



La Sapienza

Università degli Studi di Roma

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE

Dottorato di Ricerca in Scienze Immunologiche
-XVIII ciclo-

TESI DI DOTTORATO

**Il ripristino della via di segnale del TGF- β si associa
ad una riduzione del potenziale metastatico delle
cellule di tiroide trasformate dall'oncogene *K-ras*.**

COORDINATORE:

Prof.ssa Angela Santoni

DOTTORANDA:

Dott.ssa Arianna Nicolussi

RELATORE:

Dott.ssa Anna Coppa

Settore disciplinare (MED 04)

Anno Accademico 2005-2006

Indice

1. INTRODUZIONE.....	3
IL TGF-β.....	4
LA SUPERFAMIGLIA	
I RECETTORI	
LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE	
LE FUNZIONI BIOLOGICHE DEL TGF-β.....	18
CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELL'APOPTOSI	
CONTROLLO DELLA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE	
CONTROLLO DEI PROCESSI DI SINTESI E DEGRADAZIONE DELLA	
MATRICE	
IL TGF-β E I TUMORI.....	24
GENI ONCOSOPPRESSORI NELLA VIA DEL SEGNALE DEL TGF- β	
IL TGF- β E IL PROCESSO DI INVASIONE METASTATICA	
IL TGF- β : ONCOSOPPRESSORE E "TUMOR PROMOTER"	
IL TGF-β E LA TIROIDE.....	35
CRESCITA E DIFFERENZIAZIONE DELLA TIROIDE	
CANCEROGENESI TIROIDEA E RUOLO DEL TGF- β NELLO SVILUPPO	
DEI TUMORI DELLA TIROIDE	
2. SCOPO DEL LAVORO.....	43
3. MATERIALI E METODI	46
4. RISULTATI	55
5. DISCUSSIONE	67
6. BIBLIOGRAFIA	74
7. ACRONIMI	103

INTRODUZIONE

IL TGF- β

La superfamiglia.

La superfamiglia del TGF- β rappresenta una grossa famiglia di citochine pleiotropiche tra loro strutturalmente correlate che nei vertebrati conta approssimativamente 40 membri distinti: essi, generalmente, vengono suddivisi in due branche, la TGF β /Activins/Nodals e la BMPs, e sono in grado di attivare una delle due cascate di segnale intracellulari (Izzi L. and Attisano L., 2004). Diversi rappresentanti di questa famiglia sono stati caratterizzati anche tra gli invertebrati (Massagué J., 1990) (Figura 1 → La superfamiglia del TGF- β).

Tali citochine svolgono un ruolo importante nella regolazione delle principali funzioni fisiologiche delle cellule come la proliferazione, lo sviluppo, la differenziazione, la migrazione, l'adesione cellulare, l'espressione delle proteine della matrice extracellulare (ECM), l'apoptosi e la riparazione delle ferite (ten Dijke P. and S.Hill C., 2004). Alterazioni della produzione e della trasduzione dei segnali di alcuni membri della superfamiglia del TGF- β sono importanti fattori patogenetici implicati in anomalie dello sviluppo e in varie patologie umane inclusi il cancro, le fibrosi e le patologie autoimmuni.

Si conoscono cinque diverse isoforme del fattore di crescita TGF- β . Nei mammiferi solo tre di queste isoforme, TGF- β 1, TGF- β 2, e TGF- β 3, sono espresse, ognuna codificata da uno specifico gene ed espressa sia in maniera tessuto-specifica che regolata durante lo sviluppo. Il TGF- β 1 è specifico delle cellule endoteliali, ematopoietiche e del tessuto connettivo; il TGF- β 2 delle cellule neuronali ed epiteliali; mentre il TGF- β 3 viene espresso nelle cellule mesenchimali (Massagué J., 1990). Le tre isoforme hanno sequenze altamente conservate con un'omologia del 70-80%.

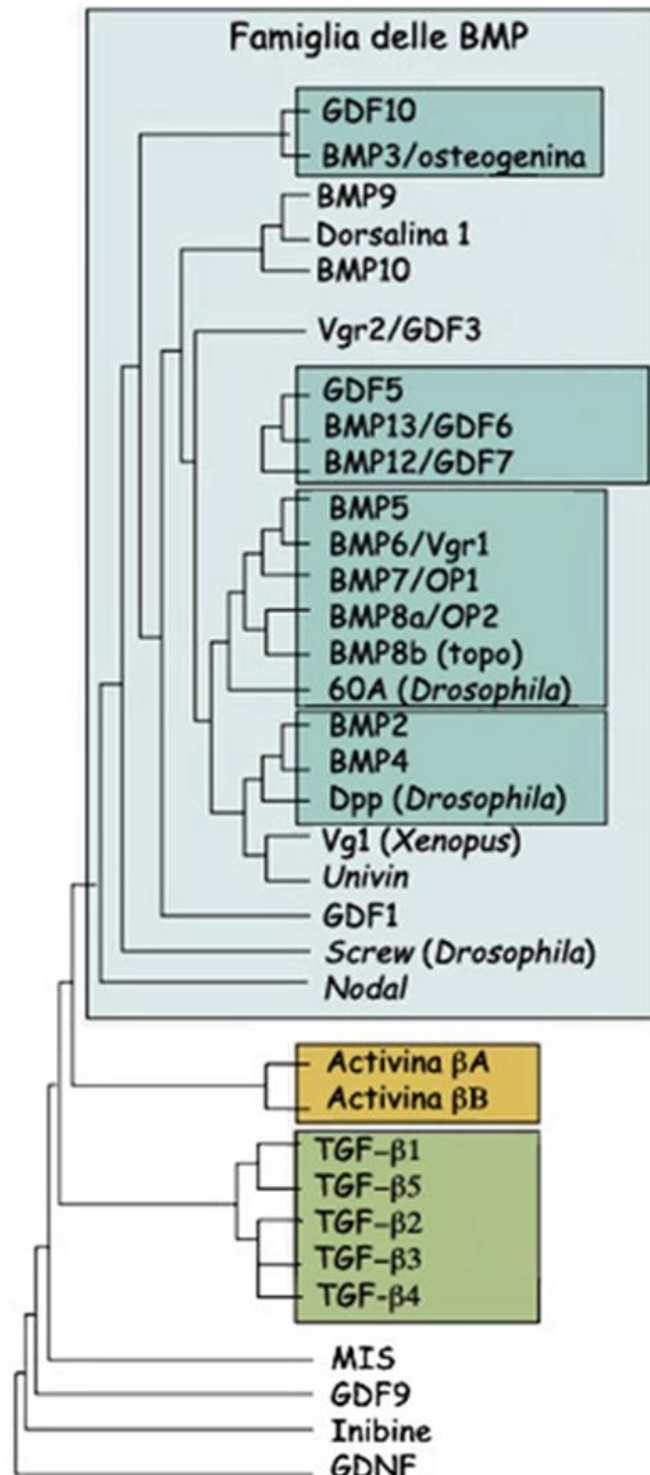


Figura 1. La superfamiglia del TGF- β .

La superfamiglia del TGF- β rappresenta una grossa famiglia di citochine pleiotropiche, tra loro strutturalmente correlate, che nei vertebrati conta approssimativamente 40 membri distinti: essi, generalmente, vengono suddivisi in due branche, la TGF β /Activins/Nodals e la BMP, e sono in grado di attivare una delle due cascate di segnale intracellulare. Diversi rappresentanti di questa famiglia sono stati caratterizzati anche tra gli invertebrati.

(Adattata da Massagué, 1994)

Il TGF- β 1 è l'isoforma più abbondante e universalmente espressa ed è anche quella che nella maggior parte degli studi viene presa in esame o utilizzata per effettuare trattamenti sperimentali con il fattore di crescita esogeno.

Il TGF- β 1 è secreto nella matrice extracellulare come complesso proteico latente, legato a proteine associate allo stato di latenza e ad una delle quattro isoforme di proteine leganti il TGF- β 1 latente. L'attivazione del TGF- β 1, che è necessaria per la sua attività biologica, ha luogo attraverso meccanismi ancora scarsamente compresi e prevede la processazione proteolitica delle proteine associate al fattore e il rilascio del fattore stesso (Figura 2 -> L'attivazione del TGF- β 1).

Nella forma attiva questo fattore ha un peso molecolare di 25 kDa ed è composto da due catene polipeptidiche di 112 amminoacidi, ciascuna contenente sette residui di Cys altamente conservati, sei dei quali formano una struttura nota come "nodo di cisteine" (Massagué J., 1998), mentre il settimo forma un ponte disolfuro con il corrispondente residuo di cisteina dell'altra catena polipeptidica.

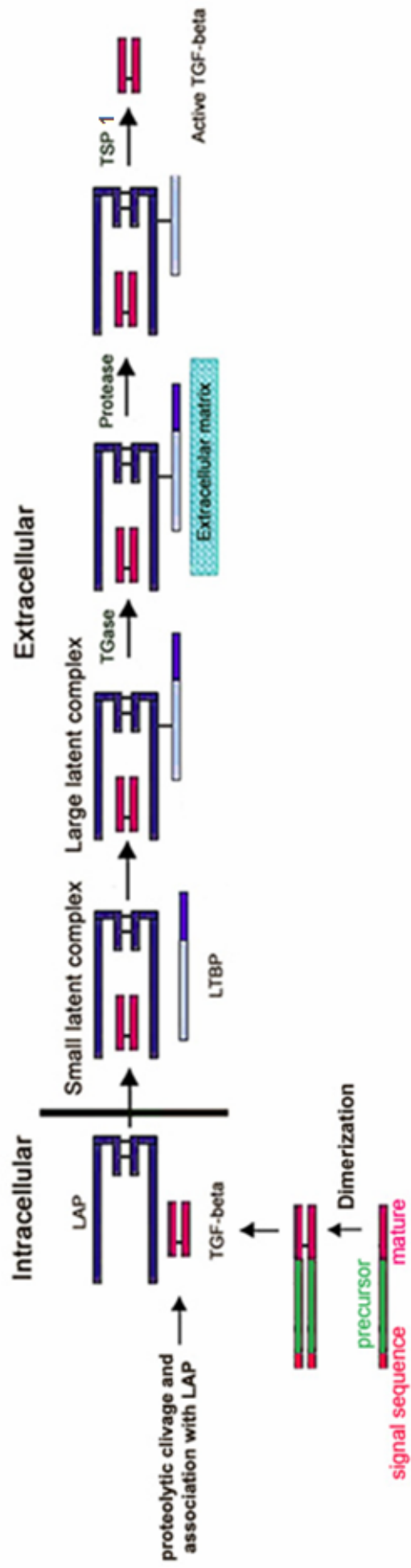


Figura 2. L'attivazione del TGF-β1.

Il TGF-β1 è secreto nella matrice extracellulare come complesso proteico latente, legato a proteine associate allo stato di latenza e ad una delle quattro isoforme di proteine leganti il TGF-β1 latente. L'attivazione del TGF-β1, che è necessaria per la sua attività biologica, ha luogo attraverso meccanismi ancora scarsamente compresi e prevede la processazione proteolitica delle proteine associate al fattore e il rilascio del fattore stesso.

I recettori.

La via del segnale del TGF- β è stata, e continua ad essere, l'argomento di molti studi anche recenti. Una volta attivate, le varie isoforme del TGF- β possono regolare i processi cellulari, attraverso il legame a tre tipi di recettori di superficie altamente affini, oppure ad altre molecole di superficie identificate attraverso esperimenti di "crosslinking": il recettore di tipo I (T β RI), il recettore di tipo II (T β RII), il recettore di tipo III (T β RIII, anche indicato come betaglicano) e le endogline. Nei vertebrati sono stati identificati 7 recettori di tipo I, anche detti Activin-receptor-like-kinases (ALKs), e 5 recettori di tipo II. I recettori di tipo I (T β RI) e di tipo II (T β RII) sono glicoproteine di membrana di peso molecolare 55 kDa e 75 kDa, rispettivamente, caratterizzate dalla presenza di un dominio extracellulare altamente glicosilato di circa 150 amminoacidi, di un dominio transmembrana e di uno citoplasmatico. Il T β RI è caratterizzato dalla presenza, nel dominio citoplasmatico, di una regione di 30 amminoacidi costituita da una sequenza SGS β SGS β chiamata "dominio GS" che precede quello chinasi ed è coinvolta nel controllo dell'attività chinasi del recettore stesso e nella sua interazione con il substrato. La mutazione di alcuni residui di serina in questo dominio ha come conseguenza la perdita della capacità di trasdurre il segnale (Franzén P. et al., 1995). Al dominio GS segue un motivo di residui leucina-prolina che funziona come sito di legame per l'immunofilina FKBP12 che è in grado di regolare negativamente la via di segnale per il TGF- β (Wang T. et al., 1996), inibendo l'attività del recettore in assenza del TGF- β . Il T β RI è anche caratterizzato da una coda C-terminale più corta rispetto a quella del T β RII. Sia l'uno che l'altro sono accomunati, comunque, dal dominio citoplasmatico altamente conservato ad attività serina/treonina chinasi, necessario alla trasduzione del segnale (Figura 3 -> I recettori di tipo I (T β RI) e di tipo II (T β RII) del TGF- β). Il

dominio serina/treonina chinasi nel T β R_{II} è costitutivamente attivato e si rende responsabile dell'autofosforilazione e attivazione del T β R_{II} stesso e della fosforilazione e attivazione del T β R_I, nel contesto dei complessi recettoriali a stechiometria variabile la cui formazione è indotta dal ligando. Il recettore di tipo III (T β R_{III} o betaglicano) (circa 280 kDa) è un proteoglicano di 853 amminoacidi, ancorato alla membrana, che lega ad alta affinità le tre isoforme β 1, β 2, β 3 del fattore di crescita e si ipotizza, sulla base della sua struttura, non sia coinvolto direttamente nella trasduzione del segnale, ma nella presentazione del TGF- β ai recettori trasducenti di questa via (Lòpez-Casillas F. et al., 1994). Dove è espresso, il T β R_{III} è il più abbondante recettore; esso è classicamente in grado di legare il fattore di crescita e di trasferirlo al T β R_I e al T β R_{II}, costituendo al contempo anche una sorta di "reservoir" a livello della superficie della membrana plasmatica. Secondo studi recenti, il T β R_{III} è coinvolto anche nella specificità del segnale del TGF- β : cellule non esprimenti questo recettore, infatti, non risponderebbero al TGF- β 2 che lega solo a bassissima affinità il T β R_{II} al quale, invece, le isoforme β 1 e β 3 possono legarsi efficientemente. Il T β R_{III} è implicato nella Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) e pare abbia un ruolo non ridondante nella mediazione del segnale e nella EMT indotta dal TGF- β nel cuore dell'embrione di pollo, durante lo sviluppo, e che sia "downregolato" durante l'EMT in un modello cellulare umano epiteliale di mammella. Sembra, inoltre, che il T β R_{III} svolga il potenziale ruolo di mediatore dei diversi effetti del TGF- β sulle cellule epiteliali e mesenchimali: potenziando la trasduzione del segnale nelle cellule mesenchimali e inibendola, viceversa, nelle cellule epiteliali (Elliott R. L. and Blobel G.C., 2005). Tutti questi dati sul T β R_{III} suggeriscono un suo ruolo emergente nella mediazione/regolazione del segnale del TGF- β , incluso il duplice e dicotomico ruolo del fattore durante la tumorigenesi.

Le endogline (180 kDa) sono molecole presenti ad alti livelli sulla superficie cellulare delle cellule endoteliali. Queste molecole, di 625-658 amminoacidi, formano dei dimeri e sono strutturalmente correlate al betaglicano, con cui mostrano di avere un'elevata identità di sequenza; esse non possono legare direttamente il TGF- β e la loro espressione ectopica inibisce il segnale TGF- β -ALK5. Recenti studi genetici hanno riscontrato, inoltre, una relazione fra le endogline e il recettore ALK1: mutazioni nei geni di entrambe le proteine, infatti, determinerebbero la manifestazione della stessa forma ereditaria emorragica di telangectasia. A tutt'oggi, il ruolo di questa molecola nella trasduzione del segnale non è stato ancora chiarito.

Le diverse isoforme del TGF- β interagiscono, nella loro forma attivata, con il recettore di tipo III o direttamente con il recettore di tipo II, in grado, successivamente, di reclutare il recettore di tipo I, principalmente il T β RI/ALK5, per costituire un complesso recettoriale attivato (Franzén P. et al., 1993). Altri membri della superfamiglia del TGF- β interagiscono con combinazioni differenti di recettori omologhi di tipo I e II, con attività serina/treonina chinastica. A tutt'oggi, l'esatta stechiometria del complesso recettoriale eteromero TGF β -indotto T β RI/T β RII non è ancora nota, ma è probabile che esso sia organizzato almeno come un eterotetramero composto da due recettori T β RI/ALK5 e due T β RII. In assenza di ligando, i recettori si presentano come omodimeri ancorati alla membrana plasmatica, e studi strutturali cristallografici del dominio citoplasmatico del T β RI suggeriscono che esso sia dimerico. Studi su recettori di tipo I e II mutati o su loro chimere hanno indicato che sono indispensabili almeno due recettori T β RI nel complesso recettoriale, e che l'attività chinastica del T β RII è regolata attraverso l'omo-oligomerizzazione. Numerose ricerche hanno sottolineato che la presenza del recettore di tipo II è fondamentale nel mediare gli effetti del TGF- β (Zhao Y. and Young

L.S., 1996), mentre esperimenti eseguiti transfettando le cellule con recettori di tipo I e II, che presentavano alterazioni del dominio chinamico, hanno dimostrato che entrambi i recettori sono fondamentali alla trasduzione del segnale (Brand T. et al., 1995). Nella maggior parte delle cellule, il TGF- β segnala attraverso ALK5, anche se nelle cellule endoteliali la trasduzione può avere luogo attraverso ALK1. ALK5, infatti, è espresso diffusamente, mentre ALK1 è predominante nelle cellule endoteliali e a particolari siti di interazione con le cellule mesenchimali. Le vie di segnale TGF- β /ALK5 e TGF- β /ALK1 hanno effetti opposti sul comportamento delle cellule endoteliali: ALK5 inibisce la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali, mentre ALK1 stimola entrambi i processi. Questa segnalazione recettoriale alternativa, potrebbe essere solo un esempio e suggerisce la possibilità che in altri tipi cellulari possa verificarsi qualcosa di simile, che sia in grado di giustificare i duplici ruoli svolti dal TGF- β (ten Dijke P. and S.Hill C., 2004).

La chinasi del T β RII è costitutivamente attivata e, nel contesto del complesso recettoriale eterotetramericco, è in grado di attivare il recettore di tipo I, fosforilandolo a livello di particolari residui di serine e treonine localizzati nel dominio GS, una regione altamente conservata di residui di glicine e serine posta subito prima del dominio chinamico (Wrana L. J. et al., 1994). Questa fosforilazione è un evento associato all'attivazione del recettore di tipo I e del suo dominio chinamico e alla propagazione del segnale del TGF- β (Figura 4 → Meccanismo di attivazione del complesso recettoriale T β RI/T β RII).

TGF- β receptors I & II

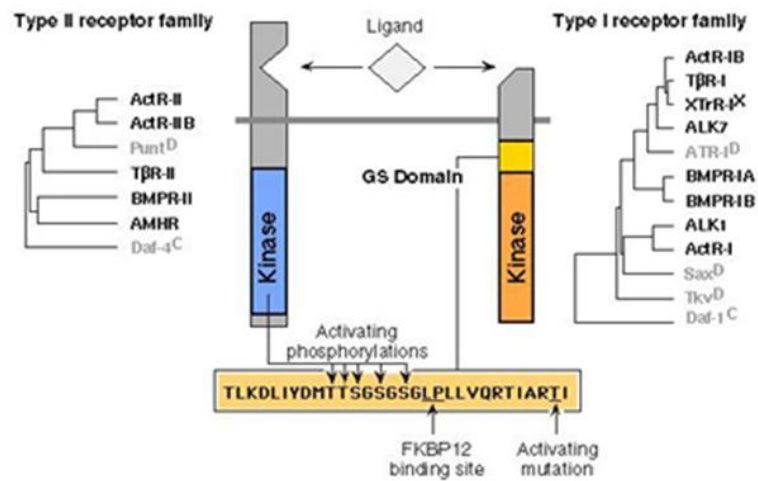


Figura 3. I recettori di tipo I (T β RI) e di tipo II (T β RII) del TGF- β .

I recettori di tipo I (T β RI) e di tipo II (T β RII) sono glicoproteine di membrana di peso molecolare 55 kDa e 75 kDa rispettivamente, caratterizzate dalla presenza di un dominio extracellulare di circa 150 amminoacidi, altamente glicosilato, di un dominio transmembrana e di uno citoplasmatico, altamente conservato, ad attività serina/treonina chinasi, necessario alla trasduzione del segnale.

(Adattata da Massagué, Annu Rev Biochem, 1998)

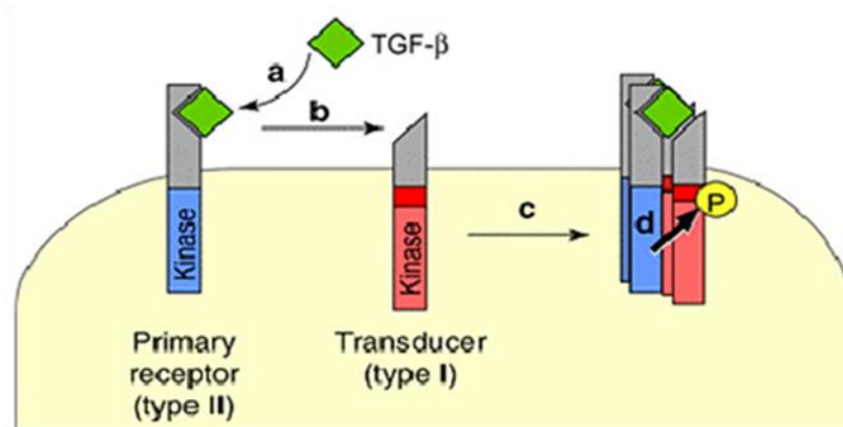


Figura 4. Meccanismo di attivazione del complesso recettoriale T β RI/T β RII.

La chinasi del T β RII è costitutivamente attivata e, nel contesto del complesso recettoriale eterotetrameric, è in grado di attivare il recettore di tipo I, fosforilandolo a livello di particolari residui di serine e treonine localizzati nel dominio GS, una regione altamente conservata di residui di glicine e serine, posta subito prima del dominio chinasi. Questa fosforilazione è un evento associato all'attivazione del recettore di tipo I e del suo dominio chinasi e alla propagazione del segnale del TGF- β .

(Adattata da Massagué, Annu Rev Biochem, 1998)

La trasduzione del segnale.

Il T β RI inizia la trasduzione intracellulare del segnale attraverso la fosforilazione dei componenti di una famiglia di fattori trascrizionali: le proteine Smad. Le proteine Smad, evolutivamente conservate, sono caratterizzate da due regioni, N e C-terminali, di omologia all'ortologo Mad di *Drosophila*, indicate, rispettivamente, come domini di omologia a Mad, MH1 e MH2. I domini MH1 e MH2 sono legati da una regione flessibile, indicata come regione "linker" o cerniera, meno conservata e ricca in residui di prolina.

Nei mammiferi sono stati individuati otto membri appartenenti alla famiglia delle Smad, i cui geni sono stati mappati su quattro cromosomi diversi (Attisano L. and Lee-Hoeflich S.T., 2001). Queste proteine possono essere raggruppate in tre classi funzionali, ciascuna delle quali gioca un ruolo specifico nella via di trasduzione del segnale: le Smad attivate dal recettore o R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8), la Smad comune mediatrice o Co-Smad (Smad4), e le Smad inibitorie o I-Smad (Smad6 e Smad7) (Figura 5 -> Le proteine Smad). L'interazione delle BMP con gli specifici recettori, determina la fosforilazione di Smad1, Smad5, Smad8, mentre quella del TGF- β o delle activine causa la fosforilazione di Smad2 e Smad3. In condizioni basali, le R-Smad sono ancorate, sotto forma di dimeri, alla proteina di membrana Smad-Anchor for Receptor Activation o SARA, e presentano i domini MH1 e MH2 associati tra loro. La fosforilazione delle R-Smad interessa, specificatamente, due residui di serine, contenuti in una regione altamente conservata -SS(M/V)S- C-terminale, entrambi richiesti per l'attivazione dei segnali Smad-dipendenti. Le R-Smad interagiscono specificamente con i complessi recettoriali attivati e sono i diretti substrati dei recettori di tipo I. Il reclutamento, da parte del recettore, delle suddette R-Smad, è facilitato dalla proteina

ausiliaria SARA e dal suo dominio proteico FYVE in grado di riconoscere e legare lipidi, residui di fenilalanina, tiroxina, valina e acido glutammico. La comparazione delle strutture tridimensionali del dominio chinasi del T β RI e del dominio di legame alle Smad della proteina SARA, Smad Binding Domain o SBD, ha dimostrato che la proteina SARA è richiesta per portare Smad2 in stretta vicinanza dei residui aminoacidici della regione L45 nel dominio chinasi del recettore. La regione L45 è responsabile della specificità di legame tra Smad2 e il T β RI stesso. È noto che le R-Smad non possiedono attività enzimatica, pertanto questa via di segnalazione non può essere amplificata e le risposte cellulari possono variare anche in seguito a piccoli cambiamenti di espressione di queste proteine. Gli studi più recenti suggeriscono che l'espressione delle Smad possa essere dinamicamente regolata a livello post-traduzionale attraverso la loro ubiquitinazione, operata dalle ubiquitine-ligasi in grado di operare in maniera TGF β -dipendente e non, e la degradazione delle Smad a livello del proteasoma. I risultati ottenuti lavorando con i topi transgenici Smad2 e Smad3 null, che non sopravvivono, diversamente dai singoli mutanti, suggeriscono che ci possa essere un effetto dose-gene-dipendente sui bersagli delle proteine Smad e che i livelli relativi di Smad2 e Smad3 in determinate cellule possano influenzare, non solo la capacità di rispondere al TGF- β , ma anche la natura di queste risposte (Weinstein M. et al., 2000).

Recentemente, è stata dimostrata una forte interazione tra il citoscheletro e l'attivazione delle proteine Smad, che lascia ipotizzare una stretta relazione tra alterazioni citoscheletriche e trasformazione cellulare. Smad2 e Smad3, infatti, interagiscono con la β -tubulina e si localizzano lungo la fitta rete microtubulare interna alla cellula. La distruzione dei microtubuli, non solo interferisce con il legame delle Smad alla β -tubulina, ma determina anche la fosforilazione di Smad2 indipendentemente dal TGF- β . L'avvio del

segnale del TGF- β , in maniera ligando-indipendente, da parte di Smad2 fosforilato, lascia ipotizzare che cambi citoscheletrici, associati a trasformazione cellulare, possano influenzare direttamente il segnale del TGF- β (de Caestecker M.P. et al., 2000). Una volta fosforilate, le R-Smad associano la Co-Smad, Smad4, per costituire un complesso attivato e traslocare nel nucleo dove medieranno le risposte trascrizionali al fattore di crescita.

