



**SAPIENZA**  
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE  
XXIV CICLO**

**“Regolazione dell’espressione del  
Fibroblast Growth Factor Receptor 2 umano”**

**DOTTORANDO**  
Dott. Sirio D’Amici

**DOCENTE GUIDA**  
Prof.ssa Cinzia Marchese

**COORDINATORE DEL DOTTORATO**  
Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi

**ANNO ACCADEMICO 2010-2011**

## *Indice*

---

<b>1 Introduzione</b>	<b>5</b>
1.1 Gli FGFs	
1.1.1 Storia evolutiva e classificazione	
1.1.2 Caratteristiche strutturali	
1.1.3 Espressione e funzione	
1.2 I recettori FGF	
1.2.1 Caratteristiche strutturali	
1.2.2 L'interazione eparina-FGF ed il suo ruolo nell'attivazione di FGFR	
1.2.3 La dimerizzazione e l'attivazione di FGFR	
1.2.4 Il signalling mediato dagli FGF	
1.2.5 Il gene <i>FGFR2</i> e le sue isoforme FGFR2b e FGFR2c	
1.3 Interazione epitelio-mesenchima	
1.3.1 Ruolo degli FGF/FGFR nelle interazioni epitelio-mesenchima	
1.3.2 Le citochine	
1.3.3 Le citochine pro infiammatorie e il loro ruolo nelle interazioni epitelio-mesenchima	
1.4 La famiglia E2F	
1.4.1 Attività biologica della famiglia E2F	
1.4.2 Geni bersaglio della famiglia E2F	
<b>2 Scopo della tesi</b>	<b>41</b>
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>43</b>
3.1. Linee cellulari e trattamenti	
3.2 Microscopia a immunofluorescenza	
3.3 Immunoprecipitazione e Western blotting	
3.4 Estrazione RNA	
3.5 Retratrascrizione	
3.6 Real-time PCR	
3.7 Ceppi e Terreni	
3.8 Vettori plasmidici e trasformazione batterica	

- 3.9 Trasfezione transiente e saggio luciferasi
- 3.10 Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione
- 3.11 Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)
- 3.12 Analisi statistica

#### **4 Risultati e discussione** **53**

- 4.1 Effetti delle citochine pro-infiammatorie sulla proliferazione delle cellule epiteliali
- 4.2 Valutazione degli effetti del trattamento con le citochine sull'espressione del KGFR nelle cellule epiteliali
- 4.3 Ruolo delle citochine responsive nella modulazione dell'espressione del KGF e FGFR2IIIc nelle cellule mesenchimali.
- 4.4 Ruolo delle citochine nell'attivazione del promotore di FGFR2
- 4.5 Identificazione della sequenza del promotore del gene FGFR2 umano responsiva a E2F-1
- 4.6 Caratterizzazione del minimo elemento responsivo ad E2F1

#### DISCUSSIONE

#### **5 Bibliografia** **75**

## *Introduzione*

---

## 1.1 Gli FGFs

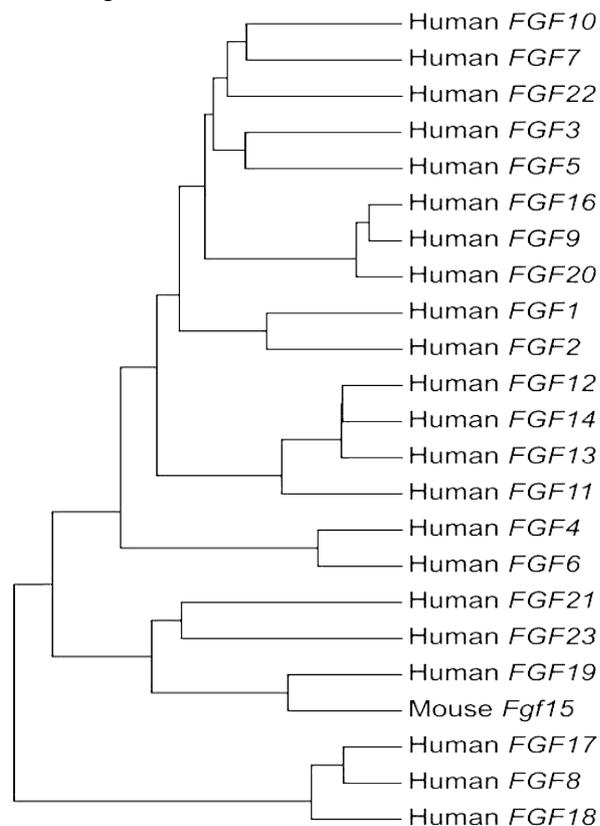
### 1.1.1 Storia evolutiva e classificazione

I fibroblast growth factors (Fgf) sono una famiglia di fattori di crescita polipeptidici con due caratteristiche principali: un'elevata affinità verso l'eparina e gli HLGAGs (heparan-like glycosaminoglycans); ed una regione centrale di 140 aa, altamente omologa tra i vari membri di questa famiglia.

Nei mammiferi la famiglia FGF comprende 23 membri, di cui però solo 18 sono ligandi degli FGFR. Infatti 4 membri (FGF11, FGF12, FGF13 ed FGF14) non sono ligandi dei recettori FGF e dunque andrebbero considerati più correttamente come dei fattori omologhi agli FGFs, ed il ligando FGF19 umano è l'omologo di Fgf15 nel topo (infatti nell'uomo il gene *FGF15* non esiste).

I membri della famiglia FGF possono essere ulteriormente divisi in gruppi o sottofamiglie in base al grado di identità di sequenza, alle proprietà biochimiche e alla funzione.

La figura 1 illustra la relazione evolutiva dei 23 FGF, umani e murini, in base all'allineamento della sequenza nucleotidica.



**Figura 1** Relazione evolutiva degli FGF umani e murini, in base all'allineamento della sequenza nucleotidica (modificata da Ornitz and Itoh, 2001).

Ad esempio i membri della sottofamiglia FGF8 (FGF8, FGF17 ed FGF18) hanno il 70-80% di identità di sequenza amminoacidica, simili proprietà di legame verso il recettore e condividono alcuni siti di espressione (tra cui la giunzione mesencefalo-romboencefalo) (Maruoka Y. *et al.* 1998).

In passato ci si riferiva agli FGF come a delle glicoproteine secrete, tuttavia oggi è invece noto che alcuni FGF hanno anche una funzione nucleare (così come ci sono sempre maggiori evidenze a sostegno di un trasporto di FGFR all'interno nucleo, dove verosimilmente avrebbero una funzione assai diversa da quella "classica" di recettore tirosin-chinasico).

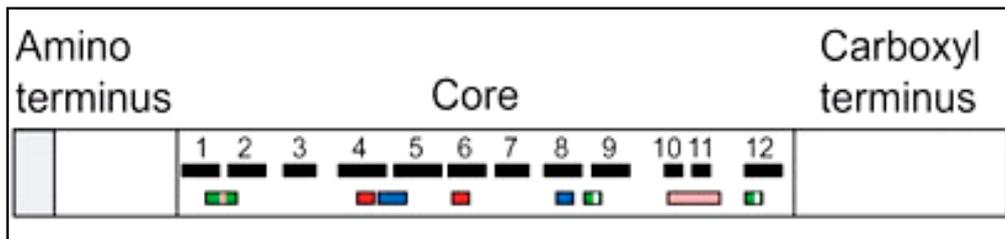
Inoltre, se fino a poco tempo fa si pensava che gli FGFs funzionassero in modo autocrino o paracrino, assai recentemente sono stati identificati alcuni membri della famiglia (FGF19, FGF21, FGF23) che si legano debolmente agli HSPGs nella matrice extracellulare e diffondono dalla sorgente di produzione nel torrente circolatorio agendo di fatto come degli ormoni (Beenken and Mohammadi 2009; Bryant and Stow 2005).

### **1.1.2 Caratteristiche strutturali**

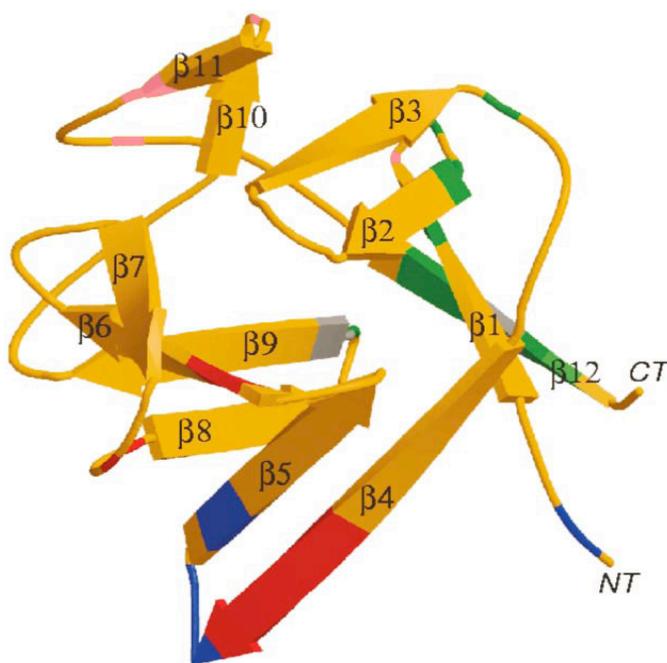
Nei vertebrati i fibroblast growth factors hanno una massa molecolare compresa tra 17 e 34 kDa.

La maggior parte degli FGF presenta una regione *core* (che comprende 6 residui amminoacidici identici e 28 altamente conservati) nella quale 10 residui amminoacidici sono coinvolti nel legame con il recettore (FGFR) (Plotnikov, 2000).

La regione *core* di FGF1 e FGF2 è costituita da 12 foglietti  $\beta$  antiparalleli che insieme formano una struttura tridimensionale cilindrica a  $\beta$ -barile topologicamente identica a quella dell'interleuchina-1 $\beta$  (Zhu X., 1991). Le regioni di legame verso FGFR sono chiaramente distinte da quelle di legame verso l'eparina (i foglietti  $\beta$ 10 e  $\beta$ 11 contengono diversi amminoacidi basici che sono cruciali per il legame all'eparina) e sono rappresentate insieme a queste ultime nelle seguenti figure 2 e 3.



**Figura 2** Caratteristiche strutturali di un generico polipeptide FGF (modificata da Ornitz and Itoh, 2001) La porzione N-terminale spesso presenta una sequenza segnale (in grigio) mentre la regione *core* contiene dei motivi altamente conservati. I rettangoli neri corrispondono ai foglietti  $\beta$  e sono numerati secondo la loro relativa posizione nella proteina. Il rettangolo rosa rappresenta la regione di legame verso l'eparina e comprende i foglietti  $\beta$  10 e 11 così come un loop compreso tra i foglietti  $\beta$  1 e 2. I rettangoli in verde rappresentano i residui che prendono contatto con il dominio Ig2 del recettore FGFR, quelli in blu con il dominio Ig3 e quelli rossi la porzione di Ig3 oggetto di splicing alternativo.



**Figura 3** Struttura tridimensionale di FGF2 (modificata da Ornitz and Itoh, 2001). I foglietti  $\beta$  sono numerati da 1 a 12 e i diversi colori corrispondono, come nella figura 2, alle diverse regioni di legame con FGFR e con l'eparina.

### 1.1.3 Espressione e funzione

L'espressione degli FGF è regolata a seconda del tipo cellulare e dello stadio di sviluppo embrionale (riassunto in Szebenyi and Fallon, 1999).

La regolazione trascrizionale di numerosi geni FGF ed altri eventi, quali il processamento degli mRNA e le modificazioni post-traduzionali delle proteine, generano molte varianti FGF. La regolazione dell'espressione, del processamento, del traffico intracellulare, del rilascio e dell'attivazione di prodotti genici degli FGF è ancora poco nota.

La notevole diversità nella struttura degli mRNA può risultare dall'uso di promotori alternativi, da splicing alternativo o dall'uso di siti di poliadenilazione alternativi. Inoltre, nelle diverse specie ci sono più varianti di mRNA per gli FGF. Alcuni FGF (FGF 3-8 e 10) hanno delle sequenze segnale consenso e sono indirizzati alla secrezione attraverso la via reticolo endoplasmatico-Golgi; altri (FGF1, 2, 9 e 11-14) pur non avendo tale sequenza segnale per la via di secrezione classica, possono comunque essere secreti dalle cellule mediante meccanismi alternativi.

Le isoforme FGF che possiedono una sequenza segnale per la secrezione sono rilasciate costitutivamente dalla cellula (mentre la secrezione delle forme che ne sono prive avviene da pool intracellulari regolati) e la secrezione può essere stimolata da shock termici, danni alla cellula o stress meccanici, come la distorsione della membrana associata al movimento cellulare.

Inoltre, alcuni FGF possiedono delle sequenze consenso di localizzazione nucleare, e molti studi sono attualmente indirizzati alla comprensione del loro ruolo biologico a livello nucleare (riassunto in Szebenyi and Fallon, 1999).

Tra le modificazioni post-traduzionali degli FGF meglio descritte ci sono la glicosilazione, la fosforilazione e l'ADP-ribosilazione.

Il processamento degli FGF può continuare anche dopo il loro rilascio dalla cellula. Ad esempio, l'FGF1 può essere rilasciato come un omodimero biologicamente inattivo, che richiede l'attivazione nella matrice extracellulare per poter legare l'eparina.

Gli FGF esplicano diverse funzioni e hanno effetti diversi anche a seconda delle condizioni biochimico-ambientali delle loro cellule bersaglio. Ad esempio regolano processi quali l'apoptosi, l'adesione, la motilità, il differenziamento, la tumorigenesi.

Essi sono prodotti in differenti momenti durante lo sviluppo dei quattro tipi di tessuti istologici (epiteliale, muscolare, connettivo, nervoso).

La loro azione è estremamente importante nell'embriogenesi e nell'organogenesi. Nel topo il signalling mediato da alcuni FGF (ad esempio FGF4 e FGF5) è richiesto per la sopravvivenza/proliferazione cellulare al momento dell'impianto dell'embrione (Feldman *et al.*, 1995; Arman *et al.*, 1998) e per la migrazione cellulare durante la gastrulazione (Ciruna *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1999).

Gli FGF sono cruciali anche negli ultimi stadi dell'embriogenesi per lo sviluppo di molti organi tra cui a) il cervello, b) i denti, c) gli arti, d) i polmoni, e) i reni, (riassunto in Goldfarb, 1996; Szebenyi and Fallon, 1999; Qiao *et al.*, 2001).

a) Molti degli FGF regolano svariati processi di sviluppo nel cervello ed infatti sono espressi a vari stadi di sviluppo di questo organo: ad esempio nel topo l'espressione perinatale di *FGF6* è limitata alla parte centrale del sistema nervoso e al muscolo scheletrico, con un segnale di espressione più intenso durante lo sviluppo nel cervello embrionale e nei topi di 5 giorni di vita.

b) La morfogenesi dei denti è strettamente regolata dalle interazioni epitelio-mesenchimali e da alcuni signalling conservati in molti processi di sviluppo. Gli FGF sono espressi a livello dell'epitelio dentale in determinati momenti dello sviluppo dei denti ed FGF4 è stato il primo della famiglia degli FGFs ad essere scoperto (Niswander and Martin 1992); tuttavia anche FGF9 ed FGF8 sembrano avere un ruolo importante (Jernvall and Thesleff 2000, Neubüser *et al.*, 1997, Tucker and Sharpe 1999).

c) Il signalling mediato dagli FGF è stato ampiamente studiato negli arti dei vertebrati, dove è stato dimostrato il suo ruolo nella formazione e nella promozione della crescita iniziale dell'abbozzo dell'arto (riassunto in Martin, 1998). Ad esempio i topi che sovraesprimono *FGF2* hanno le ossa degli arti corte (Coffin *et al.* 1995), mentre gli embrioni mostrano all'inizio una normale formazione dell'abbozzo

dell'arto ma mancano del suo normale accrescimento successivo (Sekine *et al.* 1999).

d) Esperimenti *in vitro* ed *in vivo* hanno provato inoltre l'importanza di alcuni fibroblast growth factor nella morfogenesi polmonare: *FGF1*, *FGF2*, *FGF7*, *FGF9*, *FGF10* and *FGF18*, sono espressi distintamente nello spazio e nel tempo durante lo sviluppo del polmone (Clark *et al.*, 2001). FGF7 è ad esempio espresso

nel mesenchima del polmone nel feto mentre FGF10 è espresso nel mesenchima adiacente agli abbozzi polmonari durante le fasi iniziali dello sviluppo di tali organi (Bellusci *et al.*, 1997), inducendo così nelle cellule epiteliali vicine un cambiamento della forma, nonché migrazione e proliferazione (Park *et al.*, 1998, Werner *et al.*, 2000). A sostegno del ruolo essenziale di FGF10 nella formazione del polmone e degli arti c'è la dimostrazione che i topi *FGF10*<sup>-/-</sup> depleti omozigoti muoiono alla nascita (Sekine *et al.*, 1999).

e) Il signalling mediato dagli FGFs è cruciale anche durante l'organogenesi del rene e con l'eccezione di FGF6 tutti da FGF1 a FGF10 sono espressi a diversi livelli durante il suo sviluppo nel ratto (Cancilla *et al.*, 2001). In particolare il mesenchima secerne solo alcuni tipi di FGF come ad esempio FGF2 e/o FGF7 ed esperimenti di ibridazione in situ ed immunohistochimica su campioni di rene fetale umano hanno dimostrato che FGF2 è espresso nelle cellule epiteliali dell'epitelio dell'abbozzo ureterico, dei tubuli prossimali e distali dei glomeruli renali (Drummond *et al.* 1998) ed è necessario quale fattore in grado di indurre la morfogenesi delle cellule dell'abbozzo ureterico (Sakurai *et al.*, 1997).

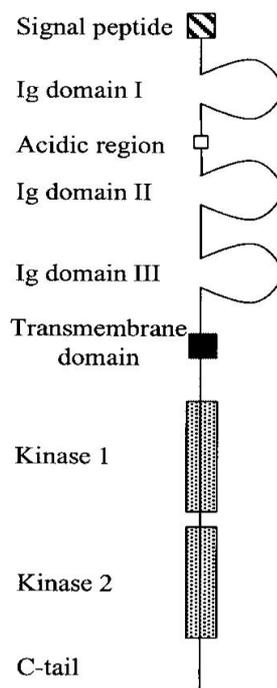
Svariati studi transgenici hanno provato che FGF1, FGF3, FGF7 and FGF10, ligandi del recettore FGFR2 (IIIb) hanno un ruolo nello sviluppo del rene (Celli *et al.*, 1998); nonostante ciò sembra che solo mutazioni nulle nei geni FGF7 e FGF10 causino degli effetti rilevanti benché variabili nello sviluppo renale poiché ad esempio negli embrioni mancanti di FGF7 i reni sono visibilmente più piccoli a causa di una crescita ridotta dell'abbozzo ureterico e del sistema collettore (Ohuchi *et al.*, 2000, Qiao *et al.*, 1999).

## 1.2 I recettori FGF

### 1.2.1 Caratteristiche strutturali

Gli FGF esplicano la loro azione biologica legandosi in maniera specifica alla famiglia di recettori tirosin-chinasi per fattori di crescita (FGFR), costituita da quattro membri strettamente correlati (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4) e codificati da quattro geni differenti (flg, bek, cek-2, frek). Nei topi è stato dimostrato che FGFR1 è coinvolto nella migrazione cellulare attraverso la stria primitiva (Deng et al., 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994), l'espressione di FGFR2 è invece coinvolta nello sviluppo dei polmoni, degli arti e di altri tessuti oltre che nella formazione delle ossa craniali (De Moerlooze *et al.*, 2000; Eswarakumar *et al.*, 2002). Per quanto riguarda FGFR3 questo risulta coinvolto nei processi di crescita della cartilagine (Avivi *et al.*, 1991; Peters *et al.*, 1992), mentre per FGFR4 è stato riscontrato un suo coinvolgimento nello sviluppo del polmone e nella velocità di crescita in associazione alla mancanza di espressione del gene FGFR3 (Weinstein *et al.*, 1998)

E' stato identificato anche un quinto recettore FGFR5 (noto anche come FGFR1L1) che, a differenza degli altri membri, nonostante legni FGFs, è privo del dominio citoplasmatico tirosin-chinasico ed ha una isoforma, FGFR5 $\gamma$ , che è costituita solamente dai primi due domini Ig. Nell'uomo gli FGFRs hanno una identità di sequenza amminoacidica compresa tra il 55% e il 72% (FGFR1 e FGFR2 sono i recettori maggiormente correlati, mentre FGFR1 e FGFR4 sono i meno correlati). Tali recettori sono delle proteine transmembrana e le loro caratteristiche strutturali sono rappresentate dal prototipo nella figura 4 che segue.



**Figura 4 Rappresentazione strutturale di un prototipo del recettore FGFR (modificata da Powers *et al.* 2000).**

La porzione extracellulare è costituita da una sequenza segnale idrofobica, da due o tre domini Ig (IgG) fiancheggiati da cisteine, e da una regione acidica importante per il legame all'eparina, che ha tra quattro e otto amminoacidi acidi variabili nei vari recettori FGFR.

Proseguendo verso il C-terminale del recettore ci sono una regione transmembrana ed una intracellulare. Quest'ultima comprende una regione juxta-membrana, due domini chinasi altamente conservati nei vari FGFR (anche in specie diverse), una regione tra i domini chinasi (kinase insert) ed una regione carbossi-terminale che possiede i siti di autofosforilazione che permettono l'interazione con substrati specifici.

La regione acidica lega cationi bivalenti, tra cui il calcio, il rame, il manganese ed il magnesio. Questi ioni contribuiscono al raggiungimento della conformazione di FGFR ottimale, necessaria per l'interazione ad alta affinità recettore/HLGAG e di conseguenza per il legame del recettore al ligando.

I domini chinasi e i siti di fosforilazione sono richiesti per la trasduzione del segnale mediata dagli FGF.

Nell'uomo sono state scoperte diverse isoforme dei recettori FGFR1, FGFR2 ed FGFR3, derivanti da eventi di splicing alternativo degli mRNA (Johnson D and Williams, 1993; Johnson D. *et al.*, 1991) e rappresentate nella figura 5 A.

Questo importante meccanismo permette di ottenere a partire da un solo gene una grande varietà di isoforme con diverse proprietà di legame verso il ligando e di trasduzione del segnale. Questa varietà di isoforme è possibile grazie alle caratteristiche strutturali dei geni *FGFR*, raffigurate nella figura 5 B.

La metà C-terminale del dominio IgIII è infatti codificata da tre esoni soggetti a splicing alternativo (IIIa, IIIb, IIIc) che sono disposti in modo continuo e nello stesso ordine nei geni *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* (Johnson *et al.*, 1991; Chellaiah *et al.*, 1994).

Il gene *Fgfr4* è l'unico in cui esiste solamente una forma di dominio IgIII (Vainikka *et al.*, 1992).

L'inclusione o meno dei diversi esoni nel trascritto maturo produce diverse proteine che possono essere ad esempio di dimensione ridotta (tronche), o mancanti dei domini Ig o ancora avere diversi esoni per uno stesso dominio Ig.

Quindi lo splicing ha conseguenze diverse sulla funzionalità dei recettori a seconda che causi ad esempio la perdita del primo dominio Ig, o della regione acidica, o addirittura di entrambe le regioni intracellulare e transmembrana.

