



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale

-XX ciclo-

TESI DI DOTTORATO

**Ruolo delle alterazioni di Smad4 nelle patologie
neoplastiche tiroidee.**

DOTTORANDA: Dott.ssa Sonia D'Inzeo
Matricola 1135005

DOCENTE GUIDA: Dott.ssa Anna Coppa

COORDINATORE DOTTORATO:

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi

Anno Accademico 2007-2008

Indice

1. INTRODUZIONE.....	4
IL TGF-β.....	5
LA SUPERFAMIGLIA.	
I RECETTORI DEL TGF- β E LA LORO ATTIVAZIONE.	
LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE.	
MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELLA VIA DEL SEGNALE DEL TGF- β .	
"CROSSTALK" FRA LE VIE DI SEGNALE.	
LE FUNZIONI BIOLOGICHE DEL TGF-β.....	28
CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELL'APOPTOSI.	
CONTROLLO DELLA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE.	
CONTROLLO DEI PROCESSI DI SINTESI E DEGRADAZIONE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE (ECM).	
IL TGF-β E I TUMORI.....	34
GENI ONCOSOPPRESSORI NELLA VIA DEL SEGNALE MEDIATA DAL TGF- β .	
IL TGF- β E IL PROCESSO DI INVASIONE METASTATICA.	
IL TGF- β : ONCOSOPPRESSORE E "TUMOR PROMOTER".	
IL TGF-β E LA TIROIDE.....	44
CRESCITA E DIFFERENZIAZIONE DELLA TIROIDE.	
RUOLO DEL TGF- β NELLO SVILUPPO DEI TUMORI DELLA TIROIDE.	
CANCEROGENESI TIROIDEA.	
LE MUTAZIONI DI SMAD4 NEI TUMORI DELLA TIROIDE.	

2. PARTE SPERIMENTALE I.....	52
SCOPO DEL LAVORO.....	53
MATERIALI E METODI.....	56
RISULTATI.....	71
DISCUSSIONE.....	88
3. PARTE SPERIMENTALE II.....	94
SCOPO DEL LAVORO.....	95
MATERIALI E METODI.....	97
RISULTATI.....	107
DISCUSSIONE.....	126
4. BIBLIOGRAFIA	131
5. ACRONIMI	161

INTRODUZIONE

IL TGF- β

La superfamiglia.

La superfamiglia del TGF- β è costituita da un ampio gruppo di citochine pleiotropiche e strutturalmente correlate, che nei vertebrati conta approssimativamente 40 membri generalmente suddivisi in due branche: la TGF β /Activins/Nodals e la BMPs, ciascuna in grado di attivare una delle due cascate di segnale intracellulari (Izzi L. e 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. e Hill C.S., 2004). Alterazioni dell'espressione di alcuni membri della superfamiglia del TGF- β e/o della loro via di trasduzione del segnale, sono importanti fattori patogenetici implicati in anomalie dello sviluppo e in varie patologie umane inclusi il cancro, le fibrosi e le patologie autoimmuni (Kaminska B. et al., 2005).

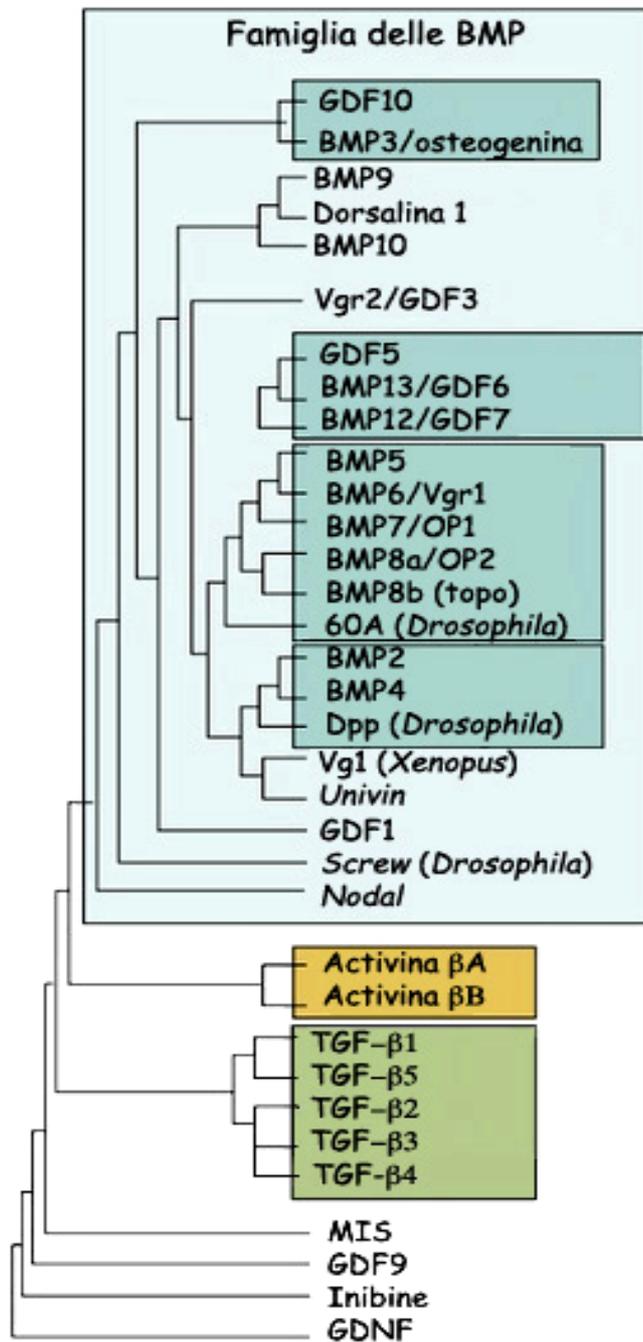


Figura 1. La superfamiglia del TGF- β . La superfamiglia del TGF- β rappresenta una grossa famiglia di citochine pleiotropiche tra loro strutturalmente correlate che nei vertebrati conta approssimativamente 40 membri distinti: essi, generalmente, vengono suddivisi in due branche, la TGF β /Activins/Nodals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

Il TGF- β , isolato per la prima volta dalle piastrine umane, è il prototipo strutturale di questa superfamiglia. Attualmente, sono note cinque diverse isoforme; solo tre, TGF- β 1, TGF- β 2, e TGF- β 3, sono state isolate nei mammiferi, 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%.

Il TGF- β 1 non solo è l'isoforma più abbondante e universalmente espressa, ma anche quella che più frequentemente risulta aumentata nei tumori umani ed è per tale motivo oggetto di molti studi volti a comprendere il suo ruolo nel processo di tumorigenesi (Derinck R. et al., 2001).

Il TGF- β 1 è prodotto e secreto nella matrice extracellulare come complesso proteico latente, in cui il dimero del fattore di crescita maturo è associato in modo non covalente al propeptide N-terminale LAP (*Latency Associated Peptide*). Lo stato latente è importante poiché consente di stabilizzare e mantenere nella forma inattiva il fattore di crescita fino a quando non sono presenti le giuste condizioni fisiologiche e non venga raggiunta la cellula bersaglio (Hyytiainen M.D. et al., 2004).

L'attivazione del TGF- β 1, necessaria per la sua attività biologica, ha luogo attraverso una serie di tagli proteolitici delle proteine associate 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.

La forma omodimerica del fattore di crescita è quella più comune ma sono state isolate anche le forme eterodimeriche TGF- β 2/3 e TGF- β 1/2: queste due forme potrebbero avere attività biologiche che differiscono da quelle degli omodimeri TGF- β 1 e TGF- β 2 (Ogawa Y. et al., 1992).

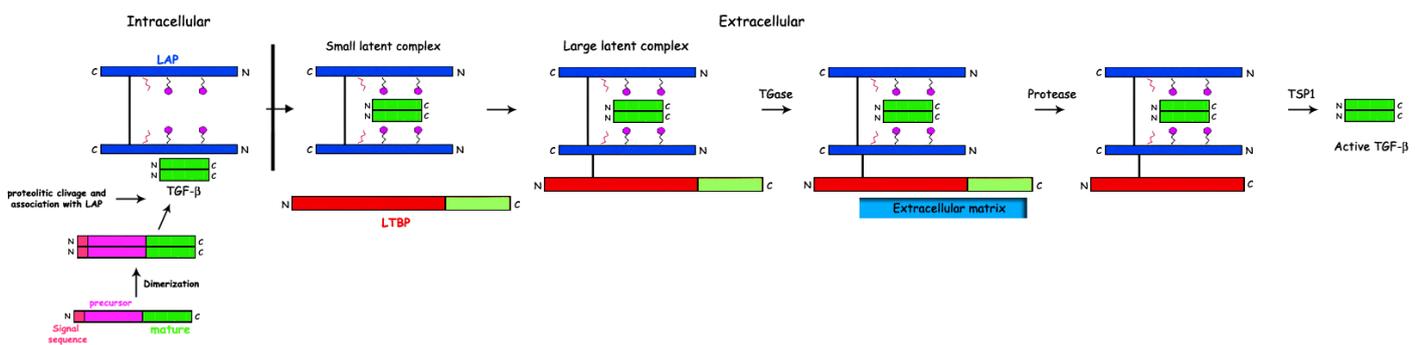


Figura 2. L'attivazione del TGF- β 1. Il TGF- β 1 è secreto nella matrice extracellulare come complesso proteico latente legato a proteine associate allo stato di latenza e ad una delle quattro isoforme di proteine leganti il TGF- β latente. L'attivazione del TGF- β 1, che è necessaria per la sua attività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

I recettori del TGF- β e la loro attivazione.