Smad4 o DPC-4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4) è un importante gene oncosoppressore la cui delezione o inattivazione si osserva in circa il 40% dei carcinomi pancreatici. Smad4 è privo del motivo C-terminale -SS(M/V)S- caratteristico delle R-Smad e non è fosforilato a seguito dell'attivazione recettoriale. Esso rappresenta un nodo di convergenza nella via delle Smad a valle dei recettori della superfamiglia del TGF- β , complessandosi non solo con le R-Smad attivate da TGF- β e Activine, Smad2 e Smad3, ma anche con le R-Smad attivate dalle BMP, Smad1, Smad5 e Smad8. L'etero-oligomerizzazione delle R-Smad e di Smad4 coinvolge il dominio MH2, mentre il dominio MH1 di Smad4 è responsabile del meccanismo auto-inibitorio, che previene l'interazione ligando-indipendente Smad4/R-Smad. Una volta avvenuta la formazione dell'oligomero R-Smad/Smad4, il complesso trasloca nel nucleo, dove direttamente o mediante l'interazione con altri fattori di trascrizione, regola la trascrizione di specifici geni (Figura 6 → La trasduzione del segnale del TGF- β).

I complessi R-Smad/Smad4 regolano la trascrizione legando una sequenza di quattro basi (5'-GTCT-3') chiamata "Smad box", presente nel promotore dei geni responsivi al TGF- β : due sequenze di questo tipo sono organizzate in maniera palindromica nell'elemento di legame delle Smad, Smad Binding Element o SBE, di 8 paia di basi (Zawel L. et al., 1998). Le proteine Smad

interagiscono con i vari fattori trascrizionali nucleari, attraverso motivi ricchi in residui di prolina, come lo Smad Interacting Motif o SIM o il Fast o FoxH1 Motif o FM. Il SIM può interagire sia con monomeri di Smad2 o Smad3, che con i complessi attivati. Il motivo FM, si differenzia dal SIM, per la sua capacità di interagire preferenzialmente con i complessi attivati Smad2/Smad4 e con i complessi omomerici della proteina Smad2. E' stato dimostrato che Smad2 e Smad3 traslocano nel nucleo, anche indipendentemente dal legame con Smad4. Questo implica che, il ruolo principale di queste proteine è la trasmissione del segnale del TGF- β dal citoplasma al nucleo, mentre quello della proteina Smad4 è principalmente di regolare la trascrizione.

La fine regolazione ed il significato funzionale dello "shuttling" delle Smad è ancora oggetto di studio. Alcuni autori hanno dimostrato che lo "shuttling" nucleo-citoplasmatico delle Smad, è indipendente da recettori di trasporto ed è mediato esclusivamente da interazioni con nucleoporine come la Nup214, anche nota come CAN, e la Nup153, entrambe componenti dei pori nucleari (Xu L. et al., 2000; Xu L. et al., 2002; Xu L. et al., 2003). Il sito di legame con le nucleoporine è incluso nel dominio MH2 di Smad2 e di Smad3, e si sovrappone allo SBD della proteina SARA e ai siti di legame SIM e FM per i fattori trascrizionali, pertanto, il segnale Smad è propagato dal recettore al nucleo, via pori nucleari e attraverso una serie di interazioni proteiche mutualmente esclusive. Smad4 entra nel nucleo, legando l'importina- β , che interagisce con l'importina- α , capace di riconoscere e legare una regione bipartita chiamata Nuclear Localization Signal o NLS (Pierreux C.E. et al., 2000; Xiao Z. et al., 2003). Il suo trasporto fuori dal nucleo è, invece, assicurato dall'interazione con la proteina CRM-1, che lega il Nuclear Export Signal o NES nella regione linker solo di Smad4 (Watanabe M. et al., 2000; Inman G.J. et al., 2002). La sequenza NLS, è

presente sia nella proteina Smad2 che in Smad3; mutazioni o inserzioni in questa regione, alterano l'accumulo nucleare, TGF β -indotto, di queste proteine (Xiao Z. et al., 2000a, b; Kurisaki A. et al., 2001).

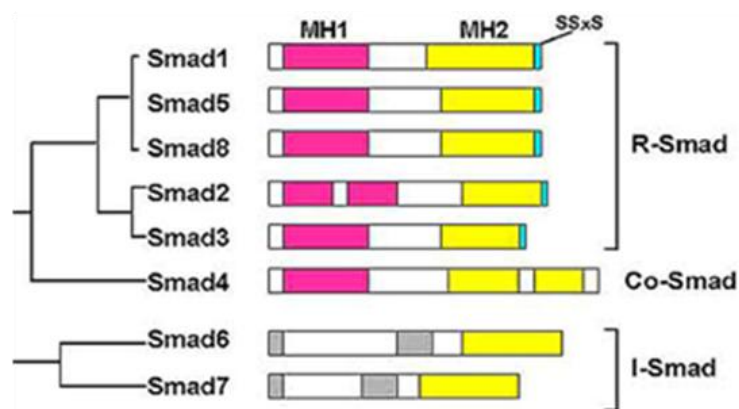
La via di segnale che coinvolge le proteine Smad, pur essendo molto importante, non è l'unica usata dalle cellule, infatti, numerosi studi hanno dimostrato che altre vie di segnale come la cascata delle MAPK, l'attivazione della PI3-K, della chinasi p70S e di RhoA, possono essere coinvolte nella trasduzione del segnale del TGF- β (Derynck R. and Zhang Y.E., 2003) (Figura 7 -> Le vie di trasduzione del segnale del TGF- β alternative a quella delle Smad).

In cellule Smad4 null, l'induzione della fibronectina e l'inibizione della proliferazione cellulare, possono essere risposte Smad4-indipendenti, che richiedono l'attivazione di vie di segnale alternative, a valle del TGF- β , come le JNK e le MAPK. Non può essere esclusa, inoltre, l'espressione, in queste cellule Smad4 null, di una Co-Smad diversa da Smad4 tipo la XSmad4b, che recentemente è stata isolata in *Xenopus* e che potrebbe avere un ortologo nei mammiferi (de Caestecker M. P. et al., 2000).

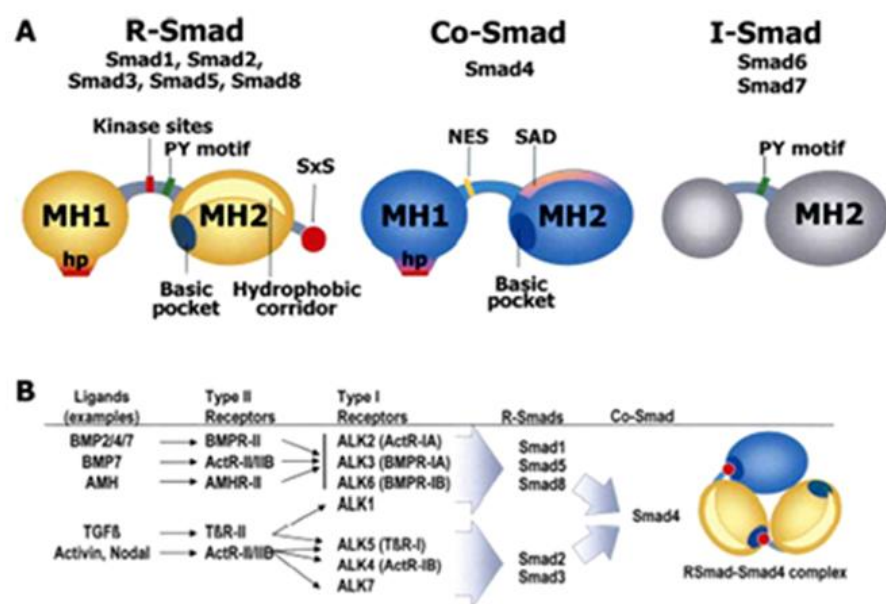
Il TGF- β può sia attivare direttamente le MAPK che cooperare via Smad con esse. E' stato dimostrato che la persistente attivazione della via delle MAPK, o per mutazioni attivanti o, più frequentemente, per stimolazione da parte dell'oncogene *ras*, può inibire il segnale del TGF- β , impedendo la traslocazione nucleare di Smad2 o di Smad3. In una linea cellulare umana di carcinoma del colon, l'espressione dell'oncogene *K-ras*, determina un forte accumulo citoplasmatico delle R-Smad, che non viene revertito neanche dall'iperespressione di Smad4 (Calonge M.J. and Massagué J., 1999).

In linee cellulari umane di mammella, è stata, recentemente, dimostrata una complessa interazione/cooperazione fra le proteine R-Smad e le vie di segnale della p38 MAPK e di Rho/ROCK. In particolare, è necessaria la fosforilazione di due residui serina, nella regione linker di Smad2 o Smad3, da parte di p38 MAPK e di Rho/ROCK, per l'inibizione della proliferazione indotta da TGF- β , determinata dalla diminuzione della produzione di c-Myc, e dall'aumentata produzione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente, p21 (Kamaraju A.K. and Roberts A.B., 2005).

La via del TGF- β è sotto il controllo di molti meccanismi di regolazione: le proteine Inhibitory Smad o I-Smad, Smad6 e Smad7, sono le principali protagoniste di questi processi. Queste proteine, come Smad4, non possiedono il motivo C-terminale -SS(M/V)S- e non sono fosforilate a seguito dell'attivazione recettoriale. Hanno conservato il dominio MH2 e la



Adapted by Riko Nishimura et al, *Frontiers in Bioscience* 2002



Adapted by Joan Massagué, Joan Seoane and David Wotton/*Genes & Development* 2005

Figura 5. Le proteine Smad.

Nei mammiferi sono stati individuati otto membri appartenenti alla famiglia delle Smad i cui geni sono stati mappati su quattro cromosomi diversi. Come mostrato nell'immagine in alto, le Smad possono essere raggruppate in tre classi funzionali, ciascuna delle quali gioca un ruolo specifico nella via di trasduzione del segnale: le Smad attivate dal recettore o R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8), la Smad comune mediatrice o Co-Smad (Smad4), e le Smad inibitorie o I-Smad (Smad6 e Smad7).

(Adattata da Riko Nishimura et al., *Frontiers in Biosciences*, 2002)

Nella figura in basso, il pannello A mostra la struttura delle proteine Smad e i loro domini funzionali mentre il pannello B, elenca i recettori di tipo I, specifici delle varie R-Smad, e mostra la stechiometria del complesso trascrizionale R-Smad/Co-Smad.

(Adattata da Massagué et al., *Genes & Development*, 2005)

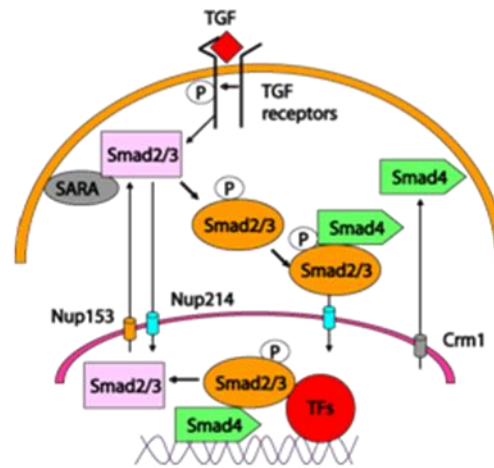
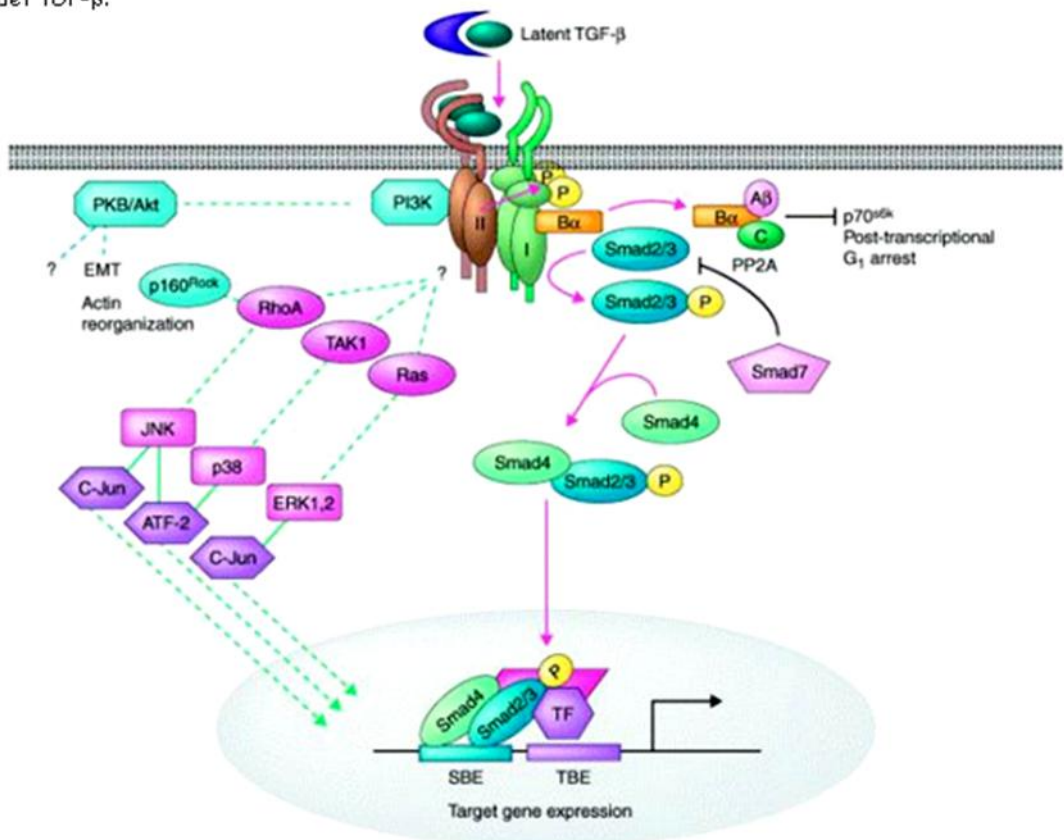


Figura 6. La trasduzione del segnale del TGF- β .

La più importante via di trasduzione del segnale del TGF- β è quella che coinvolge le proteine Smad. Dopo il legame del TGF- β al T β RII e la costituzione dei complessi recettoriali eterotetrameric T β RII/T β RI, il T β RII, costitutivamente fosforilato e attivato, transfosforila il T β RI, attivando anche quest'ultimo. Il T β RI attivato può quindi andare a fosforilare Smad2 o Smad3 (R-Smad) permettendo loro di formare con Smad4, partner comune di tutte le R-Smad, un complesso trascrizionalmente attivo che, una volta translocato nel nucleo, va a regolare la trascrizione dei geni bersaglio del TGF- β .



Current Opinion in Genetics & Development

Figura 7. Le vie di trasduzione del segnale del TGF- β alternative a quella delle Smad.

Sebbene la via del segnale delle Smad rappresenti la principale via a valle dei recettori del TGF- β , studi recenti hanno dimostrato il coinvolgimento di altre vie come quella delle ERK, quella della p38 MAPK, della PI3-K, della chinasi p70S e di RhoA come modulatori degli effetti biologici TGF β -dipendenti.

(Current Opinion & Genetics Development)

loro regione N-terminale mostra solo minime somiglianze con il dominio MH1 delle R-Smad e di Smad4. Le I-Smad svolgono la loro funzione utilizzando almeno due meccanismi diversi: uno di tipo competitivo e l'altro dipendente dall'aumento della degradazione da parte del proteasoma. Le I-Smad inibiscono la fosforilazione delle R-Smad, competendo con il legame tra T β RI e R-Smad, inoltre, Smad6 è in grado di competere con Smad4 per il legame con Smad1, attivata dal recettore delle BMP. Entrambi questi meccanismi, possono essere operativi nei diversi tipi cellulari e il prevalere dell'uno sull'altro è da imputare solo ai livelli relativi di queste I-Smad nelle cellule stesse.

Studi recenti, hanno dimostrato che la via dell'ubiquitina/proteasoma gioca un ruolo critico nella regolazione della trasduzione del segnale della superfamiglia del TGF- β . Le R-Smad, infatti, sono degradate dalla via ubiquitina/proteasoma in modo ligando-dipendente, provocando in questo modo la terminazione del segnale (Lo R.S. and Massagué J., 1999). L'azione di alcune E3-ubiquitine ligasi, note come Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1 (Smurf1) o 2 (Smurf2), è indispensabile per la regolazione delle numerose funzioni svolte dalla superfamiglia del TGF- β . Infatti, tali proteine, non solo favoriscono l'ubiquitinazione e la degradazione di alcune R-Smad, ma stimolano, anche, la traslocazione dal nucleo al citoplasma delle I-Smad, favorendone l'interazione con i recettori di tipo I, contribuendo in tal modo al controllo negativo della via di segnale del TGF- β (ten Dijke P. and S.Hill C., 2004).

Molto recentemente, è stato dimostrato che Smad7 svolge la sua azione inibitoria sul recettore I anche attraverso l'azione di una fosfatasi; esso, infatti, induce il legame tra il T β RI attivato ed un complesso costituito da GADD34 e dalla subunità catalitica della fosfatasi 1, in grado di defosforilare il recettore e di inattivarlo. L'azione delle I-Smad a livello

nucleare, invece, è stato dimostrata solo per Smad6 che è in grado di reclutare il corepressore CtBP e di reprimere la trascrizione BMP-indotta (ten Dijke P. and S.Hill C., 2004).

LE FUNZIONI BIOLOGICHE DEL TGF- β

Le attività biologiche del TGF- β sono molteplici; esso controlla numerose risposte cellulari come la proliferazione, la differenziazione, la migrazione, l'espressione delle proteine della matrice extracellulare (ECM), l'adesione cellulare, la migrazione e l'apoptosi (Figura 8 → Il TGF- β è un fattore pleiotropico e multipotente capace di regolare numerose risposte cellulari).

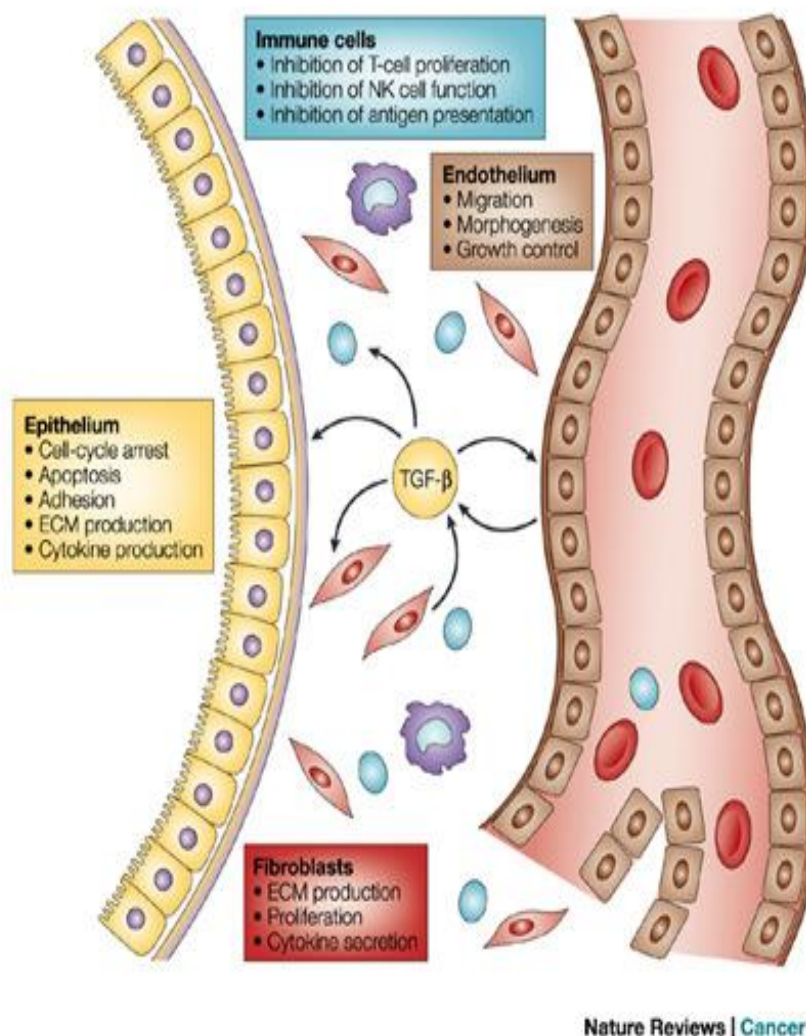


Figura 8. Il TGF- β è un fattore pleiotropico e multipotente capace di regolare numerose risposte cellulari.

(Adattata da Siegel and Massague. Nat Rev Cancer, 2003)

Controllo della proliferazione e dell'apoptosi.

La proliferazione cellulare normalmente è regolata dall'attività di una serie di fattori mitogenici e di fattori antiproliferativi che convergono a livello dei regolatori del ciclo cellulare. Sebbene il TGF- β sia stato inizialmente identificato come un fattore di crescita in grado di stimolare la proliferazione, e indurre la trasformazione delle cellule mesenchimali (Frolik C.A. et al., 1983), oggi è noto come potente inibitore della proliferazione delle cellule epiteliali, endoteliali ed ematopoietiche, in grado di bloccare le cellule a livello della fase G1 avanzata del ciclo cellulare (Massagué J., 1998). Il TGF- β svolge questa azione sia inducendo l'espressione di inibitori di chinasi ciclina dipendente, come p15 (Hannon G.J. and Beach D., 1994), p21 (Datto M.B. et al., 1995) e p27 (Polyak K. et al., 1994), che inibendo direttamente l'espressione di c-Myc (Pietenpol J.A. et al., 1990). Il blocco delle cicline e delle chinasi ciclina dipendente determina, anche, l'inibizione della fosforilazione della proteina del retinoblastoma (Rb), che, nello stato ipofosforilato, lega e sequestra il fattore trascrizionale E2F. L'insieme di questi eventi impedisce l'avanzamento del ciclo dalla fase G1 verso la fase S.

Per le sue azioni sui linfociti T e sulle cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells o APCs), il TGF- β è considerato anche un potente immunosoppressore (Taipale J. et al., 1998). Esso, infatti, sintetizzato e secreto dalle cellule T, è in grado di bloccare la produzione di interleuchina-2 (IL-2), inibendo così la proliferazione IL-2-dipendente degli stessi T (Kehrl J.H. et al., 1986), di inibire la differenziazione dei linfociti T e di prevenire l'acquisizione da parte dei T "naive", delle funzioni effettrici (citotossiche o helper) (Gorelik L. and Flavell R.A., 2002). Il TGF- β , inoltre, esercita un'attività immunosoppressiva sui linfociti T anche attraverso le cellule T regolatrici, CD4 CD25, che sono in grado sia di secernerlo che di

esporlo sulla superficie della membrana (Nakamura K. et al., 2001). Anche le cellule APC sono sensibili all'azione del TGF- β . In topi nudi (atimici), TGF- β 1 deficienti, infatti, è stata dimostrata un'elevata insorgenza di processi infiammatori, che suggerisce un ruolo cruciale del TGF- β nel sopprimere la proliferazione delle cellule coinvolte in questi processi (Blobe G.C. et al., 2000), e una completa assenza delle cellule di Langerhans, sebbene essi esprimano i precursori funzionali, che suggerisce che il TGF- β sia richiesto per il loro normale sviluppo e/o per la loro migrazione fino all'epidermide (Borkowski T.A. et al., 1997).

Il TGF- β esercita la sua azione pleiotropica anche sul processo apoptotico. Il mantenimento dell'omeostasi cellulare, soprattutto in tessuti caratterizzati da rapida proliferazione, come per esempio i tessuti epiteliali, è garantita da un fine equilibrio tra i processi proliferativi e quelli di apoptotici (Akhurst R.J. and Derynck R., 2001).

Il TGF- β può promuovere il processo apoptotico, sopprimerlo o non influenzarlo affatto, anche se nella maggior parte dei casi, il suo segnale è pro-apoptotico, cellula e contesto specifico (Arsura M. et al., 1996; Hsing A.Y. et al., 1996; Francis J.M. et al., 2000; Schuster N. and Kriegelstein K., 2002; Li Q.L. et al., 2002; Hyman K.M. et al., 2002). Esso agisce attraverso vari meccanismi, come l'attivazione delle caspasi (Inman G.J. and Allday M.J., 2000), e/o la regolazione positiva dei fattori pro-apoptotici come Bax, e/o quella negativa dei fattori anti-apoptotici come Bcl-2 e Bcl-XL (Motyl T. et al., 1998). Nel sistema immunitario, per esempio, il TGF- β induce una riduzione dell'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 e un aumento dell'espressione della proteina pro-apoptotica Bax, che comporta uno sbilanciamento tra fattori promotori di morte e non. In altri casi, il processo apoptotico si accompagna ad una riduzione dell'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-XL e all'attivazione della caspasi 3 (Saltzman

A. et al., 1998). In cellule di epatoma Hep3B, invece, il TGF- β induce l'apoptosi contrastando la via del segnale della PI3-K/Akt, che blocca l'induzione dell'attivazione della caspasi 3 TGF β -mediata (Chen R.H. et al., 1998), o attivando direttamente le proteasi della famiglia delle caspasi (Hung W.C. et al., 1998). L'apoptosi TGF β -indotta è frequentemente mediata dalla via di segnale Smad-dipendente (Atfi A. et al., 1997; Yamamura Y. et al., 2000), ed è noto, inoltre, che la I-Smad, Smad7, è in grado di indurla sia nelle cellule epiteliali di polmone che nelle cellule di carcinoma della prostata (Landstrom M. et al., 2000; Lallemand F. et al., 2001).

Controllo della differenziazione cellulare.

Il TGF- β controlla i processi di differenziazione cellulare, inibendoli e alterando l'espressione delle proteine della matrice extracellulare e dei recettori che mediano l'adesione delle cellule in alcuni tipi di cellule (Massagué J., 1990).

Nel corso dello sviluppo del topo e nell'adulto, il TGF- β controlla la differenziazione delle cellule di Schwann, infatti, in risposta a danni al tessuto nervoso, i neuroni esprimono e rilasciano le varie isoforme del TGF- β nell'ambiente circostante, suggerendo per il TGF- β un ruolo importante nella rigenerazione nervosa (Moses H.L. and Serrat R., 1996).

Il TGF- β , insieme alle BMP, è anche coinvolto nella differenziazione degli osteoblasti. Le sue isoforme TGF- β 1 e TGF- β 3 insieme con il BMP4, infatti, agiscono in sinergia per promuovere la condrogenesi nelle cellule mesenchimali degli abbozzi degli arti. La risposta delle cellule al TGF- β dipende dal loro stato di differenziazione, di adesione e dal profilo di espressione dei recettori del TGF- β sulla superficie delle cellule. Gli studi condotti fino ad oggi, hanno evidenziato che il TGF- β , insieme agli altri membri della superfamiglia, può decidere il destino di cellule multipotenti

indirizzando la differenziazione lungo precise linee, sia regolando direttamente la trascrizione dei geni della differenziazione, che indirettamente, come nel caso specifico del TGF- β , controllando l'adesività cellulare (Moses H.L. and Serratt R., 1996).

Controllo sui processi di sintesi e degradazione della matrice extracellulare (ECM).

La composizione della matrice extracellulare (ECM) è il risultato di un processo dinamico di sintesi e di degradazione delle molecole che la costituiscono e il TGF- β è in grado di intervenire su questo equilibrio.