La perdita del primo dominio Ig non altera la capacità del recettore FGFR1 di legare i ligandi FGF1 o FGF2 (Johnson and Williams, 1993), perché il dominio di legame si trova all'interno di una regione di 139 aminoacidi che comprende parte del secondo e terzo dominio Ig. Ig I è il meno conservato negli FGFR e sebbene non sia essenziale per il legame con il ligando, può regolarne l'affinità di legame: la sua rimozione, infatti, produce un recettore con una maggiore affinità per gli FGF.

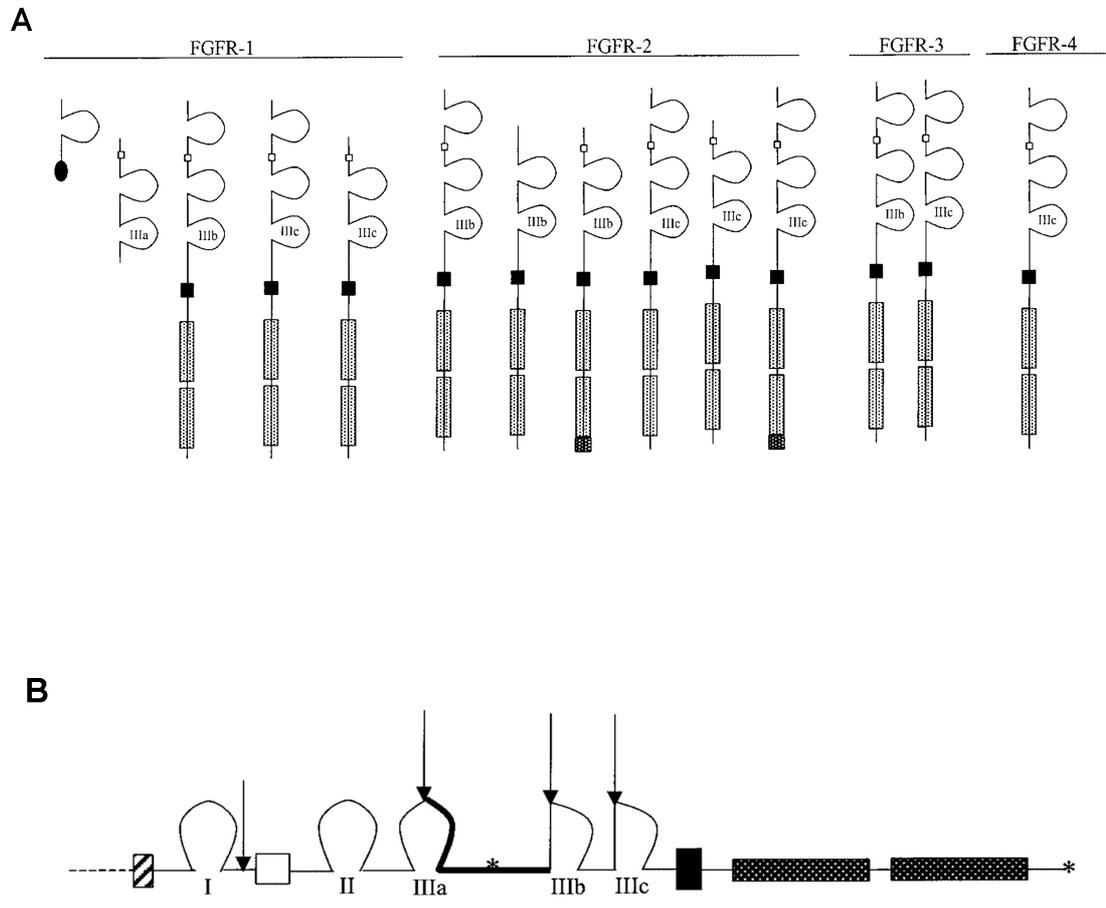
Il secondo dominio Ig è altamente conservato nelle varie isoforme FGFR e comprende la regione di legame per l'eparina.

Il terzo dominio Ig conferisce la specificità di legame verso il ligando FGF.

I recettori che vengono secreti ma non sono transmembrana sono delle varianti di splicing che utilizzano dei codoni di stop precoci (dopo IgI o dopo IgIII) (Johnson and Williams, 1993).

I recettori che vengono secreti ed hanno il dominio IgIII generalmente contengono l'esone IIIa e, sebbene non possano trasdurre direttamente un segnale

extracellulare, possono interferire indirettamente con il signalling sequestrando i ligandi FGF a livello della membrana plasmatica.



**Figura 5 (A) Rappresentazione delle possibili varianti di splicing dei quattro FGFR (modificata da Powers *et al.* 2000). (B) Rappresentazione strutturale degli esoni codificanti FGFR1 umano con le regioni codificanti i tre possibili domini IgIII (modificata da Powers *et al.*, 2000). La regione non tradotta al 5' (UTR) è rappresentata tratteggiata, la sequenza segnale (rettangolo a strisce), i tre domini Ig, il dominio acido (tra IgI e IgII), la regione transmembrana (rettangolo nero), i due domini chinasi (rettangoli puntinati). Gli asterischi rappresentano i codoni di stop e le frecce indicano i possibili siti di splicing. Come si può notare la sequenza 5' del dominio IgIII è seguita al 3' da tre diverse possibili sequenze.**

### 1.2.2 L'interazione eparina-FGF ed il suo ruolo nell'attivazione di FGFR

Una delle caratteristiche biologiche più importanti degli FGF è, come già accennato precedentemente, l'elevata affinità verso l'eparina, gli eparansolfati (HS) ed i proteoglicani eparansolfati (HSPG).

La famiglia dei glicosaminoglicani include l'eparina e l'eparansolfato, una molecola strutturalmente molto simile all'eparina.

I primi studi si sono focalizzati esclusivamente sull'interazione tra gli FGF ed l'eparina/HS ma successivamente dati ulteriori hanno chiaramente dimostrato che l'eparina/HS interagisce sia con gli FGF sia con gli FGFR e questo ha richiesto uno studio più approfondito riguardante il legame dell'eparina/HS al complesso FGF-FGFR.

L'interazione eparina-FGF è stata inizialmente studiata per FGF1 e FGF2, i quali sono stati per la prima volta isolati rispettivamente da Armelin (1973) e Gospodarowicz (1974) in frazioni parzialmente purificate di estratti pituitari bovini.

FGF1 e FGF2 si legano specificatamente a dei gruppi solfato nell'eparina/HS.

Per quanto riguarda invece FGF2, Baird *et al.*, (1988) hanno caratterizzato due domini funzionali per il legame all'eparina tramite l'utilizzo di due peptidi, corrispondenti alla sequenza amminoacidica 24-68 e 106-115 di FGF2. Ulteriori esperimenti, basati sull'analisi della struttura cristallografica di complessi FGF2-eparina (Faham *et al.*, 1996), hanno identificato altri due siti ricchi di amminoacidi basici. L'eparina quindi, non solo è importante nella strategia di purificazione di FGF1 e 2, ma ha anche un ruolo essenziale per la funzione di questi due fattori di crescita.

Il legame dell'eparina o dei HLGAGs agli FGF1 e 2 ha soprattutto due conseguenze fisiologiche funzionali:

1) protezione dei due FGF dalla denaturazione causata da ambiente acido e da calore, nonché dalla degradazione proteolitica.

Infatti il legame dell'eparina a FGF1 e a FGF2 protegge la degradazione di questi ligandi dalla degradazione rispettivamente da parte della trombina (Lobb; 1988) e della tripsina o della plasmina (Sommer and Rifkin, 1989; Saksela *et al.*, 1988).

2) creazione di una importante riserva di FGF.

Questo sistema permette ad esempio di mantenere gli FGF localizzati nell'ECM in una determinata popolazione cellulare durante lo sviluppo, anche tramite la

regolazione dell'espressione degli HLGAGs in prossimità della superficie cellulare (Gould *et al.*, 1995).

Il legame degli HLGAG a FGF2 induce in quest'ultimo un cambiamento conformazionale che ne favorisce il legame al suo recettore FGFR1 e FGFR2 (e di conseguenza l'attivazione) (Lindahl and Hook 1978; Mansukhani *et al.*, 1992).

Klagsbrun e Baird (1991) hanno in seguito proposto che quindi il ruolo degli HLGAG nel signalling mediato dagli FGF è:

- reclutare gli FGFs sulla superficie cellulare incrementandone così la concentrazione e quindi rendendo la successiva attivazione dei recettori FGFRs termodinamicamente più favorevole;
- legare gli FGF o gli FGFR, inducendo così dei cambiamenti conformazionali che rendono il loro legame assai più stabile.

Ornitz *et al.* (1992) hanno per primi dimostrato tramite esperimenti *in vitro* che l'attività mitogenica di FGF2 è eparina-dipendente; infatti FGF2 richiede l'eparina (che agisce facilitando l'oligomerizzazione di FGF) per legare e attivare FGFR1.

### **1.2.3 La dimerizzazione e l'attivazione di FGFR**

I recettori FGF, come tutti i recettori tirosin-chinasici, sono in grado di trasmettere diversi segnali extracellulari all'interno della cellula grazie all'attivazione di alcune vie di trasduzione del segnale.

In seguito al legame del ligando, avviene la dimerizzazione del recettore e l'auto-fosforilazione su specifici residui di tirosina della regione citoplasmatica (Lemmon and Schlessinger, 1994).

Il recettore attivato può a sua volta fosforilare ed attivare (direttamente od indirettamente tramite altre proteine adattatrici) svariate molecole trasduttrici del segnale (Pawson, 1995).

Poiché ogni dimero FGFR è a sua volta in grado di fosforilare e attivare altri omo- ed etero-dimeri FGFR, ciò permette di amplificare ulteriormente il segnale di trasduzione (Bellot *et al.*, 1991).

Il complesso trimolecolare FGF-FGFR-HLGAG è stabilizzato dall'insieme delle interazioni di queste componenti.

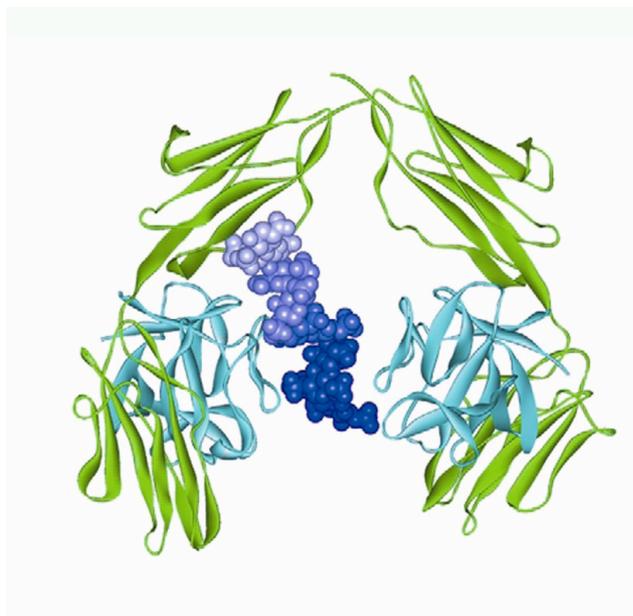
Nello scorso decennio la risoluzione dei complessi FGF-FGFR-eparina, tramite analisi cristallografica, ha permesso di ottenere nuove informazioni riguardanti le caratteristiche strutturali dell'interazione eparina-FGF ed eparina-FGFR.

Un gruppo di ricerca (Pellegrini *et al.*, 2000) ha proposto un modello (figura 7) risolvendo la struttura cristallografica del complesso ternario FGF1-FGFR2-eparina (figura 6), che si forma in soluzione aggiungendo le singole componenti purificate (FGF1, FGFR2 ed un deca-saccaride) secondo una stechiometria 2:2:1.

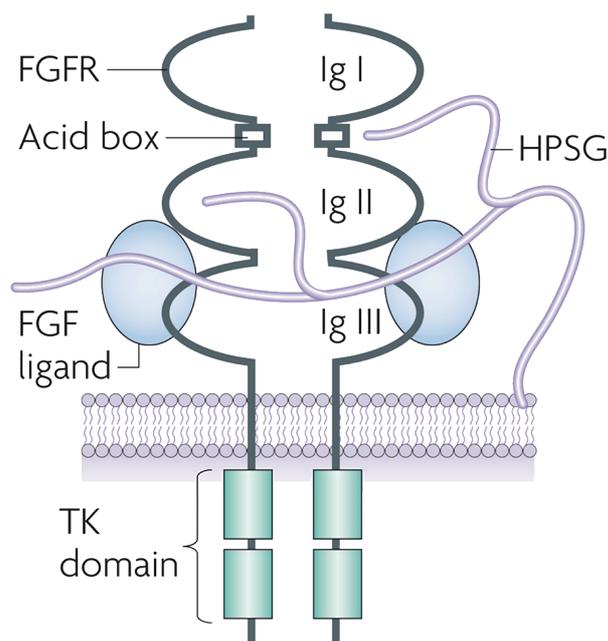
All'interno del complesso, costituito da 2FGF:1HPSG:2FGFR, il dimero FGFR è legato a 2 molecole FGF e questo rapporto 2:2 è stabilizzato dall'interazione con una catena HPSG che è posizionata in un solco tra FGFR-FGF.

Una singola molecola FGF lega IgII ed IgIII su FGFR2. Queste interazioni creano così all'interfaccia IgII-FGF un solco carico positivamente nel quale si può posizionare una singola molecola HPSG. Il dimero FGFR inoltre è stabilizzato anche dalle interazioni deboli di Van der Waals tra i domini extracellulari dei monomeri FGFR, probabilmente a livello della regione tra IgII e IgIII.

Questo modello mette in risalto il ruolo essenziale di HPSG nel crosslinking di due molecole di FGF che formano un dimero che tiene unite le catene dei due recettori. In altre parole l'HPSG fa da ponte tra due complessi 1:1 FGF-FGFR.



**Figura 6** Struttura cristallografica del complesso ternario FGF1-FGFR2-eparina secondo una stechiometria 2:2:1 (modificata da Luca Pellegrini *et al.*, *Current Opinion in Structural Biology* 2000). Ciascun FGFR è rappresentato in colore verde, gli FGF sono in azzurro e l'eparina è in blu (la porzione scura indica l'estremità riducente mentre quella più chiara l'estremità non-riducente).



**Figura 7** Rappresentazione del modello proposto da Pellegrini *et al.* (modificata da Turner and Grose *Nature Reviews Cancer* 2010).

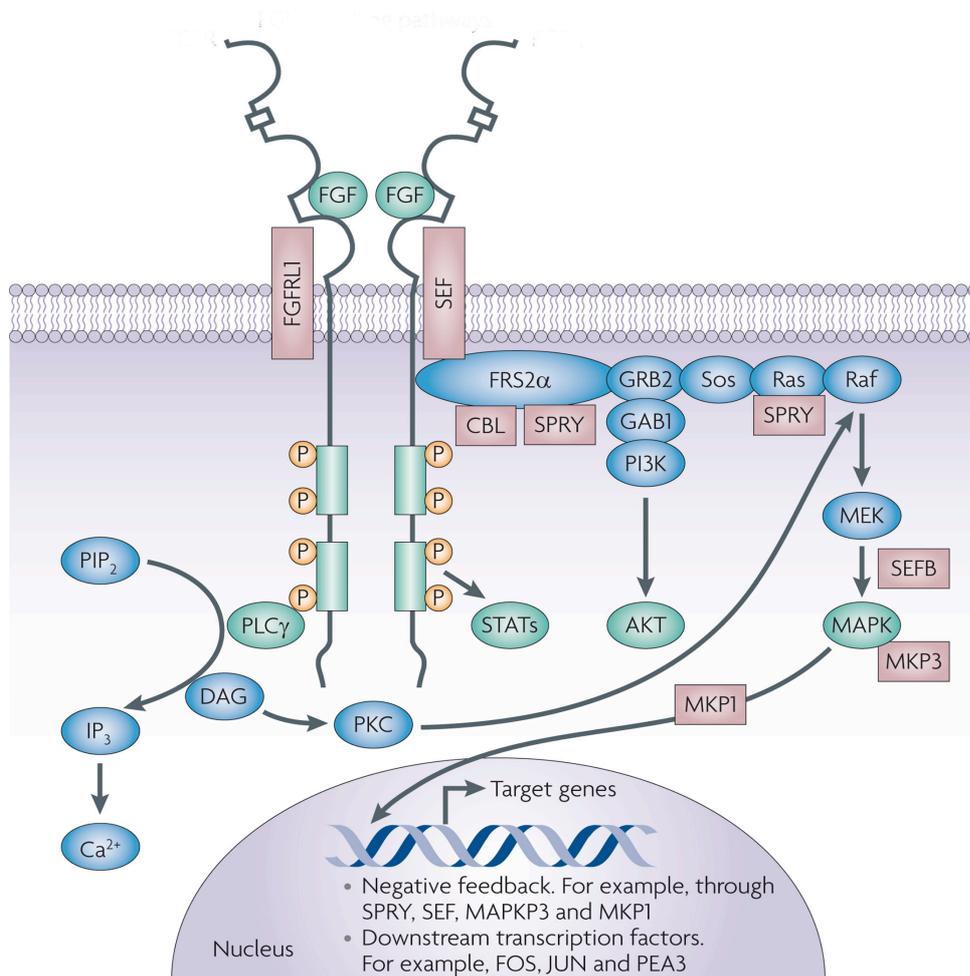
#### 1.2.4 Il signalling degli FGFR

La complessa cascata di trasduzione del segnale mediata dai recettori FGF riflette le molteplici funzioni fisiologiche che sono regolate da tali fattori. La maggior parte degli studi, volti a chiarire la dinamica del meccanismo di trasduzione del segnale, è stata condotta prendendo come prototipo FGFR1 (anche se i diversi isotipi FGFR hanno probabilmente dei pathways molto simili, poichè condividono una elevata omologia di sequenza amminoacidica) (Johnson and Williams, 1993). In effetti creando dei recettori chimerici, costituiti dal dominio extracellulare di PDGFR e dal dominio citoplasmatico di FGFR1, FGFR3 ed FGFR4, si è visto che essi differivano non nelle proteine target ma bensì nella forza di attività chinasi (Raffioni *et al.*, 1999).

In seguito al legame di FGF ed alla dimerizzazione del recettore, si verifica un cambiamento conformazionale nel recettore che ne attiva l'attività chinasi. Tale attivazione avviene tramite la transfosforilazione intermolecolare dei domini chinasi, ed intramolecolare delle code C-terminali del recettore. La fosforilazione avviene su alcuni specifici residui di tirosina: i siti fosforilati nella

regione catalitica regolano il livello di attività chinasi, mentre i residui fosforilati nella restante regione citoplasmatica, aumentano l'affinità di legame verso alcune proteine adattatrici (Powers *et al.*, 2000) che tipicamente presentano o dei domini SH2 (Src homology 2) o dei domini PTB (phosphotyrosine-binding domain).

Queste proteine possono essere direttamente fosforilate da FGFR e attivando così a loro volta degli specifici pathways (figura 8) (Eswarakumar *et al.*, 2005).



**Figura 8** Rappresentazione delle diverse cascate di trasduzione del segnale mediate da FGFR (modificata da Turner and Grose *Nature Reviews Cancer* 2010).

Le due proteine di circa 90 kDa ed altamente omologhe SNT-1 ed FRS2 $\alpha$  e  $\beta$  sono tra le proteine adattatrici meglio studiate.

SNT-1/FRS2 (FGFR substrate 2) sono veicolate sulla membrana plasmatica dopo una miristilazione post-traduzionale all'N-terminale ed hanno il dominio PTB che le rende altamente specifiche verso il dominio juxtamembrana di FGFRs (ma può legare anche altri recettori tirosin chinasi come NTRK1 e ALK).

La proteina FRS2, legata al recettore FGF attivato, viene fosforilata nella regione C-terminale su dei residui di tirosina specificatamente riconosciuti dai domini SH2 presenti in altre proteine adattatrici (Hadari *et al.*, 1998; Kouhara *et al.*, 1997).

Il complesso FRS2/GRB2 (growth factor receptor-bound2), unitamente a SOS (son of sevenless) recluta la proteina RAS sulla membrana plasmatica e la attiva. RAS-GTP successivamente attiva a valle la cascata trasduzionale che comprende la serina/treonina chinasi RAF, MEK che fosforila le MAPK (miogen-activated protein kinase), e le MAPK tra cui le due isoforme ERK1 ed ERK2 (Eswarakumar *et al.*, 2005).

In alternativa il complesso FRS2 $\alpha$ /GRB2/GAB1 (GRB2-associated binding protein 1) recluta la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) che a sua volta attiva AKT ed il pathway anti-apoptotico da questa dipendente (Altomare and Testa, 2005).

E' necessario specificare tuttavia che il recettore FGFR attivato è in grado di reclutare dei mediatori anche indipendentemente dal legame di FRS2.

Ad esempio PLC $\gamma$  (phospholipase C $\gamma$ ), grazie al dominio SH2, lega alcuni specifici residui di tirosina nella regione C-terminale del recettore, ed una volta attivata, catalizza l'idrolisi di PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato) a IP<sub>3</sub> (inositolo-3,4,5-trifosfato) e DAG (diacilglicerolo). IP<sub>3</sub> e DAG agiscono di concerto e attivano PKC (proteina chinasi C) che, fosforilando RAF, regola positivamente il pathway RAF-MAPK (Peters *et al.*, 1992; Klint and Claesson-Welsh, 1999).

Altro esempio è il signalling dipendente dalle STAT (signal transducer and activator of transcription) (Hart *et al.*, 2000).

Inoltre, come si può vedere in figura 8, esistono numerosi fattori (rappresentati in marrone) che possono regolare negativamente il signalling mediato da FGFR, intervenendo in diversi punti della cascata di trasduzione del segnale.

Ad esempio la degradazione o il riutilizzo del recettore è un processo almeno in parte dipendente dalla monoubiquitinazione effettuata da CBL (Thien and Langdon, 2001).

Le MAP chinasi ERK1 ed ERK2, possono inibire il reclutamento di GRB2, fosforilando la proteina adattatrice FRS2 su alcuni specifici residui di serina e/o treonina.

Più a valle nella cascata trasduzionale esistono altri regolatori negativi come MKP3 (MAPK fosfatasi3), SPRY (Sprouty) e SEF.

MPK3 può fosforilare ERK1 ed ERK2 in modo da inibire almeno in parte il signalling delle MAPK (Zhao and Zhang, 2001).

SPRY può bloccare il signalling delle MAPK o legando direttamente RAF, o agire quale competitore di SOS per il legame a GRB2, impedendo l'attivazione di RAS (SOS-dipendente) (Casici *et al.*, 1999; Hacohen *et al.*, 1998).

Nei vertebrati sono stati identificati quattro geni omologhi al gene *Dspry* in *Drosophila*, che agisce come regolatore negativo nel signalling che coinvolge *FGFR* nel sistema tracheale (Hacohen *et al.*, 1998) ma anche in altri signalling mediati da recettori tirosin chinasi come ad esempio *EGFR* (Casici *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 1999; Reich *et al.*, 1999). Nonostante la funzione di *Dspry* e *Sprouties* rispettivamente in *Drosophila* e nei vertebrati sia conservata ed associata all'organogenesi polmonare (Minowada *et al.*, 1999; Tefft *et al.*, 1999) e all'angiogenesi (Lee *et al.*, 2001), la loro espressione e funzione durante l'organogenesi non è ancora chiara.

SEF invece esiste come due isoforme: una transmembrana che interagisce direttamente con gli FGFR, ed una variante di splicing citoplasmatica. Entrambe le forme inibiscono la fosforilazione e l'attivazione delle ERK (Furthauer *et al.*, 2002; Tsang *et al.*, 2002; Tsang and Dawid, 2004).