Il meccanismo di trasduzione del segnale del TGF- β dalla membrana cellulare al nucleo è stato, e continua ad essere, l'argomento di molti studi anche recenti. Le varie isoforme del TGF- β , in seguito all'attivazione, sono in grado di esercitare la loro azione biologica interagendo con specifici recettori presenti sulla superficie di molti

tipi cellulari. Attraverso esperimenti di "crosslinking" è stato possibile identificare cinque tipi di recettori di superficie altamente affini: il recettore di tipo I ($T\beta RI$), il recettore di tipo II ($T\beta RII$), il recettore di tipo III ($T\beta RIII$, anche noto come betaglicano), le endogline e il recettore di tipo V ($T\beta RV$).

I recettori di tipo I ($T\beta RI$) e II ($T\beta RII$) sono direttamente coinvolti nell'attivazione della via del segnale del $TGF-\beta$. 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 $T\beta RI$ e $T\beta RII$ sono glicoproteine di membrana strutturalmente simili 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 $T\beta RI$ è caratterizzato dalla presenza nel dominio citoplasmatico di una regione di 30 amminoacidi costituita da una sequenza *SGSGSG* chiamata "dominio *GS*" che precede quello chinasi ed è probabilmente coinvolta nel controllo dell'attività chinasi del recettore stesso o 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 pare coinvolta nella regolazione negativa della via di segnale per il $TGF-\beta$ (Wang T. et al., 1996). FKBP12 potrebbe avere un ruolo importante nell'inibire l'attività del recettore in assenza del $TGF-\beta$. Il recettore $T\beta RI$ è anche caratterizzato da una coda C-terminale più corta rispetto a quella del $T\beta RII$. Entrambi i recettori sono, comunque, accomunati dal dominio citoplasmatico ad attività

serina-treonina chinasi altamente conservate, necessarie alla trasduzione del segnale (figura 3 -> I recettori di tipo I e di tipo II del TGF- β).

TGF- β receptors I & II

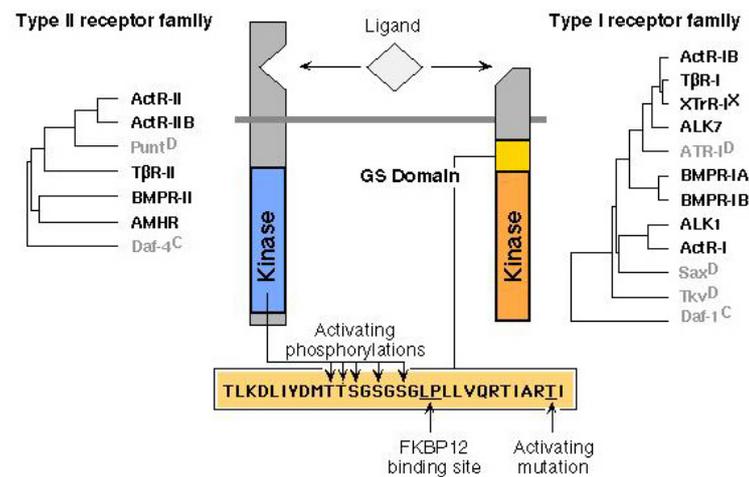


Figura 3. I recettori di tipo I (T β RI) e di tipo II (T β RII) del TGF- β . I recettori di tipo I (T β RI) e di tipo II (T β RII) sono glicoproteine di membrana di peso molecolare 55 kDa e 75 kDa rispettivamente, caratterizzate dalla presenza di un dominio extracellulare di circa 150 amminoacidi, altamente glicosilato, di un dominio transmembrana e di uno citoplasmatico, altamente conservato, ad attività serina/treonina chinasi, necessario alla trasduzione del segnale (adattata da Massagué J., 1998).

Il dominio serina-treonina chinasi nel T β RII è costitutivamente attivato e si rende responsabile dell'autofosforilazione/attivazione del T β RII stesso e della fosforilazione e attivazione del T β RI, nel contesto dei complessi recettoriali a stechiometria variabile la cui formazione è indotta dal ligando.

Il recettore di tipo III (T β RIII o betaglicano) è un proteoglicano transmembrana di 853 amminoacidi e circa 280 kDa, altamente espresso in molti tipi cellulari, che è in grado di legare ad alta affinità le tre isoforme β 1, β 2, β 3 del fattore di crescita (López-Casillas F. et al., 1994).

La struttura del T β R β III fa ipotizzare che esso non sia coinvolto direttamente nella trasduzione del segnale, ma nella presentazione del TGF- β ai recettori trasducenti di questa via, costituendo al contempo anche una sorta di "reservoir" a livello della superficie della membrana plasmatica. Risulta ancora non chiara la funzione del suo dominio citoplasmatico, che essendo ricco in serine e treonine potrebbe rappresentare un possibile sito di fosforilazione (Lòpez-Casillas F. et al., 1994). In realtà diversi studi hanno dimostrato che la fosforilazione del dominio citoplasmatico del T β R β III, da parte del recettore di tipo II, è un evento che ne favorisce il rilascio dal complesso recettoriale attivato (Blobe G.C. et al., 2001).

Secondo studi recenti, il T β R β III è coinvolto nella specificità del segnale del TGF- β : cellule non esprimenti questo recettore, infatti, non rispondono al TGF- β 2 che lega solo a bassissima affinità il T β R β II a cui, invece, le isoforme β 1 e β 3 possono legarsi efficientemente. Sembra, inoltre, che il T β R β 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. e Blobel G.C., 2005). Tutti questi dati sul T β R β III suggeriscono un suo ruolo emergente nella mediazione/regolazione del segnale del TGF- β .

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 una elevata identità di sequenza; esse possono legare direttamente le isoforme TGF- β 1 e TGF- β 3 ma non il TGF- β 2 (Cheifetz S. et al., 1992). 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, la funzione di questa molecola nella via del segnale del TGF- β non è stata ancora chiarita ma si ipotizza che essa abbia un ruolo nel reclutamento di altre proteine importanti nella trasduzione del segnale.

Il recettore di tipo V (T β RV) (circa 400 kDa), anche noto come IGFBP-3R o LRP-1, è un recettore per il TGF- β e per IGFBP-3 ed è coespresso con i recettori T β RI, T β RII e T β RIII in molti tipi cellulari. Diversi studi hanno evidenziato l'importanza del T β RV nella risposta all'inibizione della crescita mediata dal TGF- β in cellule epiteliali; è stata osservata, infatti, una perdita o ridotta espressione di questo recettore nelle cellule di carcinoma insensibili all'azione del fattore di crescita (Leal S.M. et al., 1999; Liu Q. et al., 1997). Evidenze genetiche e sperimentali indicano che T β RV media l'inibizione della crescita da parte del TGF- β in cooperazione con il T β RI e il T β RII (Huang S.S. et al., 2003). Il recettore T β RV sembra, inoltre, coinvolto nella regolazione negativa del processo di *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT) e la sua perdita di espressione favorisce il fenotipo metastatico e invasivo delle cellule tumorali (Tseng W.F. et al., 2004).

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., 1995). 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. I complessi recettoriali omodimerici non sono sufficienti alla

propagazione del segnale mediato dal TGF- β ma sembrerebbero funzionalmente importanti nella regolazione dell'attività chinasi recettoriale (Luo K. e Lodish H.F., 1997).

Quando il recettore di tipo II riconosce il ligando viene a formarsi un complesso recettoriale eterotetramericato attivato composto dall'unione degli omodimeri dei due recettori e dal TGF- β . Numerose ricerche hanno sottolineato che la presenza del recettore di tipo II è fondamentale nel mediare gli effetti del TGF- β (Zhao Y. e Young S.L., 1996), mentre esperimenti eseguiti transfettando le cellule con recettori di tipo I e II, che presentavano alterazioni del dominio chinasi, hanno dimostrato che entrambi i recettori sono fondamentali alla trasduzione del segnale (Brand T. e Schneider M.D., 1995).

La trasduzione del segnale nel compartimento citoplasmatico è favorita da un insieme di fosforilazioni catalizzate dall'attività chinasi del dominio citoplasmatico dei recettori stessi. La chinasi del T β R β II è costitutivamente attivata e, nel contesto del complesso recettoriale eterotetramericato, 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 (Wrana L.J. et al., 1994). 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 nella citoplasma cellulare (figura 4 → Meccanismo di attivazione del complesso recettoriale T β R β I/T β R β II).