Il TGF- β 1 favorisce la produzione della matrice attraverso due meccanismi. Il primo è rappresentato dall'induzione dell'espressione dei geni codificanti i componenti della matrice extracellulare, come la fibronectina e i vari tipi di collagene (Massagué J., 1990), mentre il secondo consiste nel controllo della produzione di diverse proteasi, come le collagenasi, e di specifici inibitori delle proteasi stesse che impediscono la degradazione della matrice. Il TGF- β 1, infatti, incrementa la sintesi di inibitori come l'inibitore delle metalloproteasi di tipo 1 (Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1, TIMP-1) e quello dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 o PAI-1) (Taipale J. et al., 1998), che presenta all'interno del suo promotore una sequenza riconosciuta da Smad3 e Smad4 (Denkler S. et al., 1998).

L'effetto marcato e generalizzato del TGF- β sulla matrice extracellulare, riveste un ruolo importante nei processi di morfogenesi e sviluppo degli organismi, nei processi di riparazione dei tessuti e in molti processi patologici come il cancro. La matrice extracellulare e la membrana basale, con le loro componenti, rappresentano, infatti, la principale barriera fisica

contro l'invasività, e la degradazione proteolitica di queste strutture, è un evento che svolge un ruolo cruciale nel favorire la metastatizzazione delle cellule tumorali (Stetler-Stevenson W.G. et al., 1993).

IL TGF- β E I TUMORI

Geni oncosoppressori nella via del segnale mediata dal TGF- β .

Il processo della tumorigenesi nell'uomo, è rappresentato da un complesso insieme di eventi stocastici che potenzialmente possono insorgere in tutti i tipi di cancro umano. Tali eventi, determinano alterazioni genetiche, epigenetiche o somatiche, responsabili della trasformazione maligna, che rendono le cellule cancerose capaci di proliferare, anche in assenza di fattori di crescita esogeni, e di acquisire un'illimitata capacità replicativa, di invadere i tessuti e metastatizzare a distanza, di sfuggire all'apoptosi, di automantenersi per mezzo dell'angiogenesi e di evadere la sorveglianza del sistema immunitario.

Il TGF- β con tutta la sua via del segnale svolge un complesso ruolo di regolatore fisiologico di ciascuna di queste funzioni. La perdita da parte del TGF- β della capacità di trasmettere i suoi segnali, pertanto, può spingere le cellule di molti organi verso la trasformazione maligna (Alexandrow M.G. and Moses H.L., 1995) (Figura 9 → Le alterazioni della via del segnale del TGF- β nei tumori umani).

Il TGF- β svolge il ruolo di regolatore fisiologico della proliferazione e della differenziazione cellulare ed è comunemente considerato come un fattore in grado di contrastare l'insorgenza dei tumori. Non stupisce, quindi, che molti degli elementi della sua via di segnale, siano oggetto di alterazioni genetiche e di espressione nelle cellule neoplastiche, a partire dai ligandi, fino ai recettori ed ai trasduttori intracellulari. L'intera via di segnale del TGF- β viene considerata come un complesso di prodotti genici ad azione oncosoppressoria (Markowitz S.D. and Roberts A.B., 1996; Lazzereschi et al., 1997). Potenzialmente, tutti i tumori di derivazione epiteliale (>85% di

tutti i cancri umani), sono resistenti all'azione di inibizione della proliferazione mediata dal TGF- β . In alcuni carcinomi, tra cui colon e pancreas, questa resistenza è legata a mutazioni del recettore di tipo II, o mutazioni o delezioni della proteina Smad4.

Mutazioni inattivanti del recettore T β RII sono state caratterizzate in molti carcinomi del colon e dello stomaco con instabilità microsatellitare. Questo tipo di alterazione è tipica di forme tumorali sporadiche ed è il risultato di difetti dei processi riparativi del DNA, che causano l'aggiunta o la delezione di nucleotidi in semplici sequenze ripetute del genoma (o microsatelliti). L'alterazione nella riparazione di una regione microsatellitare, situata nella sequenza genica che codifica per il dominio extracellulare del recettore di tipo II e costituita da un tratto ripetitivo di poliadenina (BAT-RII), ha come conseguenza la formazione di un prodotto inattivo del recettore (Markowitz S. et al., 1995). Mutazioni di questo dominio del recettore sono state spesso caratterizzate in individui affetti da carcinoma ereditario non-poliposico del colon (Massagué J. et al., 2000). Le mutazioni a carico del recettore di tipo II possono, inoltre, avere la funzione dominante negativa e risultare responsabili della perdita di risposte al TGF- β (Sun L. et al., 1994; Tang B. et al., 1999).

Il gene che codifica per la proteina Smad4, localizzato sul cromosoma 18q21, è stato originariamente denominato Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4 o DPC-4, perché frequentemente appare deletato o mutato nei carcinomi pancreatici (Hahn S.A. et al., 1996). Smad4 è mutato in rilevante proporzione anche nei tumori del colon (Takagi Y. et al., 1996; MacGrogan D. et al., 1997) e meno frequentemente nei carcinomi della mammella, dell'ovaio (Schutte M. et al., 1996), di testa e collo (Kim S.K. et al., 1996), della prostata (MacGrogan D. et al., 1997), dell'esofago e dello stomaco (Lei J. et al., 1996). La più alta frequenza delle mutazioni di Smad4, rispetto alle altre

Smad, è in accordo con il suo ruolo unico e non ridondante di partner comune nella via del segnale per il TGF- β (Heldin C.-H. et al., 1997).

Mutazioni di Smad2, un gene localizzato sul cromosoma 18 in stretta vicinanza con il locus di Smad4, sono state osservate nei tumori del colon e del polmone (Heldin C.-H. et al., 1997). L'inattivazione dei geni che codificano Smad2 e Smad4 deriva, non solo da grandi delezioni, ma anche da mutazioni missenso, nonsense e "frameshift", molte delle quali colpiscono il dominio MH2 della proteina. Mutazioni di questo tipo sono in grado di compromettere la stabilità della proteina, di impedire la formazione dei complessi attivi in risposta al TGF- β e l'interazione con il recettore attivato. Solo in pochi tumori sono state osservate mutazioni nel dominio MH1. Una di queste mutazioni (Arg100Thr) interessa Smad4 nel carcinoma del pancreas (Schutte M. et al., 1996), e determina il blocco della proteina in uno stato inattivo, nel quale la sua traslocazione nel nucleo, in seguito all'attivazione della via del segnale del TGF- β , sarebbe impedita.

Alla base della resistenza al TGF- β , sono stati identificati anche altri meccanismi, che includono una diminuita espressione di T β RI, T β RII o T β RIII oppure, una iperespressione delle I-Smad, in particolare di Smad7. Anche alterazioni a carico di oncoproteine come p53, c-Myc, E1A, ras, Ski/SnoN ed Evi-1, impediscono la trasmissione del segnale del TGF- β . Infine, la resistenza al fattore di crescita può essere causata anche dalla riduzione dell'espressione o l'inattivazione di geni oncosoppressori quali Menin, Disabled2 e RUNX3, che regolano direttamente la via del segnale del TGF- β (Elliott R. L. and Blobel G. C., 2005).

Tipiche alterazioni del pathway nei tumori umani:

- Mutato/deleto/downregolato
- Amplificato/overespresso

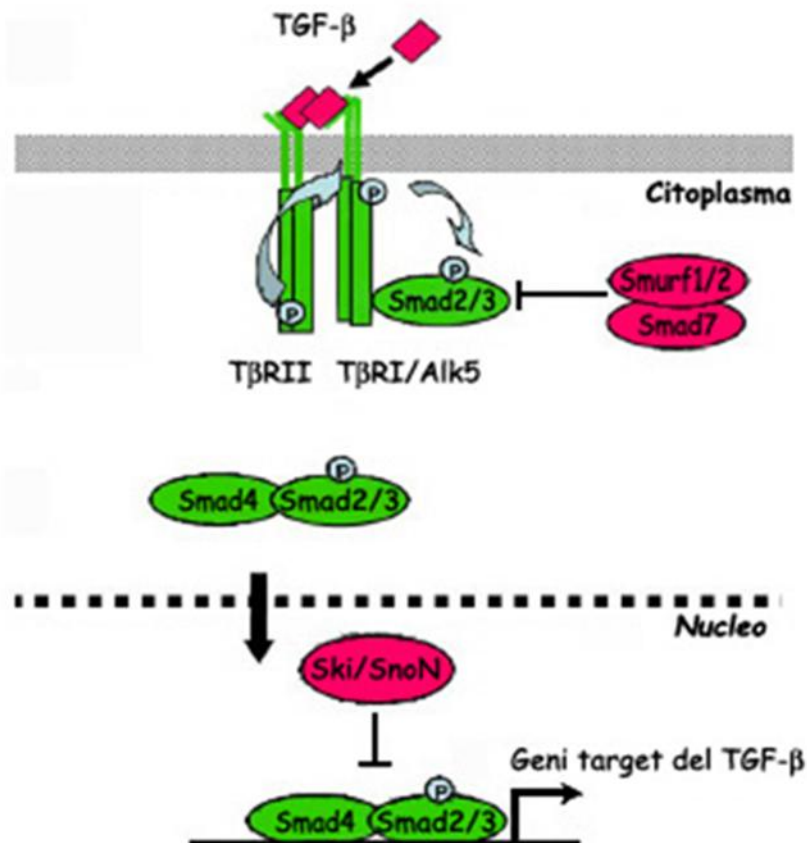


Figura 9. Le alterazioni della via del segnale del TGF-β nei tumori umani.

Il processo della tumorigenesi nell'uomo, è rappresentato da un complesso insieme di eventi stocastici che potenzialmente possono insorgere in tutti i tipi di cancro umano e che determinano alterazioni genetiche, epigenetiche o somatiche, responsabili della trasformazione maligna, rendendo le cellule cancerose capaci di proliferare, anche in assenza di fattori di crescita esogeni, di acquisire un'illimitata capacità replicativa, di invadere i tessuti e metastatizzare a distanza, di sfuggire all'apoptosi, di automantenersi per mezzo dell'angiogenesi e di evadere la sorveglianza del sistema immunitario.

Il TGF-β con tutta la sua via del segnale svolge un complesso ruolo di regolatore fisiologico di ciascuna di queste funzioni e non stupisce, quindi, che molti degli elementi della sua via di segnale, siano oggetto di alterazioni genetiche e di espressione nelle cellule neoplastiche, a partire dai ligandi, fino ai recettori ed ai trasduttori intracellulari.

(Adattata da Levy L. e Hill C.S., 2005)

Il TGF- β e il processo di invasione metastatica.

I tumori solidi producono i loro effetti letali invadendo i tessuti circostanti il tumore primario e metastatizzando in siti distanti dell'organismo. Il processo attraverso il quale le cellule cancerose invadono e metastatizzano, coinvolge interazioni complesse fra le cellule trasformate e l'ambiente extracellulare circostante. Il TGF- β è un potente regolatore dell'adesione, della motilità cellulare e della matrice extracellulare. Esso controlla le proprietà adesive delle cellule riducendo l'espressione della E-caderina (Miettinen P.J. et al., 1994) e, quindi, l'adesività cellulare, incrementando l'espressione delle integrine associate all'invasione, come l'integrina $\alpha 3\beta 1$ (Giannelli G. et al., 2002), e aumentando l'espressione delle proteine leganti le integrine, come la fibulina-5 (Schiemann W.P. et al., 2002). Inoltre, esso aumenta direttamente anche la motilità delle cellule epiteliali e di quelle del cancro della mammella (Dumont N. et al., 2003) e, durante il processo della tumorigenesi, stimola l'attività proteolitica delle cellule cancerose, aumentando l'espressione degli enzimi che degradano la matrice (Desruisseau S. et al., 1996). Le cellule cancerose stesse, producono alti livelli di TGF- β , responsabile del processo dell'invasività (Maehara Y. et al., 1999). Il TGF- β esogeno, infatti, è capace di aumentare l'atteggiamento invasivo e metastatico delle cellule cancerose di mammella anche mentre continua ad inibire la loro proliferazione (Tobin S.W. et al., 2002).

Il passaggio da cellule epiteliali a cellule mesenchimali è decisivo per l'embriogenesi degli organismi metazoi e lo sviluppo degli organi. Tale processo viene indicato come Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) ed è studiato con interesse per il suo coinvolgimento nello sviluppo e, al contempo, in diverse patologie dell'adulto, compreso il cancro. Un tipico epitelio è organizzato come uno strato di cellule, spesso un monostrato, nel contesto del quale, ad intervalli regolari, le cellule epiteliali si trovano

legate a quelle confinanti da giunzioni cellula-cellula, che conferiscono al monostrato una certa rigidità e resistenza meccanica e una ben determinata polarità. Le cellule mesenchimali, al contrario, generalmente non mostrano di possedere una struttura così organizzata e non formano giunzioni strette con le altre cellule, risultando più mobili e capaci di migrare. Esse, inoltre, hanno una forma più allungata e possiedono una tipica polarità "fronte-retro", corrispondente al loro fronte di avanzamento. Il passaggio da cellule epiteliali a mesenchimali richiede alterazioni della morfologia e dell'architettura cellulare, dell'adesione e della capacità migratoria (Lee J.M. et al., 2006). La perdita di espressione della E-caderina è il primo degli eventi che si verificano durante l'EMT. La E-caderina, molecola di adesione omofilica, è caratteristica delle cellule epiteliali e forma con le catenine le giunzioni aderenti, che sono completamente assenti nelle cellule mesenchimali. Seguono alla perdita della E-caderina e alla riorganizzazione dei complessi di contatto cellula-cellula, altri eventi come la transizione dei filamenti intermedi da cheratina a vimentina, la modificazione dei complessi di adesione cellulare, la sintesi delle proteine della matrice extracellulare, normalmente espresse dalle cellule mesenchimali (fibronectina e collagene I/III), e l'espressione di diverse proteasi, incluse le metalloproteasi (Matrix Metalloproteases, MMPs), che sono predominantemente espresse dalle cellule stromali. Tutti questi cambi molecolari, conferiscono alle cellule epiteliali l'abilità di diffondere ("scatter"), di migrare e di degradare le componenti della ECM, che sono proprietà non esclusive di un tessuto epiteliale coesivo normale.

In un contesto diverso da quello dello sviluppo, l'EMT ha un ruolo importante nella fibrosi e nel cancro, in particolar modo, nella progressione tumorale e nei processi di metastatizzazione e di invasione, che richiedono la capacità delle cellule di migrare, invadere lo stroma circostante e disseminarsi in

altri organi (Hay E.D., 1995; Birchmeier C. et al., 1996; Thiery J.P and Chopin D., 1999; Massagué J. et al., 2000b; Savagner P., 2001; Derynck R. et al., 2001). Il TGF- β è uno dei maggiori regolatori della EMT. Tutte e tre le isoforme isolate nei mammiferi, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, possono regolare l'EMT con conseguenze diverse, a seconda del tipo di tessuto, e dello stato di differenziazione cellulare (Wakefield L.M. and Roberts A.B., 2002; Dumont N. and Arteaga C.L., 2003) (Figura 10 → Il TGF- β e l'Epithelial Mesenchymal Transition o EMT).

Errore.

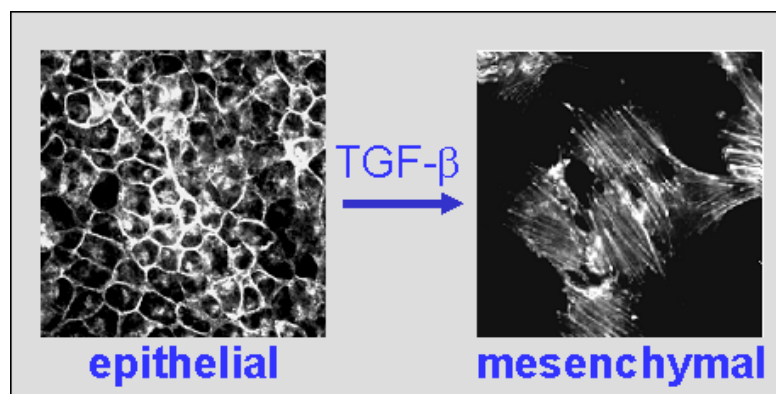
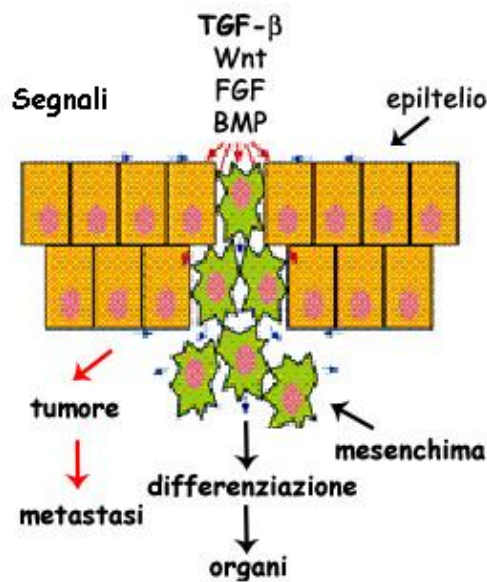


Figura 10. Il TGF- β e l'Epithelial Mesenchymal Transition o EMT.
 Il TGF- β è uno dei maggiori regolatori della EMT. Esso ha un ruolo nell'EMT sia durante lo sviluppo embrionale che durante i processi di tumorigenesi.

Studi effettuati *in vitro* in cellule epiteliali mammarie NMuMG (Miettinen P.J. et al., 1994), hanno dimostrato che l'EMT, indotta dal TGF- β , è completamente reversibile, ed è determinata da una riduzione dell'espressione di marcatori di differenziazione epiteliali, come la E-caderina (Miettinen P.J. et al., 1994), la "zonula occludens" (ZO-1) e le desmoplachine I e II, da una delocalizzazione della E-caderina rispetto alle giunzioni cellulari, da riarrangiamenti citoscheletrici Rho-dipendenti (Bhowmick N.A. et al., 2001), e da modificazioni delle interazioni tra le integrine e le componenti della matrice extracellulare. Anche l'aumento della migrazione cellulare è un altro di quegli eventi tipicamente associati all'EMT TGF β -indotta. L'induzione della EMT da parte del TGF- β è legata all'attivazione di vie di segnale sia Smad-dipendenti che Smad-indipendenti, come quella della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3-K) (Bakin A.V. et al., 2000), di Rho (Bhowmick N.A. et al., 2001), di *ras* e della p38 MAPK (Savagner P., 2001). Il ruolo di Smad2 o di Smad3 è essenziale per lo sviluppo dell'EMT associata alla progressione tumorale, come dimostrato *in vitro*, in colture di cellule epiteliali di mammella (Zavadil J. et al., 2004). Mutazioni inattivanti di Smad2, inibiscono la formazione delle metastasi perché bloccano l'EMT indotta dal TGF- β (Lee J.M. et al., 2006).

Nelle NMuMG, l'attivazione di RhoA e p160 ROCK da parte del TGF- β , determina la delocalizzazione della E-caderina rispetto alle giunzioni cellulari, e l'espressione della N-caderina ai margini della cellula. La via di segnale della PI3-K/Akt contribuisce all'EMT, invece, attraverso la distruzione delle giunzioni strette che correla con la delocalizzazione della E-caderina, di ZO-1, e della integrina β 1, rispetto alle giunzioni cellulari e l'assunzione da parte delle cellule di un fenotipo fibroblasticoide (Bakin A.V. et al., 2000). La p38 MAPK, che viene attivata dal T β RI e dal T β RRII, coinvolta nel processo dell'EMT TGF β -indotto, è necessaria ma non

sufficiente a provocare l'EMT. La cooperazione funzionale tra la via di *ras* e quella del TGF- β , dimostrata in vari contesti cellulari, suggerisce che esiste una stretta relazione fra queste due importanti vie di segnale e l'avvio del processo EMT. In cellule epiteliali di mammella, infatti, l'oncogene *H-ras*, promuove l'EMT attraverso la stimolazione della produzione autocrina del TGF- β , responsabile dell'attivazione continua della via attraverso la stimolazione del T β RI. Anche un Raf iperattivato, concorre, attraverso lo stesso meccanismo, al mantenimento del fenotipo invasivo nelle cellule epiteliali di rene di cane MDCK (Lehmann K. et al., 2000).

Il rimodellamento controllato della matrice extracellulare è essenziale per la crescita, l'invasione e la metastatizzazione dei tumori maligni. Le metalloproteasi della matrice (MMP), tra loro simili dal punto di vista strutturale, sono endopeptidasi secrete, zinco-dipendenti, appartenenti ad una specifica famiglia, capaci di degradare le componenti della ECM. La famiglia delle MMP comprende 23 omologhi umani (Benaud C. et al., 1998; Sternlicht M.D. and Werb Z., 2001; Egeblad M. and Werb Z., 2002; Lafleur M.A. et al., 2003) che possono essere suddivisi in diversi sottogruppi sulla base della loro struttura e della loro specificità per i vari substrati. La loro struttura è caratterizzata dalla presenza di tre domini: il dominio "pre" che indirizza le MMP al reticolo endoplasmatico, il dominio "pro" che mantiene le MMP in una forma inattiva e il dominio "catalitico". L'attivazione enzimatica richiede il taglio del dominio "pro" da parte di enzimi simil-furina a livello della sequenza consenso del "prodominio" (Figura 11 → La struttura delle metalloproteasi). L'attività delle MMP può essere regolata da specifici inibitori tissutali indicati come TIMP-1 -4.

In generale le MMP possono virtualmente degradare ogni componente della matrice. Le MMP, attraverso la loro funzione, non solo facilitano la migrazione e l'invasione da parte delle cellule, ma possono anche modulare

segnali provenienti dalla matrice e la biodisponibilità di fattori di crescita depositati nel contesto della matrice stessa.

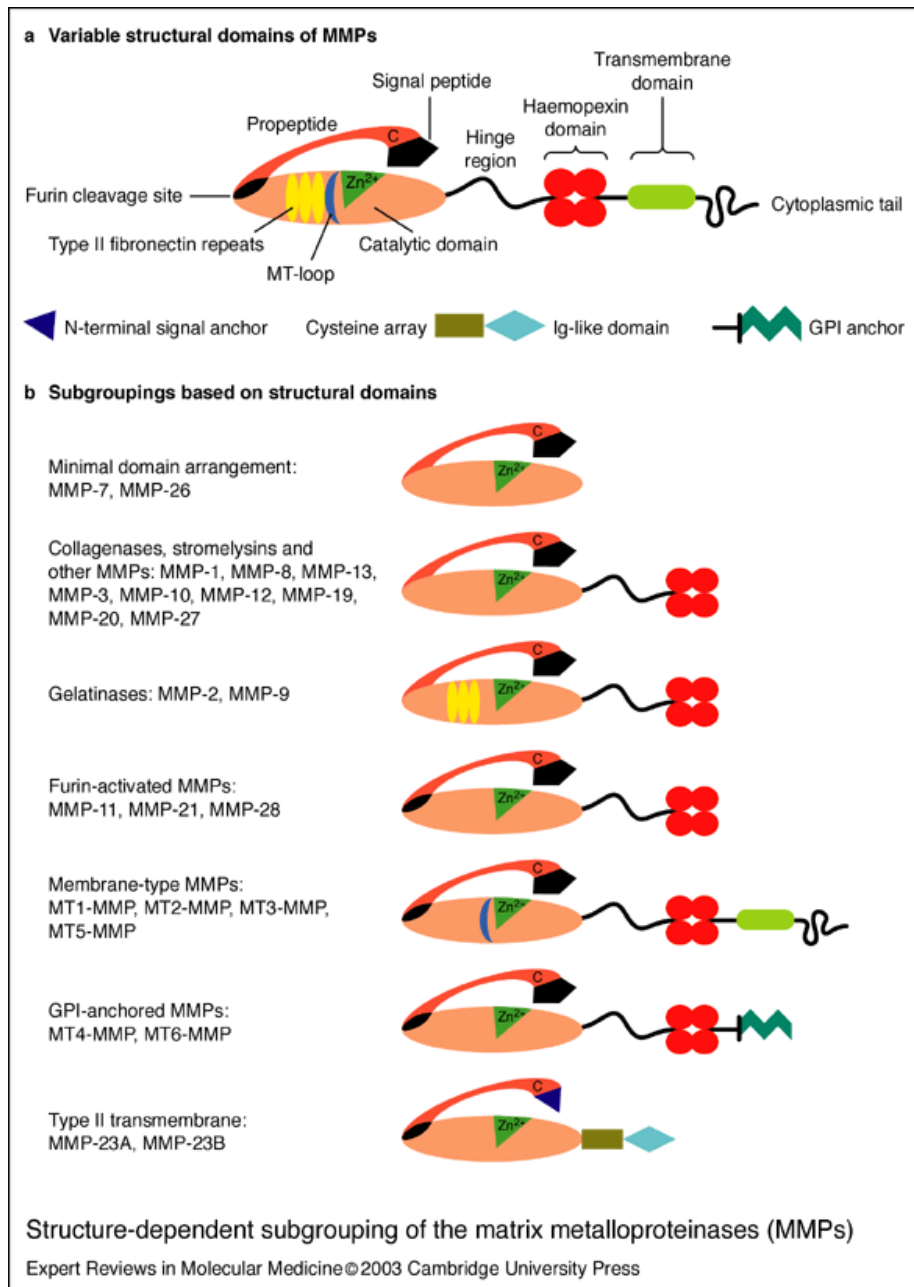


Figura 11. La struttura delle metalloproteasi.

Le MMP hanno una struttura multidomini con alcuni domini specifici comuni a tutte le MMP. Il peptide segnale all'estremità N-terminale è quello responsabile della secrezione del proenzima. Tra i domini conservati dobbiamo ricordare il dominio "pre" che indirizza le MMP al reticolo endoplasmatico, il dominio "pro" che mantiene le MMP in una forma inattiva e il dominio "catalitico".

Le gelatinasi MMP-2 e MMP-9 (gelatinasi A e B, rispettivamente) degradano il collagene IV, che è il costituente principale della membrana basale. La perdita della membrana basale è uno dei segni più importanti di invasività e di aggressività dei carcinomi (Barsky S.H. et al., 1983; Woodhouse E.C. et al., 1997).