### 1.2.5 Il gene *FGFR2* e le sue isoforme *FGFR2IIIb* e *FGFR2IIIc*

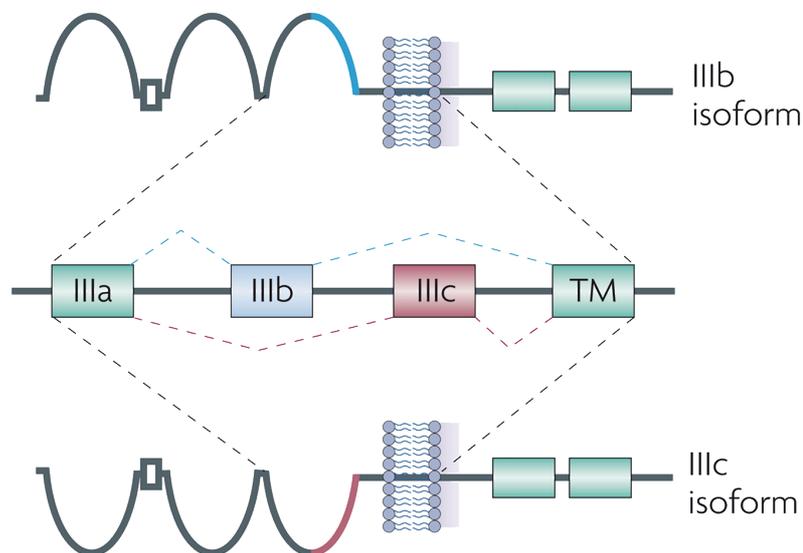
Il gene *FGFR2* nell'uomo mappa nella regione 26 del braccio lungo del cromosoma 10 (10q26) ed è costituito da 21 esoni.

*FGFR2* può generare due diverse isoforme *FGFR2IIIb* e *FGFR2IIIc* in seguito ad un evento di splicing alternativo che riguarda il terzo dominio Ig del trascritto e che avviene grazie alla presenza di alcune sequenze consenso probabilmente all'interno dell'introne 8.

Tali isoforme sono espresse in modo mutualmente esclusivo rispettivamente nelle cellule epiteliali e nelle cellule mesenchimali.

La variante *FGFR2IIIb* include gli esoni 1-6, 8, 9, 11-19, mentre la variante *FGFR2IIIc* consiste negli esoni 1-6, 8, 10-19 (Carstens *et al.*, 2000).

Come si vede in figura 9, la prima metà (IIIa) del dominio IgIII è presente in entrambe le isoforme, mentre la seconda metà è costituita rispettivamente da IIIb o IIIc.



**Figura 9** Rappresentazione dello splicing alternativo del dominio IgIII nel recettore FGF (modificata da Turner and Grose *Nature Reviews Cancer* 2010). TM indica il dominio transmembrana, mentre IIIa, IIIb e IIIc sono i domini Ig.

Nonostante tali isoforme differiscano solo nella metà C-terminale del terzo dominio Ig (dove infatti si osserva solo il 47% di identità di sequenza amminoacidica), la quale corrisponde agli esoni 9 o 10, e nonostante abbiano una evidente somiglianza nella struttura tridimensionale proteica, esse differiscono nell'affinità di legame verso il ligando (Ornitz *et al.*, 1996; Dell *et al.*, 1992; Yayon *et al.*, 1992; Miki *et al.*, 1992).

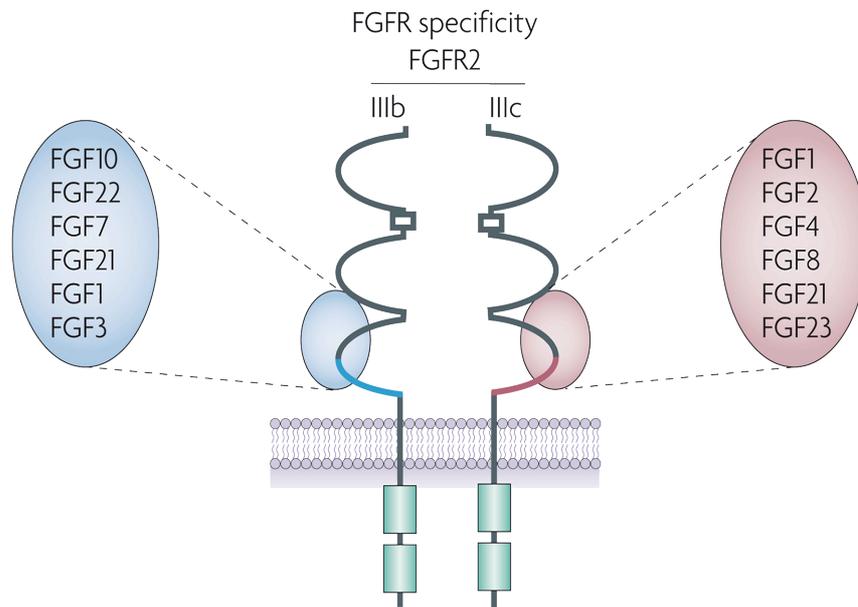
Attraverso la produzione di proteine chimeriche FGFR2 IIIb e IIIc è stato osservato che la diversa affinità delle due isoforme verso il ligando dipende da una sequenza di 50 amminoacidi differente per composizione (Yayon *et al.*, 1995).

L'isoforma IIIc lega con uguale affinità FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF4, FGF8, FGF21 e FGF23, mentre l'isoforma IIIb lega FGF1, FGF2 (ma quest'ultimo con un'affinità 1000 volte minore) FGF7 (KGF), FGF10 FGF21 e FGF22 (Ornitz *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006)(figura 10).

Il Keratinocyte Growth Factor (KGF o FGF7) e il Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10 o KGF2) sono quindi due specifici ligandi di KGFR, che legano con un legame ad alta affinità.

Essi presentano un'elevata omologia di sequenza e di espressione a livello tissutale (Yamasaki *et al.*, 1996; Emoto *et al.*, 1997) ed entrambi sono dei potenti mitogeni ed inoltre possono promuovere anche il differenziamento delle cellule epiteliali (Roubin *et al.* 1999; Visco *et al.*, 2004; Marchese *et al.*, 1990; Marchese *et al.*, 2001).

I due ligandi, pur presentando molte analogie, mostrano una differente richiesta di eparina/proteoglicani eparan solfati (HSPG) per il legame al recettore: l'eparina esogena, infatti, inibisce l'attività mitogenica del KGF ma favorisce l'attività dell'FGF10 (Igarashi *et al.*, 1998; Marchese *et al.*, 2001). Infatti, in presenza di eparina ed in alcuni modelli cellulari, l'FGF10 risulta essere un mitogeno più potente del KGF (Marchese *et al.*, 2001; Igarashi *et al.*, 1998).



**Figura 10** Rappresentazione della specificità di legame delle due isoforme FGFR2 verso i ligandi (modificata da Turner and Grose *Nature Reviews Cancer* 2010) I ligandi di FGFR2-IIIc sono in rosso mentre quelli di FGFR2-IIIb sono in azzurro.

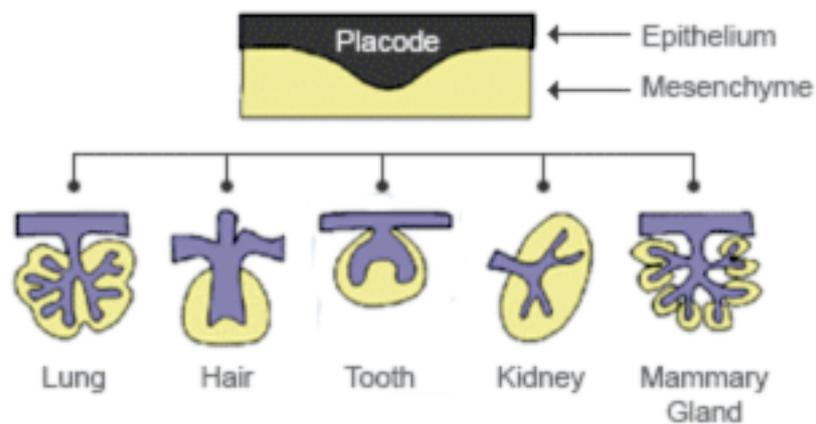
### 1.3 Interazione epitelio-mesenchima

L'interazione tra epitelio e mesenchima gioca un ruolo centrale nel controllo della crescita e della differenziazione dell'epitelio durante lo sviluppo embrionale (figura 11), la morfogenesi e la guarigione delle ferite di diversi tessuti (Donjacour and Cunha, 1991; Fusenig, 1994; Mackenzie, 1994). Ad esempio tutte le regioni dell'intestino si sviluppano da interazioni epitelio-mesenchimali che dipendono: dall'espressione sequenziale di una serie di geni specifici e basali, dalla regolazione dell'orologio dello sviluppo presente in tutte le aree di accrescimento, dai meccanismi di regolazione endogena e dalle influenze ambientali locali (Lebenthal 1989). Benché questi fattori riguardino tutti i tessuti in via di sviluppo, differenze a livello locale di uno qualsiasi di tali fattori promuovono il differenziamento, ad esempio della mucosa gastrica e degli epatociti. Altri esempi di interazioni epitelio mesenchimali sono l'interazione del mesenchima degli arti con l'ectoderma sovrastante che porta alla formazione degli abbozzi degli arti e la loro differenziazione oppure l'induzione del cristallino da parte dell'epitelio della coppa ottica.

Quando sono alterate queste interazioni posso portare a casi patologici (Cullen and Lippman, 1992, Sawhney *et al.*, 1992; Chung, 1993). Ad esempio è stato riportato che le proteine p107 e p130 sono espresse in modo differenziale durante il processo di differenziazione terminale in vitro dei cheratinociti (Paramio *et al.*, 1998; Paramio *et al.*, 2000). Analizzando la pelle di topi mutati per i geni di una o entrambe queste proteine è stata riscontrata un'alterazione della differenziazione in vivo dei cheratinociti, comportando un'alterazione dell'interazione epitelio-mesenchimale riscontrabile nell'alterazione dei follicoli piliferi e delle gemme dentali dei topi stessi (Ruiz *et al.*, 2003).

La natura dei segnali di origine mesenchimale responsabili della crescita e della differenziazione del tessuto epiteliale sono stati largamente studiati. Queste interazioni tra epitelio e mesenchima possono essere mediate da componenti della matrice extracellulare, da molecole associate alla superficie cellulare o da fattori di crescita solubili (ad esempio le citochine). Questi ultimi sono i più coinvolti in questo tipo di segnale, in quanto possono agire sia in modo autocrino e/o paracrino,

senza la necessità di un contatto cellula-cellula. Comunque queste tre vie di segnalazione non sono mutualmente esclusive in quanto l'azione di una può dipendere o essere mediata dall'espressione delle altre (Nathan and Sporn, 1991).



**Figura 11 Alcuni principi dello sviluppo nei mammiferi (tratto da SysCODE):** Molti organi dei vertebrati, tra cui le gemme dentali, le isole pancreatiche e le valvole cardiache si formano attraverso una serie reiterata , sequenziale e temporalmente distinta di interazioni epitelio-mesenchimali. Serie di segnali sono in sequenza scambiati tra i tessuti che interagiscono nei diversi stadi di sviluppo, con una conseguente differenziazione graduale di uno o di entrambi i tessuti. I segnali possono essere dati sia molecole di segnalazione solubili che da interazioni cellula-cellula tra i tessuti interagenti.

### 1.3.1 Ruolo degli FGF/FGFR nelle interazioni epitelio-mesenchima

Tra le molecole associate alla membrana cellulare, i recettori per i fattori di crescita dei fibroblasti (FGFRs) conducono un ruolo molto importante come modulatori delle interazioni epitelio-mesenchimali, essendo coinvolti in svariati processi biologici durante lo sviluppo embrionale e nel mantenimento dell'omeostasi dei tessuti dell'adulto. Ad esempio è stato dimostrato che in topi transgenici, in cui veniva a mancare la produzione di FGF7 anche se ancora vitali, si avevano malformazioni nello sviluppo del rene, con una riduzione dei rami uretrali e del 30% dei nefroni (Quiao *et al.*, 1999), mentre la delezione di FGF10 comporta una mortalità prenatale dovuta probabilmente al mancato o erroneo sviluppo di alcuni organi come arti e polmoni (Ohuchi *et al.*, 2000).

La via del segnale paracrina, specifica del KGF, lo rende uno dei favoriti tra i candidati coinvolti nei processi chiave della regolazione epitelio-mesenchima sia durante i processi fisiologici che patologici.

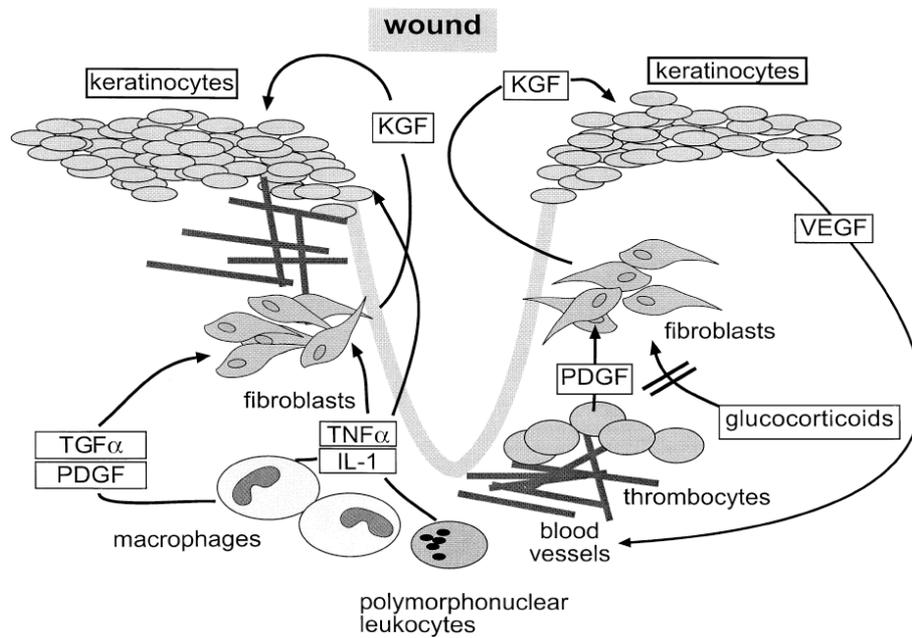
Uno dei processi fisiologici più importanti che coinvolge sia la partecipazione dei cheratinociti che dei fibroblasti, quindi un'interazione tra epitelio e mesenchima, è la guarigione delle ferite (figura 12). Infatti attraverso la modulazione della migrazione, della proliferazione e del differenziamento di queste cellule viene indotta una risposta infiammatoria nel sito della ferita, promuovendo la formazione di nuovo tessuto fino alla guarigione della ferita stessa. Un ruolo chiave in questo processo è giocato dal KGF, del quale è stato dimostrato un aumento di espressione durante la riepitelizzazione di pelle umana normale. Aumenti dell'espressione del trascritto del KGF sono stati riscontrati anche in modelli murini di guarigione delle ferite (Werner *et al.*, 1992) e un livello aumentato di riepitelizzazione è stato osservato successivamente all'applicazione ectopica di KGF ricombinante (Staiano-Coico *et al.*, 1993; Pierce *et al.*, 1994). Inoltre un livello relativamente basso di questo fattore di crescita è stato riscontrato nei tessuti danneggiati in particolari condizioni associate ad una compromessa guarigione delle ferite (Werner *et al.*, 1994; Brauchle *et al.*, 1995). Interessante è anche il fatto che l'effetto di alcuni farmaci, come il Phenitoin (PHT) di cui si conoscono i poteri di acceleratore nella guarigione delle ferite parodontali fin dal 1958 (Shapiro M., 1958) siano stati recentemente correlati con l'aumentata espressione a livello proteico e trascrizionale del KGF *in vitro* (Da set Olsen 2001)

L'importanza dell'interazione KGFR/KGF nella guarigione delle ferite è stata dimostrata anche da studi sul KGFR, il quale risulta strettamente modulato in questi processi (Marchese *et al.*, 1995). In particolare è stato visto che la deregolazione di questa via del segnale, in topi transgenici esprimenti un dominante negativo mutato del gene FGFR2IIIb nei cheratinociti basali, provoca un ritardo nella riepitelizzazione delle ferite (Werner *et al.*, 1994), infatti dall'analisi istologica dei tessuti si osserva un netto ritardo nella riepitelizzazione rispetto ai controlli sani, con una riduzione dei cheratinociti proliferativi nella zona della ferita ridotta dell'80-90%. Sorprendentemente Topi nulli per FGF7 non riportano alterazioni evidenti nella riparazione tissutale (Guo *et al.*, 1996), anche se studi successivi indicano in FGF10 il principale candidato in grado di compensare la mancanza del primo FGF (Beer HD *et al.*, 1997; Tagashira *et al.*, 1997; Jameson *et al.*, 2002).

Il coinvolgimento dell'asse KGFR/KGF nella guarigione delle ferite è stato recentemente dimostrato anche come conseguenza di un accumulo di ROS (cioè le specie reattive dell'ossigeno come ad esempio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i quali possono essere generati in risposta a vari stimoli, come calore, luce ultravioletta, infezioni e ferite meccaniche (Chapple IL 1997; Canakci *et al.*, 2005) e indurre l'attivazione e l'internalizzazione del recettore KGFR (Marchese *et al.*, 2003; Belleudi *et al.*, 2006).

L'espressione delle due isoforme FGFR2IIIb e IFGFR2IIIc è risultata essere alterata anche in due particolari tumori cutanei a carattere infiammatorio, quali il sarcoma di Kaposi (KS) ed il dermatofibroma (DF)(Skroza *et al.*, 2008; Cottoni *et al.*, 2009), nei quali sono espressi livelli elevati di citochine pro-infiammatorie (Samaniego *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998).

Nel KS è stato osservato un aumento di entrambe le isoforme, sia a livello trascrizionale che proteico, ed in particolar modo dell'isoforma FGFR2IIIc, in linea quindi con l'origine stromale di questo tumore; inoltre l'isoforma FGFR2IIIb è risultata sovraespressa, spesso ectopicamente nel derma. Dati analoghi sono emersi nel caso del DF.



**Figura 12** Schema di alcune interazioni epitelio-mesenchima durante la guarigione delle ferite. (Tratto da Werner Sabine., 1998)

### 1.3.2 Le citochine

In aggiunta ai “classici” fattori di crescita anche le citochine, oltre ad essere coinvolte nello sviluppo della risposta immunitaria, hanno mostrato avere un ruolo importante nella mediazione delle interazioni epitelio-mesenchima durante la guarigione delle ferite.

Le citochine sono proteine a basso peso molecolare di origine proteica o glicoproteica, con azioni regolatrici o infiammatorie, secrete da globuli bianchi e cellule di altra natura presenti nel corpo in risposta ad una serie di stimoli (Hoffman *et al.*, 2002).

Queste proteine svolgono un ruolo nel regolare lo sviluppo di cellule effettrici del sistema immunitario e, in alcune situazioni, possiedono di per se delle funzioni effettrici.

Le citochine si legano a recettori specifici sulla membrana di cellule bersaglio, provocando la trasduzione del segnale che in ultima analisi, è in grado di modificare l'espressione genica nelle cellule bersaglio stesse (Nicola, 1994).

La sensibilità della cellula bersaglio ad una particolare citochina è determinata dalla presenza di specifici recettori di membrana.

In generale, le citochine e i loro recettori mostrano un'elevata affinità l'uno per l'altro, con costanti di dissociazione che vanno da  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$  M (Nicola, 1994).

Poiché la loro affinità è così elevata, le citochine sono in grado di mediare effetti biologici a concentrazioni picomolari.

Un singola citochina può legarsi ai recettori presenti sulla membrana della stessa cellula che l'ha secreta, esercitando un effetto definito autocrino .

La citochina può legarsi a recettori sulle cellule bersaglio nelle vicinanze della cellula secernente, esercitando azione paracrina; in pochi casi tali proteine sono in grado di legarsi a cellule bersaglio localizzate a distanza nel corpo, esercitando un'azione endocrina (Ozaki et Leonard, 2002).

Le citochine regolano l'intensità e la durata della risposta immunitaria stimolando o inibendo l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione delle varie cellule e regolando la secrezione di anticorpi o di altre citochine.

Il legame di precise tipologie di citochine a cellule bersaglio, generalmente, stimola un'aumentata espressione di recettori per altre citochine e la secrezione di altre citochine, che colpiscono altre cellule target a loro volta. In tal modo le

citochine secrete anche da uno piccolo numero di linfociti attivati da antigene possono influenzare l'attività di numerose cellule coinvolte nella risposta del sistema immunitario. Ad esempio, le citochine prodotte da un linfocita T helper attivato sono in grado di influenzare l'attività dei linfociti B, dei linfociti T citotossici, dei linfociti T natural killer, dei macrofagi, dei granulociti, e delle cellule staminali del comparto ematopoietico, attivando così un'intera rete di interazione fra cellule.

Alle citochine vengono attribuite le caratteristiche di pleiotropia, ridondanza, sinergia, antagonismo e la cascata di induzione, che consente loro di regolare l'attività cellulare in una maniera coordinata e interattiva.

Nel momento in cui una data citochina svolge differenti effetti biologici su diverse cellule bersaglio, tale capacità viene definita pleiotropismo (Ozaki et Leonard, 2002).

Il termine citochine comprende proteine secrete da linfociti, sostanze precedentemente note come linfocine, e proteine secrete da monociti e macrofagi, sostanze precedentemente note come monochine.

Sebbene questi altri due termini continuino ad essere utilizzati, sono forvianti dato che la secrezione di molte linfocine e monochine non è limitata a linfociti e monociti come questi termini farebbero pensare, ma si estende ad un ampio spettro di cellule. Per questo motivo, il termine più inclusivo di citochine è da preferirsi.

Le citochine hanno generalmente una massa molecolare inferiore ai 30 kDa; studi strutturali hanno dimostrato che le citochine caratterizzate finora appartengono a quattro gruppi: la famiglia delle ematopoietine, la famiglia degli interferoni, la famiglia delle chemochine e, infine, la famiglia dei fattori di necrosi tumorale (Ozaki et Leonard, 2002).

Sebbene a volte la sequenza aminoacidica differisca considerevolmente, i membri appartenenti alla stessa famiglia presentano un elevato grado di omologia strutturale. Un esempio è costituito da 2 membri appartenenti alla famiglia delle ematopoietine, IL2 e IL4, che nonostante differiscano in maniera significativa per quanto concerne la sequenza aminoacidica, entrambe presentano un elevato grado di strutture ad  $\alpha$  eliche e scarse od assenti strutture a foglietti  $\beta$ . Tali molecole condividono un polipeptide simile in 4 regioni ad  $\alpha$  elica nelle quali prima e

seconda elica si sviluppano parallelamente; stessa struttura dicasi per la terza e la quarta. Tali  $\alpha$  eliche sono connesse attraverso un uncino (Ozaki *et Leonard*, 2002).

Per esercitare le loro funzioni biologiche le citochine devono innanzitutto legarsi ad un recettore specifico espresso sulla membrana di cellule target.