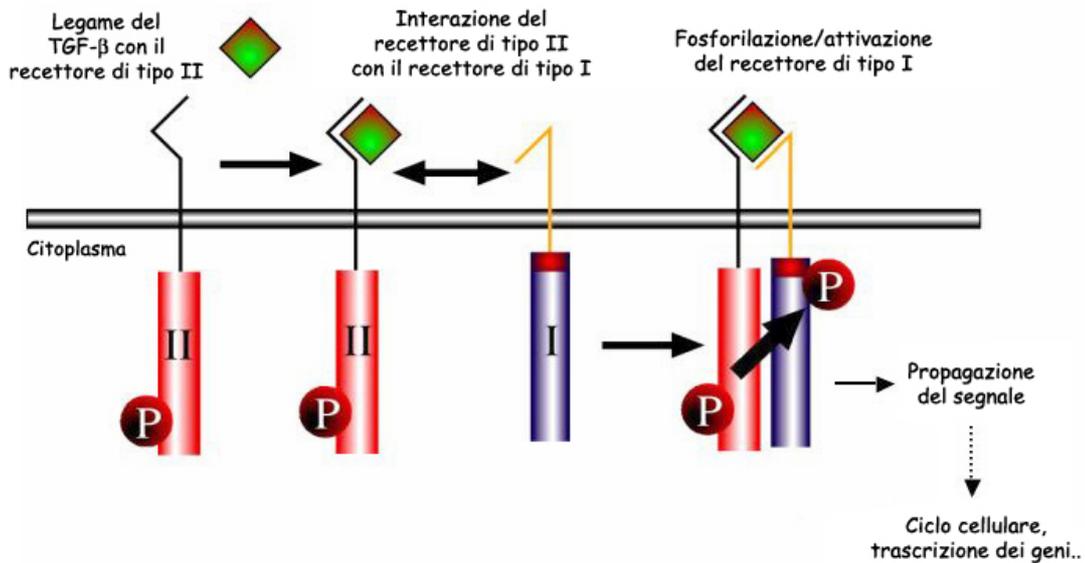


Figura 4. Meccanismo di attivazione del complesso recettoriale T β RI/T β RII. La chinasi del T β RII è costitutivamente attivata e, nel contesto del complesso recettoriale eterotetramericco, è in grado di attivare il recettore di tipo I fosforilandolo a livello di particolari residui di serine e treonine localizzati nel dominio GS, una regione altamente conservata di residui di glicine e serine posta subito prima del dominio chinamico. 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 (adattata da Wrana J.L. et al., 1994).

La trasduzione del segnale.

Il T β RI inizia la propagazione intracellulare del segnale attraverso la fosforilazione dei componenti di una famiglia di fattori trascrizionali: le proteine Smad. Le Smad sono proteine evolutivamente conservate, infatti, i primi geni di questi mediatori citoplasmatici sono stati identificati in *Drosophila*, dove vengono chiamati MAD (*Mothers Against Dpp*), e successivamente in *Caenorhabditis elegans* dove prendono il nome di SMA (Sekelsky J.J. et al., 1995). Nei mammiferi sono stati individuati otto membri appartenenti alla famiglia delle Smad, i cui geni sono stati mappati su quattro cromosomi diversi (Attisano L. e Lee-Hoeflich S.T., 2001).

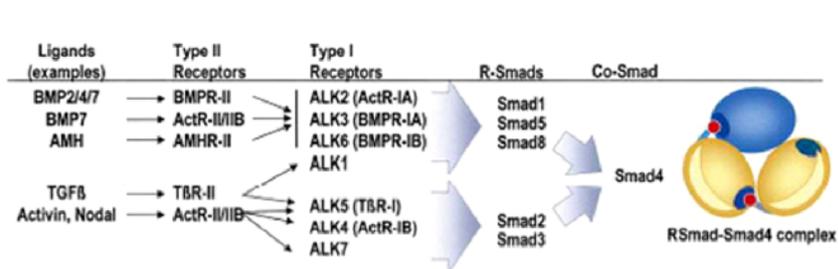
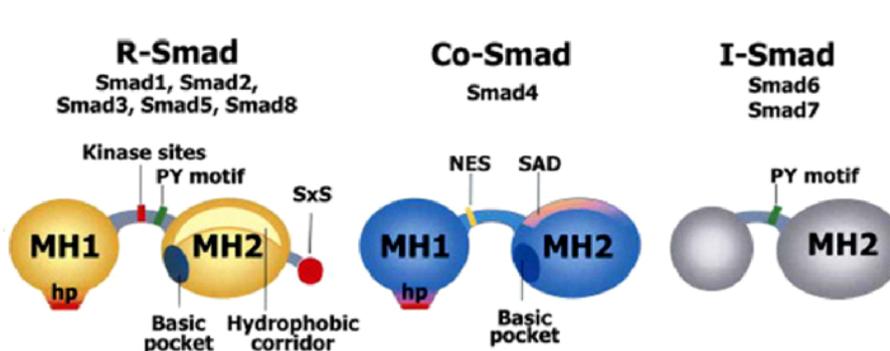
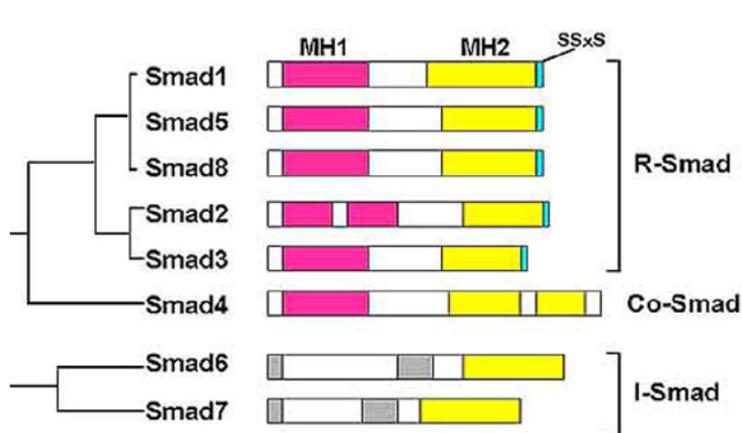
Sulla base della struttura e della funzione, le Smad possono essere divise in 3 classi funzionali, ciascuna delle quali gioca un ruolo specifico nella via di trasduzione del

segnale: (a) le Smad attivate dal recettore o R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8); (b) la Smad comune mediatrice o Co-Smad (Smad4); (c) le Smad inibitorie o I-Smad (Smad6 e Smad7) (figura 5 -> Le proteine Smad).

Le proteine Smad hanno tutte struttura simile, caratterizzata dal dominio N-terminale MH1 (*Mad Homology 1*) e dal dominio C-terminale MH2 (*Mad Homology 2*) altamente conservati, separati da una regione "linker o cerniera" che mostra elevata variabilità sia in lunghezza che nella sequenza. Le I-Smad differiscono da questa struttura generale poiché mancano del dominio MH1.

Il dominio MH1 delle R-Smad e Smad4, costituito da 130 amminoacidi, è coinvolto nel legame al DNA ed inibisce l'attività trascrizionale del dominio MH2 (Massagué J., 1998). Al suo interno è presente una regione per la localizzazione nucleare (*Nuclear Localization Sequence*, NLS) che svolge un ruolo cruciale nella traslocazione delle Smad nel nucleo (Xiao Z. et al., 2000). Mutazioni o inserzioni in questa regione di Smad2 e di Smad3, alterano l'accumulo nucleare, TGF β -indotto, di queste proteine (Lutz M. e Knaus P., 2002). Il dominio MH2 è costituito da 200 amminoacidi e svolge molteplici funzioni: partecipa alla formazione degli etero-oligomeri con le altre Smad, media l'interazione con i fattori di trascrizione nel nucleo ed è la regione in cui si verificano le fosforilazioni catalizzate dal dominio chinasi del T β RI (Massagué J., 1998). I residui di serina che vengono fosforilati fanno parte di una sequenza specifica altamente conservata -SS(M/V)S- di questo dominio (Attisano L. e Lee-Hoeflich S.T., 2001). La regione di congiunzione tra i due domini, che inizialmente si riteneva avesse solo un ruolo strutturale, sembra al contrario dotata di siti di regolazione. La fosforilazione di questi siti in seguito ad attivazione di MAP-chinasi,

infatti, inibisce la traslocazione delle Smad nel nucleo (Massagué J., 1998; Padgett R.W. et al., 1998; Attisano L. e Lee-Hoeflich S.T., 2001). In questa regione sono state individuate nella proteina Smad4 una sequenza Segnale di Esporto Nucleare (*Nuclear Export Signal*, NES) importante per la sua localizzazione subcellulare, (Watanabe M. et al., 2000) e il Dominio Smad Attivante (*Smad Activation Domain*, SAD) coinvolto nella regolazione dell'attività trascrizionale (de Caestecker M.P. et al., 2000). Nelle R-Smad e I-Smad, sempre nella regione *linker*, sono presenti dei siti PY ricchi in residui di proline e tirosine che potrebbero avere un ruolo nell'interazione con le proteine ubiquitine ligasi Smurf1 e 2 (Attisano L. e Lee-Hoeflich S.T., 2001) (figura 5 -> Le proteine Smad).



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

Figura 5. Le proteine Smad. (pannello A) Nei mammiferi sono stati individuati otto membri appartenenti alla famiglia delle Smad i cui geni sono stati mappati su quattro cromosomi diversi. 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 Nishimura R. et al., 2003).

Il pannello B mostra la struttura delle proteine Smad e i loro domini funzionali. Il pannello C riporta i recettori specifici di tipo I per le varie R-Smad e la stechiometria del complesso trascrizionale R-Smad/Co-Smad (adattata da Massagué J. et al., 2005).

Le R-Smad interagiscono specificamente con i complessi recettoriali attivati e sono i diretti substrati della fosforilazione da parte dei recettori di tipo I. Le specifiche R-Smad coinvolte in questo evento dipendono dal ligando che attiva il recettore: è ormai ampiamente dimostrato che le citochine TGF- β /Activin/Nodal determinano la fosforilazione di Smad2 e 3, mentre le BMP/GDF/MIS attivano Smad1, 5, e 8 (Massagué J., 1990).