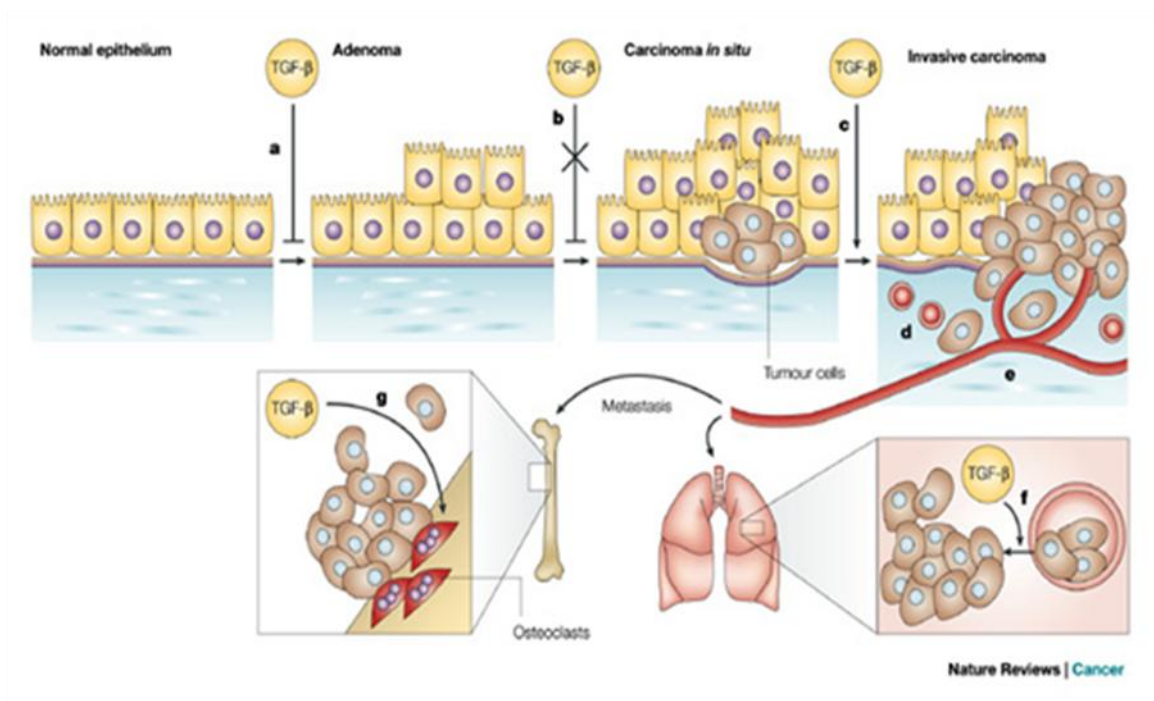
In un modello sperimentale di colture primarie normali e trasformate di cellule epiteliali e stromali di prostata, è stato dimostrato che il TGF- β induce l'espressione e la secrezione di MMP-2 e MMP-9 e che l'innalzamento dei livelli di tali MMP si associa alla maggiore aggressività del tumore (Wilson M.J. et al., 2002). In altri casi, come, per esempio, in colture di fibroblasti dell'endometrio uterino umano, il TGF- β regola negativamente l'espressione di MMP-1 e MMP-2 agendo a livello di mRNA. Tale regolazione è mediata dall'"Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer" o EMMPRIN, membro della superfamiglia immunoglobulinica delle molecole di adesione, coinvolto nell'attivazione di diverse MMP (Braundmeier A.G. and Nowak R.A., 2006), la cui espressione è controllata negativamente dal TGF- β , a livello di mRNA.

TGF- β : oncosoppressore e "tumor promoter".

Il TGF- β è stato considerato originariamente un "tumor promoter" per la sua capacità di indurre la crescita ancoraggio-indipendente dei fibroblasti di topo (Moses H.L. et al., 1981); solo gli studi successivi hanno chiarito che esso è anche un potente inibitore della proliferazione delle cellule epiteliali, endoteliali ed ematopoietiche (Tucker R.F. et al., 1984; Massagué J., 1998). L'iperespressione del TGF- β 1 nei topi transgenici, sotto il controllo di promotori tessuto-specifici, protegge da carcinomi indotti da oncogeni o da carcinogeni (Pierce D.F. Jr et al., 1995), e un particolare polimorfismo del gene TGFB1, che si associa ad un incremento dei suoi livelli nel siero,

corrisponde una riduzione del rischio di carcinoma della mammella nelle donne in postmenopausa (Ziv E. et al., 2001). Il TGF- β , pertanto, è un importante oncosoppressore grazie alla sua capacità di inibire il ciclo cellulare, di controllare l'instabilità genomica, e di indurre la senescenza replicativa e l'apoptosi (Kordon E.C. et al., 1995).

Le cellule trasformate sfuggono a questo controllo negativo della proliferazione, accumulando mutazioni che sono in grado di attenuare o addirittura spegnere il segnale del TGF- β e, molto insidiosamente, riescono a volte a corrompere la via del segnale del TGF- β e a convertirlo da oncosoppressore a mediatore delle metastasi (Figura 12 → Il TGF- β e l'invasione). L'alterazione della via del segnale del TGF- β , riscontrata in molti cancri umani, è il prodotto di delezioni parziali o complete dei geni che codificano le proteine Smad, il recettore T β RI o il recettore T β RII, che non viene espresso nel 31% dei carcinomi con un'elevata capacità invasiva (Gobbi H. et al., 2000). L'alta produzione e/o attivazione del TGF- β , riscontrata negli stadi più avanzati di tumori maligni, può stimolare la progressione tumorale con meccanismi autocrini o paracrini, attraverso l'alterazione della matrice extracellulare e dell'espressione delle molecole di adesione, l'induzione dell'angiogenesi e dell'immunosoppressione (Derynck R. et al., 2001; Wakefield L.M. and Roberts A.B., 2002). Le cellule altamente trasformate, diventano resistenti all'azione oncosoppressiva del TGF- β , ma restano sensibili alla sua azione di "tumor promoter" per quanto riguarda la motilità, la migrazione e l'invasione (Oft M. et al., 1998; McEarchern J.A. et al., 2001). Questa importante alterazione nella risposta al TGF- β , insorge nel momento in cui le cellule trasformate vanno incontro al fenomeno dell'EMT. Durante l'EMT, infatti, le cellule epiteliali perdono il loro fenotipo e acquisiscono quello mesenchimale caratterizzato da un'aumentata motilità e capacità di invadere i tessuti circostanti.



- a) Normalmente limita la proliferazione delle cellule epiteliali
- b) La perdita dell'inibizione della crescita TGF β -mediata determina iperplasia e sostiene la trasformazione
- c) Il controllo della proliferazione da parte del TGF- β può indurre la transizione epitelio-mesenchimale e favorire l'invasione
- d) Il TGF- β sopprime le risposte dei linfociti T contribuendo alla fuga dal sistema immunitario
- e) Il TGF- β ha effetti pro-angiogenici
- f) Il TGF- β induce l'extravasazione e l'attaccamento delle cellule tumorali ai tessuti di siti distanti
- g) Il TGF- β promuove la risposta degli osteoclasti e il rimodellamento osseo nelle metastasi distanti

Figura 12. Il TGF- β e l'invasione.

Le cellule trasformate sfuggono al controllo negativo della proliferazione esercitato dal TGF- β accumulando mutazioni che sono in grado di attenuare o addirittura spegnere il segnale del TGF- β e, molto insidiosamente, riescono a volte a corrompere la via del segnale del TGF- β e a convertirlo da oncosoppressore a mediatore delle metastasi.

(Adattata da Siegel and Massague. Nat Rev Cancer, 2003)

IL TGF- β E LA TIROIDE

Crescita e differenziazione della tiroide.

La tiroide è una ghiandola endocrina riccamente vascolarizzata, sede di produzione e di accumulo di ormoni tiroidei, che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo e dei processi di crescita e differenziazione cellulare.

L'unità morfologica e funzionale della ghiandola è rappresentata dai follicoli tiroidei, formati da cellule epiteliali follicolari, polarizzate, che delimitano una cavità interna contenente la colloide, sede di deposito della Tireoglobulina (TG), e degli ormoni tiroidei, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). La biosintesi degli ormoni tiroidei si svolge in varie tappe e richiede: il trasporto dello ioduro all'interno della cellula, mediante un cotrasportatore Na⁺/I⁻ symporter (NIS), clonato per la prima volta nelle cellule FRTL-5 da Dai (Dai G. et al., 1996); la sintesi e l'accumulo di TG nel lume dei follicoli; l'idrolisi della TG e il successivo rilascio degli ormoni tiroidei nel sangue.

La regolazione fisiologica della crescita e delle funzioni della ghiandola tiroidea è il risultato dell'azione combinata di ormoni e fattori di crescita che agiscono attraverso meccanismi di tipo endocrino, paracrino e autocrino. L'ormone ipofisario tireotropina (Thyroid Stimulating Hormone, TSH) è uno dei più importanti regolatori della proliferazione e differenziazione delle cellule tiroidee. Il legame del TSH al suo recettore consente la trasduzione di un segnale mediante più vie, la principale delle quali è quella dell'adenilato ciclasi e dell'Adenosin Monophosphato ciclico (c-AMP). Il TSH, oltre alla proliferazione del tireocita, esercita il suo controllo sul metabolismo dello iodio, direttamente, e a livello trascrizionale sulla

produzione del NIS (Ohno M. et al., 1999; Taki K. et al., 2002; Lin X. et al., 2004). La tiroide esprime i cosiddetti "geni tiroideo-specifici", che codificano le proteine che sono state trovate esclusivamente nella tiroide, come la tireoglobulina e la tireoperossidasi, e le proteine che sono principalmente coinvolte nella funzione tiroidea, ma che possono essere presenti anche in pochi altri tessuti, come il recettore del TSH e il Na⁺/I⁻ symporter. La trascrizione di questi geni sembra dipendere dall'azione coordinata di un gruppo di fattori di trascrizione che include la "homeodomain protein" TTF-1, la "paired-domain protein" PAX-8 e anche la "forkhead-domain protein" TTF-2 (Damante G. and Di Lauro R., 1994; Damante G. et al., 2001). Il TSH controlla solo la sintesi di PAX-8, anche se topi geneticamente modificati, deficienti in TSH funzionale o recettore del TSH, non presentano livelli ridotti di PAX-8, probabilmente per la presenza di meccanismi di compensazione che assicurano un'adeguata produzione di questi fattori, quando lo sviluppo tiroideo deve avvenire in assenza dei normali stimoli fisiologici.

La ghiandola tiroidea è influenzata anche dall'azione d'altri ormoni non specifici, come l'idrocortisone, che *in vitro* svolge un'azione differenziante (Gerard C.M. et al., 1989; Dumont J.E et al., 1991), o gli estrogeni che, con un meccanismo ancora sconosciuto, modulano la funzione tiroidea durante la gravidanza e il ciclo mestruale. L'ormone della crescita (Growth Hormone, GH), induce la proliferazione delle cellule tiroidee attraverso la produzione locale delle somatomedine (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1). Gli effetti che il TSH esercita sono potenziati da altri fattori di crescita come l'insulina e l'IGF-1, che favoriscono la crescita cellulare e contribuiscono al mantenimento del funzionamento della tiroide (Santisteban P. et al., 1987). Studi condotti *in vitro* dimostrano che l'Epithelial Growth Factor (EGF) stimola la sintesi del DNA ed inibisce la captazione dello iodio in tessuto

tiroideo umano (Paschke R. et al., 1995), mentre la somministrazione di Fibroblast Growth Factor (FGF) nei topi, può avere un effetto gozzigeno senza influenzare la captazione dello iodio (De Vito W.J. et al., 1992). Sia EGF che FGF sono sintetizzati dalla ghiandola tiroidea in risposta allo stimolo indotto, rispettivamente, dalla tiroxina e dal TSH (Becks G.P. et al., 1994).

Il TGF- β , costituisce un'altra categoria di citochine, prodotte localmente dai tireociti, capace di influenzare la loro proliferazione e l'azione degli altri fattori mitogenici. Il TGF- β , inibisce la proliferazione ed antagonizza molti degli effetti del TSH e del c-AMP nei tireociti umani e di ratto *in vitro* (Grubeck-Loebenstein B. et al., 1989; Cirafici A.M. et al., 1992; Taton M. et al., 1993). Il TGF- β è sintetizzato come precursore inattivo, che può essere attivato da molte proteasi prodotte dai tireociti stessi. La sua espressione è aumentata durante l'iperplasia indotta dal TSH nei ratti, suggerendo l'esistenza di un meccanismo autocrino che serve a limitare l'accrescimento del gozzo (Logan A. et al., 1994). Anche l'Activina A e il BMP, appartenenti alla superfamiglia del TGF- β , inibiscono la proliferazione dei tireociti *in vitro*, ma a differenza del TGF- β , vengono prodotti direttamente in forma attiva (Franzén A. et al., 1999). I recettori T β R II e T β R I , importanti per avviare la trasduzione del segnale del TGF- β , sono normalmente espressi dalle cellule tiroidee umane e di ratto, sulle quali il TGF- β esercita i suoi effetti inibitori sulla proliferazione, bloccandole nella fase G1 del ciclo cellulare (Grubeck-Loebenstein B. et al., 1989). Nei tireociti di cane è stato dimostrato che questo fattore inibisce selettivamente la proliferazione c-AMP-dipendente, impedendo la fosforilazione di Cdk4 e la formazione del complesso ciclina D-Cdk4 e p27 (Depoortere F. et al., 2000; Coulonval K. et al., 2003).

Studi effettuati *in vitro*, utilizzando linee cellulari di tiroide di ratto o di maiale, hanno dimostrato che il TGF- β 1 esercita un'importante azione anche nel controllo dell'espressione dei principali geni di differenziazione delle cellule tiroidee (Franzén A. et al., 1999; Nicolussi A. et al., 2003) e, in particolare, inibisce la produzione di PAX-8 attraverso l'azione delle proteine Smad (Costamagna E. et al., 2004).

Nelle cellule FRTL-5, dopo trattamento con TGF- β 1, sono stati osservati cambiamenti della morfologia per la riorganizzazione dei microfilamenti che ne compongono il citoscheletro e per un'aumentata produzione delle proteine dell'ECM (Garbi et al., 1990).

Cancerogenesi tiroidea e ruolo del TGF- β nello sviluppo dei tumori della tiroide.

La ricerca di alterazioni genetiche che possono contribuire all'evoluzione delle neoplasie tiroidee, ha fornito in questi anni dei risultati importanti, alcuni di potenziale impatto clinico ed applicativo. Molti degli aspetti molecolari della tumorigenesi tiroidea, restano tuttavia ancora oscuri ed il modello poligenico e sequenziale dell'evoluzione e dei rapporti tra le differenti forme tumorali, pur accettato nelle sue linee generali, presenta numerose lacune, soprattutto nella correlazione tra alterazioni genetiche e specifici aspetti istopatologici.

I tumori tiroidei rappresentano un particolare modello di trasformazione neoplastica epiteliale. Infatti, la maggior parte delle neoplasie tiroidee che originano da una singola cellula, la cellula follicolare tiroidea, comprende un ampio spettro di tumori con caratteristiche fenotipiche diverse, di cui sono stati definiti vari stadi di malignità: dagli adenomi follicolari benigni, ai carcinomi differenziati papilliferi e follicolari, alle forme inevitabilmente

fatali di carcinoma anaplastico (indifferenziato) ed invasivo. Nei tumori della tiroide, così come osservato in molte neoplasie d'altri organi, la trasformazione maligna è il risultato di cambiamenti genetici multipli che coinvolgono l'attivazione di protooncogeni e la perdita di geni oncosoppressori mediante mutazioni puntiformi, riarrangiamenti genici e delezioni (Farid N.R. et al., 1994). I riarrangiamenti dell'oncogene RET/PTC, che codifica per un recettore tirosin-chinasico, sono tipici dei carcinomi papilliferi (Fagin J.A., 1992), così come le mutazioni di BRAF, riscontrate, inoltre, anche nei carcinomi indifferenziati insorti su carcinomi papilliferi (Jhiang S. et al., 1996). c-Myc, la cui espressione è stimolata dal TSH nelle cellule tiroidee normali, negli adenomi e nei carcinomi è costitutivamente espresso. Il protooncogene *ras* è fortemente coinvolto nella cancerogenesi tiroidea; iperespressioni o mutazioni attivanti nei codoni 12, 13, e 61 di *H-ras* sono state trovate tanto negli adenomi che nei carcinomi, ma la presenza di mutazioni di *H-ras* anche in gozzi multinodulari, suggerisce che tali mutazioni potrebbero rappresentare un evento precoce nella cancerogenesi (Namba H. et al., 1990a, b). *In vitro*, la trasformazione delle cellule FRTL-5 mediata da *ras*, sopprime l'espressione dei marcatori di differenziazione come la TG, il NIS e il TPO. L'iperespressione della forma costitutivamente attivata di RhoA induce, in queste cellule, un vantaggio proliferativo e una morfologia di tipo fibroblastoide, suggerendo che tale proteina possa avere un ruolo importante come induttore della trasformazione delle FRTL-5. Oltre alla proteina RhoA, anche la proteina Rac è essenziale nella trasformazione *ras*-mediata. L'iperespressione di RhoA, a tutt'oggi, è stata associata a diverse forme di tumore (Sahai E. and Marshall C.J., 2002) e potrebbe suggerire per RhoA un ruolo di controllo sulla motilità cellulare e, quindi, sulla formazione delle metastasi (Bourguignon L.Y. et al., 1999). Alcuni autori (Medina D.L. et al., 2002) hanno dimostrato che l'attivazione di

RhoA nelle cellule normali e differenziate di tiroide di ratto FRTL-5, promuove la trasformazione e la perdita di caratteri differenziativi mimando gli effetti trasformanti di *ras* sulle stesse cellule: tali risultati fanno pensare che RhoA possa essere a valle di *ras* nella via di controllo del fenotipo differenziato delle cellule di tiroide e/o che le due vie di segnale si incrocino.

E' stata recentemente dimostrata la traslocazione del dominio di legame al DNA di PAX-8 sul gene che codifica per PPAR- γ 1 (Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ 1), il risultante oncogene di fusione è in grado di trasformare il tireocita e renderlo maligno (Kroll T. et al., 2000; Sahin M. et al., 2005). Questa traslocazione potrebbe rappresentare un evento precoce della cancerogenesi tiroidea, infatti, è stata ritrovata anche in alcuni adenomi follicolari (Marques A.R. et al., 2002).

L'oncogenesi tiroidea, oltre ai fattori genetici positivi, spesso coinvolge anche alterazioni di geni oncosoppressori, come p53 e il TGF- β . Mutazioni o delezioni di p53, sono state trovate sia in alcuni carcinomi differenziati che in molti carcinomi indifferenziati, suggerendo che la delezione di p53 può essere una delle tappe finali che conduce allo sviluppo di un carcinoma anaplastico (Fagin J.A. et al., 1993).

L'altro oncosoppressore coinvolto in questo processo è il TGF- β . L'acquisizione della "resistenza" al TGF- β è un carattere precoce di cloni di cellule suscettibili alla trasformazione neoplastica: non a caso la perdita di risposta a questo fattore correla con una maggiore tumorigenicità in un modello di progressione neoplastica nel topo nudo. Linee trasformate dall'oncogene *K-ras*, altamente maligne, presentano livelli ridotti del mRNA e della proteina del T β RII (Coppa A. et al., 1997); cloni transfettati con il cDNA di tale recettore, mostrano una ripristinata sensibilità al TGF- β e una ridotta malignità *in vitro*, ed, impiantati in topi nudi, sviluppano più

lentamente tumori *in vivo*, con metastasi in numero significativamente minore (Turco A. et al., 1999). Studi condotti *in vivo*, hanno evidenziato come, in neoplasie tiroidee umane benigne e maligne a variabile istopatologia, un consistente gruppo di carcinomi mostra una chiara ipoespressione del T β RII, valutata a livello di RNA e di proteina (Lazzereschi D. et al., 1997).

La ricerca condotta negli ultimi anni sul ruolo di anomalie genetiche e di espressione, a livello di RNA e di proteina, del trasduttore del segnale TGF β -dipendente, Smad4, nello sviluppo dei tumori tiroidei, ci ha consentito di acquisire alcune importanti informazioni che confermano il suo coinvolgimento nel processo di trasformazione tumorale dei tireociti, specie in quello che porta ai carcinomi papilliferi (PTC). La ricerca condotta negli ultimi anni sul ruolo delle anomalie genetiche e di espressione di Smad4, trasduttore del segnale TGF β -dipendente, nello sviluppo dei tumori tiroidei, ci ha consentito di acquisire alcune importanti informazioni che confermano il suo coinvolgimento nel processo di trasformazione tumorale dei tireociti, specie in quello che porta ai carcinomi papilliferi (PTC). Lo studio del gene SMAD4 e la sua espressione in un gruppo di tumori sporadici della tiroide con differenti istotipi, ha evidenziato la presenza di una o più mutazioni, localizzate prevalentemente nel dominio funzionale MH2 e nel dominio intermedio, la cosiddetta regione "linker", raramente mutata in altri tipi di tumori. Le mutazioni trovate non correlano con uno specifico istotipo e sono presenti sia nelle neoplasie della tiroide benigne che maligne. Nel complesso, accanto alla notazione dell'incidenza elevata di mutazione per SMAD4 (27%), si sottolinea come essa vada considerata un evento relativamente precoce nella tumorigenesi, essendo anche presente in neoplasie benigne, e come non si rintracci un'associazione preferenziale con uno specifico istotipo (Lazzereschi D. et al., 2005).

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DEL LAVORO

La perdita di risposta all'inibizione della crescita TGF β -dipendente è un momento importante nel processo di tumorigenesi, determinato da mutazioni o delezioni dei recettori del TGF- β , T β RII o T β RI, o delle proteine Smad che possono, per questo motivo, essere considerati degli oncosoppressori (Serra R. and Moses H.L., 1996). In particolare, la transfezione di cDNA del T β RII wt in cellule di tumore che hanno perso l'espressione di questo recettore del TGF- β , come linee cellulari di cancro del colon o di cancro della mammella, si associa ad una perdita della capacità di proliferare e di invadere (Markowitz S. et al., 1995; Sun et al., 1994).

Anche in un modello di cellule tiroidee di ratto trasformate da *K-ras*, la transfezione di cDNA HA-T β RII wt, provoca una parziale reversione del fenotipo trasformato. I cloni stabili iperesprimenti il T β RII wt, infatti, presentano una ridotta crescita ancoraggio-dipendente e -indipendente rispetto alle cellule parentali e una diminuita capacità tumorigenica. Anche il potenziale metastatico (numero di metastasi artificiali e spontanee) di questi cloni, è ridotto in misura statisticamente significativa, e si associa ad un aumento del tempo di sopravvivenza dei topi nudi inoculati, rispetto ai controlli inoculati con le cellule parentali altamente maligne (Turco A. et al., 1999). In questi cloni, la riduzione TGF β -dipendente della crescita e dell'invasività, si accompagna ad un incremento della sintesi e deposizione di uno specifico componente della matrice, il collagene IV, che è un importante componente della membrana basale nella tiroide adulta (Lohi J. et al., 1997), barriera che rappresenta uno degli ostacoli che il tumore deve affrontare, distruggere e superare per invadere altri tessuti e metastatizzare. E' noto che il TGF- β regola in molti sistemi cellulari l'adesione, la migrazione, la polarità cellulare e l'espressione delle metalloproteasi (MMP), pertanto lo scopo di questo lavoro è di chiarire gli eventi molecolari coinvolti in questa modulazione del potenziale metastatico delle cellule di tiroide di ratto

trasformate dall'oncogene *K-ras*, iperesprimenti il T β RII. A tal fine, nei cloni iperesprimenti il T β RII, è stata studiata: la via del segnale del TGF- β , il comportamento adesivo e migratorio in varie condizioni sperimentali, l'espressione di una delle integrine potenzialmente coinvolte in tali comportamenti, della proteina RhoA, e della MMP-2.

MATERIALI E METODI

Anticorpi e Reagenti.

Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali e policlonali. Come anticorpi monoclonali sono stati usati: anti- $\alpha 5$ (Immunological Sciences), anti- β -actina e anti-RhoA (26C4) comprati da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, anti-Smad2/3 e anti-Smad4 (BD Biosciences, Pharmingen, CA). Come anticorpi policlonali sono stati usati: anti- $\alpha 5\beta 1$ (Immunological Sciences), anti-CRM-1, anti-T β RII, anti-Smad4, anti-metalloproteasi 2, anti-Erk-1 e anti-emoagglutinina del virus influenzale (HA) comprati da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA e anti-Smad2-P (Upstate, Lake Placid, NY).

Cellule.

Le cellule K10 derivano dalle cellule K.M.A.1, cellule di tiroide di ratto ottenute infettando le FRTL-5 con il virus KiMSV (MolMuLV). Come le K.M.A.1, le K10 sono resistenti all'attività di inibizione del TGF- β sulla crescita cellulare (Colletta G. et al., 1991). Come precedentemente descritto (Turco A. et al., 1999), i cloni RIIK2 e RIIK4 sono stati ottenuti transfettando le cellule K10 con un vettore di espressione pMEP4 contenente il cDNA umano del T β RII wt, etichettato dall'emoagglutinina del virus influenzale, HA, e controllato da un promotore metallotionina-inducibile (cortesemente fornito dalla Dott.ssa L. Attisano). Le cellule K10 e i cloni sono state cresciute in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ con il mezzo F12 modificato da Coon supplementato con il 5% di siero di vitello. I cloni sono stati mantenuti in coltura in presenza di 200 μ g/ml di igromicina B (Invitrogen-Life Technologies) e incubati per 2-4 ore in mezzo di Dulbecco modificato da Eagle (D-Mem) allo 0,2% di siero fetale bovino contenente cloruro di zinco (ZnCl₂) (50 μ M), per indurre l'iperespressione del T β RII. Dopo il trattamento di induzione con lo ZnCl₂, le cellule sono

state lavate due volte con il PBS e lasciate un'ora in mezzo privo di siero prima di procedere agli esperimenti di immunofluorescenza, e agli esperimenti di adesione e migrazione.

Le FRTL-5, invece, sono un clone normale di cellule di tiroide di ratto Fischer, con un tempo di raddoppiamento di circa 36 ore, che hanno mantenuto le caratteristiche funzionali della captazione dello iodio, della sintesi della tireoglobulina (TG) e del metabolismo dei nucleotidi ciclici anche dopo prolungati periodi di coltura (Ambesi-Impiomato F.S. et al., 1980). Le cellule FRTL-5 sono state cresciute a 37°C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ con il mezzo F12 modificato da Coon supplementato con il 5% di siero di vitello e con la miscela di sei ormoni (6H) contenente: TSH bovino (10 mU/ml), insulina (10 µg/ml), idrocortisone (10⁻⁸ M), transferrina (5 µg/ml), Gly-L-His-L-Lys acetato (10 ng/ml) e somatostatina (10 µg/ml), forniti dalla SIGMA-Aldrich.

Transfezione transiente.

Le cellule K10 sono state cresciute in piastre di coltura Petri di 100 mm di diametro fino ad una confluenza del 60-80% utilizzando il mezzo F12 modificato da Coon supplementato con il 5% di siero di vitello. Le K10 sono state transfettate in transiente con il vettore pcDNA3 vuoto e il pcDNA3 contenente il cDNA umano HA-T β RII wt usando la tecnica della lipofectamina (LipofectAMINE PLUS-GIBCO BRL, Life Technologies) e seguendo le istruzioni del produttore. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule transfettate sono state usate in saggi di adesione e di migrazione.

Saggi di luciferasi.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre multipozzetto da 24 pozzetti e sono state transfettate usando la tecnica della lipofectamina. La transfezione è stata eseguita con i costrutti pCMV β Gal e pCMV5 3TP-Lux, utilizzando, per 4 ore, 1 μ g/200 μ l/pozzetto dei suddetti DNA, per diluirli poi, per le restanti 18 ore di incubazione, in 1 ml di mezzo completo. Dopo la transfezione, le cellule sono state trattate o non trattate per 3 ore con $ZnCl_2$ (50 μ M) e poi incubate per tutta la notte con o senza 10 ng/ml di TGF- β 1 diluito in mezzo privo di siero. L'attività luciferasica è stata misurata attraverso il sistema della Promega Corporation e normalizzata verso l'efficienza di transfezione usando il vettore controllo esprimente la β Gal (Sambrook J. et al., 1989). Ogni risultato è la media di tre esperimenti differenti.

Stimolazione delle cellule e preparazione dei lisati.