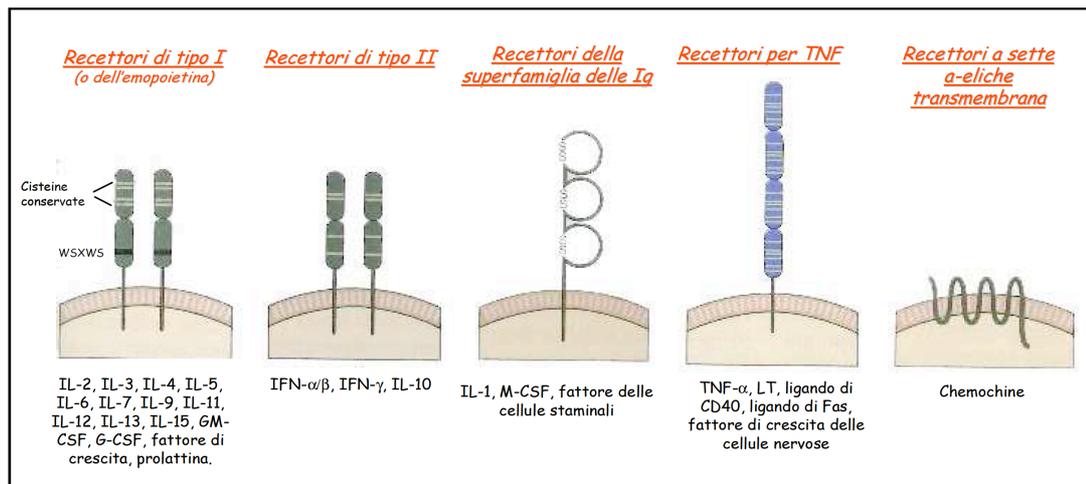
Poiché questi recettori sono espressi da una moltitudine di cellule diverse, le citochine possono agire su diverse tipologie di cellule.

La caratterizzazione biochimica dei recettori delle citochine inizialmente è stata molto difficoltosa vista la scarsa presenza di tali siti sulla membrana. Attraverso l'avvento di tecniche di biologia molecolare, in grado di clonare i geni codificanti per questi recettori, è stato possibile identificarli e caratterizzarli con maggior rapidità.

I recettori delle citochine vengono distinti in 5 famiglie di appartenenza nonostante vi sia una notevole differenza da un punto di vista strutturale (Barrett *et al.*, 1995; Prieschl *et al.*, 1995).

Tale suddivisione comprende (figura 13):

- la superfamiglia dei recettori per immunoglobuline;
- la famiglia di recettori citochinici di classe I, anche noti come famiglia dei recettori per l'ematopoietina;
- la famiglia di recettori citochinici di classe II, anche noti come famiglia dei recettori per l'interferone;
- la famiglia di recettori per i fattori di necrosi tissutale (TNF);
- la famiglia di recettori per le chemochine.



**Figura 13** Schematizzazione della struttura dei recettori per le citochine (Tratto da Abbas et al: *Cellular and Molecular Immunology 6e*). I recettori per le diverse citochine sono suddivisi in cinque famiglie sulla base della presenza di strutture o dominioni conservati nella porzione extracellulare. Sotto ciascun disegno sono elencate le citochine o i ligandi dei recettori stessi.

### 1.3.3 Le citochine pro infiammatorie e il loro ruolo nelle interazioni epiteliomesenchima

Da molto tempo si pensa che le citochine pro infiammatorie, incluse le interleuchine 1 $\alpha$  e 1 $\beta$  (IL1 $\alpha$  e IL1 $\beta$ ), IL6 e TNF $\alpha$ , giochino un importante ruolo nei processi alla base della guarigione delle ferite. Infatti esse influenzano vari processi nel sito della ferita, compresa la stimolazione dei cheratinociti e la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi e la degradazione delle proteine della matrice extracellulare, la chemiotassi dei fibroblasti e la regolazione della risposta immunitaria.

A supportare il ruolo delle citochine pro infiammatorie nella riparazione delle ferite vi sono varie evidenze, ad esempio è stato visto che durante la fase infiammatoria della guarigione l'espressione di IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  aumenta fortemente (Hubner *et al.*, 1996; Grellner *et al.*, 2000; Grose *et al.*, 2002). Queste sono prodotte per la maggior parte dai leucociti polimorfo nucleati e dai macrofagi, anche se ne è stata osservata l'espressione da parte di alcune cellule residenti (Feiken *et al.*, 1995; Hubner *et al.*, 1996). Il coordinamento

dell'espressione di queste citochine sembra essere importante nei normali processi di riparazione, infatti l'espressione di questi geni risulta fortemente ridotta dopo l'alterata riparazione delle ferite in topi trattati con glucocorticoidi (Hubner *et al.*, 1996) e prolungata nel diabete genetico db/db dei topi (Wetzler *et al.*, 2000).

Nel caso di IL1 è stato dimostrato che subito dopo la formazione della ferita viene rilasciata immediatamente dai cheratinociti, quindi oltre ad avere un effetto paracrino ha anche un effetto autocrino, aumentando la proliferazione e la migrazione dei cheratinociti stessi (reviewed in Raja *et al.*, 2007). Altro effetto importante riscontrato in questa citochina è la capacità di attivare i fibroblasti e aumentarne il rilascio di FGF-7 (Tang *et al.*, 1996).

Per quanto riguarda IL6 è stato dimostrato che questa citochina è importante nell'iniziare la risposta di guarigione; infatti la sua espressione è aumentata dopo la formazione di ferite e tende a persistere in quelle vecchie (Grellener *et al.*, 2000; Di Vita *et al.*, 2006; Finnerty *et al.*, 2006). Inoltre ha effetti mitogenici (Gallucci *et al.*, 2004) e proliferativi (Peschen *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999) sui cheratinociti, oltre ad essere chemioattrattiva verso i neutrofili. In topi "Knock-out" per IL6 è stato infatti riscontrato un ritardo nella guarigione delle ferite sino a tre volte superiore rispetto ai controlli normali a causa di un forte ritardo nella riepitelizzazione.

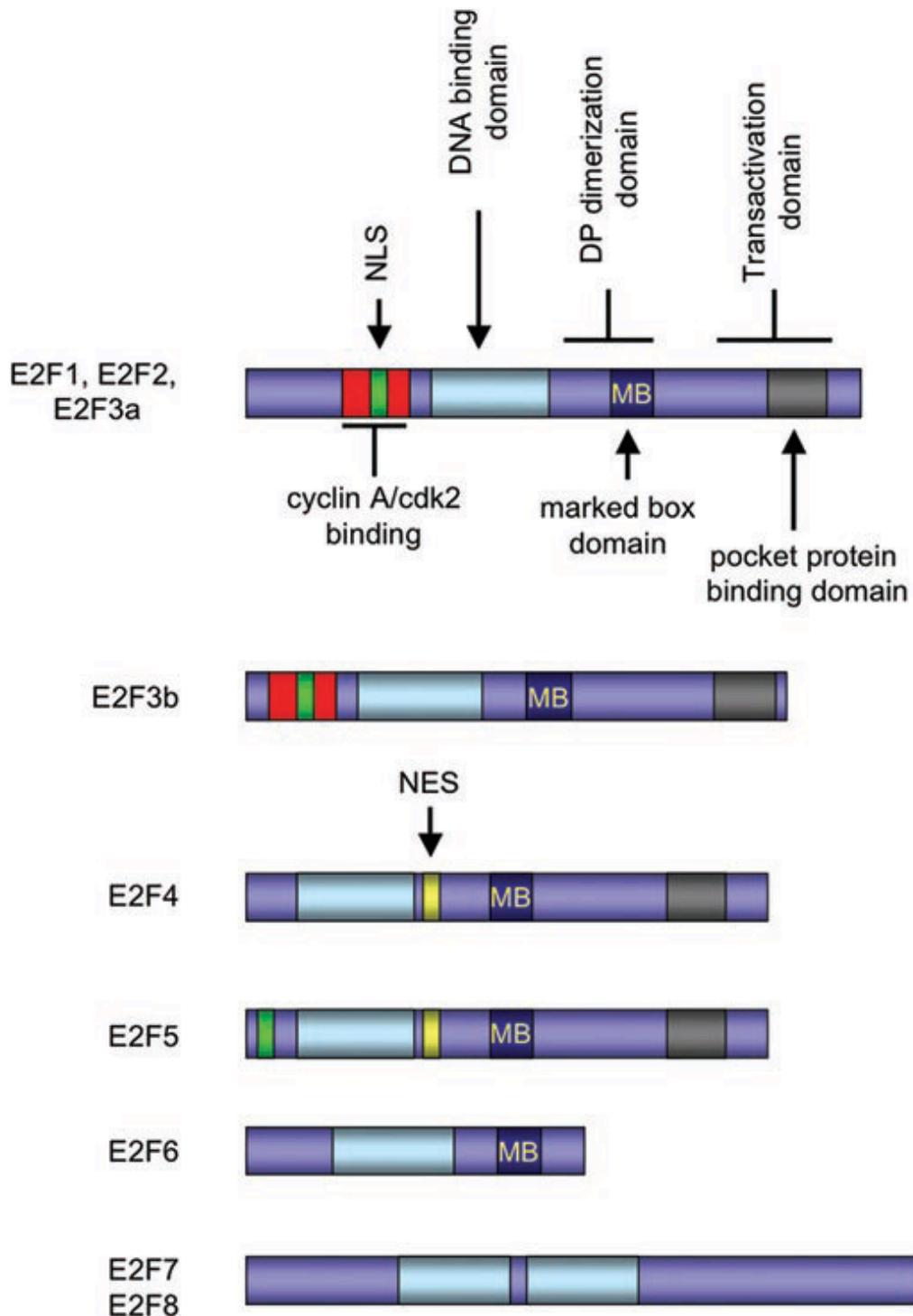
Anche nel caso di TNF $\alpha$  come per IL1 è stato riscontrata un'induzione nella produzione di FGF-7, facendo pensare ad un suo ruolo indiretto nei processi di riepitelizzazione (Kristensen *et al.*, 1993; Brauchle *et al.*, 1994).

#### 1.4 La famiglia E2F

I fattori di trascrizione E2F furono inizialmente scoperti e caratterizzati come fattori leganti il promotore del gene E2 dell'adenovirus (Kovesdi *et al.*, 1986; Kovesdi *et al.*, 1987). Successivamente a questa scoperta, l'osservazione che E2F fosse in grado di interagire con la proteina regolatrice del ciclo cellulare e soppressore dei tumori Rb (Chellapan *et al.*, 1991; Chittender *et al.*, 1991; Bandara *et al.*, 1991; Bagchi *et al.*, 1991) portò allo studio di tutti quei geni del ciclo cellulare che potevano essere influenzati da E2F.

Tipicamente i geni controllati dai fattori di trascrizione E2Fs sono repressi nelle cellule quiescenti ed indotti fortemente nelle cellule in proliferazione (Dyson, 1998): l'attivazione di E2F supera il blocco prodotto da Rb e ciò è sufficiente a spingere le cellule in fase S. Studi recenti hanno, tuttavia, evidenziato come E2F, in realtà, giochi un ruolo ben più vasto: esso agisce regolando non solo la proliferazione cellulare ma anche il differenziamento (Dimora and Dyson, 2005) e può essere così considerato sia un oncogene che un oncosoppressore. Ad esempio l'inattivazione di E2F1 nei topi porta ad atrofia testicolare così come alla formazione di tessuto tumorale specifico (Yamasaki *et al.*, 1998), mentre l'inattivazione di E2F2 porta a malattie autoimmuni (Murga M *et al.*, 2001).

Nei mammiferi l'attività di E2F è mediata dalla formazione di un gran numero di complessi: sono stati clonati 8 geni codificanti fattori di trascrizione della famiglia E2F (Figura 14), tre geni DP (DP1-3) e tre geni codificanti "Pocket Proteins" (pRb, p107, p130).



**Figure 14 Rappresentazione schematica dei domini della famiglia(modificata da Kelly A. McClellanRuth S. Slack\*2007 ).** Da notare che il dominio legante il DNA si conserva in tutti i membri della famiglia. NLS, “nuclear localization sequence”; NES, “nuclear export sequence”;MB, “marked box domain”.

La tradizionale famiglia dei fattori E2F può essere suddivisa in gruppi in base alle proprietà trascrizionali, alla regolazione e alle interazioni con le “Pocket Proteins”.

E2F1-2-3a sono potenti attivatori trascrizionali, interagiscono principalmente con pRb e sono espressi periodicamente durante il ciclo cellulare. E2F4-5 sono deboli attivatori trascrizionali e sembrano funzionare come repressori reclutando le “Pocket Proteins”: E2F4 può interagire con tutte le proteine di questa famiglia, mentre E2F5 si lega solamente a p130 (Ginsberg *et al.*, 1994; Hijmans *et al.*, 1995; Sardet *et al.*, 1995; Vairo *et al.*, 1995; Moberg *et al.*, 1996; Leone *et al.*, 2000; He y *et al.*, 2000). In generale, gli “attivatori” promuovono la progressione nel ciclo cellulare, mentre i “repressori” si ritiene siano necessari per l’uscita dal ciclo e per il differenziamento avendo, quindi, effetto opposto. E2F3b, uno dei membri della famiglia recentemente identificato, sembra funzionare come repressore ed è costitutivamente espresso così come E2F4 e 5. E2F6 sembra reprimere la trascrizione grazie all’interazione con le “Polycomb group proteins”, ma non con le “Pocket Proteins”, in quanto manca del sito di legame con esse; lavora in associazione con sia DP1 che DP2 (Morkel *et al.*, 1997).

Per quanto riguarda E2F7 come E2F8, esse non dimerizzano con le DP proteins, ne interagiscono con le “pocket proteins” (Logan *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005).

#### **1.4.1 Attività biologica della famiglia E2F**

Le proteine E2F/Rb sono un modulo per il controllo trascrizionale che collega l’espressione di geni richiesti per l’entrata in fase S con la progressione in ciclo, inclusi quelli per il metabolismo e la sintesi del DNA.

I repressori E2Fs (E2F4-5), complessati con le “Pocket Proteins”, sono prevalenti in G0 e in G1 precoce e i complessi vengono distrutti nella tarda fase G1. Questi reprimono attivamente la trascrizione mediante il reclutamento sui promotori da essi regolati, di istone deacetilasi (HDACs) e di altri fattori rimodellanti la cromatina. La fosforilazione Cdk mediata delle “Pocket Proteins” ne previene l’associazione sia con HDACs che con E2F4-5, consentendo in questo modo la trascrizione E2F-dipendente.

Al contrario, la forma attiva, ipofosforilata dei membri della famiglia Rb blocca l'entrata in fase S, inibendo il programma trascrizionale di E2F. Per esempio, il reclutamento di HDACs agli "E2F-responsive-promoters" in fibroblasti normali è controllato largamente da p107 e p130 durante il ciclo cellulare (Rayman *et al.*, 2002) validando l'ipotesi che Rb contribuisca alla repressione trascrizionale solo in certe condizioni, per esempio quando le cellule differenziano o diventano senescenti.

La fosforilazione delle "Pocket Proteins" si verifica dunque in tarda fase G1 e coincide con il "punto di restrizione", il momento dopo il quale una cellula non è più dipendente dai fattori di crescita presenti abbondantemente nel siero per completare il proprio ciclo cellulare. L'attività di Cdk4 e Cdk6 è indotta dal siero e con la fosforilazione di pRb queste chinasi iniziano un feedback positivo che culmina nell'attivazione del complesso Ciclina E-Cdk2.

La sovraespressione di E2F1-2-3 può indurre l'entrata in fase S in cellule private di siero, mentre E2F4-5 sono incapaci di indurre lo stesso fenomeno. Nell'induzione della fase S sembra giocare un ruolo fondamentale la localizzazione nucleare dei fattori E2Fs (Heiko Muller *et al.*, 1997).

E2F4 e E2F5 sono esportati dal nucleo e i livelli di E2F1-3 aumentano con la transizione dalla fase G1 a S. Perciò E2F4-5 occupano i promotori in fase G0/G1 mentre E2F1-3 sono associati ad essi preferenzialmente in fase S. Per esempio E2F4 è nucleare dalla fase G0 fino alla mid-G1 ed è prevalentemente citoplasmatico nella tarda fase G1, S e G2, al contrario di E2F1 che è assente in cellule quiescenti ed è prevalentemente nucleare nella fase G1 e S. È stato dimostrato che E2F4, quando sovraespresso, può promuovere l'entrata in fase S, similmente a E2F1 se dotato di una sequenza di import nucleare, suggerendo così che possieda la capacità di attivare la trascrizione di geni necessari per l'entrata in fase S (Heiko Muller *et al.*, 1997).

Bisogna tenere quindi presente che i membri della famiglia E2Fs sono diversamente espressi durante il ciclo cellulare. E2F1-2-3 sono indotti col passaggio alla fase S nella late G1 e in conseguenza al loro segnale di localizzazione (NLS) sono localizzati nel nucleo, così come se sovraespressi. Al contrario E2F4-5 non vanno incontro a grandi fluttuazioni di espressione in base alle diverse fasi del ciclo cellulare.

### **1.4.2 Geni bersaglio della famiglia E2F**

Inizialmente i geni bersaglio di E2F sono stati identificati ricercando sul promotore le sequenze di legame al DNA specifiche per E2F [TTTSSCGC] (Tao *et al.*, 1997). Attualmente questi geni sono riconosciuti come indotti nella transizione G0-G1, anche se negli ultimi anni, grazie a tecniche di microarrays e saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChiP), sono stati identificati nuovi geni bersaglio che non sono indotti in fase G1 tardiva, ma che si accumulano in fase G1 precoce o fase S/G2. Inoltre, sono stati identificati geni bersaglio non solo legati al controllo del ciclo cellulare, ma anche al riparo del DNA, ai fenomeni di apoptosi e di differenziamento e sviluppo (Bracken *et al.*, 2004).

Recentemente sono state scoperte interazioni tra i fattori di trascrizione E2F e i membri della famiglia FGFR; ad esempio per quanto riguarda il gene FGFR1 umano è stato dimostrato che questo viene attivato a livello trascrizionale dal E2F1 attraverso il riconoscimento di un sito non canonico presente sul promotore del gene FGFR1 (Kanai *et al.*, 2009), mentre per quanto riguarda il gene FGFR2 murino è stata evidenziata un'attivazione del promotore del gene da parte di alcuni membri della famiglia E2F, come E2F1-2-3 (Tashiro *et al.*, 2003), evidenziando per la famiglia di geni E2F un ruolo chiave anche in processi quali le interazioni epitelio-mesenchimali e la riparazione tissutale.

## *Scopo della tesi*

---

## 2 Scopo della tesi

Svariati studi hanno ormai dimostrato l'esistenza di una stretta relazione tra la deregolazione del signalling KGF/KGFR e la tumorigenesi; infatti un aumento dell'espressione di KGFR è frequentemente associato ad una trasformazione cellulare e ad una progressione maligna (Finch *et al.*, 2006).

Inoltre l'interazione tra epitelio e mesenchima, nel quale l'asse KGF/KGFR è uno dei protagonisti, gioca un ruolo centrale nel controllo della crescita e della differenziazione dell'epitelio durante lo sviluppo embrionale, la morfogenesi e la guarigione delle ferite di diversi tessuti (Donjacour and Cunha, 1991; Fusenig, 1994; Mackenzie, 1994).

Lavori precedenti realizzati nel nostro laboratorio hanno identificato una modulazione di espressione del KGFR nella progressione e stadiazione di due patologie cutanee a carattere infiammatorio quali il Sarcoma di Kaposi Classico (KS) e il Dermatofibroma (DF).

E' stato inoltre dimostrato come alcuni fattori di crescita, quali il bFGF e il VEGF, siano direttamente coinvolti nella progressione del KS, e il loro rilascio da parte delle cellule endoteliali sia probabilmente indotto dalla presenza di citochine proinfiammatorie, quali  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  e  $IFN\gamma$  (Samaniego *et al.*, 1997; 1998). Molto è già noto riguardo all'interazione fra citochine e fattori di crescita: per il KGF in particolare è già stato dimostrato che il rilascio  $IL1\beta$  dai fibroblasti del derma ne stimola l'espressione da parte dei fibroblasti, regolando di conseguenza in modo paracrino la proliferazione dei cheratinociti (Maas-Szabowski *et al.*, 1999; Schoop *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 2003). Molte meno informazioni si hanno invece sul ruolo delle citochine nella regolazione dell'espressione di recettori per fattori di crescita.

Partendo da queste premesse durante il mio percorso di dottorato ho analizzato il ruolo di alcune citochine pro-infiammatorie ed in particolare  $IL1\beta$ ,  $IL2$ ,  $IL6$ ,  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  coinvolte nel pathway infiammatorio di molte patologie tra cui KS e DF nella regolazione dell'espressione del KGFR.

## *Materiali e metodi*

---

### **3 Materiali e Metodi**

#### **3.1 Linee cellulari e trattamenti**

La linea cellulare umana di cellule embrionali renali HEK293 e la linea cellulare umana MCF-7 di adenocarcinoma della ghiandola mammaria, positiva al recettore alpha degli estrogeni, acquistate entrambe da American Type Culture Collection (ATCC-LGC Promochem, Teddington, UK), sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe, Germany), supplementato con 10% di siero fetale bovino e antibiotici.

Le colture primarie di fibroblasti umani sono state isolate da un 1 cm<sup>2</sup> di una biopsia di pelle da donatore, come precedentemente descritto (Scuderi *et al.*, 2008), sono state coltivate in DMEM supplementato con 10% di siero fetale bovino e antibiotici.

Le proteine umani ricombinanti IL1 $\beta$  e IL2 sono state acquistate dalla ditta Peprotech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA) mentre per quanto riguarda IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  queste provengono dalla ditta Invitrogen.

#### **3.2 Microscopia a immunofluorescenza**

Le cellule MCF-7, cresciute su vetrini, sono state deprivate del siero per 16 h e successivamente trattate per 24, 48 o 72 h con 10ng/ml delle citochine IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , o con 20 ng/ml della proteina ricombinante umana KGF (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) come controllo positivo .

Le cellule dopo i trattamenti sono state fissate per 30 min a 25°C con paraformaldeide al 4% e successivamente trattate per 20 min a 25°C con glicina 0,1M seguito da un trattamento addizionale di 5 min a 25°C in Triton X-100 0,1% allo scopo di permeabilizzare le cellule.

Per valutare la proliferazione, le cellule sono state incubate con un anticorpo policlonale anti-Ki67 di coniglio (1:50 in PBS; Zymed Laboratories, San Francisco, CA) il quale permette di identificare le cellule ciclanti. L'anticorpo primario è stato visualizzato attraverso un anticorpo Capra anti-coniglio IgG coniugato a Texas Red (1:100 in PBS; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grovr, PA).

I nuclei sono stati visualizzati con l'utilizzo di 4',6-diamido-2-fenilindolo diidrocloreuro (DAPI) (1:10000 in PBS; Sigma-Aldrich srl, Milano, Italy).

I segnali di fluorescenza sono stati analizzati registrando le immagini attraverso una fotocamera digitale SPOT-2 (Diagnostic Instruments Incorporated, Sterling Heights, MI) e utilizzando il software Axiovision (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany).

La percentuale di cellule positive all'anticorpo Ki-67 è stata valutata mediante la conta per ogni trattamento di un totale di 500 cellule prese in modo casuale da 10 campi visivi del microscopio in tre differenti esperimenti, espressa come valore medio  $\pm$  deviazione standard (SD) e riportata come grafico.