In condizioni basali, le R-Smad presentano i domini MH1 e MH2 associati tra loro e sono ancorate, sotto forma di dimeri, alla proteina di membrana *Smad-Anchor for Receptor Activation* o SARA. Questa proteina è dotata di un dominio funzionale FYVE, che media la sua interazione con i fosfolipidi di membrana, e un dominio adiacente di legame alle Smad, *Smad Binding Domain* o SBD. La comparazione delle strutture tridimensionali del dominio chinasi del T β RI e del dominio SBD, ha dimostrato che la proteina SARA è necessaria 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. La proteina SARA favorisce la localizzazione citoplasmatica delle R-Smad poiché maschera la regione NLS (Xu L. et al., 2000), e ne facilita la fosforilazione da parte del T β RI; quest'ultimo evento consente la dissociazione della R-Smad da SARA e la sua interazione con l'unico partner comune Smad4 a costituire un complesso trascrizionale eteromero attivato (Heldin C.H. et al., 1997). La formazione del complesso trascrizionale R-Smad/co-Smad è favorita dalla presenza delle proteine TRAP-1 (Wurthner J.U. et al., 2001) e TLP (*TRAP-1-like protein*) (Felici A. et al., 2003) che reclutano Smad4 nelle vicinanze del complesso recettoriale. L'esatta stechiometria del complesso eteromero delle

Smad è ancora oggetto di controversie; si ipotizza, infatti, che i complessi trascrizionali possano essere esamerici, trimerici o dimerici (Lutz M. e Knaus P., 2002).

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 50% dei carcinomi pancreatici (Hahn S.A. et al., 1996; Schutte M. et al., 1996). La proteina Smad4, priva del motivo C-terminale -SS(M/V)S- caratteristico delle R-Smad, non viene fosforilata a seguito dell'attivazione recettoriale. Essa rappresenta un nodo di convergenza nella via del segnale della superfamiglia del TGF- β , infatti, si complessa 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 regola l'espressione di specifici geni direttamente o mediante l'interazione con coattivatori o corepressori trascrizionali (figura 6 → La trasduzione del segnale del TGF- β).

La trascrizione viene regolata dal complesso mediante il riconoscimento di una sequenza di quattro basi (5'-GTCT-3') chiamata Smad box presente nel promotore dei geni bersaglio del TGF- β : due sequenze di questo tipo sono organizzate in maniera palindromica nell'elemento di legame delle Smad (*Smad Binding Element, SBE*) di 8 paia di basi (Zawel L. et al., 1998).

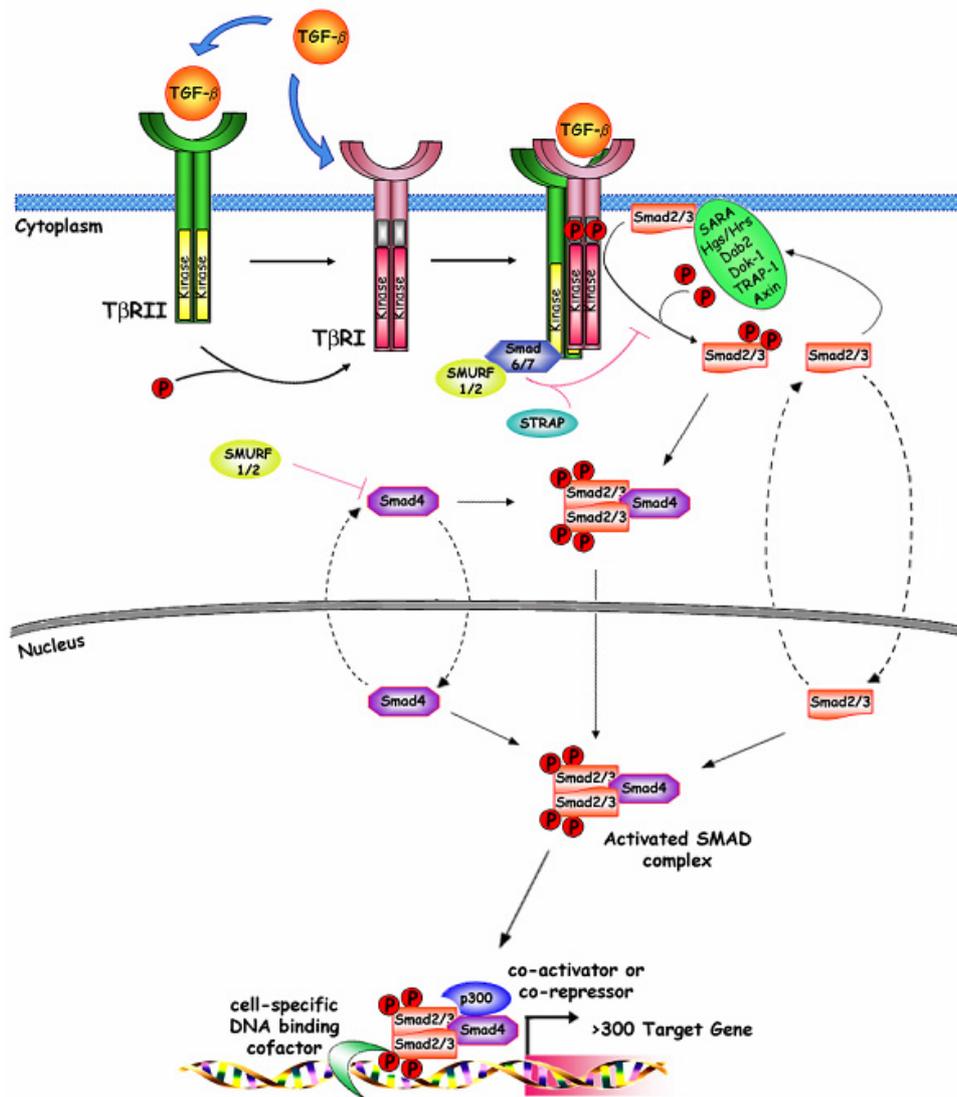


Figura 6. La trasduzione del segnale del TGF- β . La più importante via di trasduzione del segnale del TGF- β è quella che coinvolge le proteine Smad. Dopo il legame del TGF- β al T β R_{II} e la costituzione dei complessi recettoriali eterotetramerici T β R_{II}/T β R_I, il T β R_{II}, costitutivamente fosforilato e attivato, transfosforila il T β R_I attivandolo. Il T β R_I attivato fosforila Smad2 o Smad3 (R-Smad) formando con Smad4 un complesso trascrizionalmente attivo che, una volta translocato nel nucleo, va a regolare la trascrizione dei geni bersaglio del TGF- β .

L'interazione di fattori trascrizionali aggiuntivi con il complesso R-Smad/Smad4 è un evento importante poiché garantisce la specificità trascrizionale, infatti: (1) solo un sottogruppo dei geni target del TGF- β può essere regolata da una particolare combinazione "RSmad-Smad4-partner trascrizionale"; (2) la risposta cellulare all'azione del TGF- β può dipendere dall'espressione di fattori trascrizionali "cellula

specifici"; (3) alcuni fattori trascrizionali possono legare solo Smad2/3 mentre altri possono interagire solo con Smad1/5/8, garantendo così la regolazione specifica dei geni sotto il controllo del TGF- β o delle BMP.

Il primo fattore trascrizionale identificato è stato FoxH1 (inizialmente noto come FAST1) (Chen X. et al., 1996); questa proteina interagisce con il dominio MH2 di Smad2 e 3 mediante un motivo ricco in residui di prolina, noto come *Smad Interacting Motif* o SIM (Germain S. et al., 2000). Ulteriori studi hanno portato alla scoperta di un numero sempre crescente di fattori trascrizionali interagenti con le Smad (Massagué J. et al., 2005). Tra questi, FoxO1, FoxO3 e FoxO4 intervengono nell'attivazione degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti p21Cip1 o CDKN1A (Seoane J. et al., 2004) e AP1 interagisce con le Smad nella regolazione di *c-jun* (Zhang Y. et al., 1998), delle collagenasi I/MMP1 (Wong C. et al., 1999) e dell'interleuchina 11 (Kang Y. et al., 2005). Le Smad, inoltre, mediante il loro dominio MH2, sono in grado di interagire nel nucleo con proteine coattivatrici e corepressorie della trascrizione. Tra le proteine coattivatrici, p300 e CBP possono promuovere l'interazione delle Smad con il macchinario trascrizionale basale o direttamente o attraverso la loro intrinseca attività acetilasi che agisce sulla struttura cromatinica. Diversi studi hanno dimostrato che le proteine MSG1 e SMIF promuovono l'interazione di p300/CBP con il dominio attivante SAD di Smad4 (Yahata T. et al., 2000; Bai R.Y. et al., 2002). Tra i corepressori sono noti TGIF (*TG3-interacting factor*) e le oncoproteine Ski (*Sloan-Kettering Institute*) e SnoN (*Ski-related novel gene N*) contenenti un omeodominio che può legare l'istone deacetilasi (HDAC) (Wotton D. et al., 1999). Le proteine Ski e SnoN, inoltre, competono con CBP/p300 per il legame di

Smad3 (Luo K. et al., 1999) e interagiscono direttamente con il dominio MH2 di Smad4 impedendo la formazione del complesso R-Smad/co-Smad (Wu J.W. et al., 2002).

