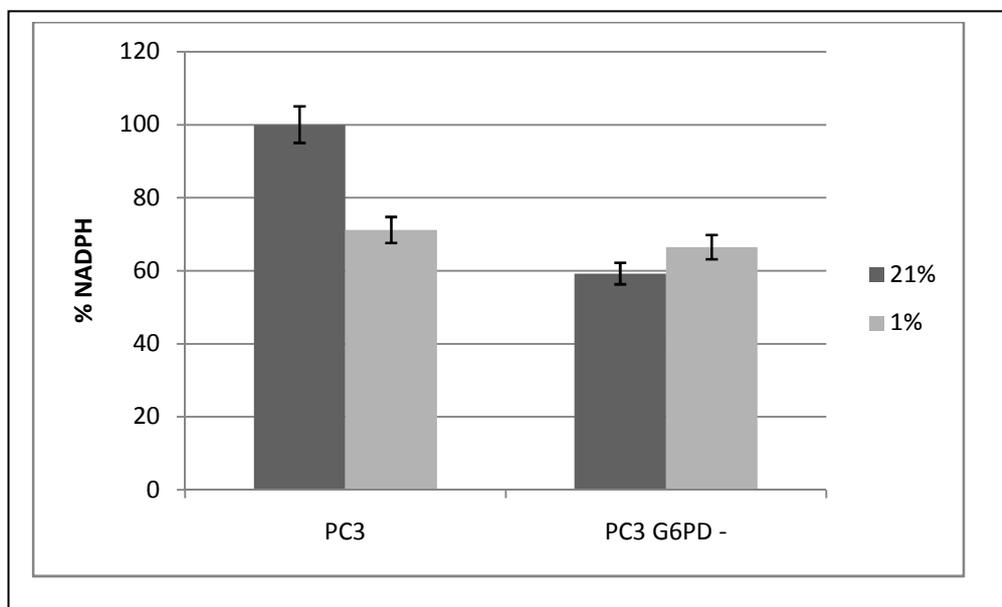


Fig 8: Dosaggio dei livelli di NADPH in cellule PC3 ed in cellule silenziate per la G6PD. Le cellule sono state messe per 24 h in ipossia. Il valore percentuale è normalizzato al valore di NADPH rilevato nel controllo.

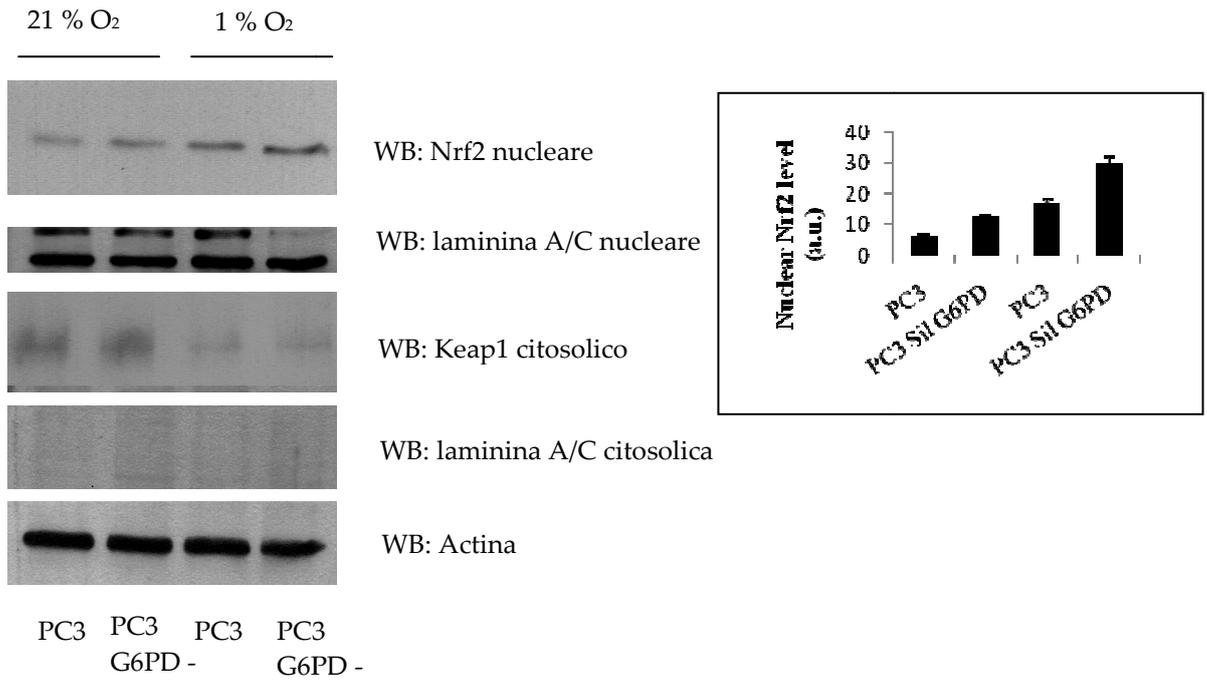


Fig 9: Estrazione nucleare per valutare la risposta antiossidante in cellule PC3 e G6PD – in normossia e ipossia. Analizzato tramite analisi Western i livelli di Nrf2 nel nucleo. Nel grafico sono riportati i livelli di Nrf2 nucleari normalizzati sulla laminina A/C. Valutato inoltre i livelli di Keap1 nel citosol.