### **3.3 Immunoprecipitazione e Western blotting**

Per l'analisi di Western blot, le cellule MCF-7 non trattate o trattate con le differenti dosi (10 o 100 ng/ml) di citochine per i differenti tempi di trattamento (8, 24, 48 e 72 h) sono state lisate nel tampone RIPA. Le proteine totali (50-150 $\mu$ g) sono state separate in condizioni denaturanti attraverso 7% SDS-PAGE e trasferite sulla membrana Immobilon-FL (Millipore, Billerica, Ma). Per la visualizzazione del KGFR, la membrana è stata incubata per tutta la notte a 4°C con anti-bek, un anticorpo policlonale di coniglio specifico per il dominio intracellulare di KGFR/FGFR2 (C-17; diluizione 1:200 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguito dall'utilizzo dell'anticorpo secondario capra anti coniglio coniugato alla perossidasi di rafano (Sigma-Aldrich).

Per valutare la fosforilazione di pRb, le membrane sono state incubate con un anticorpo anti-fosfo-pRb (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Ma, USA). La rilevazione degli anticorpi specifici è stata ottenuta mediante reazione di chemiluminescenza (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL), seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Per valutare l'eguale caricamento delle proteine, le membrane sono state reidratate attraverso il lavaggio in TBS-T, il legame con il primo anticorpo è stato eliminato attraverso il trattamento con  $\beta$ -mercaptoetanolo 100mM e SDS al 2% per 30 min a 55°C, seguito da incubazione con l'anticorpo anti-tubulina (diluizione 1:1000, Sigma-Aldrich).

Per verificare l'associazione tra pRb ed E2F1, un milligrammo delle proteine totali è stato immunoprecipitato con 4 µg/ml di anticorpo monoclonale anti-pRB. Gli immunocomplessi aggregati con 50 µl di g-bind protein-G sepharose (Amersham Bioscience, Uppala, Sweden), sono stati lavati per 4 volte con 0,6 ml di buffer, separati in condizioni denaturanti attraverso SDS-PAGE al 10% e trasferiti su membrane. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo policlonale anti-E2F1 (diluito 1:500, Santa Cruz) per 1 h a 25°C seguito da incubazione con l'anticorpo secondario capra anti topo HRP e successiva reazione di chemiluminescenza. Per valutare l'eguale caricamento delle proteine, le membrane sono state reidratate, sono stati eliminati i legami con il primo anticorpo e successivamente incubate con l'anticorpo anti-pRb (diluito 1:1000). L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il programma Quantity One (Bio-Rad Laboratories srl, Segrate (MI), Italy). Brevemente, per i valori sperimentali è stato calcolato il segnale dell'intensità di ciascuna banda a cui è stato sottratto il fondo. Il valore risultante è stato normalizzato ed espresso come aumento dell'espressione rispetto al valore del controllo.

### **3.4 Estrazione RNA**

Dalle cellule trattate e non come per l'analisi Western blot è stato estratto RNA totale con il Trizol (soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, Invitrogen), un reagente che è in grado di mantenere l'integrità dell'RNA.

In breve, il Trizol è stato aggiunto ad ogni campione e ben miscelato per lisare le cellule; successivamente è stato aggiunto anche il cloroformio in modo da permettere, dopo centrifugazione a 13000 rpm a 4°C, la separazione della soluzione in una fase organica ed una acquosa. La fase acquosa contenente l'RNA è stata recuperata e portata a volume con isopropanolo assoluto per consentirne la precipitazione. In seguito, dopo lavaggio per l'eliminazione di sali con etanolo al 70%, l'RNA precipitato è stato risospeso in RNasi free water (Quiagen) per evitare che si degradi a causa della presenza delle RNasi.

### 3.5 Retrotrascrizione

Dell'RNA cellulare estratto tramite Trizol è stato successivamente retrotrascritto circa 1ug di mRNA in cDNA seguendo la procedura del kit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen).

La fase di denaturazione avviene a 65° per 5 min aggiungendo all'RNA 1 ul di oligo dT (0.5 ug/ul), 1 ul di dNTP (ciascuno 10 mM) ed dH<sub>2</sub>O fino ad un volume totale di 13 ul, mentre la successiva fase di retro trascrizione vera e propria richiede l'aggiunta alla miscela di reazione di 4ul di 5x Buffer FS, 1 ul di 0.1 DTT, 1 ul di RNase out (40 units/ul) ed 1 ul di SuperScript III RT. Tale soluzione viene incubata a 50°C per 60 min e poi a 70°C per 15 min; successivamente viene aggiunto 1 ul di RNaseA a 37°C per 20 min al fine di rimuovere l'RNA residuo.

### 3.6 Real-time PCR

La real-time PCR è stata svolta utilizzando i kit *Taqman Universal PCR master mix* e *Taqman gene expression assay* (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. In breve, l'amplificazione è stata svolta, in triplicato, in un volume finale di 25 ml utilizzando come templat 25 ng di cDNA. Le condizioni di temperatura per l'amplificazione sono state quelle standard: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 min per 40 cicli.

La posizione e la sequenza degli oligonucleotidi per l'analisi del gene KGF sono disponibili sul website della Applied Biosystem <http://myscience.appliedbiosystems.com> (ref. Hs00384281\_m1).

Per quanto riguarda le sonde KGFR e FGFR2-IIIc, queste sono state disegnate in modo da discriminare le due isoforme prodotte su richiesta dall' Applied Biosystems attraverso il servizio "custom TaqMan® Primer/Probe" ed usate alla concentrazione 1x.

GENE	FORWARD PRIMER SEQUENCE	REVERSE PRIMER SEQUENCE	REPORTER SEQUENCE
FGFR2-IIIb	GGCTCTGTTCAATGTGACCGA	GTTGGCCTGCCCTATATAATTGGA	TTCCCCAGCATCCGCC
FGFR2-IIIc	CACGGACAAAGAGATTGAGGTTCT	CCGCCAAGCACGTATATTCC	CCAGCGTCCTCAAAG

L'espressione dei geni è stata normalizzata con il controllo del gene *housekeeping* GAPDH (*Human GAPD (GAPDH) Endogenous control 20X*, Applied Biosystems).

L'analisi dei risultati è stata eseguita secondo il metodo comparativo con valutazione del ciclo soglia (Ct). Il Ct della GAPDH, è stato sottratto al Ct dei geni da analizzare in tutti i campioni. Si è ottenuto così il Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) cui è stato ulteriormente sottratto il  $\Delta Ct$  del controllo non trattato, ottenendo così il  $\Delta\Delta Ct$ . Il dato ultimo (RQ) viene calcolato con la formula ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Questo valore numerico evidenzia quante volte, in più o in meno, è espresso il gene d'interesse nel campione di analizzato rispetto al calibratore.

### 3.7 Ceppi e terreni

I ceppi di *E. coli* usati per le trasformazioni batteriche sono:

- One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*: F- *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1* *araD139*  $\Delta(araleu)$  7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*
- HIT®-DH5 $\alpha$  High 10<sup>8</sup> RH618: F- (80d *lacZ* M15) (*lacZYA-argF*)U169 *hsdR17*(r- m+) *recA1 endA1 relA1 deoR*

Il terreno utilizzato per *E. coli* è:

- Terreno LB: 1% triptone, 1% NaCl, 0,5% estratto di lievito con aggiunta di ampicillina (100  $\mu g/ml$ ) utilizzata come antibiotico per la selezione.
- Nei terreni agarizzati, l'agar è all'1,5%.

### 3.8 Vettori plasmidici e trasformazione batterica.

Allo scopo di poter studiare la regolazione dell'espressione del gene FGFR2, è stata clonata la regione putativa del suo promotore.

E' stato quindi amplificato il frammento -1102+459 (relativo al sito di inizio della trascrizione) utilizzando nella PCR come template DNA genomico umano e l'enzima STAR® HS Polymerase, seguendo le direttive della casa produttrice (Takara Bio Inc, Otsu, Japan) con i seguenti primer specifici:

(-1102+459) Fw 5'CTTCATCTATCTTCAGGCCTC 3'

(-1102+459) Rev 5'GATGGAGAAAGCGACGGAG 3'

Il prodotto di PCR purificato è stato poi inserito nel vettore commerciale JET1.2/blunt (Fermentas) e successivamente trasferito nel vettore commerciale pGL3 basic (Promega, Madison, WI USA) dotato, a valle del *polylinker*, di un gene reporter che tramite l'emissione di un segnale luminoso consente di verificare il livello di attività del gene, mostrando possibili differenze nell'espressione genica. Questo vettore è quindi utilizzabile in esperimenti di transattivazione in seguito a trasfezione transiente.

In seguito alla ligazione avvenuta per un'ora a temperatura ambiente ad opera della T4 ligasi (*Bioline Quick stick ligase*), il plasmide è stato amplificato tramite trasformazione batterica di un ceppo di *E.Coli* commerciale (Invitrogen).

Il gene per la selezione delle cellule trasformate codifica per la resistenza all'ampicillina.

Il DNA plasmidico è stato aggiunto alle cellule batteriche competenti e lasciato in ghiaccio per 30 min, successivamente sottoposto a shock termico a 42°C per 30 sec.

La sospensione batterica ottenuta dall'aggiunta di 250 ml di terreno SOC è stata poi mantenuta in agitazione a 37°C per 1 ora, i batteri sono poi stati seminati su piastre di *Luria Broth* (LB) agar (Sigma Aldrich) contenenti ampicillina (100 mg/ml). Dopo incubazione di circa 18 ore a 37°C, alcune colonie singole sono state prelevate e inoculate in 3 ml di terreno LB liquido contenente ampicillina (LBA). I singoli cloni sono stati incubati in agitazione per 18 ore a 37°C e le colture così ottenute sono state testate per la presenza del plasmide contenente l'inserito specifico. Per l'estrazione del DNA plasmidico è stato usato il kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) secondo il protocollo della casa produttrice. Il DNA ottenuto è stato poi digerito con enzimi di restrizione

specifici per 1 ora a 37°C ed il prodotto della restrizione è stato analizzato dopo corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

Il clone positivo è stato quindi inoculato in 100 ml di terreno LBA e fatto crescere per 18 ore a 37°C in agitazione vigorosa. Il DNA plasmidico da utilizzare per saggi di trasfezione è stato poi ottenuto mediante il kit *Pure Link HiPure Plasmid midiprep* (Invitrogen) secondo il protocollo della casa produttrice. La concentrazione del DNA plasmidico è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro.

Il sequenziamento del plasmide ha permesso di verificare la correttezza dell'inserto.

Una serie di regioni troncate del promotore sono state ottenute con la stessa procedura evitando il passaggio attraverso il vettore commerciale JET1.2/blunt; I Prodotti delle PCR sono stati purificati, digeriti attraverso endonucleasi specifiche e poi ligati all'interno del *polilinker* del vettore pGL3 basic.

I primer utilizzati per l'amplificazione sono i seguenti:

(-565+459)Fw 5' GGGCAGATGAAATAGAATCAC 3'

(-565+459)Rev 5 GATGGAGAAAGCGACGGAG' 3'

(-143+459)Fw 5'GTGTCTCCGGCTGCTCG 3'

(-143+459)Rev 5' GATGGAGAAAGCGACGGAG 3'

(-81+114)Fw 5'GGGGGTACCGCGCTGATTGGCAGAGAG 3'

(-81+114)Rev 5'GGGGCTAGCCCGAGCTTTGTGGCGGCCGC 3'

(-81+58)Fw 5'GGGGGTACCGCGCTGATTGGCAGAGAG 3'

(-81+58)Rev 5' GGGGCTAGCCCGCTCGGCTCTCCACC 3'

(-81+5)Fw 5'GGGGGTACCGCGCTGATTGGCAGAGAG 3'

(-81+5)Rev 5'GGGGCTAGCCGCCCCCGCCTCCTCGCG 3'

Gli 8 costrutti mutati del promotore troncato -81+58 sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di oligonucleotidi sintetici mutati nelle posizioni indicate (da +5 a +11; da +12 a +18; da +19 a+25; da +26 a +32; da +33 a +39; da +40 a +46 ; da +47 a +53 e da + 54 a +58) con una serie di T, poi clonati all'interno del *polilinker* del vettore pGL3 basic come precedentemente indicato.

### **3.9 Trasfezione transiente e saggio di luciferasi**

La trasfezione è una tecnica che, permettendo l'introduzione di DNA esogeno all'interno di cellule, consente di studiare le eventuali variazioni d'espressione dei geni d'interesse ad esempio verificarne l'attivazione a livello trascrizionale.

Gli esperimenti di trasfezione sono stati effettuati utilizzando il reagente liposomale *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) secondo il protocollo della casa produttrice.

In breve le cellule HEK293 sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una densità di  $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto e cotrasfettate con 1  $\mu$ g del costrutto basato sul vettore pGL3-basic e 300 ng del plasmide pRL-TK per la normalizzazione dell'efficienza della trasfezione. Per gli esperimenti in cui si valutava l'attivazione del promotore da parte di E2F1, le cellule sono state cotrasfettate con 100 ng del plasmide HA-E2F1 wt-pRcCMV (Addgene plasmid 21667) oppure della stessa quantità del vettore vuoto pRcCMV (Invitrogen). Nel caso dei trattamenti con le citochine, questi venivano effettuati dopo 6 h dalla trasfezione.

L'attività del promotore è stata saggiata utilizzando il kit *Dual-luciferase/renella reporter assay system* (Promega) con lettura al luminometro a piastra secondo il protocollo specifico. Le trasfezioni sono state effettuate in triplicato.

### **3.10 Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione**

Il DNA è stato digerito con enzimi di restrizione secondo le istruzioni della casa produttrice dell'enzima (Biolabs) al fine di caricarlo su gel d'agarosio sotto l'azione di un campo elettrico e verificare quindi la corretta grandezza delle bande ottenute.

### **3.11 Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)**

Il saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) è stato effettuato utilizzando il kit EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice Epigentek (Farmingdale, NY, USA).

In breve le cellule HEK293 non trattate e trattate con la citochina TNF- $\alpha$  sono state raccolte, trattate con paraformaldeide 1% per 10 min a temperatura ambiente e successivamente con glicina per 5 min. Le cellule sono state quindi lavate con PBS freddo e risospese in un tampone contenente inibitori delle proteasi e sonicate 3 volte per 10 sec con pause da 1 min in ghiaccio.

La cromatina estratta è stata immunoprecipitata per affinità con l'anticorpo policlonale E2F1 (Santa Cruz). Sono stati utilizzati anche degli anticorpi per il controllo positivo (anti RNA polimerasi II) e negativo (anti IgG di topo) forniti dal Kit. L'input ed il DNA immunoprecipitato sono stati amplificati mediante PCR utilizzando i seguenti primers specifici per amplificare il promotore FGFR2 nella regione -48 + 245 :

(ChIP) Fw 5'GAAACGGCTCGGGTTTCAGTGG 3'

(ChIP) Rev 5'CGAGTTGCGAAGGCTCAGAGC 3'

### **3.12 Analisi statistica**

Ogni gruppo di esperimenti è stato ripetuto almeno in triplicato ed è stata calcolata la deviazione standard. Per l'analisi statistica è stato utilizzato lo "Students two-tailed *t*-test" e il "P-values" minore di 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

## *Risultati e discussione*

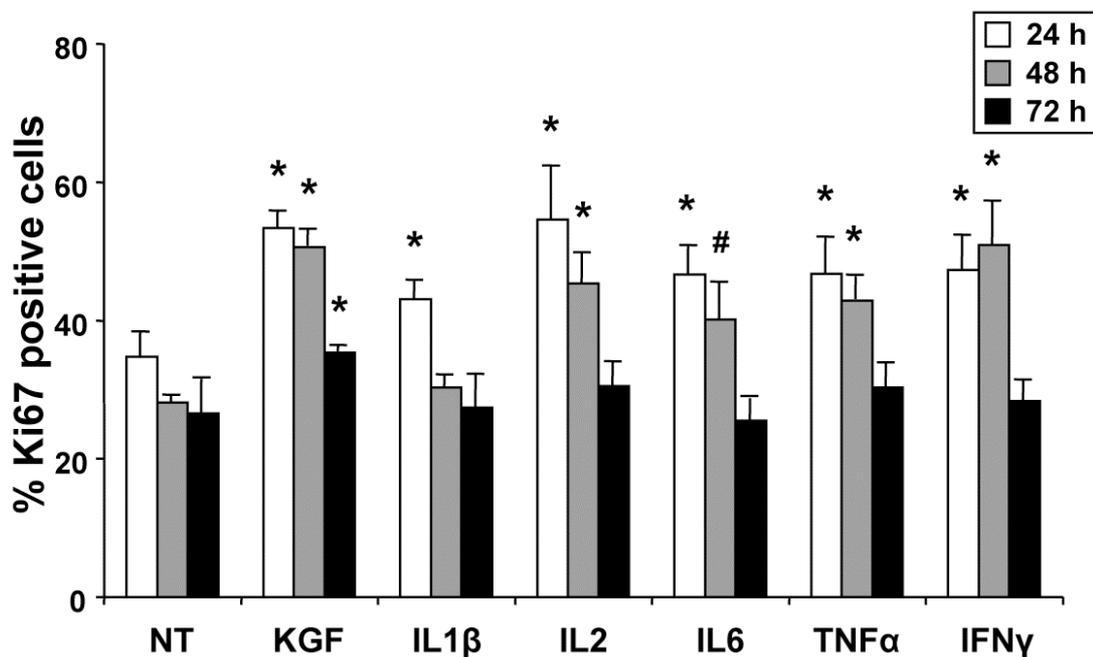
---

#### **4.1 Effetti delle citochine pro-infiammatorie sulla proliferazione delle cellule epiteliali**

Una prima serie di esperimenti è stata effettuata allo scopo di evidenziare gli effetti che le citochine infiammatorie potessero avere sulla proliferazione delle cellule epiteliali. Per questo la linea cellulare epiteliale MCF-7 è stata messa in coltura e successivamente le cellule sono state trattate con le citochine IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , e gli effetti di questi trattamenti sulla proliferazione cellulare sono stati analizzati attraverso la valutazione della colorazione con Ki-67, un indicatore conosciuto per la capacità di individuare le cellule in proliferazione.

Le colture cellulari quindi sono state trattate con le citochine(10ng/ml) e valutate dopo 24, 48 e 72 h in comparazione alle cellule non trattate. Il trattamento con il KGF alla dose di 20ng/ml è stato utilizzato come controllo positivo della proliferazione cellulare. La figura 1 mostra che dopo 24 h di trattamento tutte le citochine hanno avuto un effetto positivo sulla proliferazione delle MCF-7, con un effetto ancora più evidente a 48 h per tutte le citochine tranne IL1 $\beta$ , seguito da una diminuzione dell'effetto a 72 h, tempo in cui solo il KGF continua ad avere un significativo effetto proliferativo sulle cellule, come aspettato.

In conclusione, tutte le citochine prese in esame sembrerebbero avere un effetto nello stimolare la proliferazione delle cellule MCF-7, anche se in misura diversa: Nel caso del trattamento con IFN $\gamma$  e IL2 questo è apparso il più efficace, in particolare a 48 h (con un incremento rispettivamente di 1,81 e 1,61 volte,  $P < 0,01$ ), incremento della percentuale di cellule positive al Ki-67 paragonabile a quello indotto dal KGF (incremento di 1,80 volte,  $P < 0,01$ ), ma anche TNF $\alpha$  e IL6 inducono la proliferazione delle MCF-7 (con un incremento rispettivamente di 1,53 e 1,43 volte,  $P < 0,01$ ). Nel caso di IL1 $\beta$ , questa risulta efficace nell'indurre la proliferazione a 24 h (incremento di 1,24 volte,  $P < 0,01$ ) e non sembra indurre una proliferazione cellulare significativa a 48 e 72 h, almeno a questa dose.



**Figura 1. Effetto delle citochine sulla proliferazione cellulare delle MCF-7.** Analisi di immunofluorescenza con un anticorpo policlonale diretto contro Ki67 nelle cellule MCF-7 che sono state lasciate non trattate, trattate con 20 ng/ml KGF come controllo positivo o trattate con 10 ng/ml IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  per 24, 48 e 72 h. La percentuale di cellule positive al Ki67 è stata determinata contando il numero dei nuclei positivi al Ki67 rispetto al numero totale dei nuclei in dieci diverse aree prelevate a caso da tre diversi esperimenti. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. # P <0,05, \* P <0,01.

## **4.2 Valutazione degli effetti del trattamento con le citochine sull'espressione del KGFR nelle cellule epiteliali**

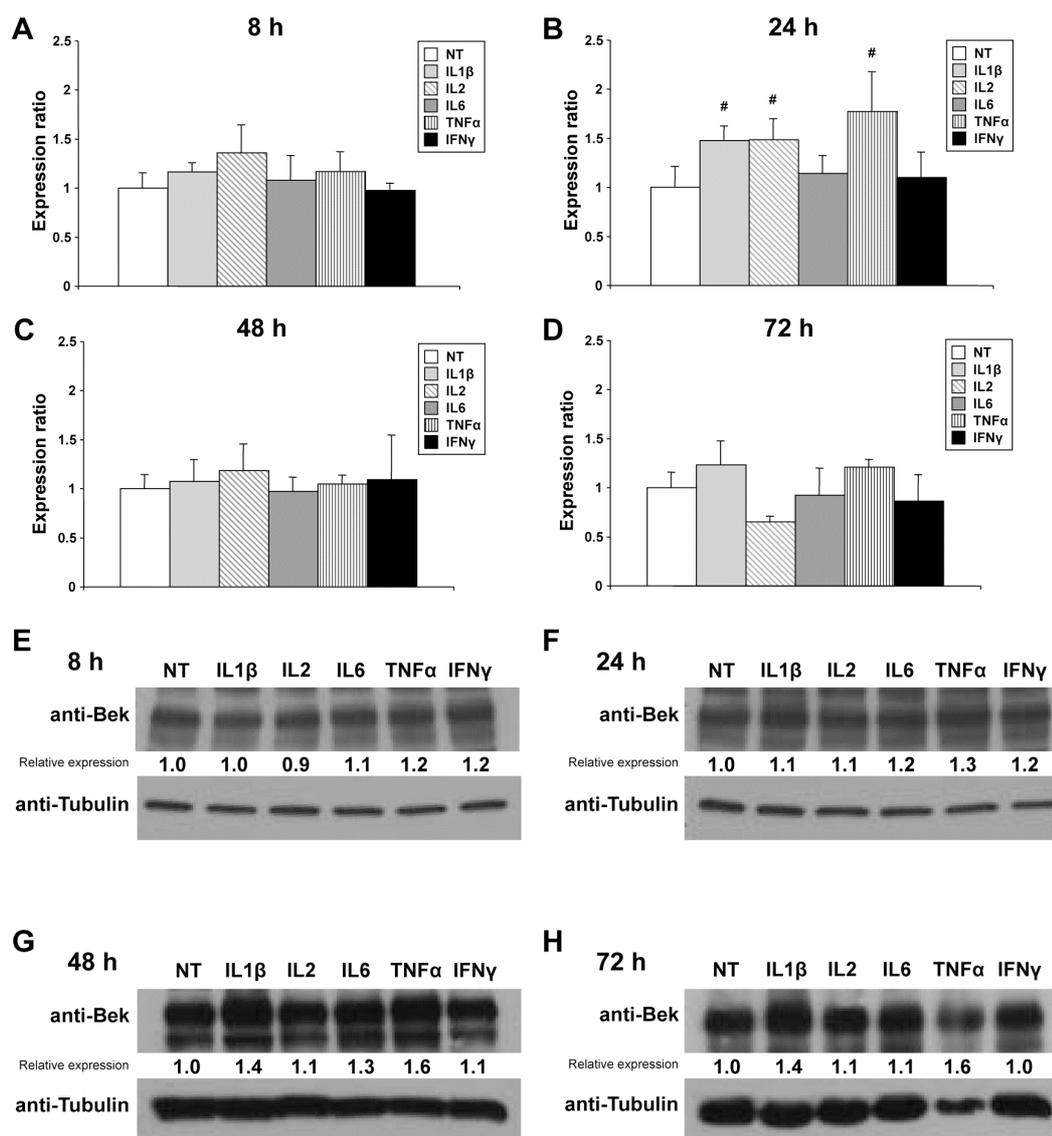
Dal momento che l'attivazione dell'asse KGF/KGFR è nota rappresentare una delle vie più importanti nell'indurre la proliferazione delle cellule epiteliali, e che l'aumentata espressione del KGFR è stata riportata nelle lesioni infiammatorie (Skroza *et al.*, 2008; Cottoni *et al.*, 2009), ho testato se il trattamento con le varie citochine prese in esame avesse effetti sull'espressione del KGFR. A tal fine le cellule MCF-7 sono state trattate per un massimo di 72 h e raccolte ad intervalli per analizzare l'espressione del KGFR sia a livello trascrizionale, valutando l'mRNA attraverso l'utilizzo della real-time PCR quantitativa, che a livello traduzionale, valutando le proteine attraverso la tecnica del Western blot.