Molti studi sono stati effettuati al fine di far luce sui meccanismi di traslocazione e di accumulo nucleare delle Smad in risposta al TGF- β . Il continuo "shuttling" nucleo-citoplasmatico delle Smad è un evento chiave nella trasduzione del segnale e consente il controllo costante dello stato di attivazione dei recettori e di conseguenza una efficiente terminazione del segnale quando i recettori vengono inattivati. L'attività dei recettori è richiesta per l'accumulo delle Smad nel nucleo e, di conseguenza, per la regolazione trascrizionale dei geni target del TGF- β (Inman G.Y. et al., 2002).

E' stato dimostrato che Smad2 e Smad3 traslocano nel nucleo anche indipendentemente dal legame con Smad4. Il ruolo principale di queste proteine, infatti, è la trasmissione del segnale del TGF- β dal citoplasma al nucleo, mentre la proteina Smad4 è principalmente coinvolta nella regolazione della trascrizione. Anche la proteina Smad4 è capace di traslocazione nucleo-citoplasmatica indipendente dalle R-Smad: questa caratteristica è dovuta alla presenza nella stessa proteina di una sequenza NLS, specifica per l'importo nel nucleo, e della sequenza NES, che favorisce l'esporto verso il citoplasma (Pierreux C.E. et al., 2000).

La fine regolazione ed il significato funzionale dello "shuttling" delle Smad è ancora oggetto di ricerca. Alcuni autori hanno dimostrato che lo "shuttling" nucleo-citoplasmatico delle R-Smad, non è mediato da recettori di trasporto ma avviene per interazione diretta con le regioni ripetute FG (Phe-Gly) delle nucleoporine CAN/Nup214 e Nup153, entrambe componenti dei pori nucleari (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 ai siti di interazione con il dominio SBD della proteina SARA e il motivo SIM 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.

La traslocazione di Smad4 nel nucleo è, invece, favorita dal legame con l'importina- β , che interagisce con l'importina- α , capace di riconoscere e legare la regione bipartita *Nuclear Localization Signal* o NLS (Pierreux C.E. et al., 2000; Xiao Z. et al., 2003), mentre il suo trasporto fuori dal nucleo è assicurato dall'interazione con la proteina CRM1, che lega il *Nuclear Export Signal* o NES, presente solo nella regione *linker* della co-Smad (Watanabe M. et al., 2000; Inman G.J. et al., 2002). Il ruolo fondamentale della sequenza NES nel processo di esporto nucleare è stato recentemente confermato dalla scoperta di una forma alternativa di splicing di Smad4 nei mammiferi (Pierreux C.E. et al., 2000) e di Smad4 β (Watanabe M. et al., 2000), anche chiamata Smad10, in *Xenopus*: entrambe queste proteine sono prive della sequenza NES e mostrano una localizzazione esclusivamente nucleare.

Meccanismi di regolazione della via del segnale del TGF- β .

La via del TGF- β è sotto il controllo di molti meccanismi di regolazione: le proteine *Inhibitory Smads* o I-Smads, 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, conservano il dominio MH2 e la loro regione N-terminale mostra solo minime somiglianze con il

dominio MH1 delle R-Smad e di Smad4. Le I-Smad regolano negativamente la via del segnale del TGF- β utilizzando diversi meccanismi: esse agiscono inattivando il complesso recettoriale attraverso il reclutamento delle ubiquitin ligasi Smurf1/2 o la protein fosfatasi I (Ebisawa T. et al., 2001; Kavsak P. et al., 2000; Shi W. et al., 2004); interferiscono con la formazione del complesso trascrizionale R-Smad/Co-Smad (Hata A. et al., 1998; Imamura T. et al., 1997); inibiscono il reclutamento dei coattivatori trascrizionali nel nucleo da parte delle R-Smad (Bai S. et al., 2000) o impediscono la formazione del complesso Smad-DNA (Zhang S. et al., 2007).

Studi recenti, hanno dimostrato che la via dell'ubiquitina/proteosoma gioca un ruolo critico nella regolazione della trasduzione del segnale della superfamiglia del TGF- β . Le R-Smad, infatti, sono degradate dalla via ubiquitina/proteosoma in modo ligando-dipendente, provocando in questo modo la terminazione del segnale (Lo R.S. e Massaguè J., 1999). L'azione di alcune E3-ubiquitine ligasi Smurf1 o 2 (*Smad Ubiquitination Regulatory Factor 1 o 2*), è indispensabile per la regolazione dello stato di attivazione della via del segnale 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. e Hill C.S., 2004).

La regolazione della via del segnale del TGF- β viene ottenuta, inoltre, mediante il controllo delle fosforilazioni attivanti delle R-Smad: recentemente, infatti, sono state descritte diverse fosfatasi in grado di rimuovere i gruppi fosfato dalle R-Smad consentendone l'inattivazione e l'esporto dal nucleo. Studi biochimici e funzionali

hanno dimostrato che la fosfatasi Mg^{2+} -dipendente PPM1A regola negativamente le vie del segnale del TGF- β e delle BMP mediante la defosforilazione del motivo C-terminale -SS(M/V)S di Smad2/3 e di Smad1, Smad5 e Smad8 (Ross S. e Hill C.S., 2008; Xu L., 2006).

Uno dei meccanismi coinvolti nella modulazione della trasduzione del segnale del TGF- β è la sumoilazione: essa rappresenta una modificazione post-traduzionale, analoga alla ubiquitinazione, in grado di regolare l'attività delle Smad. L'evento di sumoilazione è determinato dal legame covalente del polipeptide SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) ai residui di lisina della proteina bersaglio.

Diversi studi hanno dimostrato che gli enzimi E3 PIASy e Ubc9 sono responsabili della sumoilazione di Smad4 e ricerche condotte mediante analisi mutazionale hanno consentito la scoperta di siti di sumoilazione nel dominio MH1 (K113) e nella regione *linker* (K159) di Smad4 (Lin X. et al., 2003; Ohshima T. et al., 2003). E' stato osservato che la mutazione dei residui Lys159 and Lys113 in residui di arginina aumenta la stabilità della proteina e favorisce significativamente l'attivazione trascrizionale di Smad4, suggerendo che la sumoilazione possa svolgere un ruolo importante nel controllo della funzionalità della proteina stessa (Lee P.S. et al., 2003; Long J. et al., 2004). Alcuni autori hanno dimostrato che la proteina Smad4 in seguito alla sumoilazione viene reclutata dall'enzima E3 ligasi PIASy in particolari regioni del nucleo ma resta ancora da chiarire il meccanismo mediante il quale la localizzazione sub-nucleare di Smad4 sumoilata influisca sulla sua attività trascrizionale (Lin X. et al., 2003). Una possibile ipotesi è che la sumoilazione sia un evento che consente l'interazione di Smad4 con fattori trascrizionali che influiscono sulla sua efficienza

nel regolare la trascrizione dei geni target del TGF- β . In un recente lavoro è stato osservato che il TGF- β è in grado di favorire la sumoilazione di Smad4 attraverso p38 MAPK suggerendo così un possibile punto di *crosstalk* tra le due vie di segnale (Ohshima T. et al., 2003).

Crosstalk fra le vie di segnale.

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 le Erk (*Extracellular signal-regulated kinase*), le JNK e la cascata delle p38/MAPK, possono essere coinvolte nella trasduzione del segnale del TGF- β in maniera cellulo-specifica. 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 (Calonge M.J. e Massague J., 1999).

E' stato osservato che le proteine Smad vengono fosforilate dalle MAPK Erk1, Erk2 e dalle MAPK stress-attivate p38 e JNK a livello dei residui di serina e treonina presenti nella regione *linker* e nel dominio MH1 (Javelaud D. e Mauviel A., 2005). Siti consenso di fosforilazione (motivo PXSP) da parte delle Erk sono stati scoperti per la prima volta nella regione *linker* di Smad1 (S187, S195, S206, S214): in colture tissutali e nell'embrione di *Xenopus*, dove è stato osservato che Smad1 viene fosforilato dalle Erk attivate dai fattori di crescita EGF (*Epidermal Growth Factor*) e FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Kretzschmar M. et al., 1997). La fosforilazione ha

l'effetto di inibire l'attività trascrizionale di Smad1 impedendone la traslocazione nel nucleo e favorendo la sua interazione con l'ubiquitina ligasi Smurf1 (Sapkota G. et al., 2007). E' stata dimostrata la presenza di residui di serina e di treonina fosforilabili dalle MAPK, in seguito a stimolazione con EGF e HGF, anche nella regione *linker* di Smad2 (T8, T220, S245, S250 e S255) e di Smad3 (T179, S204, S208, S213) (de Caestecker M.P. et al., 1998; Funaba M. et al., 2002).

Tuttavia, gli effetti di tali fosforilazioni sulla funzionalità delle Smad e della via del segnale del TGF- β restano ancora piuttosto controversi e di difficile interpretazione, infatti, esistono anche numerose evidenze che la fosforilazione di Smad2 e di Smad3 da parte di MEKK1 determina un aumento della loro attività trascrizionale, favorendo la loro stabilità nel nucleo e l'interazione con Smad4 o con coattivatori come p300/CBP (Ross S. e Hill C.S., 2008), piuttosto che il blocco della traslocazione nel nucleo o la sua interazione con l'ubiquitina ligasi Smurf1.

I diversi effetti del TGF- β e dei fattori mitogenici FGF e EGF sull'attività trascrizionale delle Smad dimostrano come questa possa essere finemente regolata dall'equilibrio tra i segnali trasmessi dai recettori ad attività serina/treonina chinasi o dai recettori ad attività tirosina chinasi.