Le cellule quasi confluenti, cresciute in presenza o non di $ZnCl_2$ (50 μ M) per 2-4 ore, sono state stimulate per differenti intervalli di tempo con 10 ng/ml di TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, Co.), e poi lisate per 30 minuti sul ghiaccio utilizzando un tampone di estrazione TNE (50 mM Tris HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100) supplementato con 1 mM di phenilmethylsulfonil fluoride o PMSF (Sigma-Aldrich, Co.), con una miscela di inibitori delle proteasi contenente 1 μ g/ml di leupeptina, 2,5 μ g/ml di aprotinina, 1 μ g/ml di idrocloruro di benzamide (Sigma-Aldrich, Co.) e con la miscela di inibitori delle fosfatasi (Sigma-Aldrich, Co.). I lisati cellulari sono stati, poi, centrifugati a 15000 g per 5 minuti a 4°C e la concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA).

Elettroforesi e analisi Western Blot.

Quantità equivalenti di proteine (40 μ g) di differenti lisati cellulari sono state separate per elettroforesi, in condizioni riducenti o non, su gel di poliacrilamide in SDS, all'8%, 10% o 12%, e poi trasferite elettricamente su filtri di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Dussel, Germany). Dopo aver bloccato la reattività aspecifica utilizzando il tampone TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6) contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA) (TBS-T/3% BSA), le membrane sono state colorate con anticorpi specifici diluiti in TBS-T (0,1% Tween-20). Dopo le incubazioni con gli anticorpi primari, le membrane sono state lavate e, quindi, incubate con gli anticorpi secondari, coniugati alla perossidasi di rafano. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti nel tampone bloccante (TBS-T/3% BSA). L'immunoreattività è stata valutata utilizzando, secondo le istruzioni del produttore, un sistema in grado di potenziare le reazioni di chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate-PIERCE, Rockford-U.S.A.) per poi visualizzarla su lastre per chemiluminescenza (CL-Xposure Film, PIERCE).

Esperimenti di immunofluorescenza.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre multipozzetto da 8 pozzetti costituite da vetrini sui quali sono montati gli 8 pozzetti rimovibili (NUNC), incubate per 3 ore in presenza o non di $ZnCl_2$ (50 μ M) e 10 ng/ml di TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, Co.), in mezzo privo di siero, e, quindi, sono state fissate per 5 minuti con etanolo puro e permeabilizzate per 2 minuti a temperatura ambiente utilizzando metanolo assoluto. Allo scopo di ridurre il legame aspecifico degli anticorpi,

le cellule sono state incubate per 1 ora con PBS contenente il 3% di BSA e poi, a 4°C per tutta la notte, con gli anticorpi monoclonali (mAb) specifici per Smad2 (clone 18) o Smad4 (clone 49) (BD Biosciences, Pharmingen, CA), diluiti 1:25 in PBS contenente 1% di BSA. La colorazione delle cellule positive è stata ottenuta incubando 1 ora a temperatura ambiente le cellule stesse con l'anticorpo secondario specifico per le IgG di topo, coniugato alla rodamina (Jackson ImmunoResearch Laboratories), diluito 1:100 in PBS contenente 1% di BSA. La colorazione dei nuclei ha richiesto, invece, l'impiego del 4,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI, Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO). La fluorescenza è stata osservata con un microscopio Olympus BX51 e fotografata ad un ingrandimento 40X.

Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA).

Allo scopo di valutare la diversa capacità delle linee cellulari usate in questo studio, di produrre e secernere il TGF- β 1, sono stati effettuati saggi immunoenzimatici ELISA, specifici per il TGF- β 1, sia con i soprannatanti che con i lisati proteici totali cellulari. I campioni sono stati raccolti in mezzo senza siero dopo 24 ore di coltura cellulare. Il saggio immunoenzimatico quantitativo (ELISA) è stato eseguito utilizzando un sistema disponibile in commercio (Human TGF- β 1 ELISA-DIACLONE Research, Besançon, France) e seguendo le istruzioni del produttore. In seguito alla reazione immunoenzimatica, la concentrazione del TGF- β 1 è stata determinata confrontando la densità ottica dei campioni in esame con una curva standard; i campioni con valori di densità ottica inferiore al "background" sono stati considerati negativi al test. I valori di densità ottica sono stati espressi in ng/ μ l e poi sono stati resi confrontabili fra loro rapportando

ognuno di essi, alla concentrazione del rispettivo campione, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, arrivando ad esprimere il risultato in $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Questi saggi sono stati ripetuti indipendentemente tre volte per conferire una significatività statistica ai risultati.

Saggi di adesione.

Preparazioni di fibronectina (FN), laminina (LM) o BSA sono state diluite in PBS a 20-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 100 μl di soluzione proteica sono stati distribuiti in piastre multipozzetto da 96 pozzetti (Costar, Cambridge, MA). Dopo un'incubazione di una notte a 4°C, i pozzetti ricoperti di substrato, sono stati lavati due volte con PBS addizionato di BSA (1%) per rimuovere il substrato non fissato al fondo del pozzetto. I siti di legame delle proteine sono stati saturati, quindi, incubando le piastre con PBS addizionato di BSA (0,2%) per 1 ora a 37°C. Le cellule trattate o non con lo ZnCl_2 per 2-4 ore, sono state staccate dalle piastre di coltura utilizzando EGTA 1X (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), lavate e risospese in mezzo privo di siero, contenente lo 0,2% di BSA, ad una concentrazione finale di 500×10^3 cellule/ml. Effettuato il piastramento delle cellule (100 $\mu\text{l}/\text{pozzetto}$), si è, quindi, permesso alle stesse di aderire al fondo dei pozzetti ricoperti di FN o LM in presenza o non di 10 ng/ml di TGF- β 1. L'incubazione ha avuto la durata di 1 ora e si è svolta a 37°C e al 5% di CO_2 . A fine incubazione, le cellule non attaccate sono state rimosse attraverso lavaggi ripetuti, effettuati utilizzando mezzo privo di siero, in modo da poter successivamente procedere alla fissazione delle sole cellule aderenti, incubandole 10 minuti in paraformaldeide al 3%. Le cellule fissate sono state, quindi, colorate per 5 minuti con il cristal violetto, lavate con H_2O distillata e, infine, solubilizzate con SDS (2%). La valutazione della adesione cellulare è stata eseguita leggendo con un lettore ELISA l'assorbanza ottica

(OD) alla lunghezza d'onda di 620 nm (Titertek Multiscan, Flow laboratories). I dati sono stati espressi come media +SD delle OD ottenute da almeno tre esperimenti indipendenti, sottraendo la media dei valori di adesione alla BSA (OD < 0.5).

Saggi di migrazione.

La migrazione cellulare è stata studiata usando le camere di migrazione Transwell (diametro 5 mm, dimensione dei pori 8 μ m; Costar Corporation, Cambridge, MA). Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre di Petri e pretrattate o non per 3 ore con lo $ZnCl_2$ (50 μ M), quindi, sono state staccate utilizzando EGTA 1X e risospese in mezzo privo di siero contenente lo 0,2% di BSA. Le cellule trattate e non con lo $ZnCl_2$, sono state, quindi, seminate nel compartimento superiore delle Transwell (30×10^3 cellule/100 μ l) ed è stato permesso loro di migrare attraverso il filtro di policarbonato utilizzando la FN o la LM (40 μ g/ml in mezzo privo di siero contenente lo 0,2% di BSA) come chemoattrattanti, aggiunti nel compartimento inferiore della Transwell. Dopo 8 ore di incubazione a 37°C, le cellule migrate sul lato inferiore del filtro sono state fissate per 5 minuti con etanolo puro, colorate per 10 minuti con ematossilina (Mayer-MERCK) e contate usando un microscopio ottico. Le cellule sono state contate tre volte da due ricercatori indipendenti e le differenze fra gli osservatori sono risultate inferiori al 5%. I dati sono stati espressi come media +SD (Standard Deviation) dei numeri delle cellule migrate, valutate in 10 differenti campi e in tre esperimenti indipendenti.

Analisi statistiche.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando lo Student's *t*-test (* indica $p < 0.05$, significatività statistica; ** indica $p < 0.001$, alta significatività statistica).

RISULTATI

Il T β RII iperespresso nelle cellule di tiroide di ratto trasformate da *K-ras*, e' un recettore funzionale.

Molteplici evidenze indicano che uno degli eventi principali e fondamentali nel processo di trasduzione del segnale del TGF- β è rappresentato dalla fosforilazione delle proteine R-Smad e dalla loro conseguente attivazione. Le Smad sono importanti mediatori del segnale del TGF- β e sono capaci di trasmettere il segnale TGF β -mediato dalla membrana al nucleo cellulare. Smad2 è una delle R-Smad specifiche per il TGF- β e viene fosforilata dal complesso recettoriale attivato T β RII/T β RI. Allo scopo di verificare se l'iperespressione del gene T β RII e del corrispondente prodotto proteico, correlasse con un recupero della sensibilità al TGF- β e della capacità di attivare la via del segnale di questo fattore nelle cellule di tiroide di ratto trasformate dall'oncogene *K-ras*, è stata esaminata l'espressione della forma fosforilata della proteina Smad2 sia nei cloni RIIK2 e RIIK4 che nelle cellule parentali altamente maligne K10 e nelle cellule controllo FRTL-5. Le cellule sono state, quindi, pretrattate per 2-4 ore con lo ZnCl₂ (50 μ M) allo scopo di indurre l'iperespressione del T β RII nei cloni transfettati stabilmente con il plasmide contenente il gene T β RII, posto sotto un promotore zinco inducibile (Figura 13), e stimolate per 30 minuti con 10 ng/ml di TGF- β 1. Le analisi Western Blot, eseguite sui lisati proteici totali utilizzando anticorpi diretti contro la forma fosforilata della proteina Smad2, hanno dimostrato che il trattamento con il TGF- β 1 determina l'induzione di alti livelli di fosforilazione di questa proteina sia nei cloni transfettati che nelle cellule di controllo FRTL-5.

Nelle K10, invece, che esprimono solo a livelli molto bassi il T β RII, il grado di fosforilazione della proteina Smad2 è risultato minore. Tutte le cellule esaminate hanno mostrato livelli di espressione comparabili delle proteine

Smad2/3 e Smad4, che non sono risultati modificabili dal trattamento con lo $ZnCl_2$ o con il TGF- β 1 (Figura 13).

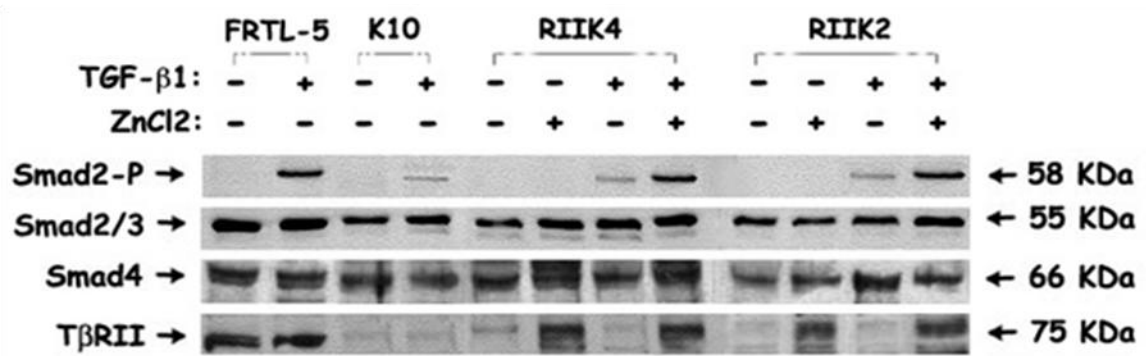


Figura 13. Il TβRII iper-espresso nelle cellule di tiroide di ratto trasformate da *K-ras* e' un recettore funzionale.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state incubate per 3 ore con (+) o senza (-) ZnCl₂ (50 μM) e stimulate per 30 minuti a 37°C con 10 ng/ml di TGF-β1 (+) o con il solo mezzo (-). Come descritto nella specifica sezione "Materiali e Metodi", le cellule sono state lisate, le proteine sono state risolte attraverso una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti, trasferite su nitrocellulosa e le membrane sono state incubate, sequenzialmente, con l'Ab anti-Smad2-P, anti-Smad2/3, anti-Smad4 e anti-TβRII. I pesi molecolari (in kDa) sono mostrati sulla destra della figura. Questo risultato è rappresentativo di altri tre esperimenti indipendenti.

L'immagine mostra che il TβRII viene iperespresso nei cloni a seguito dell'induzione con lo ZnCl₂ (50 μM) e che e' un recettore funzionale. Infatti, la stimolazione per 30 minuti con il TGF-β1 determina l'induzione di alti livelli di fosforilazione di Smad2 sia nei cloni iperesprimenti il recettore che nelle cellule di controllo FRTL-5, diversamente che nelle K10. I livelli di espressione delle proteine Smad2/3 e Smad4 sono comparabili in tutte le cellule esaminate.

Traslocazione dal citoplasma al nucleo di Smad2 e Smad4.

Smad2-P lega Smad4 per formare dei complessi trascrizionali attivati, Smad2-P/Smad4 che, una volta traslocati nel nucleo, giocano un ruolo cruciale nella regolazione trascrizionale dei geni target del TGF- β (Heldin C.H. et al., 1997; Massagué J., 1998).

La traslocazione dal citoplasma al nucleo dei complessi Smad2-P/Smad4 è stata studiata con esperimenti di immunofluorescenza condotti sulle cellule RIIK2 e RIIK4, preincubate per 3 ore in presenza o non di ZnCl₂ (50 μ M) e trattate con 10 ng/ml di TGF- β 1 per le successive 3 ore, sulle cellule parentali trasformate, K10, e sulle FRTL-5, stimolate o non per 3 ore con 10 ng/ml di TGF- β 1. I risultati ottenuti, utilizzando anticorpi monoclonali specifici per le proteine Smad2 e Smad4, hanno dimostrato che il trattamento con il TGF- β 1 induce la traslocazione nucleare sia della proteina Smad2 che della proteina Smad4, nei cloni RIIK2 e RIIK4 iperesprimenti il T β RII (Figura 14, pannelli A e B) e nelle cellule di controllo FRTL-5 (Figura 14, pannello C).

Nelle cellule K10, invece, la localizzazione delle proteine Smad2 e Smad4 è risultata nettamente citoplasmatica e non influenzabile dal trattamento con il TGF- β 1 (Figura 14, pannello C).

Per accertare la capacità della cascata del segnale dei recettori del TGF- β 1 e delle Smad di indurre l'attività trascrizionale nelle cellule in esame, è stato usato il costrutto reporter p3TP-Lux, responsivo al TGF- β 1. Il promotore p3TP contiene tre elementi consecutivi responsivi al TGF- β contenenti 12-O-tetradecanoyl-13-acetate, (TPA)-Response Elements o TREs, coinvolti nelle risposte trascrizionali di diversi geni al TGF- β 1, e una porzione della regione promotore di uno dei principali geni bersaglio del TGF- β 1, ovvero l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (Plasminogen

Activator Inhibitor 1 o PAI-1) (Wrana J.L. et al., 1992; de Groot R.P. and Kruijer W., 1990; Keeton M.R. et al., 1991).

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento con il TGF- β 1 potenzia fortemente (circa 20 volte di induzione) l'attività del gene reporter 3TP-Lux nelle FRTL-5, estremamente sensibili e responsive al fattore, mentre non modifica l'attività 3TP-Lux nelle K10, ipo-esprimenti il T β RII e resistenti all'inibizione della proliferazione TGF β -dipendente, e che questi dati non sono influenzati dal pretrattamento con lo ZnCl₂. Nei cloni RIIK2 e RIIK4 pretrattati con lo ZnCl₂, l'attività del gene reporter è risultata significativamente ($p < 0.05$) indotta dal trattamento con il TGF- β 1 (Figura 15).

Nel complesso questi risultati suggeriscono fortemente che il T β RII iperespresso nei cloni, è un recettore funzionale ed essenziale a ristabilire in queste cellule un comportamento simile a quello delle cellule normali di controllo.

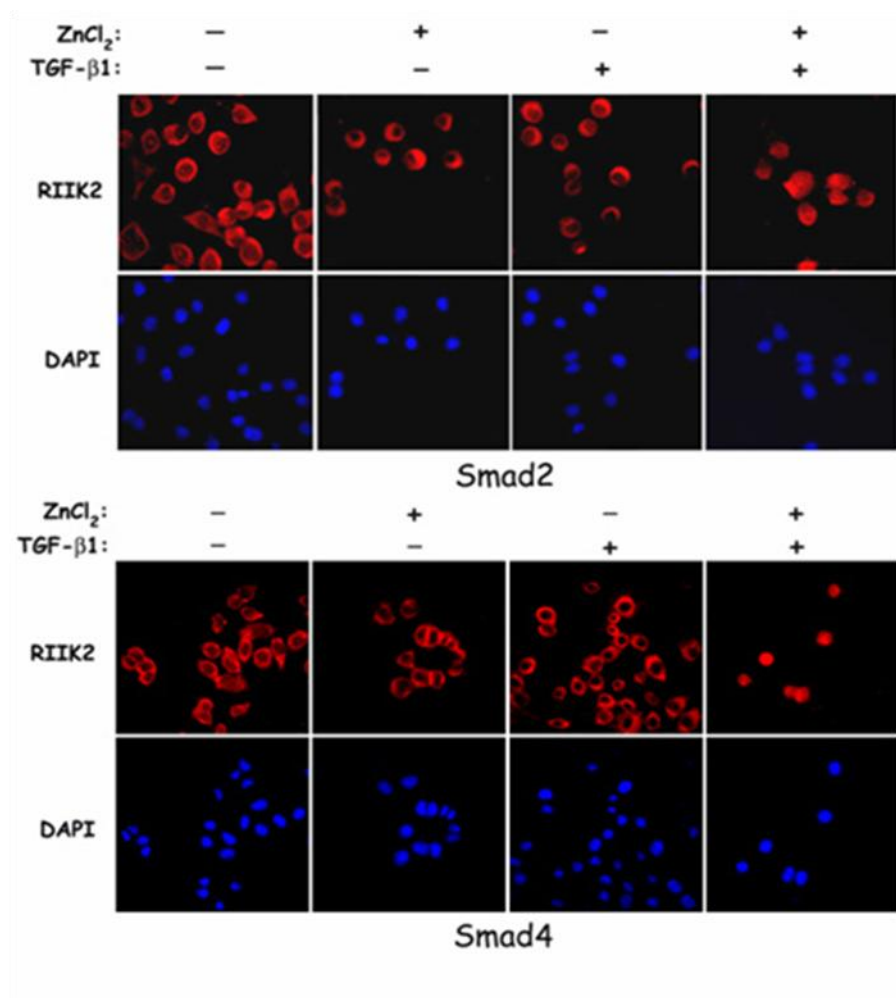


Figura 14 (pannello A). La traslocazione dal citoplasma al nucleo dei complessi Smad2-P/Smad4.

Le cellule RIIK2 sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre multipozzetto costituite da vetrini sui quali sono montati gli 8 pozzetti rimovibili (NUNC), incubate per 3 ore con (+) o senza (-) ZnCl₂ (50 μM) e stimolate per altre 3 ore in mezzo senza siero, con 10 ng/ml di TGF-β1 (+) o con il solo mezzo (-). Le cellule sono state fissate per 5 minuti con etanolo freddo e marcate utilizzando gli Ab anti-Smad2 (pannello superiore) e anti-Smad4 (pannello inferiore). La colorazione dei nuclei è stata eseguita utilizzando il 4,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI). Le immagini sono state acquisite ad un microscopia a fluorescenza Olympus BX51 ad un ingrandimento 40X. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

L'immagine mostra che il trattamento con il TGF-β1 induce nel clone RIIK2, iperesprimente il TβRII, la traslocazione nucleare sia della proteina Smad2 che della proteina Smad4.

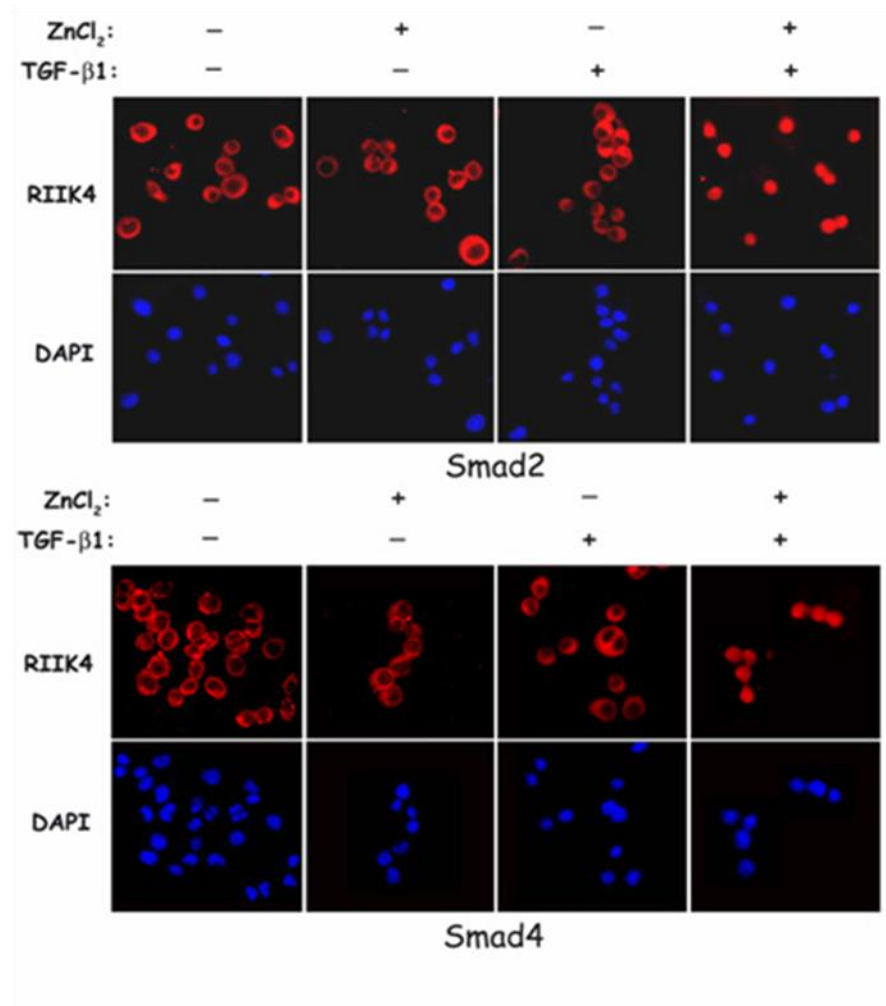


Figura 14 (pannello B). La traslocazione dal citoplasma al nucleo dei complessi Smad2-P/Smad4.

Le cellule RIIK4 sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre multipozzetto costituite da vetrini sui quali sono montati gli 8 pozzetti rimuovibili (NUNC), incubate per 3 ore con (+) o senza (-) ZnCl₂ (50 μM) e stimulate per altre 3 ore in mezzo senza siero, con 10 ng/ml di TGF-β1 (+) o con il solo mezzo (-). Le cellule sono state fissate per 5 minuti con etanolo freddo e marcate utilizzando gli Ab anti-Smad2 (pannello superiore) e anti-Smad4 (pannello inferiore). La colorazione dei nuclei è stata eseguita utilizzando il 4,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI). Le immagini sono state acquisite ad un microscopia a fluorescenza Olympus BX51 ad un ingrandimento 40X. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

L'immagine mostra che il trattamento con il TGF-β1 induce nel clone RIIK4, iperesprimente il TβRII, la traslocazione nucleare sia della proteina Smad2 che della proteina Smad4.

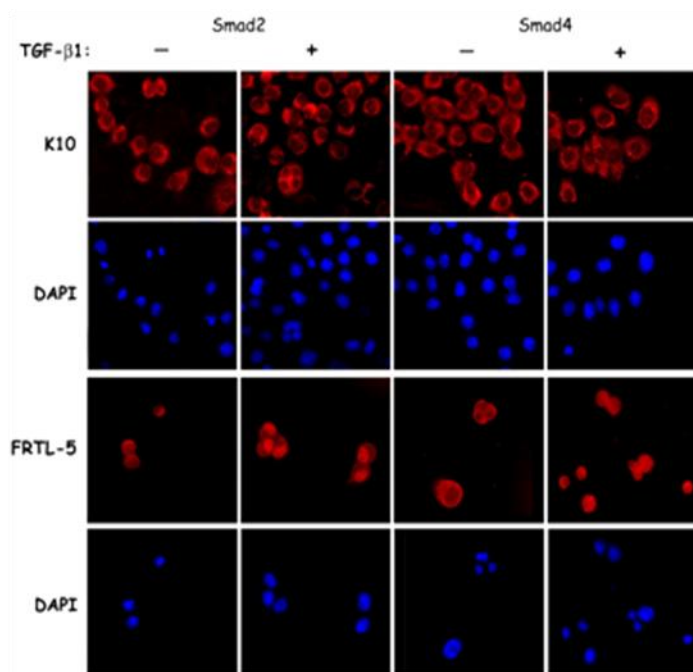


Fig. 2 panel C

Figura 14 (pannello C). La traslocazione dal citoplasma al nucleo dei complessi Smad2-P/Smad4.

Le cellule K10 e FRTL-5 sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre multipozzetto costituite da vetrini sui quali sono montati gli 8 pozzetti rimovibili (NUNC) e stimolate per 3 ore in mezzo senza siero, con 10 ng/ml di TGF- β 1 (+) o con il solo mezzo (-). Le cellule sono state, quindi, fissate per 5 minuti con etanolo freddo e marcate utilizzando gli Ab anti-Smad2 e anti-Smad4. La colorazione dei nuclei è stata eseguita utilizzando il 4,6-diamino-2-fenilindolo (DAPI). Le immagini sono state acquisite ad un microscopia a fluorescenza Olympus BX51 ad un ingrandimento 40X. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

L'immagine mostra che il trattamento con il TGF- β 1 induce nelle cellule di controllo FRTL-5, la traslocazione nucleare, sia della proteina Smad2 che della proteina Smad4, diversamente che nelle K10, non responsive al TGF- β 1, nel caso delle quali, invece, la localizzazione delle proteine Smad2 e Smad4 risulta nettamente citoplasmatica.

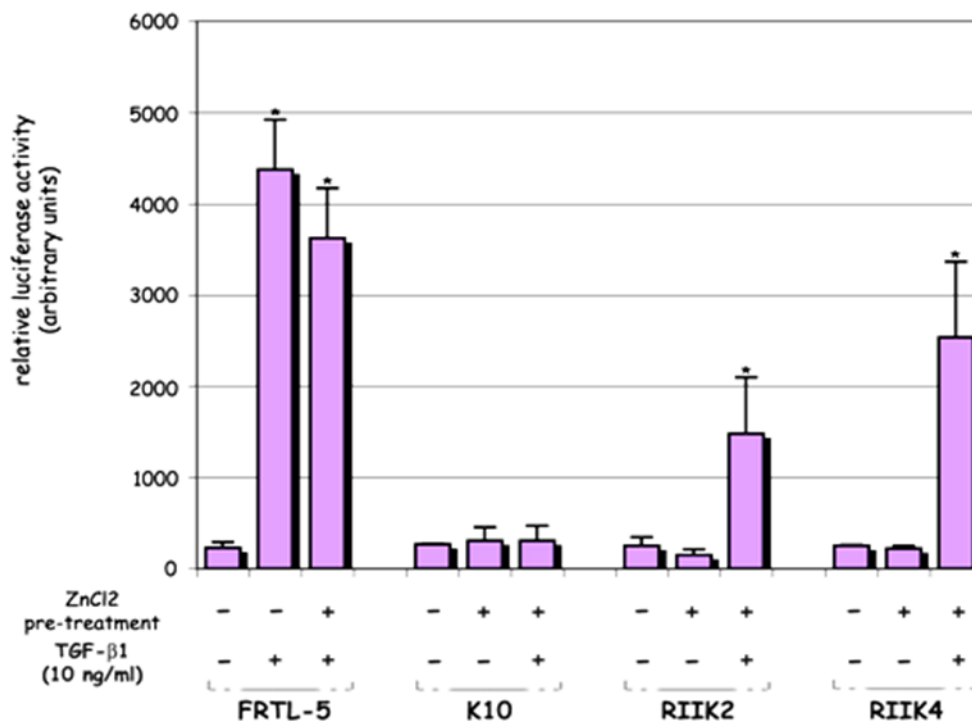


Figura 15. L'attività trascrizionale indotta dal TGF-β1 nelle cellule trasformate dall'oncogene *K-ras*.