Come mostrato in figura 2, non si evidenzia dopo 8 h di trattamento con IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  nessun aumento significativo del KGFR, ne a livello di mRNA (figura 2A), ne a livello proteico (figura 2E). Dopo 24 h il trattamento con TNF $\alpha$  e in misura minore quello con IL1 $\beta$  e IL2 induce un significativo aumento dell'espressione del KGFR a livello trascrizionale (rispettivamente con un incremento di 1,77, 1,48 e 1,48 volte,  $P < 0,05$ )(figura 2B) che non è ancora evidente a livello proteico (figura 2F). Tuttavia l'attivazione trascrizionale si riflette in un aumento rilevabile a livello di espressione proteica di KGFR nelle cellule trattate con IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  dopo 48 h (rispettivamente con un incremento di 1,4 e 1,6 volte;) e 72 h (rispettivamente con un incremento di 1,4 e 1,6 volte)(figura. 2G,H).

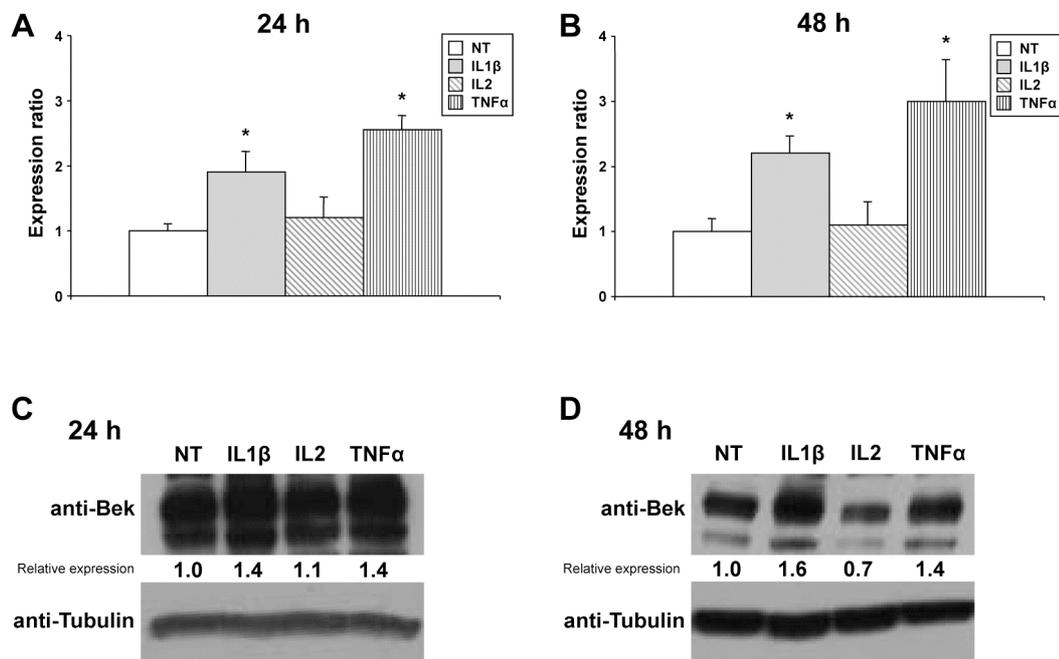
Per evidenziare gli effetti sull'espressione del KGFR, ho focalizzato la mia attenzione su TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL2, utilizzando concentrazioni più elevate di queste citochine(100ng/ml). In queste condizioni, a 24 h e a 48 h, sia IL1 $\beta$  che TNF $\alpha$  sono in grado di aumentare l'espressione dell'mRNA di KGFR con un incremento massimo rispettivamente di 2,2 e 3,0 volte (fig. 3A,B  $P < 0,01$ ). In questa serie di esperimenti, il livello di espressione proteica di KGFR riflette il corso dei livelli di mRNA, con un incremento significativo di proteina sia con il trattamento con IL1 $\beta$  che con TNF $\alpha$  dopo 24 h (rispettivamente con un incremento di 1,4 e 1,4 volte) che 48 h (rispettivamente con un incremento di 1,6 e 1,4 volte)(figura 3C,D). E' da notare che il trattamento con IL2 in queste condizioni non ha

confermato la sua efficacia nell'indurre un aumento dell'espressione del KGFR, probabilmente a causa della sua tossicità a questa concentrazione.

Presi insieme, questi esperimenti sembrerebbero indicare che uno degli effetti indotti dalle citochine rilasciate nell'ambiente infiammatorio, in modo particolare per IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , sia l'aumento dell'espressione del KGFR, un elemento chiave nella guarigione delle ferite.



**Figura 2. Effetto delle citochine sulla regolazione dell'mRNA e dell'espressione proteica di EGFR in cellule MCF-7.** (AD) Real-time PCR quantitativa relativa all'espressione dell'mRNA di EGFR in cellule MCF-7 dopo il trattamento con 10 ng/ml di IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  per 8, 24, 48 e 72 h. I valori dei livelli relativi di mRNA di EGFR sono mostrati come rapporto rispetto al livello di mRNA di EGFR presente nelle cellule non trattate. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato, ed i livelli di mRNA sono stati normalizzati per l'mRNA di GAPDH. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. # P < 0,05. (EH) Analisi Western blot dell'espressione della proteina EGFR in cellule MCF-7 non trattate o trattate con 10 ng/ml di IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  per 8, 24, 48 e 72 h. L'espressione proteica di EGFR è stata valutata con un anticorpo anti-bek. Il Western Blot con anticorpo anti-tubulina è stato utilizzato come normalizzatore del caricamento. L'intensità delle bande è stata valutata mediante l'analisi densitometrica, normalizzata e riportata come espressione relativa rispetto alle cellule non trattate.



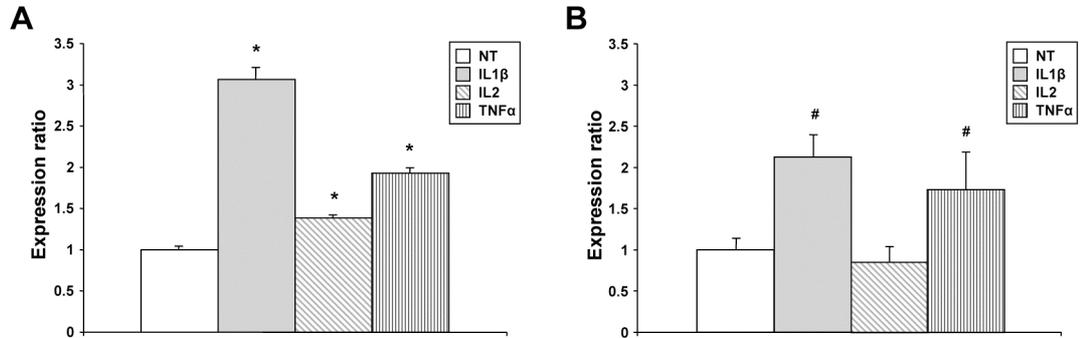
**Figura 3. Effetto di dosi più elevate di citochine sulla regolazione dell'mRNA e dell'espressione proteica di EGFR in cellule MCF-7.** (AB) Real-time PCR quantitativa relativa all'espressione dell'mRNA di EGFR in cellule MCF-7 dopo il trattamento con 100 ng/ml di IL1 $\beta$ , IL2 e TNF $\alpha$  per 24 e 48 h. I valori dei livelli relativi di mRNA di EGFR sono mostrati come rapporto rispetto al livello di mRNA di EGFR presente nelle cellule non trattate. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato, ed i livelli di mRNA sono stati normalizzati per l'mRNA di GAPDH. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. \* P < 0,01. (CD) Analisi Western blot dell'espressione della proteina EGFR in cellule MCF-7 non trattate o trattate con 100 ng/ml di IL1 $\beta$ , IL2 e TNF $\alpha$  per 24 e 48 h. L'espressione proteica di EGFR è stata valutata con un anticorpo anti-bek. Il Western Blot con anticorpo anti-tubulina è stato utilizzato come normalizzatore del caricamento. L'intensità delle bande è stata valutata mediante l'analisi densitometrica, normalizzata e riportata come espressione relativa rispetto alle cellule non trattate.

### **4.3 Ruolo delle citochine responsive nella modulazione dell'espressione del KGF e FGFR2IIIc nelle cellule mesenchimali.**

Le interazioni paracrine tra cheratinociti e fibroblasti che sono alla base dei processi di guarigione sono strettamente regolate dall'asse KGF/KGFR; Quindi, per confermare gli effetti delle citochine menzionate precedentemente sull'espressione del KGF a livello trascrizionale ho utilizzato delle colture primarie di fibroblasti umani. Come mostrato in figura 4A, tutte le citochine utilizzate sono in grado di stimolare l'espressione dell'mRNA di KGF. In particolare, IL1 $\beta$  ha aumentato il livello di mRNA fino a 3,07 volte (P<0,01), sebbene anche TNF $\alpha$  (incremento 1,93 volte, P<0,01) e in misura minore IL2 (incremento 1,39 volte, P<0,05) hanno dimostrato avere effetto sull'espressione di KGF.

Il duplice effetto di IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$  di stimolare l'espressione del ligando e del suo recettore (KGF e KGFR) sottolinea il ruolo di queste citochine nei processi fisiologici che coinvolgono la via del segnale KGF/KGFR in particolare riguardo alla proliferazione delle cellule epiteliali e la guarigione delle ferite.

Dato che il gene FGFR2 da origine al KGF nelle cellule epiteliali e alla sua variante di splicing alternativo FGFR2IIIc nelle cellule mesenchimali, ho valutato la possibile modulazione dell'espressione di FGFR2IIIc dopo trattamento con citochine in colture primarie di fibroblasti umani. L'espressione dell' mRNA di FGFR2IIIc nelle cellule trattate con IL1 $\beta$ , IL2 e TNF $\alpha$  è stata misurata mediante real-time PCR quantitativa, comparandola con l'espressione nelle cellule non trattate. Come mostrato in figura 4B, sia il trattamento con IL1 $\beta$  che con TNF $\alpha$  sono stati in grado di indurre un aumento significativo dell'espressione di FGFR2IIIc (con un incremento rispettivamente di 2,12 e 1,7 volte, P<0,05), confermando un effetto sulla trascrizione del gene FGFR2 in entrambi i tessuti.



**Figura 4. Effetto delle citochine sulla regolazione dell'espressione dell'mRNA di KGF e FGFR2-IIIc in fibroblasti umani primari.** (A) Real-time PCR quantitativa relativa all'espressione dell'mRNA di KGF in seguito al trattamento con 100 ng/ml di IL1 $\beta$ , IL2 e TNF $\alpha$  per 24 h. I valori dei livelli relativi di mRNA di KGF sono mostrati come rapporto rispetto al livello di mRNA di KGF presente nelle cellule non trattate. (B) Real-time PCR quantitativa relativa all'espressione dell'mRNA di FGFR2-IIIc in seguito al trattamento con 100 ng/ml di IL1 $\beta$ , IL2 e TNF $\alpha$  per 24 h. I valori dei livelli relativi di mRNA di FGFR2-IIIc sono mostrati come rapporto rispetto al livello di mRNA di FGFR2-IIIc presente nelle cellule non trattate. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato, ed i livelli di mRNA sono stati normalizzati per l'mRNA di GAPDH. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. # P <0.05, \* P <0,01.

#### 4.4 Ruolo delle citochine nell'attivazione del promotore di FGFR2

L'osservazione del consistente aumento di espressione dell'mRNA del KGFR e dell'FGFR2IIIC umano in seguito ai trattamenti con TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  mi ha portato ad indagare riguardo i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione della trascrizione del gene FGFR2. Fino ad ora sono poche le notizie relative al promotore del gene umano FGFR2, così come sono poco conosciuti i meccanismi coinvolti nel controllo della sua espressione. Il primo approccio da me intrapreso è stato quello dell'analisi della struttura della ipotetica sequenza del promotore al fine di trovare motivi *consensus* noti attraverso l'uso di software specifico (MatInspector 2.2). La mia attenzione si è focalizzata sia sui membri della famiglia STAT, noti essere coinvolti nella trasduzione del segnale della maggior parte delle citochine (Yoshimura *et al.*, 2006), sia sui motivi noti per rispondere ad E2F, dal momento che i membri della famiglia E2F sono stati precedentemente indicati nella regolazione di altri geni FGFR (Tashiro *et al.*, 2003; Kanai *et al.*, 2009). Nella figura 5A è stata rappresentata la posizione dei siti putativi in una regione che copre circa 1500 bp intorno al sito di inizio della trascrizione.

Per verificare se la regione analizzata contenesse elementi che sono stimolati dalle citochine, ho clonato questa frammento nel polylinker di in un vettore reporter esprime il gene della luciferasi, ed ho messo a punto un saggio di trans attivazione.

Il plasmide contenente la regione del promotore da 1,5 Kbp è stato trasfettato in cellule HEK293, una linea di cellule epiteliali che ha dimostrato essere un buon modello cellulare per esperimenti di trasfezione.

Dopo la trasfezione, le colture cellulari sono state trattate con le tre citochine che si sono dimostrate più efficaci negli esperimenti precedentemente mostrati. Come mostrato nella figura 5B, nessun aumento significativo dell'attività della luciferasi è stato osservato dopo il trattamento con IL1 $\beta$  e IL2, rispetto alle cellule non trattate. Tuttavia, il TNF $\alpha$  sembra essere efficace nell'indurre l'attivazione del promotore, portando l'attività della luciferasi ad un incremento del 145% rispetto alle cellule non trattate (P<0,01).

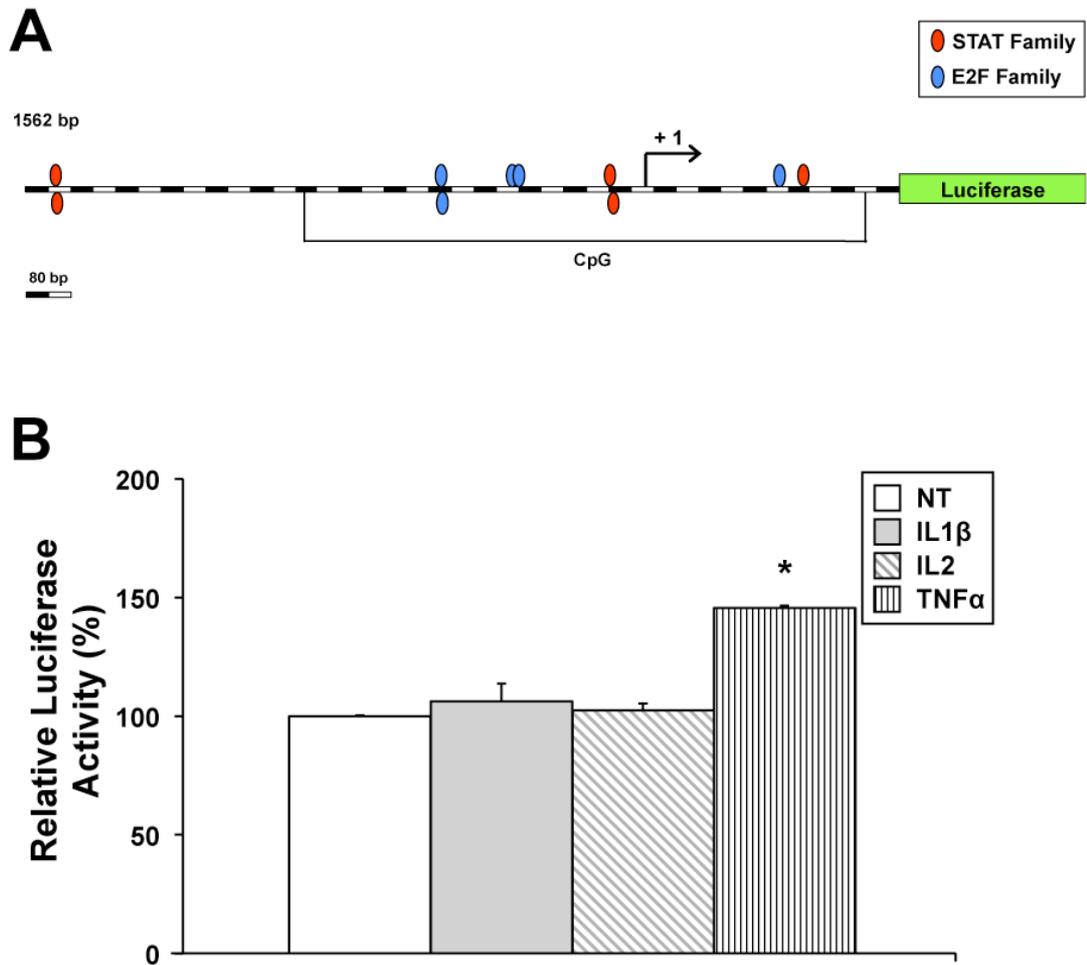
I meccanismi coinvolti nell'attivazione della trascrizione dei geni mediata dal TNF $\alpha$  sono stati precedentemente studiati (Tammali *et al.*, 2010), ed è stato dimostrato che il trattamento con TNF $\alpha$  induce l'attivazione della famiglia E2F. Inoltre, un ruolo potenziale di E2F-1 nell'attivazione della trascrizione degli

FGFR è stato indicato per l'omologo murino del gene FGFR2 così come per il gene FGFR1 umano (Tashiro *et al.*, 2009; Kanai *et al.*, 2009). Così ho deciso di effettuare degli esperimenti per verificare se nell'attivazione del gene umano FGFR2 può essere coinvolto il fattore trascrizionale E2F1.

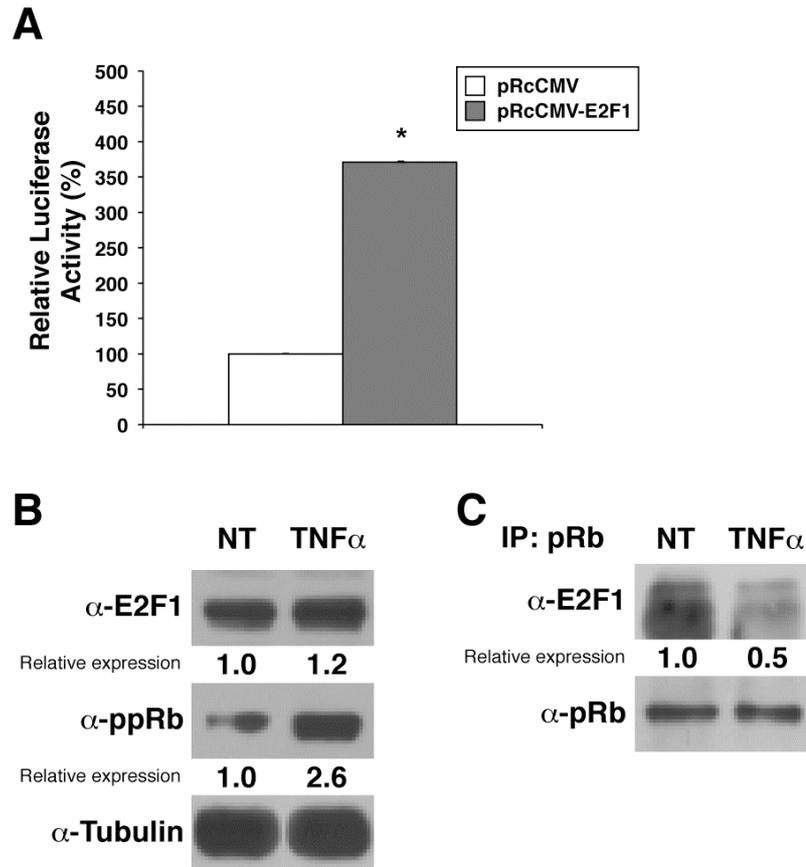
Quindi ho trasfettato il mio plasmide reporter nelle cellule HEK293, insieme ad un plasmide che esprime il fattore trascrizionale E2F1 (pRcCMV-E2F1). Come mostrato nella figura 6A, E2F1 è in grado di indurre una forte attivazione del promotore del KGFR, raggiungendo un valore di attivazione che è il 371% rispetto alle cellule co-trasfettate solo con il vettore vuoto (pRcCMV)( $P < 0,01$ ). La forma ipofosforilata di pRb si lega al fattore trascrizionale E2F1 impedendone la traslocazione nel nucleo e l'attivazione dei geni bersaglio (Nevins *et al.*, 1992), mentre la iperfosforilazione di pRb stimola il rilascio di E2F1 trascrizionalmente attivo. Quindi ho deciso di verificare lo stato di fosforilazione di pRb nelle cellule HEK293 dopo il trattamento con  $TNF\alpha$ . Come osservato in figura 6B,  $TNF\alpha$  induce fortemente la fosforilazione di pRb (2,6 volte).

Per dimostrare ulteriormente la dissociazione tra pRb ed E2F1, ho effettuato un esperimento di co-immunoprecipitazione.

Come mostrato nella figura 6C, nelle cellule non trattate sono stato in grado di co-immunoprecipitare pRb e d E2F1, mentre nelle cellule trattate con  $TNF\alpha$  immunoprecipitate con pRb, l'ammontare di E2F1 si è dimostrato notevolmente ridotto (0,5 volte), confermando il suo rilascio da parte di pRb, sebbene i livelli proteici totali della proteina E2F1 non sono stati influenzati dal trattamento con  $TNF\alpha$ , come osservato dall'analisi Western blot effettuata con un anticorpo anti E2F1. Pertanto è possibile ipotizzare che la trascrizione del gene umano FGFR2 indotta da  $TNF\alpha$  sia mediata da E2F1.



**Figura 5. Ruolo del TNF $\alpha$  nella stimolazione dell'attività del promotore di FGFR2.** (A) Rappresentazione schematica del costrutto del promotore di FGFR2, nel quale una porzione di 1,5 Kb intorno al sito di inizio della trascrizione del gene FGFR2 è legata al gene reporter della luciferasi. I siti di legame putativi per i fattori trascrizionali appartenenti alle famiglie STAT e E2F presenti sul promotore sono mostrati come ovali. (B) Il saggio dell'attività della luciferasi è stato effettuato in cellule HEK293. Il costrutto del promotore 1.5 Kb (-1138/+459) di FGFR2 ricombinante pGL3-basic è stato trasfettato nelle cellule HEK293, e non trattato o trattato con IL1 $\beta$ , IL2 e TNF $\alpha$  per 24 h, con successiva determinazione dell'attività della luciferasi. I dati del saggio di luciferasi sono espressi come percentuali del controllo (cellule non trattate) e rappresentano la somma di tre esperimenti separati dopo la normalizzazione in termini di efficienza di trasfezione effettuata con l'attività di pRL-TK. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. \* P < 0,01.