Anche in Smad4 è stato descritto un sito di fosforilazione da parte delle Erk localizzato a livello del residuo treonina 276 nel dominio attivante SAD (aa 275-322). La fosforilazione di tale sito, indotta da EGF e mediata da ERK, è responsabile dell'accumulo di Smad4 nel nucleo solo in presenza di TGF- β , mentre la mutazione di questo residuo diminuisce l'efficienza di traslocazione nel nucleo in risposta al TGF- β . Questo lascia supporre che il residuo di treonina 276 di Smad4 sia un importante

punto di "crosstalk" e di sinergia tra la via del segnale del TGF- β e quella del fattore di crescita EGF (Roelen A.J.B. et al., 2003).

In conclusione, la scoperta di un numero sempre crescente di chinasi cellulari in grado di modulare l'attività delle Smad mediante la fosforilazione di specifici residui aminoacidici, dimostra che tali eventi potrebbero essere critici nel mantenimento dell'equilibrio fra differenti vie di segnale.

LE FUNZIONI BIOLOGICHE DEL TGF- β

Le attività biologiche del TGF- β sono molteplici; esso controlla numerose risposte cellulari come la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi, l'espressione delle proteine della matrice extracellulare (ECM), l'adesione cellulare e la migrazione (figura 7 → Il TGF- β 1 è un fattore pleiotropico e multipotente capace di regolare numerose risposte cellulari).

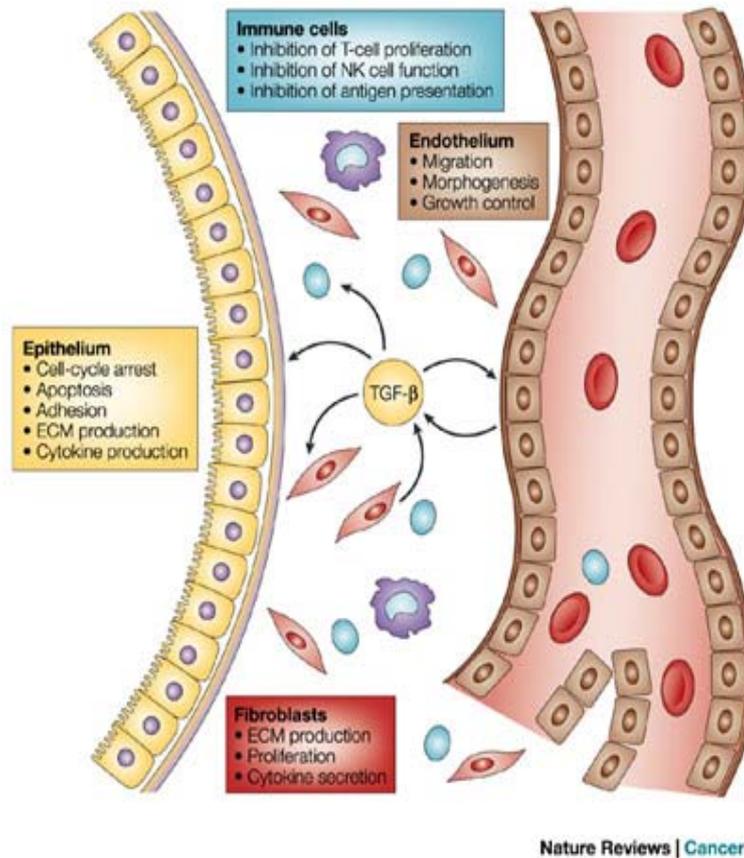


Figura 7. Il TGF- β 1 è un fattore pleiotropico e multipotente capace di regolare numerose risposte cellulari.

Controllo della proliferazione e dell'apoptosi.

La proliferazione cellulare 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. e 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, inoltre, 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 la sua azione di inibitore della proliferazione dei linfociti T e delle 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. e 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, promuovendolo o inibendolo, 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. e Krieglstein K., 2002; Hyman K.M. et al., 2002). Esso agisce attraverso vari meccanismi, come l'attivazione delle caspasi (Inman G.J. e 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). L'apoptosi TGF β -indotta è frequentemente mediata dalla via di segnale Smad-dipendente (Atfi A. et al., 1997; Yamamura Y. et al., 2000).

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 cellulare (Massagué J., 1990).

Il TGF- β ha un ruolo importante nella rigenerazione nervosa, infatti, nel corso dello sviluppo del topo e nell'adulto, controlla la differenziazione delle cellule di Schwann in risposta a danni al tessuto nervoso (Moses H.L. e Serrat R., 1996).

Il TGF- β , insieme alle BMP, è anche coinvolto nella differenziazione degli osteoblasti e, in particolare, le sue isoforme TGF- β 1 e TGF- β 3 insieme con il BMP4, agiscono in sinergia per promuovere la condrogenesi nelle cellule mesenchimali degli abbozzi degli arti. 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 controllando l'adesività cellulare (Moses H.L. e 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.

Esso 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 (Dennler 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 quello dell'invasività e della metastatizzazione. 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. e Moses H.L., 1995) (figura 8 → Le alterazioni della via del segnale del TGF- β nei tumori umani).

L'intera via di segnale del TGF- β viene considerata come un complesso di prodotti genici ad azione oncosoppressoria (Markowitz S.D. e Roberts A.B., 1996; Lazzereschi D. et al., 1997) le cui mutazioni, delezioni o alterazioni di espressione contribuiscono all'insorgenza del cancro. 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.

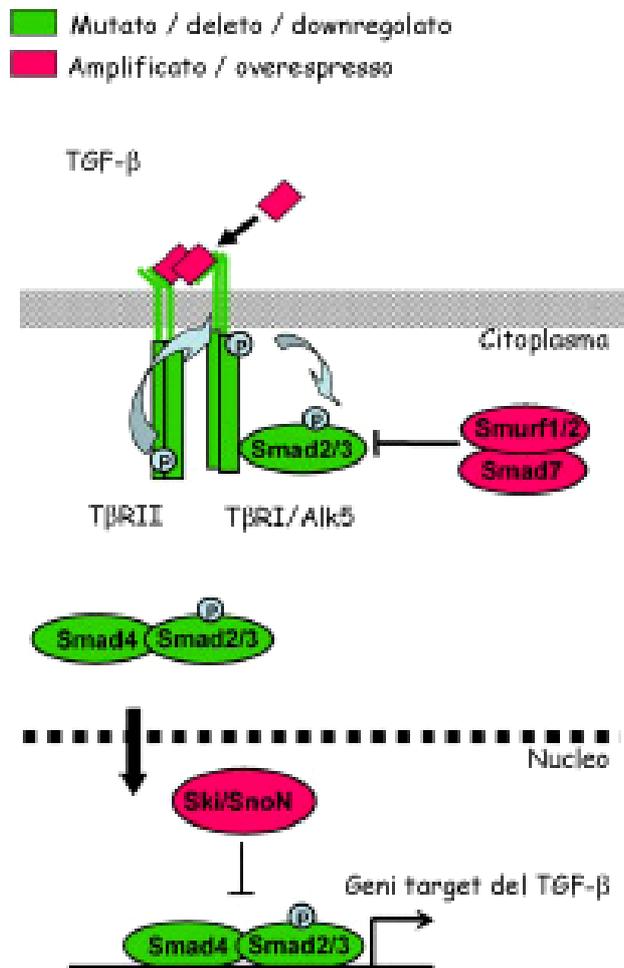


Figura 8. Le alterazioni della via del segnale del TGF-β nei tumori umani. Il TGF-β e i mediatori della sua via del segnale, svolgono un complesso ruolo di regolatori fisiologici di molte funzioni cellulari e in particolare della proliferazione. La perdita della capacità di rispondere ai segnali TGFβ-mediati, pertanto, può spingere le cellule di molti organi verso la trasformazione maligna (adattata da Levy L. e Hill C.S., 2005).

Mutazioni inattivanti del recettore TβRII sono state isolate in molti carcinomi dello stomaco e del colon che presentavano anche instabilità microsatellitare del recettore.

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 deletato o mutato nel 50% dei 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) (Tabella 1). 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; Miyaki M. e Kuroki T., 2003).

Table 2 Missense mutations of *MADH4/DPC4/SMAD4* reported for all tumor types

Tumor type	Codon	Nucleotide change	Validated ^a	Ref. no.	
Pancreatic cancer	43	TTG to TCG	+	50	
	100	AGG to ACG	+	1	
	355	GAC to GGC		40 ^b	
	365	NA ^c	+	51	
	406	GCG to ACG	+	50	
	493	GAT to CAT	+	1 and 38	
	523	C to G		38	
Biliary cancer	433	GCA to AGA	+	17 ^b	
	497	CGC to CAC	+	17	
	502	AGG to GGG	+	17	
	523	TGC to TGG	+	17	
Pancreatic neuroendocrine tumors	369	AAT to GAT		18	
	457	GCA to TCA		18	
Hepatocellular carcinoma	332	GAT to GGT	+	52	
Small intestinal carcinoma	401	TGC to CGC	+	52	
	132	CAC to CTC	+	37	
	350	GTT to GAT	+	37	
	351	GAT to AAT	+	37	
	361	CGC to TGC	+	37	
	Colorectal cancer	64	GGA to GTA		19
95		TAT to AAT	+	20	
115		TGT to CGT		42	
118		GCG to GAG		21	
129		AAT to AAG	+	20	
130			+	41	
302		TGG to CGG		22	
330		GAA to GCA	+	21, 22, and 39	
340		AAG to GAG		21	
350		GTT to GAT		21	
351		GAT to CAT		19 and 23	
355		GAC to GAA	+	20 and 39	
361		CGC to AGC		22, 41, and 42	
		CGC to CAC			
363		TGT to AGT		42	
370		GTT to GAT		41	
408		TTT to TCT		22	
433		GCA to GTA		22	
497		CGC to CAC		42	
507		AAA to CAA		42	
515		AGA to GGA		42	
537		GAT to TAT	+	23	
540		CTA to CGA	+	23	
Juvenile polyposis syndrome		180	NA ^c	+	24
		361	CGC to TGC	+	25–27
		386	NA ^c		28
		390	GAA to AAA		27
	445	NA ^c	+	26	
	448	NA ^c		28	
	Ovarian cancer	317	CAT to CGT		29
351		GAT to CAT	+	16 and 29	
379		GCA to ACA		29	
386		GGT to TGT		29	
504		AGT to AGA		29	
Cervical cancer	230	NA ^c		53	
	488	NA ^c		53	
Lung cancer	420	CGT to CAT		30	
Acute myelogenous leukemia	441	CGT to CCT		30	
	102	CCT to CTT	+	54	

^a Only those missense mutations that were confirmed by repeat sequencing of an independently derived PCR product, as indicated in “Materials and Methods” and/or “Results” of each study, are considered to be validated mutations.