Allo scopo di valutare l'attività trascrizionale indotta dal TGF-β1, le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state transfettate in transiente con un plasmide reporter 3TP-Lux, incubate per 3 ore (+) o non (-) con ZnCl₂ (50 μM) e trattate per 24 ore in mezzo senza siero, con (+) o senza (-) TGF-β1 (10 ng/ml). L'attività luciferasica è stata espressa in unità arbitrarie come valore assoluto. Ogni risultato è la media di tre esperimenti indipendenti (* indica una significatività statistica $p < 0,05$ rispetto alle cellule non trattate).

L'immagine mostra che il trattamento con il TGF-β1 potenzia fortemente (circa 20 volte di induzione) l'attività del gene reporter 3TP-Lux nelle FRTL-5 mentre non la modifica nelle K10, ipo-esprimenti il TβRII. Nei cloni RIIK2 e RIIK4 pretrattati con lo ZnCl₂, l'attività del gene reporter è significativamente ($p < 0,05$) indotta dal trattamento con il TGF-β1.

Produzione e secrezione cellulare di TGF- β 1.

Le cellule di tiroide, sia normali che trasformate, conservano *in vitro* la capacità di sintetizzare e di rilasciare il TGF- β 1.

Allo scopo di valutare la diversa capacità delle linee cellulari usate in questo studio, di produrre e secernere il TGF- β 1, sono stati effettuati saggi immunoenzimatici ELISA specifici per il TGF- β 1. Gli esperimenti sono stati condotti sui lisati proteici totali cellulari e sui supernatanti delle colture cellulari raccolti dopo 24 ore di coltura in mezzo senza siero. Come mostrato nella Figura 16, tutte le linee cellulari producono e secernono quantità significative di TGF- β 1 anche se i livelli di TGF- β 1 secreto dai cloni RIIK2 e RIIK4 sono risultati minori di quelli di TGF- β 1 secreto da parte delle cellule FRTL-5 e K10.

Principio del test ELISA specifico per il TGF- β 1 (DIACLONE)

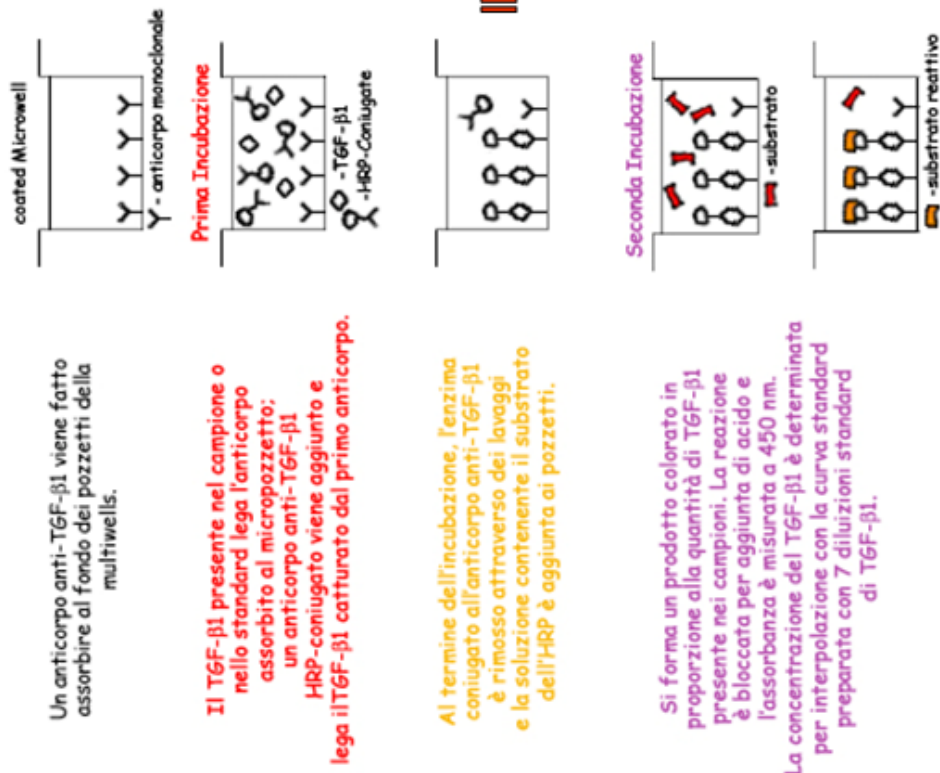


Figura 16. Studio della produzione e secrezione del TGF- β 1 attraverso saggi ELISA.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state coltivate in mezzo senza siero per 24 ore. Gli estratti proteici totali (pannello A) e i soprannatanti (pannello B) sono stati analizzati attraverso saggi ELISA specifici per quantificare i livelli di TGF- β 1. Ogni valore rappresenta la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (nel pannello A, *indica la significatività statistica $p < 0.05$ delle RIIK2 rispetto alle K10 e delle RIIK4 rispetto a tutte le altre linee cellulari; nel pannello B, * indica la significatività statistica $p < 0.05$ delle RIIK2 e delle RIIK4 rispetto a tutte le altre linee cellulari). Come mostrato in figura, tutte le linee cellulari producono e secernono quantità significative di TGF- β 1 anche se i cloni RIIK2 e RIIK4 ne rilasciano meno nel mezzo Nell'immagine, a sinistra, la metodica sperimentale e, a destra, i risultati degli esperimenti opportunamente rappresentati.

Adesione e migrazione nei cloni iperesprimenti il T β RII.

L'adesione e la migrazione cellulare sono due importanti funzioni nella regolazione delle proprietà metastatiche delle cellule tumorali. Noi abbiamo dimostrato in precedenza che l'iperespressione del T β RII è responsabile di una riduzione del potenziale metastatico delle cellule di tiroide di ratto trasformate da *K-ras* (Turco A. et al., 1999). Allo scopo di chiarire se questo comportamento sia o no, la diretta conseguenza di variazioni della capacità di queste cellule di aderire e migrare, abbiamo condotto saggi di adesione e di migrazione *in vitro*, utilizzando come substrati la fibronectina (FN) e la laminina (LM).

La Figura 17 (pannelli A e B) mostra che tutte le linee cellulari sono in grado di aderire alla FN e alla LM. La capacità di aderire alla laminina è comparabile fra la linea parentale K10 e la normale, FRTL-5, mentre l'adesione delle K10 alla FN risulta maggiore rispetto alle FRTL-5. Un più elevato grado di adesione ad entrambe le componenti della ECM è stato, invece, registrato nel caso dei cloni RIIK2 e RIIK4. Il trattamento con lo ZnCl₂ (50 μ M) e, quindi, la conseguente iperespressione nei cloni del recettore II, ha determinato nelle RIIK2 e RIIK4 una riduzione della capacità di aderire alla FN e alla LM del 51% e 67% e del 47% e 57%, rispettivamente, quando comparate alle stesse cellule non iperesprimenti il recettore; lo stesso trattamento con lo zinco delle FRTL-5 e delle K10 non ha modificato in alcun modo il comportamento adesivo di queste linee cellulari. L'adesione alla FN e alla LM dei cloni pretrattati è risultata significativamente ridotta ($p < 0,05$) anche rispetto alle K10. Il trattamento con 10 ng/ml di TGF- β delle RIIK2 e RIIK4 pretrattate con lo zinco, per la durata dell'esperimento di adesione, inoltre, non ha prodotto ulteriori modificazioni della capacità di aderire. Questo risultato suggerisce che l'iperespressione del recettore ripristini in queste cellule la capacità di

rispondere al TGF- β autocrino non consentendo al fattore esogeno di amplificare questo tipo di risposte cellulari. Analoghi esperimenti sono stati condotti in cellule K10 transfettate in transiente con il plasmide pcDNA3 contenente il cDNA umano HA-T β R_{II}, posto sotto un promotore costitutivamente attivo, e con il solo vettore vuoto pcDNA3, al fine di confermare il ruolo svolto dal T β R_{II} nel controllo della adesività di queste cellule alla FN e alla LM.

I risultati ottenuti hanno dimostrato una significativa riduzione della capacità di aderire alla FN e alla LM, sia nelle K10 iperesprimenti il T β R_{II}, rispetto a quelle transfettate con il solo vettore vuoto ($p < 0,05$), che nelle stesse cellule dopo trattamento con il TGF- β 1 ($p < 0,001$) (Figura 17, pannelli A e B). I dati finora riportati indicano che la riduzione dell'adesività osservata nei cloni RIIK2, RIIK4 e nelle K10 transfettate in transiente, iperesprimenti il T β R_{II}, rende il comportamento di queste cellule più simile a quello delle cellule di tiroide di controllo FRTL-5.

I saggi di migrazione sono stati condotti sulle cellule in esame, pretrattate o non per 3 ore con lo ZnCl₂ (50 μ M), utilizzando piastre con inserti (transwells). I risultati ottenuti da questi esperimenti hanno dimostrato che le RIIK2, le RIIK4 e le K10, diversamente dalle FRTL-5, migrano fortemente in risposta alla FN e alla LM. Le FRTL-5, infatti, non migrano verso questi chemoattrattanti né a 6 e né a 8 ore (Figura 18). Il pretrattamento con lo ZnCl₂ ha inibito, in maniera statisticamente significativa, la migrazione dei cloni RIIK2 e RIIK4, rispettivamente, attraverso la LM e la FN, del 82-84% (RIIK2) e del 50% e 71% (RIIK4), mentre la motilità delle K10 e delle FRTL-5 non è risultata influenzata dallo ZnCl₂ (Figura 18, pannelli A e B). La riduzione della motilità verso la FN e a LM, dei cloni pretrattati con lo ZnCl₂, è risultata, inoltre, statisticamente significativa ($p < 0,05$) rispetto alle cellule K10 (Figura 18, pannelli A e B).

Analoghi risultati sono stati ottenuti in saggi di migrazione condotti sulle cellule K10, transfettate in transiente con i plasmidi pcDNA3 HA-T β RII wt e con il vettore vuoto pcDNA3 (Figura 18, pannello C).

Tutti questi dati dimostrano che l'iperespressione del T β RII nelle cellule di tiroide di ratto K10, altamente maligne, determina una forte riduzione della adesività e della motilità. Pertanto, è ipotizzabile che il ripristino del T β RII funzionale in tumori tiroidei umani che lo ipoesprimono, possa contrastare la loro disseminazione e il loro comportamento aggressivo.

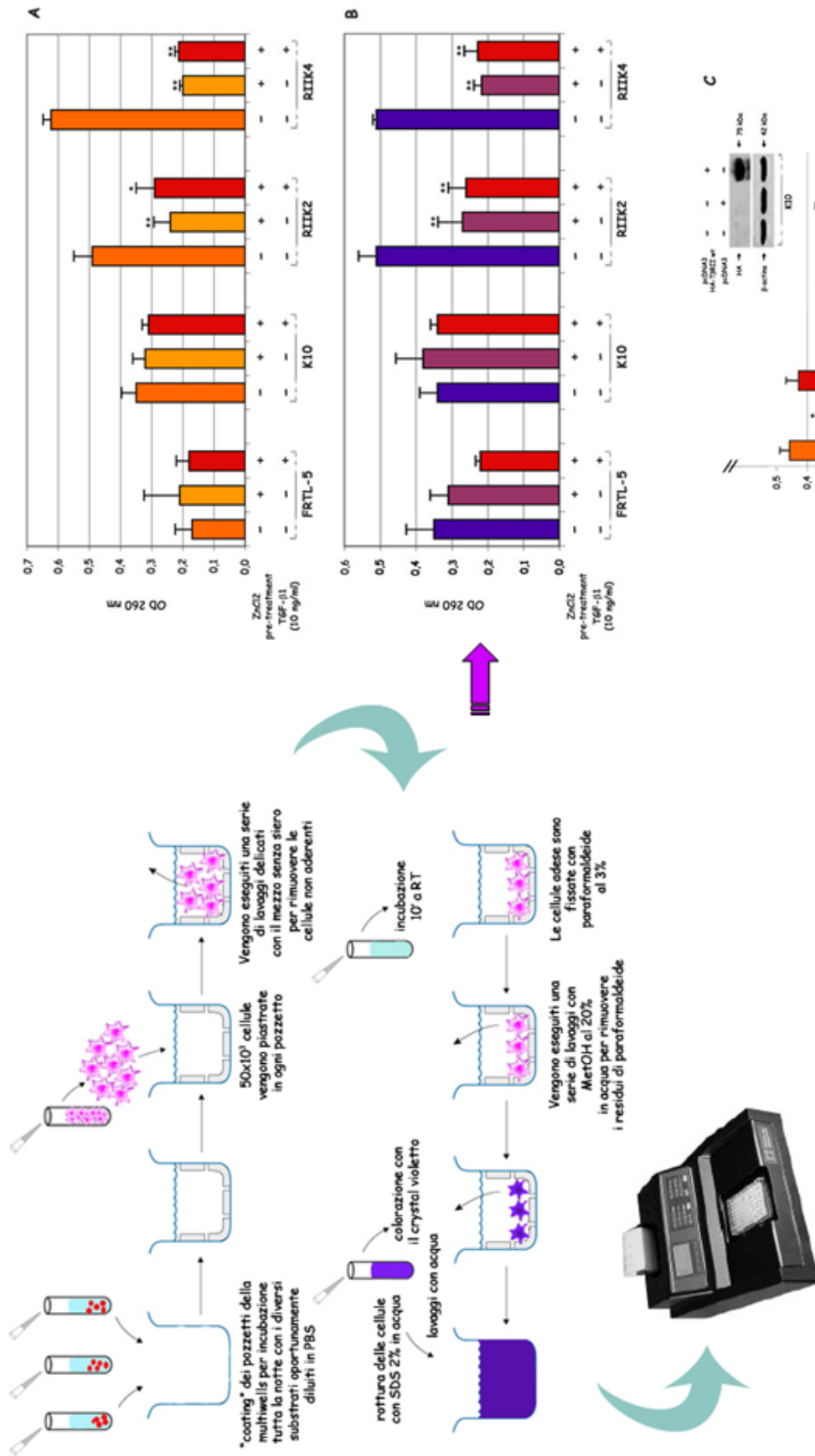


Figura 17. Effetti del TGF-β1 sull'adesione alla FN e alla LM delle FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4. Le cellule sono state trattate per 2-4 ore con ZnCl₂ (50 mM) e saggiate per la loro capacità di aderire al fondo di pozzetti ricoperti in precedenza con 2-3 mg/pozzetto di FN (pannello A), LM (pannello B) o BSA, in presenza (+) o non (-) di TGF-β1 (10 ng/ml). Come descritto nella specifica sezione di "Materiali e Metodi", a fine incubazione le cellule sono state fissate e colorate con il cristal violetto. La reazione colorimetrica è stata quantificata al lettore ELISA (620 nm). I dati graficati sono la media ±SD delle OD ottenute da almeno 3 esperimenti indipendenti, sottraendo la media dei valori di adesione alla BSA (OD < 0,5). (* e ** indicano la significatività statistica p<0,05 e p<0,001, rispettivamente, dei cloni rispetto al relativo controllo non trattato).

Pannello C: le K10 transfettate in transiente con i plasmidi pcDNA3 HA-TβRII wt e con il vettore vuoto sono state saggiate per l'adesione alla FN e alla LM (* e ** indicano la significatività statistica p<0,05 e p<0,001, rispettivamente, delle cellule transfettate con il TβRII wt rispetto alle relative cellule transfettate con il vettore vuoto). Il Western Blot inserito prova l'espressione del TβRII nelle K10, transfettate con una efficienza dell'80%. Nell'immagine, a sinistra, la metodica sperimentale e a destra, i risultati degli esperimenti opportunamente rappresentati.

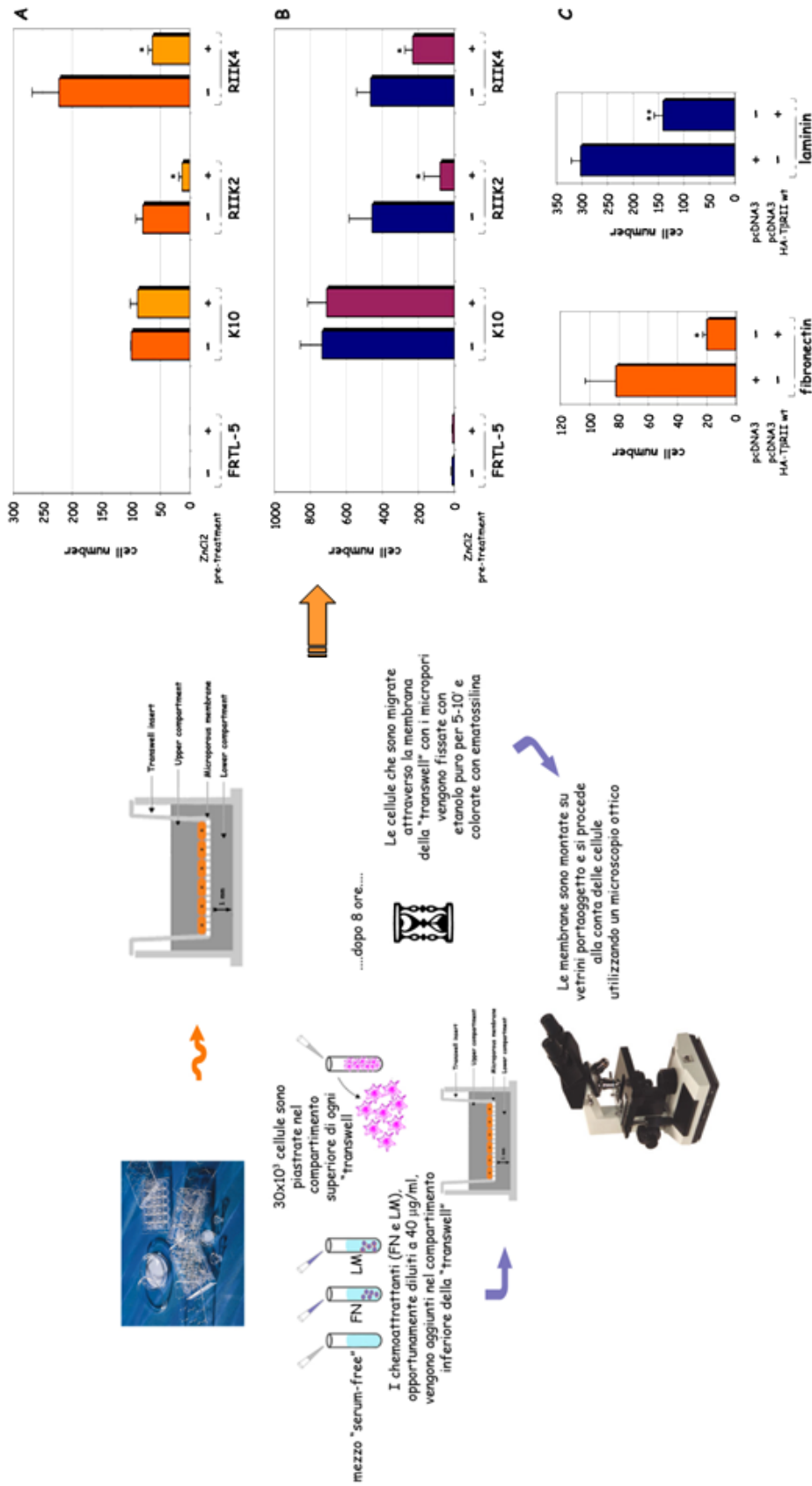


Figura 18. Effetti del TGF- β 1 sulla migrazione verso la FN e la LM delle FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4. Come descritto nella specifica sezione di "Materiali e Metodi", le cellule sono state trattate per 2-4 ore con ZnCl₂ (50 µM), sono state risospese in mezzo senza siero contenente lo 0.2% di BSA e saggiate per la loro capacità di migrare attraverso filtri di poliacarbonato usando come chemoattrattanti la FN o la LM (40 µg/ml) (pannello A e pannello B, rispettivamente). Trascorse le 8 ore di incubazione, le cellule sono state fissate e colorate con ematossilina. I dati graficati sono la media \pm SD del numero delle cellule migrate contate in 10 campi differenti, in tre esperimenti indipendenti. (* indica la significatività statistica p<0.05 dei cloni rispetto al relativo controllo non trattato). Pannello C: le K10 transfettate in transiente con i plasmidi pcDNA3 HA-TBR1 wt e con il vettore vuoto sono state saggiate per la capacità di migrare attraverso la FN e la LM (* e ** indicano la significatività statistica p<0.05 e p<0.001, rispettivamente, delle cellule transfettate con il TBR1 wt rispetto alle relative cellule transfettate con il vettore vuoto). Nell'immagine, a sinistra, la metodica sperimentale e a destra, i risultati degli esperimenti opportunamente rappresentati.

Espressione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ nei cloni iperesprimenti il T β RII.

Le integrine funzionano come recettori che trasducono segnali dentro le cellule funzionando in sinergismo con altri sistemi recettoriali. Esse controllano l'adesione cellulare, la migrazione, l'assemblaggio della matrice e altre risposte come la proliferazione, e le variazioni di forma delle cellule, svolgendo, inoltre, un ruolo chiave nel processo tumorigenico, promuovendo l'angiogenesi, la formazione delle metastasi tumorali e, come nel caso dell' $\alpha 5\beta 1$, modulando il comportamento adesivo e migratorio delle cellule.

E' stato dimostrato che il TGF- β è in grado di alterare l'espressione di diverse integrine, e, tra queste, quella dell' $\alpha 5\beta 1$ e della sua subunità $\alpha 5$ (Cai T. et al., 2000), influenzando l'adesione cellulare.

Allo scopo di verificare se le modificazioni di adesione e di migrazione osservate nei cloni iperesprimenti il T β RII, fossero correlate o meno, con modificazioni di espressione del recettore integrinico $\alpha 5\beta 1$, sono state, quindi, condotte analisi Western Blot per valutare l'espressione della subunità integrinica $\alpha 5$ e dell'integrina $\alpha 5\beta 1$.

I lisati proteici totali sono stati ottenuti da cellule pretrattate o non per 2-4 ore con lo $ZnCl_2$ (50 μM) e stimulate per 24 ore con 10 ng/ml di TGF- $\beta 1$. Come mostrato nella Figura 19, le cellule trasformate K10 e i cloni RIIK2 e RIIK4, come dimostrato anche da altri autori (Vitale et al., 1994), presentano un'evidente iperespressione della subunità $\alpha 5$ (pannello A) che non è associata ad un'iperespressione dell'eterodimero $\alpha 5\beta 1$ (pannello B). Il trattamento con il TGF- $\beta 1$ non determina variazioni significative dei livelli di espressione della subunità $\alpha 5$ e del recettore integrinico $\alpha 5\beta 1$, in nessuna delle linee esaminate.

I nostri dati dimostrano, quindi, che il TGF- β , nei cloni iperesprimenti il T β RII, modula negativamente l'adesività e la motilità cellulare, controllando la funzione integrinica e, quindi, l'affinità e l'avidità dell'integrina α 5 β 1 per il suo substrato, piuttosto che il suo livello di espressione.

Espressione di RhoA nei cloni iperesprimenti il T β RII.

L'iperespressione di RhoA è associata a diverse forme di tumore (Sahai E. and Marshall C.J., 2002) e suggerisce per RhoA un ruolo di controllo sulla motilità cellulare e sulla formazione delle metastasi (Bourguignon L.Y. et al., 1999).

Allo scopo di chiarire se l'iperespressione del T β RII nei cloni RIIK2 e RIIK4 fosse in grado di modulare l'espressione della proteina RhoA, sono state effettuate analisi Western Blot per valutare i livelli di questa proteina in tutte le linee esaminate. La Figura 20 mostra che RhoA è espresso in tutte le linee esaminate e che il livello più elevato è stato riscontrato nel clone RIIK2. Nelle cellule RIIK2 e RIIK4, l'iperespressione del T β RII determina un'importante riduzione dell'espressione di RhoA, in linea sia con il parziale recupero del fenotipo normale che con la riduzione della motilità, e rende il comportamento dei cloni più vicino a quello delle cellule normali FRTL-5.

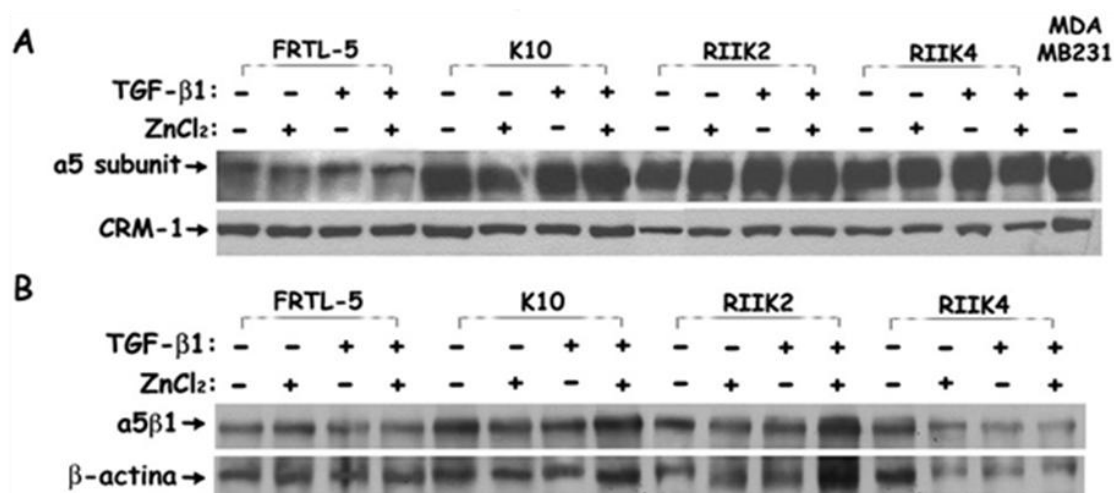


Figura 19. Espressione dell'integrina α 5 β 1 e della sua subunità α 5 nei cloni iperespressanti il T β RII.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state incubate per 3 ore con (+) o senza (-) ZnCl₂ (50 μ M) e stimolate per 24 ore, a 37°C, con 10 ng/ml di TGF- β 1 (+) o con il solo mezzo (-). Come descritto nella specifica sezione "Materiali e Metodi", le cellule sono state lisate e le proteine sono state risolte attraverso una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti, nel caso della subunità α 5 (pannello A), e in condizioni non riducenti, nel caso dell' α 5 β 1 (pannello B). Una volta completato il trasferimento delle proteine su nitrocellulosa, le membrane sono state incubate, sequenzialmente, con l'Ab anti- α 5 e anti-CRM1, e con l'Ab anti- α 5 β 1 e anti β -actina, rispettivamente. Questo risultato è rappresentativo di altri tre esperimenti indipendenti. L'immagine mostra che il trattamento con il TGF- β 1 non determina variazioni significative dei livelli di espressione della subunità α 5 e del recettore integrinico α 5 β 1, in nessuna delle linee esaminate.