**Figura 6. Ruolo di E2F1 nella stimolazione del promotore di FGFR2 indotta da TNF $\alpha$ .** (A) Il saggio dell'attività della luciferasi è stato effettuato in cellule HEK293. Il costrutto del promotore 1.5 Kb (-1138/+459) di FGFR2 ricombinante pGL3-basic è stato cotrasfettato nelle cellule HEK293 con pRcCMV (vettore vuoto) o con pRc-CMV-E2F1, e sono state valutate le attività della luciferasi. I dati del saggio di luciferasi sono espressi come percentuali del controllo (cellule trasfettate solo con pRcCMV) e rappresentano la somma di tre esperimenti separati dopo la normalizzazione in termini di efficienza di trasfezione effettuata con l'attività di pRL-TK. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. \* P < 0,01. (B) Analisi Western blot dello stato di fosforilazione di pRb in cellule MCF-7 non trattate o trattate con 100 ng/ml TNF $\alpha$  per 3 h. La fosforilazione di pRb è stata valutata con un anticorpo anti-fosfo-pRb. Il Western Blot con anticorpo anti-tubulina è stato utilizzato come normalizzatore del caricamento. Le immagini sono rappresentative di almeno tre esperimenti indipendenti. L'intensità delle bande è stata valutata mediante l'analisi densitometrica, normalizzata e riportata come espressione relativa rispetto alle cellule non trattate. (C) Il test di co-immunoprecipitazione è stato eseguito per studiare le interazioni in vivo tra le proteine pRb ed E2F1. Cellule MCF-7 non trattate o trattate con TNF $\alpha$  sono state immunoprecipitate con un anticorpo anti-pRb e rivelate con un anticorpo anti-E2F1. Il Western Blot con anticorpo anti-pRb è stato utilizzato come normalizzatore del caricamento. Le immagini sono rappresentative di almeno tre esperimenti indipendenti. L'intensità delle bande è stata valutata mediante l'analisi densitometrica, normalizzata e riportata come espressione relativa rispetto alle cellule non trattate.

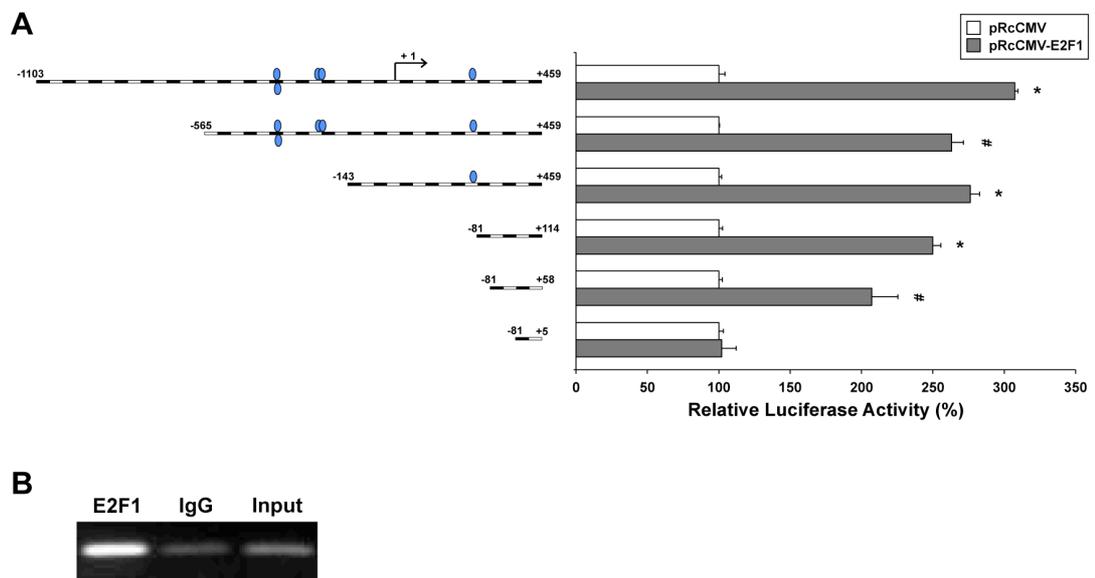
#### **4.5 Identificazione della sequenza del promotore del gene FGFR2 umano responsiva a E2F-1**

Come accennato in precedenza, ho effettuato la ricerca di sequenze putative leganti E2F nella regione del promotore del gene umano FGFR2, che va da -1103 a + 459, attraverso l'utilizzo di un software dedicato (MatInspector 2.2), trovando 5 possibili siti di legame come riportato nella figura 5A (ovali blu).

Per verificare la funzionalità di queste putative sequenze leganti E2F, ho generato una serie di frammenti del promotore di FGFR2 troncati, legati al gene reporter della luciferasi. Ognuno di questi costrutti è stato cotrasfettato rispettivamente con pRcCMV-E2F1 o con il vettore vuoto pRcCMV.

La figura 7A mostra che il primo costrutto ridotto (-565/+459), nel quale tutti i siti putativi di E2F sono conservati, mantiene una risposta consistente a E2F-1 (263%,  $P < 0,05$ ), con una riduzione trascurabile comparata al promotore non ridotto (307%,  $P < 0,001$ ). Inoltre un'attivazione simile (276%,  $P < 0,01$ ) è stata osservata anche in un costrutto più corto (-143/+459) che conserva solo uno dei cinque siti putativi leganti E2F. Anche il costrutto -81/+114, che ha perso l'ultimo sito di legame potenziale per E2F, mantiene una risposta significativa (250%,  $P < 0,01$ ).

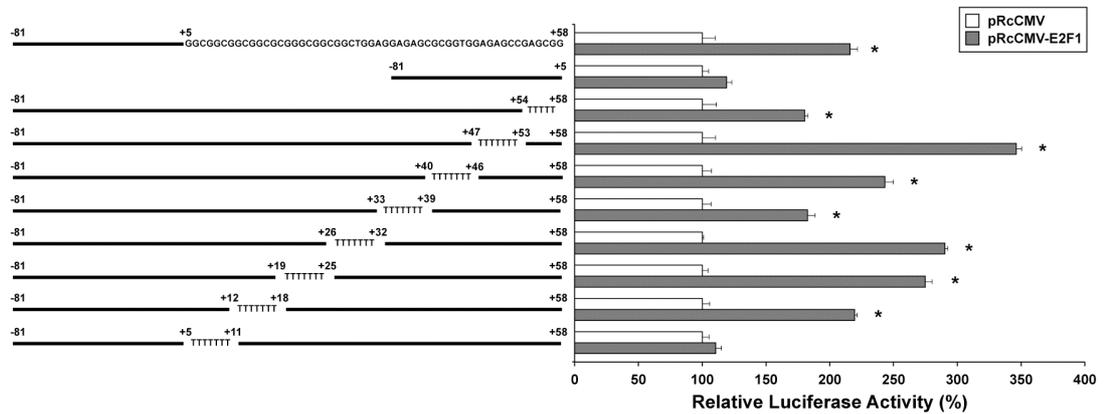
Uno studio precedente effettuato sul gene FGFR2 murino ha identificato un motivo non canonico legante E2F1 che ha un'omologia posizionale con il gene FGFR2 umano posizionata a +70/+77, anche se la sequenza non è conservata. Pertanto ho generato un costrutto -81/+55 privo della suddetta sequenza, che è ancora attivato da E2F1, anche se a livello leggermente ridotto (207%,  $P < 0,05$ ). Infine ho scoperto che un frammento più corto (-81/+5) perde la responsività ad E2F1, suggerendo che la regione legante E2F si trovi all'interno della sequenza +5/+58. Per supportare che E2F1 è fisicamente reclutato dal promotore endogeno dell'FGFR2 umano, ho effettuato una immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) con un anticorpo anti E2F1. Utilizzando come templati frammenti di DNA precipitati con l'anticorpo anti-E2F1, una coppia di primer è stata disegnata per amplificare la regione da -48 a + 245, regione che comprende il frammento precedentemente identificato attraverso i saggi di luciferasi come responsivo ad E2F. Come mostrato nella figura 7B, l'amplificazione della regione selezionata risulta consistentemente maggiore quando i frammenti di DNA sono stati immunoprecipitati con l'anti-E2F1, in confronto ai controlli, confermando che questa regione del promotore lega la proteina E2F1.



**Figura 7. Identificazione della regione responsiva ad E2F1 nel promotore di FGFR2.** (A) Analisi dell'attività dei costrutti ridotti del promotore di FGFR2 in cellule HEK293. Le cellule sono state cotrasfettate con diversi costrutti ridotti del promotore clonati nel pGL3-basic e con pRcCMV (vettore vuoto) o con pRcCMV-E2F1, e sono state valutate le attività della luciferasi. I costrutti del promotore di diversa lunghezza sono raffigurati sulla sinistra. I dati del saggio di luciferasi sono espressi come percentuali del controllo (cellule trasfettate solo con pRcCMV) e rappresentano la somma di tre esperimenti separati dopo la normalizzazione in termini di efficienza di trasfezione effettuata con l'attività di pRL-TK. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. #  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.01$ . (B) I lisati delle cellule HEK293 sono stati sottoposti a ChIP con gli anticorpi indicati (E2F1 o IgG). Il DNA immunoprecipitato e il DNA input sono stati sottoposti ad amplificazione della regione del promotore di FGFR2 che va da -48 a + 245 mediante PCR. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

#### 4.6 Caratterizzazione del minimo elemento responsivo ad E2F1

Dal momento che l'analisi genetica ha mostrato che non sono presenti motivi consensus leganti E2F1 nella regione +5/+58, ho ipotizzato che la trascrizione del gene umano FGFR2 potrebbe essere regolata da E2F1 mediante una sequenza non canonica legante E2F1, in linea con le osservazioni simili riportate nell'omologo murino (Tashiro *et al.*, 2003). Ho quindi effettuato degli esperimenti di mutagenesi sito-specifica sintetizzando 8 differenti frammenti del promotore -81/+58 contenenti mutazioni di tratti successivi di 7 nucleotidi nella regione da +5 a +58 (figura 8). I mutanti sono stati analizzati mediante saggi di luciferasi nelle cellule HEK293, a seguito di cotrasfezione con pRcCMV-E2F1 o con il vettore vuoto pRcCMV. Il primo costrutto mutato, da +54 a +58, ha mostrato un'attivazione del 180%, inferiore al costrutto originale (216%) ma comunque statisticamente significativo ( $P < 0,01$ ). I costrutti mutati da +47 a +53 e da +40 a +46, sono stati consistentemente attivati da E2F-1 (rispettivamente del 346% e 243%,  $P < 0,01$ ). Mentre il plasmide mutato da +33 a +39 è stato stimolato ad un'attivazione del 183% ( $P < 0,01$ ). I costrutti mutati nella regione da +26 a +32, da +19 a +25 e da +12 a +18 mantengono una significativa attivazione del gene reporter della luciferasi (rispettivamente del 290%, 275% e del 219%,  $P < 0,01$ ), mentre quando ad essere mutata è la regione da +5 a +11, E2F1 non è in grado di attivare il gene reporter, portandomi a postulare che il tratto di 7 nucleotidi 5'-GGCGGCG-3' può rappresentare il motivo non canonico legante E2F-1 all'interno del gene umano FGFR2.



**Figura 8. Analisi per mutazione dell'attività del promotore di FGFR2 in cellule HEK293.** I costrutti in cui pCL3-basic è stato legato a differenti regioni del promotore di FGFR2 (-81/+58 o -81/+5) o a sequenze sintetiche mutate in modo sequenziale di sette bp nella regione responsiva ad E<sup>2</sup>F1( +5/+58) sono stati cotrasfettati con pRcCMV (vettore vuoto) o con pRc-CMV-E2F1 in cellule HEK293, e sono state valutate le attività della luciferasi. I costrutti normali e mutati del promotore sono rappresentati sulla sinistra. I dati del saggio di luciferasi sono espressi come percentuali del controllo (cellule trasfettate solo con pRcCMV) e rappresentano la somma di tre esperimenti separati dopo la normalizzazione in termini di efficienza di trasfezione effettuata con l'attività di pRL-TK. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard. \* P < 0,01.

## DISCUSSIONE

I meccanismi alla base della complessa rete di rapporti esistente tra le cellule epiteliali e quelle mesenchimali non sono ancora pienamente compresi, ma gli FGF e la famiglia dei loro recettori FGFR sono riconosciuti come elementi chiave (Rubin *et al.*, 1995; Werner *et al.*, 1998; Werner *et al.*, 2003; Barrientos *et al.*, 2008). In questo lavoro ho analizzato gli effetti delle citochine infiammatorie nell'indurre l'espressione dei geni FGFR2 e KGF in cellule epiteliali e mesenchimali. La capacità delle citochine di stimolare l'espressione sia del KGF che del KGFR, attivando così un loop paracrino, è interessante soprattutto in relazione con i processi fisiologici e patologici che coinvolgono le interazioni derma-epidermide. Mentre l'attivazione della sintesi di KGF nei fibroblasti confermata nel mio studio è nota (Chedid *et al.*, 1994; Tange *et al.*, 1996; Maas-Szabowski *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 2003) poco si conosce riguardo la regolazione del gene umano FGFR2. A mia conoscenza nel presente studio è la prima volta che si evidenzia il ruolo delle citochine pro-infiammatorie nell'indurre l'aumentata espressione dell' mRNA del gene FGFR2 e l'attivazione della sua trascrizione. In questo studio ho osservato che l'espressione genica di FGFR2 può essere indotta in entrambe le linee cellulari epiteliali che nei fibroblasti primari umani trattati con IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , dando luogo rispettivamente al KGFR e a FGFR2IIIc, a seguito dello splicing alternativo istotipico. Questa osservazione sembra indicare che il reclutamento locale dei mediatori infiammatori durante la guarigione delle ferite promuove l'attivazione della via del segnale KGF/KGFR, contribuendo così alla riparazione tissutale.

Pochi sono gli studi precedentemente effettuati sui meccanismi molecolari che regolano l'espressione umana di FGFR2. Recentemente è stato segnalato che il fattore di trascrizione nucleare Y si lega alla regione prossimale del promotore di FGFR2 murino e ne attiva l'espressione in osteoblasti murini (Sun *et al.*, 2009).

In questo lavoro ho valutato gli effetti sulla sovraregolazione del gene FGFR2 e sull'attivazione del suo promotore da parte di quelle citochine pro-infiammatorie (IL1 $\beta$ , IL2, IL6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) che si sono rivelate efficaci nell'indurre la proliferazione delle cellule epiteliali. Tra queste IL2 sembrava indurre alcuni effetti a basso dosaggio, ma a dosi più elevate si è rivelato inefficace sull'espressione sia di KGFR che di FGFR2IIIc, probabilmente a causa di

un'attività tossica. Per quanto riguarda IL1 $\beta$ , questa induce l'attivazione di FGFR2 sia a livello proteico che di mRNA. Tuttavia non è stata osservata una transattivazione del promotore di FGFR2 dopo il trattamento con questa citochina, anche se all'interno del frammento del promotore che ho testato sono presenti potenziali elementi sensibili alla famiglia dei fattori trascrizionali delle STAT, conosciuti per essere attivati dalle interleuchine (Yoshimura *et al.*, 2006). Pertanto si potrebbe pensare alla possibilità che l'effetto di IL1 $\beta$  sul gene FGFR2 sia mediata da elementi al di fuori del frammento del promotore che ho considerato nel presente studio. In ogni caso, i meccanismi alla base della sovraregolazione di FGFR2 da parte di IL1 $\beta$  devono essere ulteriormente investigati e chiariti.

Per quanto riguarda TNF $\alpha$ , questo induce l'espressione di FGFR2 ed inoltre mostra attivarne il suo promotore. Qui ho dimostrato che l'induzione dell'espressione di FGFR2 da parte del TNF $\alpha$  è mediata attraverso il fattore trascrizionale E2F1. Questo evento è conseguente all'iperfosforilazione di pRb ed al conseguente rilascio di E2F1 nella sua forma attiva, come documentato dai saggi di co-immunoprecipitazione e Western blot, più che da un aumento della quantità totale della proteina E2F1. Questo risultato è in linea con le osservazioni simili riportate su un modello murino di cellule vascolari della muscolatura liscia (Tammali *et al.*, 2010). Una volta rilasciato, E2F1 esercita la sua attività trascrizionale sul gene FGFR2 legandosi direttamente al promotore, come dimostrato da esperimenti di ChIP.

L'osservazione che E2F1 transattiva l'espressione di FGFR2 mi ha portato ad analizzare la regione del promotore del gene alla ricerca di motivi rispondenti ad E2F1. Sono in fine riuscito ad identificare una regione che si trova tra le posizioni +5/+11 relative al sito di inizio della trascrizione, la cui mutazione abolisce l'attività di E2F1. Questo tratto di nucleotidi 5'-GGCGGCG-3' non corrisponde a motivi consensus noti rispondere ad E2F1, né agli elementi non canonici leganti E2F precedentemente identificati nell'FGFR2 murino (Tashiro *et al.*, 2003) o nell'FGFR1 umano (Kanai *et al.*, 2009), quindi può essere considerata una nuova sequenza rispondente ad E2F1.

Nel gene umano FGFR1 le sequenze responsive ad E2F1 si trovano nei pressi del sito di inizio della trascrizione (+4/+22 e +25/+43) (Kanai *et al.*, 2009). Questo risultato è in linea con la mia osservazione nel gene FGFR2 umano, portandomi a considerare che meccanismi simili di attivazione del gene si siano conservati

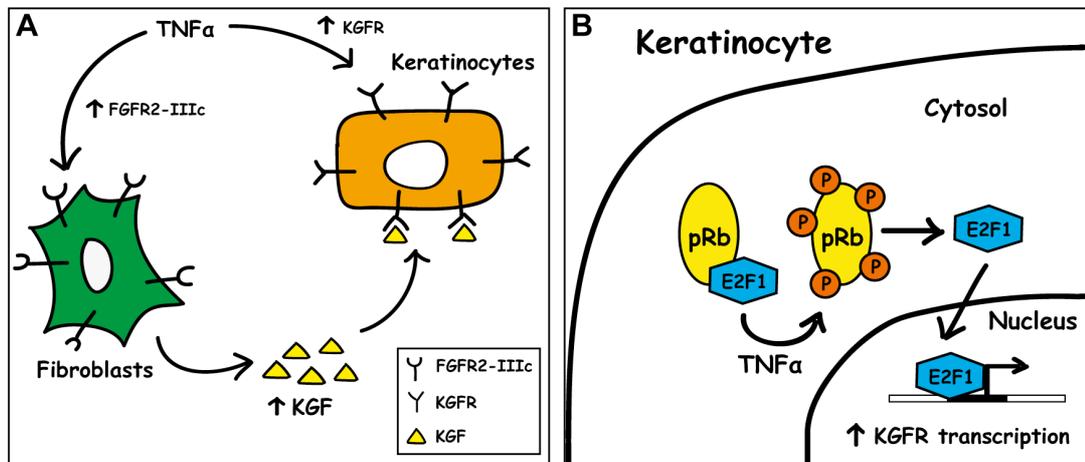
almeno per i primi due membri della famiglia degli FGFRs. E' interessante notare che mutazioni della sequenza nei punti +47/+53 portano ad una forte attivazione di FGFR2 da parte di E2F1, più alta rispetto a quella ottenuta con il costrutto parentale. Tale osservazione mi ha portato a ipotizzare che questa regione potrebbe contenere un elemento potenzialmente legato da un repressore trascrizionale di FGFR2.

In conclusione, nel presente studio suggerisco un semplice modello per spiegare il ruolo ed il meccanismo d'azione del TNF $\alpha$  e del KGFR nella regolazione delle interazioni epitelio-mesenchimali durante la guarigione delle ferite (figura 9). Il primo passo che si verifica in vivo è il reclutamento di TNF $\alpha$  nel sito di infiammazione; quindi TNF $\alpha$  può agire sia sui fibroblasti, stimolando l'espressione di FGFR2IIIc e la produzione di KGF, sia sui cheratinociti, inducendo l'aumento dell'espressione del KGFR. La sovraregolazione del ligando (KGF) e del suo recettore (KGFR) può stimolare la via del segnale KGF/KGFR, con un conseguente aumento della proliferazione delle cellule epiteliali, che rappresenta un passo fondamentale per la riepitelizzazione (figura 9A). Uno dei potenziali meccanismi alla base dell'aumento di KGFR indotto da TNF $\alpha$  implica la capacità di questa citochina di fosforilare pRb, permettendo così il rilascio del fattore trascrizionale E2F1 e la sua traslocazione dal citosol al nucleo, dove si lega al promotore di FGFR2 attraverso una sequenza responsiva ad E2F all'interno della regione situata in posizione +5/+11, guidando la trascrizione del gene FGFR2 (figura 9B).

La deregolazione del gene FGFR2 è stata evidenziata in diverse patologie umane, come nel melanoma, e nei tumori della tiroide, della mammella, del polmone, dello stomaco e delle ovaie, in cui una sovra o sotto modulazione dell'espressione del KGFR è stata osservata nelle cellule epiteliali (St Bernard *et al.*, 2005; Finch *et al.*, 2006; Katoh, 2008; Katoh *et al.*, 2009; Gartside *et al.*, 2009).

Nel carcinoma mammario, l'espressione alterata di KGF/KGFR è stata ampiamente studiata ed è stato dimostrato che il silenziamento dell'espressione di KGFR è efficace nel ridurre la proliferazione delle cellule tumorali, la migrazione e la resistenza ai farmaci chemioterapici (Rotolo *et al.*, 2008), indicando così che KGFR può rappresentare un importante obiettivo per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

I meccanismi che causano alterazioni nell'espressione di KGFR non sono ancora noti, e non è chiaro se questi eventi sono causati dall'ambiente nel contesto del tumore o se contribuiscano direttamente alla patogenesi della malattia neoplastica. In ogni caso, le modificazioni nell'espressione di KGFR potrebbero essere correlate ad eventi genetici o epigenetici che colpiscono il promotore (Zhu *et al.*, 2010). Così nuove evidenze sulla regolazione dell'espressione genica di FGFR2 e una migliore caratterizzazione del promotore di FGFR2 potrebbero rivelarsi utili per comprendere meglio la complessa rete di interazioni che avvengono tra il tessuto epiteliale e quello mesenchimale, fornendo elementi essenziali sia per la diagnosi e la prognosi delle patologie neoplastiche che sono associate alla deregolazione di FGFR2, sia potenziali bersagli per nuovi approcci nel trattamento del tumore.



**Figura 9. Modello dell'effetto di TNF $\alpha$  in vivo.** (A) TNF $\alpha$  agisce sui fibroblasti, stimolando l'aumento dell'espressione di FGFR2IIIc e la produzione di KGF. Quindi il KGF può legare e attivare il KGFR, la cui espressione nei cheratinociti è contemporaneamente stimolata da TNF $\alpha$ . (B) Il trattamento dei cheratinociti con TNF $\alpha$  induce la iper-fosforilazione di pRb, con il conseguente rilascio di E2F1 trascrizionalmente attivo, che può traslocare dal citosol nel nucleo, dove lega il promotore di FGFR2 e permette la sintesi di KGFR. Per maggiori dettagli vedere il testo.

## ***Bibliografia***

---

Altomare DA, Testa Jr; Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005; 24: 7455–7464.

Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P; Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998 Apr 28; 95(9): 5082-7.