^b Only exons 8–11 were analyzed in these studies.

^c Mutation sequence not provided in the report.

Tabella 1. Mutazioni di Smad4 in diversi tumori umani (adattata da Iacobuzio-Donahue C.A. et al., 2004).

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). Le mutazioni dei geni per Smad2 e Smad4, riscontrate con maggior frequenza, sono mutazioni missenso, nonsense e "frameshift", che colpiscono prevalentemente il dominio MH2 determinando la formazione di un prodotto proteico incapace di formare complessi attivi in risposta al TGF- β .

Particolarmente interessante è la mutazione Arg100Thr, localizzata nel dominio MH1 di Smad4 isolata da un carcinoma del pancreas (Schutte M. et al., 1996), che ha un comportamento di dominante negativo 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 , è 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 (Levy L. e Hill C.S., 2006).

Il TGF- β e il processo di invasione metastatica.

I tumori solidi producono i loro effetti letali invadendo i tessuti circostanti e metastatizzando in siti distanti da quello del tumore primario. 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), incrementando l'espressione delle

integrine associate all'invasione, come l'integrina $\alpha3\beta1$ (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 stimola direttamente sia la motilità delle cellule epiteliali (Dumont N. e Arteaga C.L., 2003) che l'attività proteolitica, aumentando l'espressione degli enzimi che degradano la matrice (Desruiiseau S. et al., 1996). Le cellule cancerose stesse, producono alti livelli di TGF- β (Maehara Y. et al., 1999).

E' noto che il TGF- β è un potente induttore del processo noto come *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT). L'EMT rappresenta una tappa molto importante dello sviluppo caratterizzata dal passaggio di cellule epiteliali a cellule mesenchimali e richiede alterazioni della morfologia e dell'architettura cellulare, dell'adesione e della capacità migratoria (Lee J.M. et al., 2006).

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 possiedono 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 una tipica polarità "fronte-retro", corrispondente al loro fronte di avanzamento. La perdita di espressione della E-caderina è il primo degli eventi che si verificano durante l'EMT. La E-caderina, molecola di adesione omofila, è caratteristica delle cellule epiteliali e forma con le catenine le giunzioni aderenti, che sono completamente assenti nelle

cellule mesenchimali. Gli eventi successivi alla perdita della E-caderina e alla riorganizzazione dei complessi di contatto cellula-cellula, sono: 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 prevalentemente 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. e Chopin D., 1999; Massagué J. et al., 2000; Savagner P., 2001; Derynck R. et al., 2001). 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. e Roberts A.B., 2002; Dumont N. e Arteaga C.L., 2003) (figura 9 → Il TGF- β e l'*Epithelial Mesenchymal Transition* o EMT).

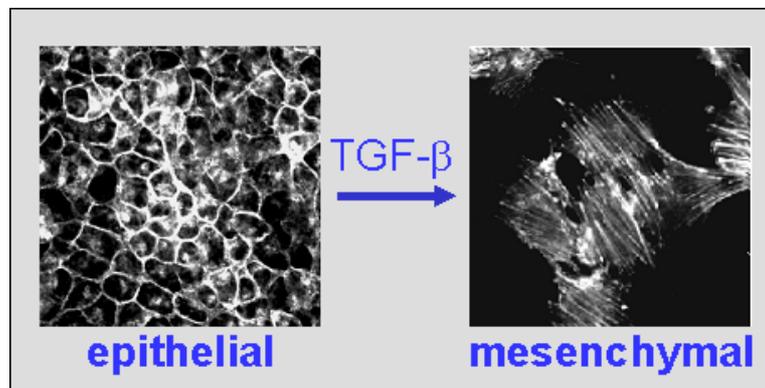
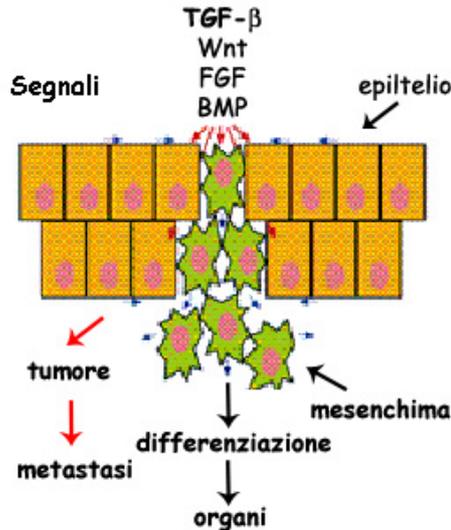


Figura 9. Il TGF- β e l'Epithelial Mesenchymal Transition o EMT. Il TGF- β è uno dei maggiori regolatori della EMT. Esso ha un ruolo nell'EMT sia durante lo sviluppo embrionale che durante i processi di tumorigenesi ed è stato implicato nello sviluppo dei cancri della pelle.

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 TGF- β 1, 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 del processo metastatico (Rahimi R.A. e Leof E.B., 2007) (figura 10 → 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. e 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 (Leivronen S.K. e Kähäri V.-M., 2007).

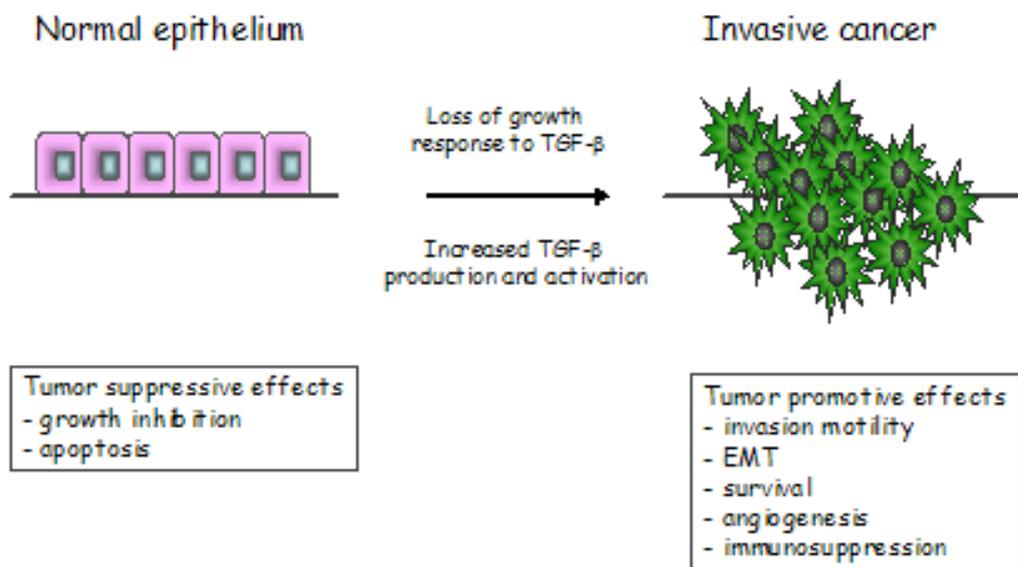


Figura 10. Il duplice ruolo del TGF- β : oncosoppressore e "tumor promoter". Il TGF- β esercita un effetto antiproliferativo sulle cellule epiteliali e sulle prime fasi della progressione tumorale. Negli stadi più avanzati i tumori maligni producono elevate quantità di TGF- β e diventano resistenti alla sua azione di inibizione della proliferazione (adattata da Leivronen S.K. e Kähäri V.-M., 2007).

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. e 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 di 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 RII e T β RI, 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 C. et al., 1990).

Ruolo del TGF- β nello sviluppo dei tumori della tiroide.

Cancerogenesi tiroidea.

La ricerca di alterazioni genetiche che possano 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 di 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 (Jiang 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. Recentemente è stata dimostrata una traslocazione del dominio di legame al DNA di PAX8 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.G. 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).