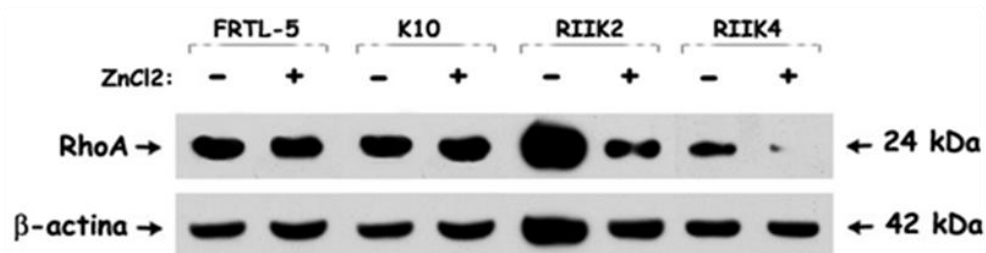


Figura 20. Espressione di RhoA nei cloni iperespressanti il T β RII.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state incubate per 3 ore con (+) o senza (-) ZnCl₂ (50 μ M) e, come descritto nella specifica sezione "Materiali e Metodi", le cellule sono state lisate e le proteine sono state risolte attraverso una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti. Una volta completato il trasferimento delle proteine su nitrocellulosa, le membrane sono state incubate, sequenzialmente, con l'Ab anti-RhoA e con l'Ab anti β -actina. Questo risultato è rappresentativo di altri tre esperimenti indipendenti. L'immagine mostra che RhoA è espresso in tutte le linee esaminate e che il livello più elevato è stato riscontrato nel clone RIIK2. Nelle cellule RIIK2 e RIIK4, l'iperespressione del T β RII determina un'importante riduzione dell'espressione di RhoA.

Espressione della metalloproteasi 2 (MMP-2) nei cloni iperesprimenti il T β RII.

La MMP-2 è una gelatinasi in grado di degradare i componenti della membrana basale, che viene prodotta sottoforma di precursore inattivo e attivata per taglio proteolitico del dominio "pro". Insieme alla MMP-9, essa gioca un ruolo cruciale in processi come l'invasione tumorale, e la sua attivazione correla con la diffusione del tumore e con una prognosi peggiore. Allo scopo di chiarire se alla riduzione del potenziale invasivo dei cloni RIIK2 e RIIK4 contribuisce anche una variazione dei livelli di espressione della MMP-2, sono state condotte analisi Western Blot su una serie di lisati di cellule K10, FRTL-5, RIIK2 e RIIK4 indotte o non con lo zinco e trattate e non per 10, 30, 60, 120 minuti con il fattore di crescita TGF- β 1. I risultati riportati in Figura 21, hanno dimostrato che l'espressione della metalloproteasi MMP-2 è maggiore nelle K10, rispetto alle FRTL-5 e ai cloni, sia per quanto concerne la forma inattiva che per quel che riguarda la forma attiva. Nelle stesse K10, inoltre, tale espressione non è influenzata dal trattamento con il TGF- β 1. L'iperspressione del T β RII, nei cloni RIIK2 e RIIK4, unita al trattamento con il TGF- β 1, ha determinato, invece, una riduzione importante dei livelli di espressione della forma attiva e di quella inattiva della MMP-2, che non è stata riscontrata né nelle K10 che nelle FRTL-5. Questo dato spiega in parte la riduzione del potenziale metastatico osservata in queste cellule (Turco et al., 1999) e permette di ipotizzare che questo possa essere un altro dei meccanismi TGF β -mediati responsabili della parziale reversione del loro fenotipo maligno.

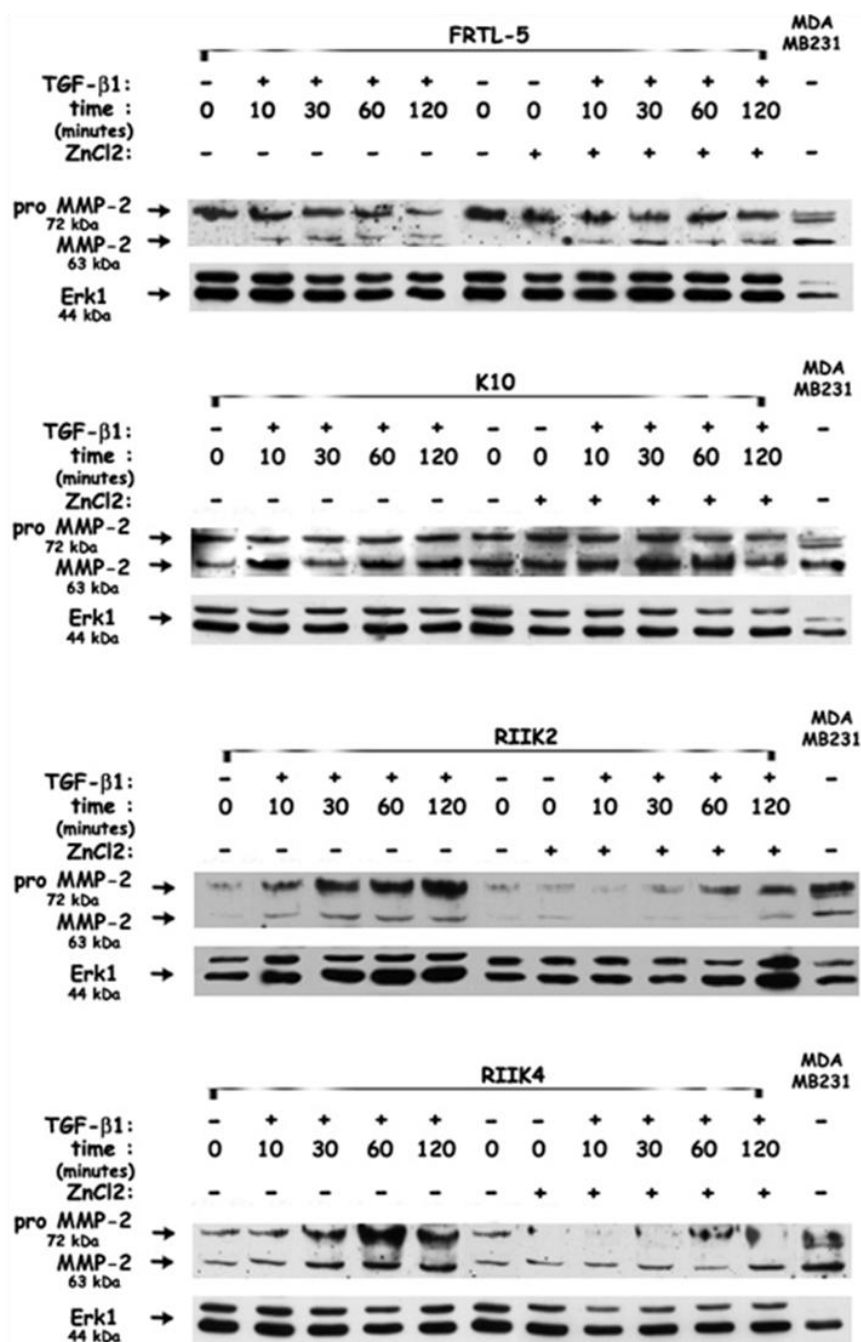


Figura 21. Espressione della metalloproteasi 2 (MMP-2) nei cloni iperesprimenti il TβRII.

Le cellule FRTL-5, K10, RIIK2 e RIIK4 sono state incubate per 3 ore con (+) o senza (-) ZnCl₂ (50 μM) e stimolate per 10, 30, 60 e 120 minuti, a 37°C, con 10 ng/ml di TGF-β1 (+), 40 μg/lane, come descritto nella specifica sezione "Materiali e Metodi", sono state risolte attraverso una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti e trasferite su nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate, sequenzialmente, con l'Ab anti-MMP2 (H-76) e con l'Ab anti-Erk1. Questo risultato è rappresentativo di altri tre esperimenti indipendenti.

L'immagine mostra che l'espressione della MMP-2 è maggiore nelle K10, rispetto alle FRTL-5 e ai cloni, soprattutto per quanto concerne la forma attiva e che l'iperspressione del TβRII nei cloni RIIK2 e RIIK4 e il trattamento con il TGF-β1 (10 ng/ml), determina una riduzione importante dei livelli di espressione delle forme attiva e inattiva della MMP-2 che non è osservabile né nelle K10 e né nelle FRTL-5.

DISCUSSIONE

Il TGF- β ha un ruolo considerevole nella regolazione della crescita e della funzione tiroidea (Coppa A. et al., 1995; Morris J.C. 3rd et al., 1988; Tsushima T. et al., 1988), nella formazione della matrice extracellulare (Garbi C. et al., 1990), nell'apoptosi (Bechtner G. et al., 1999), nella regolazione del sistema immunitario (Seddon B. and Mason D., 1999; Napolitano G. et al., 2000), nell'adesione e nella motilità (Nilsson M. et al., 1995), e nella carcinogenesi di questa ghiandola (Lazzereschi D. et al., 1997).

I dati più recenti suggeriscono che il TGF- β ha un ruolo molto complesso nel processo di carcinogenesi, con una attività di soppressore tumorale e una pro-oncogenica a seconda del particolare tipo di tumore e dello stadio della progressione maligna (Bachman K.E. and Park B.H., 2005). Il TGF- β svolge, senza dubbio, un importante ruolo anche nel controllo del processo metastatico anche se, a tutt'oggi, non è ancora stato compreso completamente il suo meccanismo di azione. Vista la natura multifunzionale del TGF- β , esso potrebbe influenzare diversi processi durante la cascata metastatica.

A questo proposito, è stato dimostrato che le cellule di tiroide di ratto K10, trasformate da *K-ras*, sono resistenti all'azione di inibizione sulla crescita del TGF- β e mostrano un'espressione diminuita del recettore II del TGF- β , T β RII, sia a livello di RNA che di proteina. I cloni stabili, iperesprimenti il T β RII, revertano parzialmente il loro fenotipo maligno e mostrano una riduzione di crescita ancoraggio-dipendente e -indipendente e una riduzione statisticamente significativa della tumorigenicità quando trapiantati in topi nudi atimici, rispetto alle cellule parentali altamente maligne, sia per quel che riguarda le metastasi spontanee che per quel che concerne le artificiali (Turco A. et al., 1999). Questo modello, che include una serie di linee cellulari di origine comune rappresentanti diversi stadi di differenziazione

dei tumori tiroidei, ci ha permesso di studiare il ruolo del TGF- β nel controllo di comportamenti cellulari, come adesione e migrazione, che sono tappe importanti del processo metastatico. I nostri dati dimostrano che, l'iperespressione del T β RII nei cloni transfettati, correla con un recupero della sensibilità al fattore di crescita TGF- β . Infatti, nonostante i mediatori citoplasmatici della via del TGF- β , Smad2 e Smad4, siano presenti in tutte le linee cellulari esaminate, una rilevante fosforilazione della proteina Smad2 risulta evidente solo nei cloni iperesprimenti il recettore, e nelle cellule di controllo FRTL-5, dopo il trattamento con il TGF- β 1. Nelle K10, infatti, l'intensità della banda di Smad2-P è molto più debole, a conferma della scarsa intensità del segnale del TGF- β in queste cellule che esprimono il recettore II solo a bassi livelli. La fosforilazione di Smad2 è fondamentale per la trasduzione del segnale del TGF- β , ma anche la localizzazione e gli spostamenti all'interno delle cellule delle proteine Smad2 e Smad4, sono molto importanti per la loro attività trascrizionale. Smad2-P si associa con Smad4 e insieme costituiscono un complesso trascrizionalmente attivo, che trasloca nel nucleo andando a regolare la trascrizione dei geni bersaglio del TGF- β . Molti sono gli studi in corso sull'argomento, ma il meccanismo preciso con cui queste proteine entrano nel nucleo non è stato ancora completamente chiarito (Xiao Z. et al., 2003). Gli esperimenti di immunofluorescenza dimostrano che la traslocazione dal citoplasma al nucleo delle proteine Smad2 e Smad4 è completamente abolita nelle cellule altamente maligne, mentre è evidente nei cloni iperesprimenti il T β RII e nelle FRTL-5 dopo il trattamento con il TGF- β 1. La localizzazione nucleocitoplasmatica di Smad2 e Smad4 nei cloni RIIK2 e RIIK4, è visibile nel 95% delle cellule dopo il trattamento con il TGF- β 1 e solo nel 16% delle cellule non trattate. Questi dati sono in perfetto accordo con i risultati ottenuti nello studio dell'attività trascrizionale del TGF- β 1 in queste cellule,

che dimostra il ripristino dell'induzione dell'attività del gene reporter 3TP-Lux in risposta al trattamento con il TGF- β 1, nei cloni RIIK2 e RIIK4 iperesprimenti il T β RII e la mancata risposta al trattamento nelle K10.

I cloni RIIK2 e RIIK4 producono e secernono TGF- β 1 e rispondono al fattore autocrino, quando iperesprimono il T β RII. Questo suggerisce che il fattore autocrino è sufficiente ad attivare la via del segnale del TGF- β e, al contempo, conferma il ruolo essenziale rivestito dal T β RII nel processo di trasduzione del segnale del TGF- β .

Il processo di invasione e metastatizzazione delle cellule tumorali coinvolge complesse interazioni fra le cellule cancerose e il loro ambiente extracellulare. L'adesione e la migrazione delle cellule tumorali hanno un ruolo importante nel processo della formazione delle metastasi. La motilità delle cellule tumorali sembra essere un prerequisito per il fenotipo metastatico tumorale e la chemiotassi potrebbe essere coinvolta in questo processo (Gassmann P. et al., 2004). L'adesione e la motilità dei cloni RIIK2 e RIIK4 verso la fibronectina e la laminina, appare ridotta fortemente in seguito all'iperpressione del T β RII e ciò rende il comportamento dei cloni simile a quello delle cellule normali di controllo FRTL-5. Questi risultati dimostrano che nelle cellule di tiroide di ratto trasformate da *K-ras*, l'iperpressione del T β RII è necessaria a ripristinare la funzionalità della via del segnale del TGF- β e, quindi, la responsività sia al fattore esogeno che all'autocrino, risultando indispensabile nella modulazione del comportamento adesivo e migratorio di queste cellule.

E' noto che, durante la trasformazione neoplastica e lo sviluppo del fenotipo metastatico, sono significativamente modificati nelle cellule, sia il pannello delle integrine espresse, che la loro affinità e avidità per le componenti della ECM (Koukoulis G.K. et al., 1993). La migrazione cellulare, inoltre, è dipendente dall'adesione e si compie attraverso cicli di adesione e

deadesione alla matrice che coinvolgono ancora una volta le integrine. Il TGF- β è in grado di alterare l'espressione di diverse integrine e, tra queste, l' $\alpha 5\beta 1$ e la sua subunità $\alpha 5$ (Cai T. et al., 2000), influenzando l'adesione cellulare. I nostri dati, dimostrano che nelle cellule di tiroide di ratto trasformate dall'oncogene *K-ras*, come in quelle umane (Vitale M. et al., 1994), è presente una forte iperespressione della subunità $\alpha 5$, non accompagnata da quella dell'integrina $\alpha 5\beta 1$, recettore della fibronectina. Né i livelli della $\alpha 5$ né quelli dell' $\alpha 5\beta 1$ risultano regolati dal trattamento con il TGF- $\beta 1$. I nostri dati, quindi, dimostrano che l'iperespressione del T β RII, ripristinando la responsività al TGF- β , determina una diminuzione dell'adesività delle cellule tiroidee controllando l'affinità e l'avidità integrinica piuttosto che i livelli di espressione degli stessi recettori integrinici (Figura 22 -> Modello di regolazione dell'affinità/avidità delle integrine). La specificità e l'affinità di un dato recettore integrinico in una data cellula non sono, infatti, sempre costanti e sono numerosi gli esempi di modulazione della funzione integrinica in cui si ritiene che le funzioni integriniche possano essere attivate o disattivate nelle diverse situazioni (Shattil S.J. and Brugge J.S., 1991; O'Toole T.E. et al., 1991).Errore.

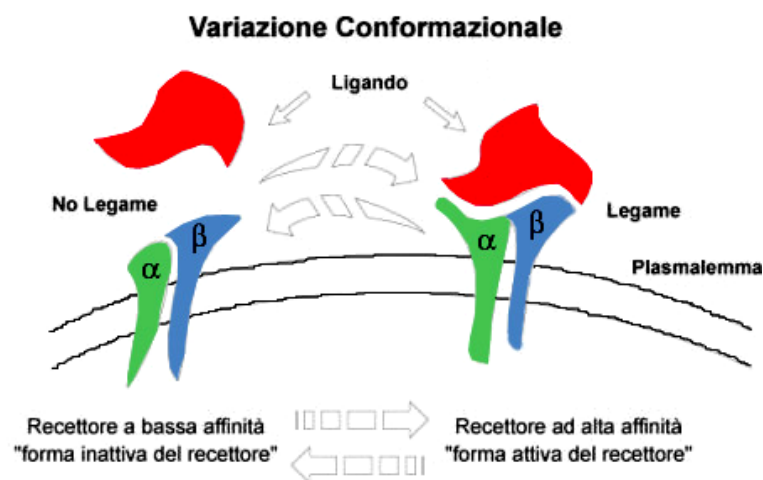


Figura 22. L'affinità/avidità delle integrine e la sua regolazione.

La specificità e l'affinità di un dato recettore integrinico in una data cellula non sono sempre costanti e sono numerosi gli esempi di modulazione della funzione integrinica in cui si ritiene che le funzioni integriniche possano essere attivate o disattivate nelle diverse situazioni.

RhoA, insieme a Rac e Cdc42, è membro della famiglia delle "small GTPasi" omologhe a *ras* ed è implicato nella regolazione della forma cellulare e nell'assemblaggio dei filamenti actinici (Hall A., 1998; Takai Y. et al., 1995), nella regolazione del citoscheletro e nel mantenimento della polarità cellulare ed è iperespresso in vari tumori. E' stato dimostrato che l'iperespressione di un RhoA costitutivamente attivato nelle cellule FRTL-5, determina la loro trasformazione rendendole più proliferanti, indifferenziate e tumorigeniche. In particolare, RhoA determina una diminuzione dei livelli di espressione di alcuni marcatori di differenziazione tiroideo-specifici come la tireoglobulina, agendo attraverso la regolazione dell'espressione del fattore trascrizionale TTF-1 (Medina D.L. et al., 2002). L'espressione di RhoA nei cloni iperesprimenti il T β RII è significativamente ridotta, quando comparate alle stesse cellule non iperesprimenti il recettore, probabilmente a causa di una maggiore instabilità T β RII-mediata della proteina RhoA. Infatti, è stato dimostrato che T β RII è in grado di fosforilare la proteina Par6, che una volta attivata, favorisce l'ubiquitinazione di RhoA da parte della E3 ligasi Smurf1, favorendone la degradazione proteasoma-mediata (Ozdamar B. et al., 2005).

La modulazione dei livelli d'espressione di RhoA, ci permette di ipotizzare che questa proteina, possa cooperare con il recettore T β RII, tanto nella regolazione del potenziale metastatico, che nel recupero di un fenotipo più differenziato da parte dei cloni iperesprimenti il T β RII (Turco A. et al., 1999).

La migrazione è una funzione cellulare necessaria nei processi dell'invasione tumorale e della formazione delle metastasi, che richiede l'attività di enzimi capaci di degradare le componenti della matrice e di creare dei varchi nella stessa, che permettano alle cellule di infiltrare i tessuti e di raggiungere i vasi, disseminandosi in tutto l'organismo. Il TGF- β può controllare sia

positivamente che negativamente l'espressione e l'attività delle MMP in maniera sia cellula che contesto specifica (Wilson M.J. et al., 2002; Braundmeier A.G. and Nowak R.A., 2006). Durante il processo di tumorigenesi, il TGF- β stimola l'attività proteolitica delle cellule cancerose aumentando l'espressione delle metalloproteasi che degradano la matrice (Desruisseau S. et al., 1996). L'iperespressione del T β RII nei cloni RIIK2 e RIIK4, unita al trattamento con il TGF- β 1, determina una riduzione importante dei livelli d'espressione delle forme attiva e inattiva della MMP-2, che non è osservata nelle K10. Questo dato spiega in parte la riduzione del potenziale metastatico osservata in queste cellule e permette di ipotizzare che i geni delle MMP siano importanti geni bersaglio del TGF- β , responsabili del controllo della capacità migratoria di queste cellule (Turco A. et al., 1999).

In questi ultimi anni sono stati compiuti importanti passi avanti nella comprensione di come i tumori, in particolar modo i tumori tiroidei, sviluppano resistenza ai segnali inibitori sulla crescita mediati dal TGF- β . La riduzione dell'espressione delle componenti della sua via del segnale, come il T β RII, o la presenza di mutazioni di SMAD4 (Lazzereschi D. et al., 2005), sono gli eventi più frequentemente riscontrati. Sono necessari, comunque, ulteriori chiarimenti sui meccanismi che regolano i processi di induzione dell'invasione e della metastatizzazione. I nostri dati si inseriscono in questo contesto ed è auspicabile che, nel futuro, possano contribuire alla comprensione di questi processi tornando utili sia nella prevenzione che nella programmazione terapeutica.

Questo lavoro è dedicato alla memoria della Prof.ssa Giulia Colletta.

BIBLIOGRAFIA

Akhurst R.J., Derynck R. (2001). "TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword". *Trends Cell Biol* **11**(11):S44-51.

Alexandrow M.G. and Moses H.L. (1995). "Transforming growth factor β and cell cycle regulation". *Cancer Res* **55**:1452-57.

Ambesi-Impiombato F.S., Parks L.A., Coon H.G. (1980). "Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids". *Proc Natl Acad Sci USA* **77**(6):3455-59.

Arsura M., Wu M., Sonenshein G.E. (1996). "TGFbeta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: Transcriptional activation of I kappa B alpha". *Immunity* **5**:31-40.

Atfi A., Buisine M., Mazars A., Gespach C. (1997). "Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway". *J Biol Chem* **272**:24731-34.

Attisano L. and Lee-Hoeflich S.T. (2001). "The Smads". *Genome Biology* **2**(8):1-8.

Bachman K.E. and Park B.H. (2005). "Duel nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter". *Curr Opin Oncol* **17**(1):49-54.

Bakin A.V., Tomlinson A.K., Bhowmick N.A., Moses H.L., Arteaga C.L. (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration". *J Biol Chem* **275**(47):36803-10.

Barsky S.H., Siegal G.P., and Jannotta F., Liotta L.A. (1983). "Loss of basement membrane components by invasive tumours but not by their benign counterparts". *Lab Invest* **49**(2):140-47.

Becks G.P., Logan A., Phillips I.D., Wang J.F., Smith C., DeSousa D., Hill DJ. (1994). "Increase of basic fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor messenger RNA during rat thyroid hyperplasia: temporal changes and cellular distribution". *J Endocrinol* **142**:325-38.

Bhowmick N.A., Ghiassi M., and Bakin A., Aakre M., Lundquist C.A., Engel M.E., Arteaga C.L., Moses H.L. (2001). "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism". *Mol Biol Cell* **12**:27-36.

Birchmeier C., Birchmeier W., Brand-Saberi B. (1996). "Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression". *Acta Anat (Basel)* **156**(3):217-26.

Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease". *N Engl J Med* **342**:1350-58.

Brand T. and Schneider M.D. (1995). "Inactive type II and type I receptors for TGF β -dependent transcription". *J Biol Chem* **270**:8274-84.

Borkowski T.A., Letterio J.J., Mackall C.L., Saitoh A., Farr A.G., Wang X.J., Roop D.R., Gress R.E., Udey M.C. (1997). "Langerhans cells in the TGF beta 1 null mouse". *Adv Exp Med Biol* **417**:307-10.

Braundmeier A.G. and Nowak R.A. (2006). "Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer". *Am J Reprod Immunol* **56**(3):201-14.

Bechtner G., Froschl H., Sachse A., Schopohl D., Gartner R. (1999). "Induction of apoptosis in porcine thyroid follicles by transforming growth factor beta1 and epidermal growth factor". *Biochimie* **81**(4):315-20.

Benaud C., Dickson R.B., and Thompson E.W. (1998). "Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer". *Breast Cancer Res Treat* **50**(2):97-116.

Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease". *N Engl J Med* **342**:1350-58.

Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Shao, L., Zhu, D., Chen, Y.W. (1999). "Rho-kinase (ROK) promotes CD44v (3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells". *Cell Motil Cytoskel* **43**(4):269-87.

Cai T., Lei Q.Y., Wang L.Y., Zha X.L. (2000). "TGF-beta 1 modulated the expression of alpha 5 beta 1 integrin and integrin-mediated signaling in human hepatocarcinoma cells". *Biochem Biophys Res Commun* **274**(2):519-25.

Calonge M.J. and Massagué J. (1999). "Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells". *J Biol Chem* **274**:33637-43.

Chen R.H., Su Y.H., Chuang R.L., Chang T.Y. (1998). "Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway". *Oncogene* **17**:1959-68.

Cirafici A.M., Pepe S., Mincione G., Esposito D., Colletta G. (1992). "TGF beta inhibits rat thyroid cell proliferation without alterations in the expression of TSH-induced cell cycle-related genes". *Biochem Biophys Res Commun.* **187**(1):225-33.

Colletta G., Cirafici A.M., Di Carlo A., Ciardiello F., Salomon D.S., Vecchio G. (1991). "Constitutive expression of transforming growth factor alpha does not transform rat thyroid epithelial cells". *Oncogene* **6**(4):583-87.

Coppa A., Mincione G., Lazzereschi D., Ranieri A., Turco A., Lucignano B., Scarpa S., Ragano-Caracciolo M., Colletta G. (1997). "Restored expression of transforming growth factor beta type II receptor in k-ras-transformed thyroid cells, TGF beta-resistant, reverts their malignant phenotype". *J Cell Physiol* **172**(2):200-8.

Coppa A., Mincione G., Mammarella S., Ranieri A., Colletta G. (1995). "Epithelial rat thyroid cell clones, escaping from transforming growth factor beta negative growth control, are still inhibited by this factor in the ability to trap iodide". *Cell Growth Differ* **6**(3):281-90.

Costamagna E., Garcia B., Santisteban P. (2004). "The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene". *J Biol Chem* **279**:3439-46.

Coulonval K., Bockstaele L., Paternot S., Dumont J.E., Roger P.P. (2003). "The cyclin D3-CDK4-p27(kip1) holoenzyme in thyroid epithelial cells: activation by TSH, inhibition by TGFbeta, and phosphorylations of its subunits demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis". *Exp Cell Res* **291**:135-49.

Damante G. and Di Lauro R. (1994). "Thyroid-Specific Gene-Expression". *Biochim Biophys Acta - Gene Structure and Expression* **1218**:255-66.

Damante G., Tell G., Di Lauro R. (2001). "A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells". *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* **66**:307-56.

Dai G., Levy O., Carrasco N. (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter". *Nature* **379**:458-60.

Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.J., Xiong Y., Wang X.F. (1995). "Transforming growth factor beta induces the cyclin dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism". *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:5545-49.

de Caestecker M.P., Piek E., Roberts A.B. (2000). "Role of Transforming Growth Factor- β Signaling in Cancer". *J Natl Cancer Inst* **92**(17):1388-02.

de Groot R.P. and Kruijer W. (1990). "Transcriptional activation by TGF beta 1 mediated by the dyad symmetry element (DSE) and the TPA responsive element (TRE)". *Biochem Biophys Res Commun* **168**(3):1074-81.

Dennler S., Itoh S., Vivien D., ten Dijke P., Huet S., Gauthier J.M. (1998). "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene". *EMBO* **17**(11):3091-100.

Depoortere F., Pirson I., Bartek J., Dumont J.E., Roger P.P. (2000). "Transforming growth factor beta(1) selectively inhibits the cyclic AMP-dependent proliferation of primary thyroid epithelial cells by preventing the association of cyclin D3-cdk4 with nuclear p27(kip1)". *Mol Biol Cell* **11**:1061-76.

Derynck R., Akhurst R.J., Balmain A. (2001). "TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression". *Nat Genet* **29**:117- 29.

Derynck R. and Zhang Y.E. (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGFbeta family signalling". *Nature* **425**(6958):577-84.

Desruisseau S., Ghazarossian-Ragni E., Chinot O., Martin P.M. (1996). "Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines". *Int J Cancer* **66**:796- 801.

De Vito W.J., Chanoine J.P., Alex S., Fang S.L., Stone S., Huber C.A., Shalhoub V., Lian J.B., Stein G.S., Braverman L.E. (1992). "Effect of in vivo administration of recombinant acidic fibroblast growth factor on thyroid function in the rat: induction of colloid goiter". *Endocrinology* **131**:729-35.

Dumont J.E., Maenhaut C., Pirson I., Baptist M., Roger P.P. (1991). "Growth factors controlling the thyroid gland". *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **5**:727-54.

Dumont N. and Arteaga C.L. (2000). "Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta". *Breast Cancer Res* **2**:125-32.

Dumont N. and Arteaga C.L. (2003). "Targeting the TGFbeta signaling network in human neoplasia". *Cancer Cell* **3**:531-6.

Egeblad M. and Werb Z. (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression". *Nat Rev Cancer* **2**(3):161-174.

Elliott R.L. and Blobe G.C. (2005). "Role of Transforming Growth Factor Beta in Human Cancer". *J Clin Oncol* **23**(9):2078-2093.

Fagin J.A. (1992). "Genetic basis of endocrine disease 3: Molecular defects in thyroid gland neoplasia". *J Clin Endocrinol Metab* **75**(6):1398-400.

Fagin J.A., Matsuo K., Karmakar A., Chen D.L., Tang S.H., Koeffler H.P. (1993). "High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas". *J Clin Invest* **91**(1):179-84.

Farid N.R., Shi Y., Zou M. (1994). "Molecular basis of thyroid cancer". *Endocr Rev* **15**(2):202-32.

Francis J.M., Heyworth C.M., Spooncer E., Pierce A., Dexter T.M., Whetton A.D. (2000). "Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells". *J Biol Chem* **275**:39137-45.

Franzén A., Piek E., Westermark B., ten Dijke P., Heldin N.E. (1999). "Expression of transforming growth factor-beta1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function". *Endocrinology* **140**:4300-10.

Franzén P., ten Dijke P., Ichijo H., Yamashita H., Schulz P., Heldin C.H., Miyazono K. (1993). "Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor". *Cell* **75**(4):681-92.

Franzén P., Heldin C.-H., and Miyazono K. (1995). "The GS domain of Transforming growth factor- β type I receptor is important in signal transduction". *Biochem Biophys Res Commun* **207**: 682-89.

Frolik C.A., Dart L.L., Meyers C.A., Smith D.M, Sporn M.B. (1983). "Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta". *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:3676-80.

Garbi C., Colletta G., Cirafici A.M., Marchisio P.C., Nitsch L. (1990). "Transforming growth factor-beta induces cytoskeleton and extracellular matrix modifications in FRTL-5 thyroid epithelial cells". *Eur J Cell Biol* **53**(2):281-9.

Gassmann P., Enns A., Haier J. (2004). "Role of tumor cell adhesion and migration in organspecific metastasis formation". *Onkologie* **27**(6):577-82.

Gerard C.M., Roger P.P., Dumont J.E. (1989). "Thyroglobulin gene expression as a differentiation marker in primary cultures of calf thyroid cells". *Mol Cell Endocrinol* **61**:23-35.

Giannelli G., Fransvea E., Marinosci F., Bergamini C., Colucci S., Schiraldi O., Antonaci S. (2002). "Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin". *Am J Pathol* **161**:183-93.

Gobbi H., Arteaga C.L., Jensen R.A., Simpson J.F., Dupont W.D., Olson S.J., Schuyler P.A., Plummer W.D. Jr, Page D.L. (2000). "Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas". *Histopathology* **36**:168-77.

Gorelik L. and Flavell R.A. (2002). "Transforming growth factor-beta in T-cell biology". *Nat Rev Immunol* **2**:46-53.

Grubeck-Loebenstein B., Buchan G., Sadeghi R., Kissonerghis M., Londei M., Turner M., Pirich K., Roka R., Niederle B., Kassal H., et al. (1989). "Transforming growth factor beta regulates thyroid growth". *J Clin Invest* **83**:764-70.

Hahn S.A., Schutte M., Hoque A.T.M.S., Moskaluk C.-A., da Costa L.T., Rozenblum E., Weinstein C.L., Fischer A., Yeo C.J., Hruban R.H., Kern S.E. (1996). "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21". *Science* **271**:350-53.

Hall A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton". *Science* **279**:509-14.

Hannon G.J. and Beach D. (1994). "P15 INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest". *Nature* **371**:257-61.

Hay E.D. (1995). "An overview of epithelio-mesenchymal transformation". *Acta Anat (Basel)* **154**(1):8-20.

Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins". *Nature* **390**(6659):465-71.

Hyman K.M., Seghezzi G., Pintucci G., Stellari G., Kim J.H., Grossi E.A., Galloway A.C., Mignatti P. (2002). "Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase". *Surgery* **132**:173-79.

Hsing A.Y., Kadomatsu K., Bonham M.J., Danielpour D. (1996). "Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines". *Cancer Res* **56**:5146-49.

Hung W.C., Chang H.C., Chuang L.Y. (1998). "Transforming growth factor beta 1 potently activates CPP32-like proteases in human hepatoma cells". *Cell Signal* **10**:511-15.

Izzi L. and Attisano L. (2004). "Regulation of the TGF β signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation". *Oncogene* **23**(11):2071-78.

Inman G.J. and Allday M.J. (2000). "Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent". *J Immunol* **165**:2500-10.

Inman G.J., Nicolas F.J., Hill C.S. (2002). "Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity". *Mol Cell* **10**:283-94.

Jhiang S., Sagartz J., Tong Q., Parker-Thornburg J., Capen C.C., Cho J.Y., Xing S., Ledent C. (1996). "Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas". *Endocrinology* **137**:375-78.

Kamaraju A.K. and Roberts A.B. (2005). "Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo". *J Biol Chem* **280**(2):1024-36.

Keeton M.R., Curriden S.A., van Zonneveld A.J., Loskutoff D.J. (1991). "Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta". *J Biol Chem* **266**(34):23048-52.

Kehrl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B., Jakowlew S., Alvarez-Mon M., Derynck R., Sporn M.B., Fauci A.S. (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth". *J Exp Med* **163**:1037-50.

Kim S.K., fan Y., Papadimitrakopoulou V., Clayman G., Hittelman W.N., Hong W.K: Lotan R. and Mao L. (1996). "DPC-4, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and squamous cell carcinoma". *Cancer Res* **56**(11):2519-21.

Kroll T.G., Sarraf P., Pecciarini L., Chen C.J., Mueller E., Spiegelman B.M., Fletcher J.A. (2000). "PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma". *Science* **289**:1357-60.

Kordon E.C., McKnight R.A., Jhappan C., Hennighausen L., Merlino G., Smith G.H. (1995). "Ectopic TGF beta 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population". *Dev Biol* **168**:47- 61.

Koukoulis G.K., Howeedy A.A., Korhonen M., Virtanen I., Gould V.E. (1993). "Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast". *J Submicrosc Cytol Pathol* **25**(2):285-95.

Kurisaki A., Kose S., Yoneda Y., Heldin C.H., Moustakas A. (2001). "Transforming growth factor- β induces nuclear import of Smad3 in an importin- β 1 and Ran-dependent manner". *Mol Biol Cell* **12**:1079-91.

Lafleur M.A., Handsley M.M., and Edwards D.R. (2003). "Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis". *Expert Rev Mol Med* **5**:1-39.

Lallemand F., Mazars A., Prunier C., , Bertrand F., Kornprost M., Gallea S., Roman-Roman S., Cherqui G., Atfi A. (2001). "Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells". *Oncogene* **20**:879-84.

Landstrom M., Heldin N.E., Bu S., Hermansson A., Itoh S., ten Dijke P., Heldin C.H. (2000). "Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells". *Curr Biol* **10**:535-38.

Lazzereschi D., Ranieri A., Mincione G., Taccogna S., Nardi F., Colletta G. (1997). "Human malignant thyroid tumors displayed reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II messenger RNA and protein". *Cancer Res* **57**(10):2071-6.

Lazzereschi D., Nardi F., Turco A., Ottini L., D'Amico C., Mariani-Costantini R., Gulino A., Coppa A. (2005). "A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours". *Oncogene* **24**(34):5344-54.

Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E.W. (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease". *J Cell Biol* **172**(7):973-81.

Lehmann K., Janda E., and Pierreux C.E., Rytomaa M., Schulze A., McMahon M., Hill C.S., Beug H., Downward J. (2000). "Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: A mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells". *Genes Dev* **14**: 2610-22.

Lei J., Zou T.-T., Shi Y.-Q., Zhou X., Smolinski K.N., Yin J., Souza R.F., Appel R., Wang S., Cymes K., Chan O., Abraham J.M., Harpaz N., and Meltzer S. J. (1996). "Infrequent DPC-4 gene mutation in esophageal cancer, gastric cancer and ulcerative colitis-associated neoplasms". *Oncogene* **13**:2459-62.

Li Q.L., Ito K., Sakakura C., Fukamachi H., Inoue K., Chi X.Z., Lee K.Y., Nomura S., Lee C.W., Han S.B., Kim H.M., Kim W.J., Yamamoto H., Yamashita

N., Yano T., Ikeda T., Itohara S., Inazawa J., Abe T., Hagiwara A., Yamagishi H., Ooe A., Kaneda A., Sugimura T., Ushijima T., Bae S.C., Ito Y. (2002). "Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer". *Cell* **109**:113-24.

Lin H.Y., Wang X.F., Ng-Eaton E., Weinberg R.A., Lodish H.F. (1992). "Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase". *Cell* **68**(4):775-85.

Lin X., Ryu K.Y., Jhiang S.M. (2004). "Cloning of the 5'-flanking region of mouse sodium/iodide symporter and identification of a thyroid-specific and TSH-responsive enhancer". *Thyroid* **14**:19-27.

Logan A., Smith C., Becks G.P., Gonzalez A.M., Phillips I.D., Hill D.J. (1994). "Enhanced expression of transforming growth factor-beta 1 during thyroid hyperplasia in rats". *J Endocrinol* **141**:45-57.

Lohi J., Leivo I., Franssila K., Virtanen I. (1997). "Changes in the distribution of integrins and their basement membrane ligands during development of human thyroid follicular epithelium". *Histochem J* **29**(4):337-45.

Lo R.S. and Massagué J. (1999). "Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2". *Nat Cell Biol* **1**(8):472-8.

Lopez-Casillas F., Payne H.M., Andres J.L., and Massagué J. (1994). "Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites". *J Cell Biol* **124**:557-68.

MacGrogan D., Pegram M., Slamon D., and Bookstein R. (1997). "Comparative mutations analysis of DPC-4 (Smad 4) in prostatic and colorectal carcinomas". *Oncogene* **15**:1111-14.

Maehara Y., Kakeji Y., Kabashima A., Emi Y., Watanabe A., Akazawa K., Baba H., Kohnoe S., Sugimachi K. (1999). "Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma". *J Clin Oncol* **17**(2):607-14.

Markowitz S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R.S., Zborowska E., Kinzler K.W., Vogelstein B., Brattain M., Willson J.K.V. (1995). "Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability". *Science (Washington DC)* **269**:1336-38.

Markowitz S.D. and Roberts A.B. (1996). "Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancer". *Cytokine Growth Factor Rev* **7**:93- 102.

Marques A.R., Espadinha C., Catarino A.L., Moniz S., Pereira T., Sobrinho L.G., Leite V. (2002). "Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas". *J Clin Endocrinol Metab* **87**:3947-52.

Massagué J. (1990). "The transforming growth factor- β family". *Annu Rev Biochem* **6**: 597-641.

Massagué J. (1998). "TGF-beta signal transduction". *Annu Rev Biochem* **67**:753-91.

Massagué J. (2000a). "How cells read TGF-beta signals". *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3):169-78.

Massagué J., Blain SW., and Lo. RS. (2000b). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders". *Cell* **103**:295-309.

McEarchern J.A., Kobie J.J., Mack V., Wu R.S., Meade-Tollin L., Arteaga C.L., Dumont N., Besselsen D., Seftor E., Hendrix M.J., Katsanis E., Akporiaye E.T. (2001). "Invasion and metastasis of a mammary tumor involves TGF-beta signalling". *Int J Cancer* **91**:76-82.

Medina D.L., Rivas M., Cruz P., Barroso I., Regadera J., Santisteban P. (2002). "RhoA activation promotes transformation and loss of thyroid cell differentiation interfering with thyroid transcription factor-1 activity". *Mol Endocrinol* **16**(1):33-44.

Miettinen P.J., Ebner R., Lopez A.R., Derynck R. (1994). "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors". *J Cell Biol* **127**:2021-36.

Morris J.C., 3rd, Ranganathan G., Hay I.D., Nelson R.E., Jiang N.S. (1988). "The effects of transforming growth factor-beta on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5". *Endocrinology* **123**(3):1385-94.

Moses H.L., Branum E.L., Proper J.A., Robinson R.A. (1981). "Transforming growth factor production by chemically transformed cells". *Cancer Res* **41**:2842-8.

Moses H.L. and Serrat R. (1996). "Regulation of differentiation by TGF- β ". *Curr Opin Genet Dev* **6**:581-6.

Motyl T., Grzelkowska K., Zimowska W., Skierski J., Wareski P., Ploszaj T., Trzeciak L. (1998). "Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells". *Eur J Cell Biol* **75**:367-74.

Nakamura K., Kitani A., Strober W. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta". *J Exp Med* **194**:629-44.

Namba H., Gutman R., Matsuo K., Alvarez A., Fagin J. (1990a). "H-Ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab* **71**(1):223-9.

Namba H., Rubin S., Fagin J. (1990b). "Point mutations of Ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis". *Molecul Endocrinol* **4**(10):1474-9.

Napolitano G., Montani V., Giuliani C., Di Vincenzo S., Bucci I., Todisco V., Laglia G., Coppa A., Singer D.S., Nakazato M., Kohn L.D., Colletta G., Monaco F. (2000). "Transforming growth factor-beta1 down-regulation of major histocompatibility complex class I in thyrocytes: coordinate regulation of two separate elements by thyroid-specific as well as ubiquitous transcription factors". *Mol Endocrinol* **14**(4):486-505.

Nicolussi A., D'Inzeo S., Santulli M., Colletta G., Coppa A. (2003). "TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation". *Mol Cell Endocrinol* **207**(1-2): 1-11.

Nilsson M., Dahlman T., Westermark B., Westermark K. (1995). "Transforming growth factor-beta promotes epidermal growth factor-induced thyroid cell migration and follicle neof ormation in collagen gel separable from cell proliferation". *Exp Cell Res* **220**(2):257-65.

Oft M., Heider K.H., Beug H. (1998). "TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis". *Curr Biol* **8**:1243-52.

Ohno M., Zannini M., Levy O., Carrasco N., di Lauro R. (1999). "The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription". *Mol Cell Biol* **19**:2051-60.

O'Toole T.E., Mandelman D., Forsyth J., Shattil S.J., Plow E.F., Ginsberg M.H. (1991). "Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb". *Science* **254**(5033):845-7.

Ozdamar B., Bose R., Barrios-Rodiles M., Wang H.R., Zhang Y., Wrana J.L. (2005). "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity". *Science* **307**(5715):1603-9.

Paschke R., Eck T., Herfurth J., Usadel K.H. (1995). "Stimulation of proliferation and inhibition of function of xenotransplanted human thyroid tissue by epidermal growth factor". *J Endocrinol Invest* **18**:359-63.

Pierce D.F. Jr, Gorska A.E., Chytil A., Meise K.S., Page D.L., Coffey R.J. Jr, Moses H.L. (1995). "Mammary tumor suppression by transforming growth factor h1 transgene expression". *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:4254-8.

Pierreux C.E., Nicolas F.J, Hissl C.S. (2000). "Transforming growth factor β -independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus". *Mol Cell Biol* **20**:9041-54.

Pietenpol J.A., Stein R.W., Moran E., Yaciuk P., Schlegel R., Lyons R.M., Pittelkow M.R., Munger K., Howley P.M., Moses H.L. (1990). "TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains". *Cell* **61**:777-85.

Polyak K., Kato J.Y., Solomon M.J., Sherr C.J., Massagué J., Roberts J.M., Koff A. (1994). "P27 Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest". *Genes Dev* **8**:9-22.

Powell J.G., Wang X., Allard B.L., Sahin M., Wang X.L., Hay I.D., Hiddinga H.J., Deshpande S.S., Kroll T.G., Grebe S.K.G., Eberhardt N.L., McIver B. (2004). "The PAX8/PPAR γ fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPAR γ inhibition". *Oncogene* **23**(20):3634-41.

Sahai E. and Marshall C.J. (2002). "RHO-GTPases and Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**(2):133-42.

Sahin M., Allard B.L., Yates M., Powell J.G., Wang X.L., Hay I.D., Zhao Y., Goellner J.R., Sebo T.J., Grebe S.K., Eberhardt N.L., McIver B. (2005). "PPAR γ staining as a surrogate for PAX8/PPAR γ fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value". *J Clin Endocrinol Metab* **90**(1):463-8.

Saltzman A., Munro R., Searfoss G., Franks C., Jaye M., Ivashchenko Y. (1998). "Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation". *Exp Cell Res* **242**:244-54.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor laboratory Press.

Santisteban P., Kohn L.D., Di Lauro R. (1987). "Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells". *J Biol Chem* **262**(9):4048-52.

Savagner P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition". *Bioessays* **23**(10):912-23.

Schiemann W.P., Blobel G.C., Kalume D.E., Pandey A., Lodish H.F. (2002). "Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades". *J Biol Chem* **277**:27367-377.

Schuster N. and Kriegstein K. (2002). "Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis". *Cell Tissue Res* **307**:1-14.

Schutte M., Hruban R.H., Hedrick L., Cho K.R., Nadasdy G.M., Weinstein C.L., Bova G.S., Isaacs W.B., Cairns P., Nawroz H., Sidransky D., Casero R.A., Jr., Melzner P.S., Hahn S.A., and Kern S.E. (1996). "DPC-4 gene in various tumor types". *Cancer Res* **56**:2527-30.

Seddon B. and Mason D. (1999). "Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8 (-) thymocytes". *J Exp Med* **189**(2):279-88.

Serra R. and Moses H.L. (1996). "Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway?". *Nat Med* **2**(4):390-1.

Shattil S.J. and Brugge J.S. (1991). "Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets". *Curr Opin Cell Biol* **3**(5):869-79.

Sternlicht M.D. and Werb Z. (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior". *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:463-516.

Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S., and Liotta L.A. (1993). "Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis". *Annu Rev Cell Biol* **9**:541-73.

Sun L., Wu G., Willson J.K.V., Zborowska E., Yang J., Rajkarunanayake I., Wang J., Gentry L.E., Wang X.F., and Brattain M.G. (1994). "Expression of TGF- β type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells". *J Biol Chem* **269**:26449-455.

Takagi Y., Kohmura H., Futamura M., Kida H., Tanemura H., Shimokawa K., and Saji S. (1996). "Somatic alterations of the DPC-4 gene in human colorectal cancers in vivo". *Curr Opin Oncol* **11**:1369-72.

Taki K., Kogai T., Kanamoto Y., Hershman J.M., Brent G.A. (2002). "A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells". *Mol Endocrinol* **16**:2266-82.

Taipale J., Saharinen J., and Keski-Oja J. (1998). "Extracellular matrix-associated transforming growth factor- β : role in cancer cell growth and invasion". *Adv Cancer Res* **75**:87-134.

Takai Y., Sasaki T., Tanaka K., Nakanishi H. (1995). "Rho as a regulator of the cytoskeleton". *Trends Biochem Sci* **20**:227-31.

Tang B., de Castro K., Barnes H., Parks W.T., Stewart L., Bottinger E.P., Danielpour D., Wakefield L.M. (1999). "Loss of responsiveness to transforming growth factor- β induced malignant transformation of non tumorigenic rat prostate epithelial cells". *Cancer Res* **59**:4834-42.

Taton M., Lamy F., Roger P.P., Dumont J.E. (1993). "General inhibition by transforming growth factor beta1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture". *Mol Cell Endocrinol* **95**:13-21.

ten Dijke P. and S. Hill C. (2004). "New insights into TGF- β -Smad signalling". *Trends Biochem Sci* **29**(5):265-73.

Thiery J.P. and Chopin D. (1999). "Epithelial cell plasticity in development and tumor progression". *Cancer Metastasis Rev* **18**(1):31-42.

Tobin S.W., Douville K., Benbow U., Brinckerhoff C.E., Memoli V.A., Arrick B.A. (2002). "Consequences of altered TGF-beta expression and responsiveness in breast cancer: Evidence for autocrine and paracrine effects". *Oncogene* **21**:108-18.

Tsushima T., Arai M., Saji M., Ohba Y., Murakami H., Ohmura E., Sato K., Shizume K. (1988). "Effects of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture". *Endocrinology* **123**(2):1187-94.

Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW. (1984). "Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor". *Science* **226**:705-7.

Turco A., Coppa A., Aloe S., Baccheschi G., Morrone S., Zupi G., Colletta G. (1999). "Overexpression of transforming growth factor beta-type II receptor reduces tumorigenicity and metastatic potential of K-ras-transformed thyroid cells". *Int J Cancer* **80**(1):85-91.

Vitale M., Bassi V., Illario M., Fenzi G., Casamassima A., Rossi G. (1994). "Loss of polarity and de novo expression of the beta 1 family of integrins in thyroid tumors". *Int J Cancer* **59**(2):185-90.

Wakefield L.M. and Roberts A.B. (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis". *Curr Opin Genet Dev* **12**:22- 9.

Wang T., Li B.-Y., Danielson P.D., Shah P.C., Rockwell S., Lechleider R.J., Martin J., Manganaro T., and Donahoe P.K. (1996). "The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF- β family type I receptors". *Cell* **86**:435-44.

Watanabe M., Masuyama N., Fukuda M., Nishida E. (2000). "Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal". *EMBO Rep* **1**:176-82.

Weinstein M., Yang X., Deng C. (2000). "Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice". *Cytokine Growth Factor Rev* **11**:49-58.

Wilson M.J., Sellers R.G., Wiehr C., Melamud O., Pei D., Peehl D.M. (2002). "Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells". *J Cell Physiol* **191**(2):208-16.

Woodhouse E.C., Chuaqui R.F., and Liotta L.A. (1997). "General mechanisms of metastasis". *Cancer* **80**:(8 Suppl)1529-37.

Wrana J.L., Attisano L., Carcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X.F., Massagué J. (1992). "TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex". *Cell* **71**(6):1003-14.

Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. & Massagué J. (1994). "Mechanism of activation of the TGF- β receptor". *Nature* **370**:341-47.

Xiao Z., Latek R., Lodish H.F. (2003). "An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity". *Oncogene* **22**(7):1057-69.

Xiao, Z., Liu X., Lodish H.F. (2000a). "Importin β mediates nuclear translocation of Smad3". *J Biol Chem* **275**:23425-28.

Xiao Z., Liu X., Henis Y.I., Lodish H.F. (2000b). "A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad3 determines its ligand-induced nuclear translocation". *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:7853-58.

Xu L., Chen Y.G., Massagué J. (2000). "The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGF- β dependent phosphorylation". *Nat Cell Biol* **2**:559-62.

Xu L., Kang Y., Col S., Massagué J. (2002). "Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feed TGF β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus". *Mol Cell* **10**:271-82.

Xu L., Alarcon C., Col S., Massagué J. (2003). "Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import". *J Biol Chem* **278**:42569-77.

Yamamura Y., Hua X., Bergelson S., Lodish H.F. (2000). "Critical role of smads and AP-1 complex in TGF β -dependent apoptosis". *J Biol Chem* **275**: 36295-302.

Zavadil J., Cermak L., Soto-Nieves N., Bottinger E.P. (2004). "Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition". *EMBO J* **23**(5):1155-65.

Zavadil J. and Bottinger E.P. (2005). "TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions". *Oncogene* **24**: 5764-74.

Zawel L., Dai J.L., Buckaults P., Zhou S., Kinzler K.W., Vogelstein B., Kern S.E. (1998). "Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators". *Mol Cell* **1**:611-17.

Zhao Y. and Young S.L. (1996). "Requirement of Transforming growth factor- β (TGF- β) type II receptor for TGF- β -induced proliferation and growth inhibition". *J Biol Chem* **271**:2369-72.

Ziv E., Cauley J., Morin P.A., Saiz R., Browner W.S. (2001). "Association between the T29C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and breast cancer among elderly white women: the study of osteoporotic fractures". *JAMA* **285**:2859-63.

ACRONIMI

ALK	Activin receptor Like Kinase
APC	Antigen Presenting Cells
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumine
c-AMP	Adenosin Monophosphato ciclico
Cdk4	Cyclin Dependent Kinase 4
Co-Smad	Common Partner-Smad
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4
DS	Standard Deviation
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epithelial Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	Epithelial Mesenchimal Transition
ERK	Extracellular signal Regulated Kinases
FITC	Fluorescin Isothiocyanate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FM	Fast o FoxH1 Motif
FN	Fibronectina
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein
GH	Growth Hormone
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IL-2	Interleuchina 2
I-Smad	Inhibitor Smad
JNK	Jun N-terminal Kinase

LM	Laminina
MAPK	Mitogen Activated Protein (MAP) Kinases
MMP	Matrix Methalloproteases
NIS	Na ⁺ /I ⁻ symporter
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
p38 (MAPK)	p38 Mitogen Activated Protein (MAP) Kinases
PI3-K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPAR- γ 1	Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ 1
Rb	Retinoblastoma
R-Smad	Receptor regulated Smad
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SBD	Smad Binding Domain
SBE	Smad Binding Element
SIM	Smad Interacting Motif
Smurf1	Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1
Smurf2	Smad Ubiquitination Regulatory Factor 2
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
T β RI	Type I TGF- β Receptor
T β RII	Type II TGF- β Receptor
T β RIII	Type III TGF- β Receptor
TG	Tireoglobulina
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1
TPO	Tireoperossidasi

TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
TTF-1	Thyroid transcription factor 1
TTF-2	Thyroid transcription factor 2
ZO-1	Zonula Occludens