Armelin HA; Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *PNAS* 1973; 70: 2702–2706.

Avivi A, Skorecki K, Yayon A, Givol D; Promoter region of the murine fibroblast growth factor receptor 2 (bek/KGFR) gene. *Oncogene* 1992; 7(10): 1957-1962.

Bagchi S, Weinmann R, Raychaudhuri P; The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 1991; 65: 1063–72.

Baird A, Schubert D, Ling N, Guillemin R; Receptor- and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *PNAS* 1988; 85: 2324–2328.

Bandara LR, La Thangue NB; Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 1991; 351: 494–7.

Barrett M P, Tetaud E, Seyfang A, Bringaud F, Baltz T; Functional expression and characterization of the Trypanosoma brucei procyclic glucose transporter, THT2.. *Biochem J.* 1995; 312 (3): 687-91.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M; Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5): 585-601

Beenken A, Mohammadi M; The FGF family: biology, pathophysiology and

therapy. *Nature Rev. Drug Discov.* 2009; 8: 235–253.

Beer HD, Florence C, Dammeier J, McGuire L, Werner S, and Duan DR; Mouse fibroblast growth factor 10: cDNA cloning, protein characterization, and regulation of mRNA expression. *Oncogene* 1997; 15: 2211–2218.

Belleudi F, Leone L, Aimati L, Stirparo MG, Cardinali G, Marchese C, et al; Endocytic pathways and biological effects induced by UVB-dependent or ligand-dependent activation of the keratinocyte growth factor receptor. *FASEB J.* 2006; 20: 395–7.

Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA; Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO Journal* 1991; 10: 2849–2854.

Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan B L; Fibroblast growth factor 10 (FGF-10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 1997; 124: 4867–4878.

Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K; E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(8): 409-17.

Brauchle M, Angermeyer K, Hubner G, Werner S; Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and proinflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 1994; 9: 3199–3204.

Brauchle M, Fassler R and Werner S; Suppression of keratinocyte growth factor expression by glucocorticoids in vitro and during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 105: 579–584.

Bryant DM, Stow JL; Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic* 2005; 6: 947–954.

Buckley S, Barsky L, Driscoll B, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D; Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am. Physio* 1998; 274 (5 Pt 1): L714–720.

Canakci CF, Cicek Y, Canakci V; Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 619–28.

Cancilla B, Davies A, Cauchi JA, Risbridger GP, Bertram JF; Fibroblast growth factor receptors and their ligands in the adult rat kidney. *Kidney Int.* 2001 Jul; 60(1): 147-55.

Carstens RP, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA; An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of *Fgfr2* through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 7388–7400.

Casci T, Vinos J, Freeman M; Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 1999; 96: 655–665.

Chapple IL; Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin Periodontol* 1997; 24 :287–96.

Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA; Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 10753–10757.

Chellaiah AT, Mcewen DG, Werner S, Xu J, Ornitz DM; Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 11620–11627.

Chellappan S, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz J, Nevins JR; The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 1991; 65: 1053–61.

Chittenden T, Livingston DM, Kaelin Jr WG; The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* 1991; 65: 1073–82.

Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, DiStefano L, Helin K; Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 5458-70.

Chung LW; Implications of stromal-epithelial interaction in human prostate cancer growth, progression and differentiation. *Semin. Cancer Biol.* 1993 Jun; 4(3): 183-92. Review.

Ciruna BG, Schwartz L, Harpal K, Yamaguchi TP, Rossant J; Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development.* 1997 Jul; 124(14): 2829-41.

Clark JC, Tichelaar JW, Wert SE, Itoh N, Perl AK, Stahlman MT, Whitsett JA; FGF-10 disrupts lung morphogenesis and causes pulmonary adenomas in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Apr; 280(4):L705-15.

Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, Mort-Hopkins T, Dorn GW 2nd, Lightfoot P, German R, Howles PN, Kier A, O'Toole BA, et al; Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell.* 1995 Dec; 6(12): 1861-73.

Cottoni F, Ceccarelli S, Masala MV, Montesu MA, Satta R, Pirodda C, Rotolo S, Frati L, Marchese C, Angeloni A; Overexpression of the fibroblast growth factor receptor 2-IIIc in Kaposi's sarcoma. *J. Dermatol. Sci.* 2009; 53: 65-68.

Cullen KJ, Lippman ME; Stromal-epithelial interactions in breast cancer. *Cancer Treat Res.* 1992; 61: 413-31. Review.

Das SJ, Olsen I; Up-regulation of keratinocyte growth factor and receptor: a possible mechanism of action of phenytoin in wound healing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr 13; 282(4): 875-81.

De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest JM, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C; An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 2000; 127: 483-92.

Dell K, Williams L; A novel form of fibroblast growth factor receptor 2: Alternative splicing of third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 21225–21229.

Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P; Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* 1994;8: 3045–57.

Dimova DK, Dyson NJ; The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 18 2005; 24(17): 2810-26

Di Vita G, Patti R, D'Agostino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, Bonventre S, Ferlazzo V, Arcoleo F, Cillari E; Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair. *Wound Repair Regen.* 2006; 14: 259–64.

Dyson N; The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998; 12, pp. 2245–2262

Donjacour AA; Cunha GR. Stromal regulation of epithelial function. *Res.* 1991; 53: 335-64. Review.

Drummond IA, Mukhopadhyay D, Sukhatme VP; Expression of fetal kidney growth factors in a kidney tumor line: role of FGF2 in kidney development. *Exp. Nephrol.* 1998 Nov-Dec; 6(6): 522-33.

Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, Katsumata T, Negoro T, Nakatsuka M, Birnbaum D, Coulier F, Itoh N; Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23191–2394.

Eswarakumar VP, Monsonego-Ornan E, Pines M, Antonopoulou I, Morriss-Kay GM, Lonai P; The IIIc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Development* 2002; 129: 3783–93.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J; Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16: 139–149.

Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC; Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* 1996; 271: 1116–1120.

Feiken E, Romer J, Eriksen J and Lund LR; Neutrophils express tumor necrosis factor-alpha during mouse skin wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 105: 120–123.

Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M; Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 1995 Jan 13; 267(5195): 246-9.

Finch PW, Rubin JS; Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 812–824.

Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DM, Rocha AM, Jeschke MG; Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. *Shock* 2006; 26: 13–9.

Furthauer M, Lin W, Ang SL, Thisse B, Thisse C; Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/ MAPK-mediated FGF signalling. *Nature Cell Biol.* 2002; 4: 170–174.

Fusenig NE, Limat A, Stark HJ, Breitkreutz D; Modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes of the hair follicle and from epidermis. *J Dermatol Sci.* 1994 Jul; 7 Suppl: S142-51. Review.

Gallucci RM, Sloan DK, Heck JM, Murray AR, O'Dell SJ; Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J. Invest. Dermatol.* 2004; 122: 764–72.

Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL, Bengston A, Yudit LM, Eliseenkova AV, Ma J, Curtin JA, Hyder P, Harper UL, Riedesel E, Mann GJ, Trent JM, Bastian BC, Meltzer PS, Mohammadi M, Pollock PM; Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol. Cancer Res.* 2009; 7(1): 41-54.

Ginsberg D, Vairo G, Chittenden T, Xiao ZX, Xu G, Wydner KL, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM; E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.* 1994; 8: 2665–79.

Goldfarb M; Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 Dec; 7(4): 311-25. Review.

Gospodarowicz D; Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 1974; 249: 123–127.

Gould SE, Upholt WB, Kosher RA; Characterization of chicken syndecan-3 as a heparan sulfate proteoglycan and its expression during embryogenesis. *Developmental Biology* 1995; 168: 438–451.

Grellner W, Georg T and Wilske J; Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) in human skinwounds. *Forensic Sci. Int.* 2000; 113: 251–264.

Grose R, Werner S, Kessler D, Tuckermann J, Durka S, Huggel K, Reichardt H and Werner S; A role for endogenous glucocorticoids in wound repair. *EMBO Reports* 2002; 3: 575–582.

Guo L, Degenstein L and Fuchs E; Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 1996; 10: 165–175.

Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA; Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* 1998; 92: 253–263.

Hadari YR, Kouhara H, Lax I, Schlessinger J; Binding of SHP2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: 3966–3973.

Hart KC, Robertson SC, Kanemitsu MY, Meyer AN, Tynan JA, Donoghue DJ; Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene* 2000; 19: 3309–3320.

He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD; Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene* 2000; 19: 3422–33.

Hijmans EM, Voorhoeve PM, Beijersbergen RL, van 't Veer LJ, Bernards R; E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15: 3082–9.

Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Andwerner S; Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 1996; 8: 548–556.

Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA; Characterization of recombinant human fibroblast growth factor FGF-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13230–13235.

Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R and Havran WL; A role for skin T cells in wound repair. *Science* 2002; 296 :747–749.

Jernvall J, Thesleff I; Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev.* 2000 Mar 15; 92(1): 19-29. Review.

Johnson D, Lu J, Chen H, Werner S, Werner L; The human fibroblast growth factor receptor genes: A common structural arrangement underlies the mechanism for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mot. Cell- Biol.* 1991; 11: 4627–34.

Johnson D, Williams L; Structural and functional diversità in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 1993; 60: 1–41.

Kanai M, Tashiro E, Maruki H, Minato Y, Imoto M; Transcriptional regulation of human fibroblast growth factor receptor 1 by E2F-1. *Gene* 2009 Jun 1; 438(1-2): 49-56. *Epub* 2009 Mar 19.

Katoh M; Cancer genomics and genetics of FGFR2. *Int. J. Oncol.* 2008; 33(2): 233-237. Review

Katoh Y, Katoh M; FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics. *Int. J. Mol. Med.* 2009; 23(3) :307-311. Review

Klagsbrun M, Baird A; A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 1991; 67: 229–231.

Klint P, Claesson-Welsh L; Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 165–177.

Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J; A lipid-anchored GRB2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 1997; 89: 693–702.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR; E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences. *Science* 1986 Feb 14; 231(4739) :719-22.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR; Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987

Apr; 84(8): 2180-4.

Kramer S, Okabe M, Hacohen N, Krasnow MA, Hiromi Y; Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila*. *Development* 1999; 126: 2515–2525.

Kristensen M, Chu CQ, Eedy DJ, Feldmann M, Brennan FM, Breathnach SM. Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) and its receptors in normal and psoriatic skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 94: 354–62.

Lee SH, Schloss DJ, Jarvis L, Krasnow MA, Swain JL; Inhibition of angiogenesis by a mouse sprouty protein. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 4128–4133.

Lemmon MA, Schlessinger J; Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Science* 1994; 19: 459–463.

Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L, Miron A, Nevins JR. Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol* 2000; 20:3626–32.

Lindahl U, Hook M; Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annual Review of Biochemistry* 1978; 47: 385–417.

Lobb RR; Thrombin inactivates acidic fibroblast growth factor but not basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1988; 27: 2572–2578.

Logan N, Delavaine L, Graham A, Reilly C, Wilson J, Brummelkamp TR, Hijmans EM, Bernards R, La Thangue NB; E2F-7: A distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* 2004; 23: 5138–50.

Maas-Szabowski N, Shimotoyodome A, Fusenig NE; Keratinocyte growth

regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J. Cell Sci.* 1999; 112(12) :1843-1853.

Mackenzie IC; Epithelial-mesenchymal interactions in the development and maintenance of epithelial tissues. In: *The Keratinocyte Handbook*, Leigh I, Lane B, Watt F (eds) pp 243-257 1994. Cambridge: Cambridge University Press

Mansukhani A, Dell'Era P, Moscatelli D, Kornbluth S, Hanafusah, Basilico C; Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin. *PNAS* 1992; 89: 3305–3309.

Marchese C, Chedid M, Dirsch OR, Csaky KG, Santanelly F, Latini C, Larochelle WJ, Torrisi MR, Aaronson SA; Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelialising human skin. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1369–1376.

Marchese C, Felici A, Visco V, Lucania G, Igarashi M, Picardo M, Frati L, Torrisi MR; Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 116: 623–628.

Marchese C, Rubin J, Ron D, Faggioni A, Torrisi MR, Messina A, Frati L, Aaronson SA; Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF family; *J. Cell. Physiol.* 1990; 144: 326–333.

Martin GR; The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 1998 Jun 1; 12(11): 1571-86. Review

Maruoka Y, Ohbayashi N, Hoshikawa M, Itoh N, Hogan BLM, Furuta Y; Comparison of the expression of three highly related genes, Fgf8, Fgf17 and Fgf18, in the mouse embryo. *Mech. Dev.* 1998; 74: 175–177.

Miki T, Bottaro DP, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, Aaronson

SA; Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992; 89: 246–250.

Minowada G, Jarvis LA, Chi CL, Neubüser A, Sun X, Hacohen N, Krasnow MA, Martin GR; Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* 1999; 126: 4465-75.

Moberg K, Starz MA, Lees JA; E2F-4 switches from p130 to p107 and pRb in response to cell cycle re-entry. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 1436–49.

Morkel M, Wenkel J, Bannister AJ, Kouzarides T, Hagemeyer C; An E2F-like repressor of transcription. *Nature* 1997; 390(6660): 567-8

Müller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K; "Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization". *Mol. Cell. Biol.* 1997; pp. 5508-5520

Murga M, Fernandez-Capetillo O, Field SJ, Moreno B, Borlado LR, Fujiwara Y, Balomenos D, Vicario A, Carrera AC, Orkin SH, Greenberg ME, Zubiaga AM; Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* 2001; 15: 959–70.

Nathan C, Sporn M; Cytokines in context. *J. Cell. Biol.* 1991 Jun; 113(5): 981-6.  
Review

Neubüser A, Peters H, Balling R, Martin GR; Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell.* 1997 Jul 25; 90(2): 247-55.

Nevins JR E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; 258: 424-429.

Nicola N.A; Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem*

*Cells* 1994; 12 Suppl 1:3-12; discussion 12-4.

Niswander L, Martin GR; Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development*. 1992 Mar; 114(3): 755-68.

Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N; FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277: 643–649

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M; Receptor specificity of the FGF family. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 15292–15297.

Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P; Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Molecular and Cellular Biology* 1992; 12: 240–247.

Ozaki K, Leonard WJ; Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol Chem.* 2002; 277 (33): 29355-8.

Palmieri C, Roberts-Clark D, Assadi-Sabet A, Coope RC, O'Hare M, Sunter A, Hanby A, Slade MJ, Gomm JJ, Lam EW, Coombes RC; Fibroblast growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1beta-induced paracrine growth factor for human breast cells. *J. Endocrinol* 2003; 177(1): 65-81.

Paramio, JM, Lain S, Segrelles C, Lane EB, and Jorcano JL; Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 1998; 17, 949-957.

Paramio JM, Segrelles C, Casanova ML and Jorcano JL; Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 41219-41226.

Park WY, Miranda B, Lebeche D, Hashimoto G, Cardoso W; FGF-10 is a chemotactic factor for distal epithelial buds during lung development. *Dev. Biol.* 1998; 201: 125–134.

Pawson T; Protein modules and signaling networks. *Nature* 1995; 373: 573–580.

Pellegrini L, Burke DF, Von Delft F, Mulloy B, Blundell TL; Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 2000; 407: 1029–34.

Peschen M, Grenz H, Brand-Saberi B, Bunaes M, Simon JC, Schopf E, Vanscheidt W; Increased expression of platelet-derived growth factor receptor alpha and beta and vascular endothelial growth factor in the skin of patients with chronic venous insufficiency. *Arch. Dermatol. Res.* 1998; 290: 291–7.

Peters KG, Marie J, Wilson E, Ives HE, Escobedo J, Del Rosario M, Mirza D, Williams LT; Point mutation of an FGF receptor abolishes phosphatidylinositol turnover and  $Ca^{2+}$  flux but not mitogenesis. *Nature* 1992; 358: 678–681.

Pierce GF, Yanagihara D, Klopchin K, Danilenko DM, Hsu E, Kennery WC and Morris CF; Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *J. Exp. Med.* 1994; 179, 831–840.

Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M; Crystal structures of two FGF FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 2000; 101: 413–424.

Powers CJ, McLuskey SW, Wellstein A; Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 2000 Sep; 7(3): 165-97. Review.

Prieschl EE, Kulmburg PA, Baumruker T; The nomenclature of chemokines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995; 107 (4): 475-83.

Qiao J, Uzzo R, Obara-Ishihara T, Degenstein L, Fuchs E, Herzlinger D; FGF-7

modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney. *Development* 1999; 126: 547–55

Qiao J, Bush KT, Steer DL, Stuart RO, Sakurai H, Wachsman W, Nigam SK; Multiple fibroblast growth factors support growth of the ureteric bud but have different effects on branching morphogenesis. *Mech Dev.* 2001 Dec; 109(2): 123-35.

Raffioni S, Thomas D, Foehr ED, Thompson LM, Bradshaw RA; Comparison of the intracellular signaling responses by three chimeric fibroblast growth factor receptors in PC12 cells. *PNAS* 1999; 96: 7178–7183.

Raja, Sivamani K, Garcia MS, Isseroff RR; Wound reepithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front. Biosci* 2007; 12: 2849–68.

Rayman, JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg J-H, Catchpole S, Watson RJ, te Riele H and Dynlacht BD; E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 2002; 16, pp. 933–947

Reich A, Sapir A, Shilo B; Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 1999; 126: 4139–4147.

Rotolo S, Ceccarelli S, Romano F, Frati L, Marchese C, Angeloni; Silencing of keratinocyte growth factor receptor restores 5-fluorouracil and tamoxifen efficacy on responsive cancer cells. *PLoS One* 2008; 3(6): e2528.

Roubin R, Naert K, Popovici C, Vatcher G, Coulier F, Thierry-Mieg J, Pontarotti P, Birnbaum D, Baillie D, Thierry-Mieg D; Let-756, a *C. elegans* Fgf essential for worm development. *Oncogene* 1999; 18: 6741–6747.

Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cunha GR, Finch PW; Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial

interaction. *EXS* 1995; 74:191-214.

Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, Santos M, Perez P, Leis H, Jorcano JL, Paramio JM; Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development*. 2003 Jun; 130(11): 2341-53.

Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB; Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *Journal of Cell Biology* 1988; 107: 743–751.

Sakurai H, Barros EJ, Tsukamoto T, Barasch J, Nigam SK; An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997 Jun 10; 94(12): 6279-84.

Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B; Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J. Immunol.* 1997; 158: 1887–1894.

Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Watanabe Y, Kao V, Kowalski K, Sonnabend JA, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B; Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am. J. Pathol.* 1998; 152: 1433–1443.

Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch. Dermatol. Res.* 1999; 291: 400–4.

Sawhney N, Garrahan N, Douglas-Jones AG, Williams ED; Epithelial-stromal interactions in tumors. A morphologic study of fibroepithelial tumors of the

breast. *Cancer*. 1992 Oct 15; 70(8): 2115-20.

Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE; Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 112: 343–353.

Scuderi N, Onesti MG, Bistoni G, Ceccarelli S, Rotolo S, Angeloni A, Marchese C; The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold. *Biomaterials* 2008; 29(11): 1620-1629.

Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S; Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.* 1999 Jan; 21(1): 138-41.

Shapiro M. *Exp. Med. Surg.* 1958; 16,41

Skroza N, Rotolo S, Ceccarelli S, Romano F, Innocenzi D, Frati L, Angeloni A, Marchese C; Modulation of the expression of the FGFR2-IIIb and FGFR2-IIIC molecules in dermatofibroma. *J. Dermatol. Sci.* 2008; 51: 53–57.

Sommer A, Rifkin DB; Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *Journal of Cellular Physiology* 1989; 138: 215–220.

Staiano-Coico L, Krueger JG, Rubin JS, D'Limi S, Vallat VP, Valentino L, Fahey T 3rd, Hawes A, Kingston G, Madden MR; Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 865–878.

St Bernard R, Zheng L, Liu W, Winer D, Asa SL, Ezzat S; Fibroblast growth factor receptors as molecular targets in thyroid carcinoma. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1145-1153.

Sun F, Xie Q, Ma J, Yang S, Chen Q, Hong A; Nuclear factor Y is required for

basal activation and chromatin accessibility of fibroblast growth factor receptor 2 promoter in osteoblast-like cells. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(5): 3136-3147.

Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR; Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* 1999 Jul 15; 13(14): 1834-46.

Szebenyi G, Fallon JF; Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int. Rev. Cytol.* 1999; 185:45-106. Review.

Tagashira S, Harada H, Katsumata T, Itoh N and Nakatsuka M; Cloning of mouse FGF10 and up-regulation of its gene expression during wound healing. *Gene* 1997; 197: 399–404.

Tammali R, Saxena A, Srivastava SK, Ramana KV; Aldose reductase regulates vascular smooth muscle cell proliferation by modulating G1/S phase transition of cell cycle. *Endocrinology* 2010; 151(5):2140-2150.

Tang A, Gilchrest BA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 1996; 11: 41–50.

Tao Y, Kassatly RF, Cress WD, Horowitz; Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *J.Mol Cell Biol.* 1997 Dec; 17(12): 6994-7007.

Tashiro E, Minato Y, Maruki H, Asagiri, Imoto M; Regulation of FGF receptor-2 expression by transcription factor E2F-1. *Oncogene* 2003 Aug 28; 22(36): 5630-5.

Tefft JD, Lee M, Smith S, Leinwand M, Zhao J, Bringas P JR, Crowe DL, Warburton D; Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of *Drosophila* sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Curr. Biol.* 1999; 9: 219–222.

Thien CB, Langdon WY; Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 294–307.

Tsang M, Dawid IB; Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci. STKE* 2004; 228: pe17.

Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB; Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nature Cell Biol.* 2002; 4: 165–169.

Tucker AS, Sharpe PT; Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J. Dent. Res.* 1999 Apr; 78(4): 826–34. Review.

Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Basilico C, Jaye M and Alitalo K; Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO Journal* 1992; 11: 4273–4280.

Vairo G, Livingston DM, Ginsberg D; Functional interaction between E2F $\square$ 4 and p130: Evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev.* 1995; 9: 869–881.

Weinstein M, Xu X, Ohshima K, Deng CX; FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 1998; 125: 3615–23.

Werner S, Grose R; Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 835–870.

Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT; Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 6896–6900.

Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT; The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 1994; 266: 819–822.

Werner S; Keratinocyte growth factor: A unique player in epithelial repair

processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 153–165.

Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J and Frank S; Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115: 245–253.

Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J; Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* 1994; 8: 3032–44.

Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S, Itoh N; Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 15918–1521.

Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K; Possible involvement of interleukin-1 in the pathogenesis of dermatofibroma. *Acta Derm. Venereol.* 1998 Mar; 78(2): 99–102.

Yamasaki L, Bronson R, Williams BO, Dyson NJ, Harlow E, Jacks T; Loss of E2F1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-) mice. *Nat. Genet.* 1998; 18: 360–4.

Yayon A, Gray T, Zimmer Y, Eisenstein M, Givol D; Ligand binding by fibroblast growth factor receptors investigated using chimeric receptor molecules. *Recep. Sig. Transdu. Res.* 1995; 15: 185–197.

Yayon A, Zimmer Y, Guo-Hong S, Avivi A, Yarden Y, Givol D; A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: Implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J.* 1992; 11: 1885–1890.

Yoshimura A; Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci.* 2006; 97(6): 439–447.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP; RNAi: Doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101: 25–33.

Zhang XP, Pento JT; Keratinocyte growth factor-induced motility of breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2000; 18: 573–580.

Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM; Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 15694–15700.

Zhao Y, Zhang ZY; The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 32382–32391.

Zhu X, Asa SL, Ezzat S; Genetic and epigenetic mechanisms down-regulate FGF receptor 2 to induce melanoma-associated antigen A in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 2010; 176(5): 2333-2343.

Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC; Three dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 1991; 251: 90–93.