## DISCUSSIONE

Questo progetto vuol cercare di dimostrare che una cellula tumorale sotto stress ossidativo riesca a difendersi attraverso una marcata attivazione della via dei pentoso fosfati. In questo progetto sto utilizzando cellule di carcinoma prostatico PC3 e fibroblasti attivati dal terreno delle PC3 (PCa-AF). Da studi svolti precedentemente nel mio laboratorio è stato osservato che il trattamento di cellule tumorali con CM-PCa-AF per 24h induce in esse un accumulo di ROS. Quindi il microambiente, comunica con le cellule tumorali attraverso l'induzione di ROS, promuovendo la EMT. In un esperimento preliminare ho osservato che la quota di ROS ritorna ai livelli basali dopo 96h dal contatto con il terreno del CM-PCa-AF. Probabilmente nella cellula si attiva un sistema di scavenging che le permette di eliminare i ROS. Forse è proprio l'attivazione della PPP a mediare questo effetto. Per valutare ciò, ho realizzato una linea cellulare silenziata per la G6PD in maniera stabile. Tale linea presenta un maggior accumulo di ROS a livello basale, rispetto alla controparte di controllo, di circa un 30% in più. Inoltre è stata dosata l'attività enzimatica della G6PD nella linea normale ed in quella silenziata ed è stato osservato una riduzione di circa il 30% dell'attività dell'enzima rispetto al controllo. Il silenziamento della G6PD ha portato, come atteso, una riduzione della

attività enzimatica con un conseguente maggior accumulo di ROS. Quindi possiamo dire che la via dei pentoso fosfati è importante nella difesa dai ROS.

Nonostante ciò, sotto stimoli pro-ossidanti come il CM-PCa-AF o l'ipossia, le due linee si comportano pressoché allo stesso modo. Sia le cellule normali che quelle silenziate per la G6PD riescono a opporsi agli stimoli pro-ossidanti a cui vengono sottoposte riportando i ROS ai livelli basali. Ciò porta a supporre che la linea PC3 abbia numerosi sistemi per eliminare e difendersi dai ROS. Anche se in difetto di G6PD, le cellule silenziate sono in grado di eliminare i ROS indotti dall'ipossia o dal contatto con CM-PCa-AF. Ho osservato che in ipossia le cellule silenziate manifestano una maggiore attivazione della risposta antiossidante mediata dalla traslocazione nucleare di Nrf2. Le cellule di controllo invece non ne hanno bisogno poiché tamponano i ROS con il potere riducente generato dalla piena attività della G6PD. L'attivazione di Nrf2 porta alla trascrizione di numerosi geni deputati alla difesa della cellula in condizioni di stress. Ho effettuato il dosaggio del NADPH all'interno della cellula sia nella linea di controllo che in quella G6PD -. Le cellule silenziate in normossia hanno circa il 40% di NADPH in meno rispetto alla linea di controllo. In presenza di uno stimolo pro-ossidante, come l'ipossia, nelle cellule di controllo registro un abbassamento dei livelli di NADPH mentre nelle silenziate il livelli rimangono pressoché invariati. Le

cellule di controllo si difendono dai ROS utilizzando le riserve di NADPH mentre le silenziate no. Una possibile spiegazione sta nel fatto che le silenziate non hanno bisogno di riportare i livelli di NADPH allo stato basale magari attivando l'enzima malico poiché riescono a difendersi dai ROS semplicemente attivando Nrf2.

Esperimenti futuri saranno necessari per capire quali siano i geni che vengono attivati da Nrf2 e che sono necessari per la difesa cellulare agli stress ossidativi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 L. Luzzatto, "Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype," *Haematologica* **91**(10), 1303 (2006).  
Ref Type: Journal
- 2 J. B. Huang, *et al.*, "Transaldolase is part of a supramolecular complex containing glucose-6-phosphate dehydrogenase in human neutrophils that undergoes retrograde trafficking during pregnancy," *Metabolism* **54**(8), 1027 (2005).  
Ref Type: Journal
- 3 B. Rais, *et al.*, "Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle," *FEBS Lett.* **456**(1), 113 (1999).  
Ref Type: Journal
- 4 S. W. Au, *et al.*, "Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency," *Structure.* **8**(3), 293 (2000).  
Ref Type: Journal
- 5 K. Itoh, *et al.*, "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**(2), 313 (1997).  
Ref Type: Journal
- 6 H. Motohashi and M. Yamamoto, "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism," *Trends Mol. Med.* **10**(11), 549 (2004).  
Ref Type: Journal
- 7 H. Okawa, *et al.*, "Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**(1), 79 (2006).  
Ref Type: Journal
- 8 M. S. Yates, *et al.*, "Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole," *Cancer Res.* **66**(4), 2488 (2006).  
Ref Type: Journal
- 9 K. Itoh, K. I. Tong, and M. Yamamoto, "Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles," *Free Radic. Biol. Med.* **36**(10), 1208 (2004).  
Ref Type: Journal
- 10 M. McMahon, *et al.*, "Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression," *J. Biol. Chem.* **278**(24), 21592 (2003).  
Ref Type: Journal
- 11 D. D. Zhang, *et al.*, "Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex," *Mol. Cell Biol.* **24**(24), 10941 (2004).  
Ref Type: Journal
- 12 R. Holland, *et al.*, "Prospective type 1 and type 2 disulfides of Keap1 protein," *Chem. Res. Toxicol.* **21**(10), 2051 (2008).  
Ref Type: Journal
- 13 T. Satoh, *et al.*, "Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1," *J. Neurochem.* **104**(4), 1116 (2008).  
Ref Type: Journal
- 14 M. Kobayashi, *et al.*, "The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds," *Mol. Cell Biol.* **29**(2), 493 (2009).  
Ref Type: Journal
- 15 K. R. Sekhar, G. Rachakonda, and M. L. Freeman, "Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1," *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **244**(1), 21 (2010).  
Ref Type: Journal