Il protooncogene *ras* è fortemente coinvolto nella cancerogenesi tiroidea, infatti, è stato osservato che la sua espressione correla con una maggiore aggressività e con una

prognosi peggiore dei tumori tiroidei (Garcia-Rostan G. et al., 2003). Iperespressioni o mutazioni attivanti sono state trovate tanto negli adenomi follicolari benigni che nei carcinomi, suggerendo che le mutazioni di *ras* potrebbero rappresentare un evento precoce nella cancerogenesi tiroidea (Namba H. et al., 1990 a e b). Recenti studi hanno dimostrato che topi transgenici con mutazioni attivanti del gene *N-ras* sviluppano tumori tiroidei scarsamente differenziati (Vitagliano D. et al., 2006). *In vitro*, la trasformazione delle cellule FRTL-5 mediata da *K-ras*, sopprime l'espressione dei marcatori di differenziazione come TG, NIS e TPO.

E' stato osservato che *ras*, attraverso le ERK e Akt, stimola il processo di EMT, facendo supporre un suo probabile ruolo non solo nella formazione ma anche nella progressione tumorale tiroidea (Brabant G. et al., 1993). Diversi studi suggeriscono che l'EMT è coinvolto nella progressione tumorale tiroidea e una ridotta espressione di E-caderina è stata osservata in tumori tiroidei con fenotipo invasivo e con alta frequenza di metastasi linfonodali (Naito A. et al., 2001; Fluge Ø. et al., 2006; Vasko V. et al., 2007).

Diversi fattori di crescita e i loro specifici recettori sono in grado di regolare il processo dell'EMT. L'iperespressione del recettore dell'EGF (Duh Q.Y. et al., 1985), dei fattori di crescita HGF e IGF e dei loro recettori, è stata osservata in molti tumori tiroidei. Tutti questi fattori di crescita stimolano la migrazione delle cellule tumorali della tiroide e in molti casi cooperano, come nel caso dell'EGF, con altri fattori come il TGF- β nel favorire questo processo (Hoelting T. et al., 1994; Nilsson M. et al., 1995).

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 *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).

Le mutazioni di Smad4 nei tumori della tiroide.

La ricerca condotta negli ultimi anni sul ruolo delle anomalie genetiche e di espressione del trasduttore del segnale TGF β -dipendente, Smad4, nello sviluppo dei tumori tiroidei, ci ha permesso di acquisire alcune importanti informazioni che

confermano il suo coinvolgimento nel processo di trasformazione tumorale dei tireociti.

Lo studio del gene *SMAD4* e della sua espressione in tumori sporadici tiroidei con differenti istotipi, ha consentito di evidenziare la presenza di mutazioni in tutti e tre i domini funzionali della proteina *Smad4*, sebbene con differenti frequenze: il dominio *MH2* e la regione *linker*, che raramente è mutata negli altri tipi di tumore, risultano maggiormente alterati (46,5%) rispetto al dominio *MH1* (6,5%). Le alterazioni trovate, la cui incidenza complessiva è risultata del 27%, sono mutazioni missenso, silenti e inserzioni di basi in "frameshift" e non correlano con uno specifico istotipo poiché sono presenti sia nelle neoplasie della tiroide benigne sia maligne (Tabella 2).

Le alterazioni della via del segnale del TGF- β a livello del mediatore citoplasmatico *Smad4* possono costituire un evento precoce e frequente nei tumori della tiroide e la perdita di risposta al TGF- β può rappresentare un evento necessario nel processo "multistep" di trasformazione dei tireociti (Lazzereschi D. et al., 2005).

Case	Histotype	Mutation	Mutated np	Mutated codon	Location	Domain	Type of mutation	Effect	
1	#20	Hürthle cell adenoma (HA)	GTG→GTA	382	128	Exon 2	MH1	Missense	Val (V)→Met (M)
			ATT→AAT	941	314	Exon 7	MH2	Missense	Ile (I)→Asn (N)
2	#37	Adenomatous hyperplasia (AH)	T→C	-26→5'	—	Intron 2-3	—	—	—
3	#2	Follicular adenoma (FA)	CCA→CTA	608	203	Exon 4	Linker	Missense	Pro (P)→Leu (L)
4	#281	Papillary thyroid carcinoma (PTC)	GCC→ACC	676	226	Exon 5	Linker	Missense	Ala (A)→Thr (T)
			AAC→AGC	788	263	Exon 6	Linker	Missense	Asn (N)→Ser(S)
5	#39	Papillary thyroid carcinoma (PTC)	GCC→GCCC	907/908	303	Exon 7	Linker	Base insertion with frameshift	Stop at codon 307
6	#41	Papillary thyroid carcinoma (PTC)	Rearrangement	—	—	Exon 7	Linker	Sequence insertion of unknown origin	No exon 7
7	#7A	Follicular adenoma (FA)	CTT→CTC	924	308	Exon 7	Linker	Silent	Leu (L)
8	#6A	Follicular adenoma (FA)	CAT→CAA	951	317	Exon 7	Linker	Missense	His (H)→Gln (Q)
9	#11.8	Lymph node metastasis (LM) of PTC	TGT→TAT	971	324	Exon 8	MH2	Missense	Cys (C)→Tyr (Y)
10	#2A	Hürthle cell carcinoma (HTC)	ATG→ACG	992	331	Exon 8	MH2	Missense	Met (M)→Thr (T)
			TTT→TCT	1016	339	Exon 8	MH2	Missense	Phe (F)→Ser (S)
11	#50	Follicular adenoma (FA)	AGT→GGT	1294	432	Exon 9	MH2	Missense	Ser (S)→Gly (G)
12	#49	Papillary thyroid carcinoma (PTC)	CGT→CAT	1487	496	Exon 11	MH2	Missense	Arg (R)→His (H)
13	#40	Hürthle cell adenoma (HA)	ATT→GTT	1579	527	Exon 11	MH2	Missense	Ile (I)→Val (V)
14	#36	Papillary thyroid carcinoma (PTC)	GAC→GAT	1482	494	Exon 11	MH2	Silent	Asp (D)
			CCT→TCT	1648	550	Exon 11	MH2	Missense	Pro (P)→Ser (S)
15	#3	Follicular adenoma (FA)	C→A	3'→+26	—	3'UTR	—	—	—

Tabella 2. Alterazioni genetiche di *Smad4* nei tumori della tiroide (Lazzereschi D. et al., 2005).

PARTE SPERIMENTALE I

SCOPO DEL LAVORO

Il TGF- β è un fattore pleiotropico e multipotenete in grado di controllare numerose risposte cellulari come la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi, l'espressione delle proteine della matrice extracellulare (ECM), l'adesione cellulare e la migrazione. Esso è comunemente considerato un fattore in grado di contrastare l'insorgenza dei tumori e la compromissione della sua via del segnale può spingere le cellule di molti organi verso la trasformazione maligna (Alexandrow M.G. e Moses H.L., 1995). In alcuni carcinomi la resistenza all'azione del TGF- β è legata a mutazioni o delezioni del gene SMAD4 e, in particolare, è stato osservato che esso risulta deletato in omozigosi nel 50% dei carcinomi pancreatici (Schutte M. et al., 1996).

Un lavoro condotto su un'ampia casistica di tumori tiroidei umani di vario istotipo, infatti, ha dimostrato che SMAD4 è mutato con una frequenza del 27% e che tali mutazioni rappresentano un evento precoce e frequente nei tumori della tiroide (Lazzereschi D. et al., 2005).

Il carcinoma papillifero è il più frequente tra i tumori maligni della tiroide (60-70% di tutti i carcinomi tiroidei), pertanto, l'obiettivo di questo progetto è stato quello di studiare *in vitro* il ruolo svolto da alcune mutazioni di Smad4 isolate da tumori di questo istotipo o dalle loro metastasi, nel processo di trasformazione tiroidea.

A tal fine sono state selezionate le mutazioni di Smad4 A226T, N263S, e P550S, provenienti da carcinomi papilliferi e la mutazione C324Y proveniente da una metastasi linfonodale di carcinoma papillifero. SMAD4 A226T e N263S sono mutazioni missenso in cui si ha, rispettivamente, la sostituzione dell'aminoacido alanina con una treonina e la sostituzione dell'aminoacido asparagina con una serina. Entrambe

queste mutazioni sono localizzate nella porzione del gene codificante la regione *linker* della proteina. Le mutazioni missenso C324Y e P550S, in cui si ha, rispettivamente, la sostituzione di una cisteina con una tirosina e di una prolina con una serina, invece, ricadono nella porzione del gene codificante il dominio MH2 della proteina.

Le mutazioni selezionate sono state ricreate *in vitro* mediante mutagenesi sito-specifica, inserite in un vettore di espressione e transfettate in modo stabile nella linea cellulare di tipo epiteliale normale di tiroide di ratto FRTL-5. Lo studio è stato, quindi, condotto sui cloni stabili focalizzando la nostra attenzione in particolare sulla mutazione C324Y, isolata da metastasi linfonodale di carcinoma papillifero, andando a valutare l'attività trascrizionale, la capacità proliferativa e la sensibilità all'inibizione della proliferazione TGF β -mediata, il comportamento adesivo e migratorio e il comportamento invasivo.

MATERIALI E METODI

Anticorpi e Reagenti. Sono stati utilizzati anticorpi monoclonali e policlonali.

Come anticorpo monoclonale è stato usato l'anticorpo specifico per la β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:5000. Come anticorpi policlonali sono stati usati: l'anticorpo specifico per la E-Caderina (Immunological Sciences) e l'anticorpo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) specifico per la "Green Fluorescent Protein" (GFP), diluito 1:500.

Colture cellulari. Le FRTL-5 sono un clone normale di cellule di tiroide di ratto

Fischer (depositata presso l'*American Type Culture Collection*-(ATCC # 8305), Rockville, Maryland), 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-Impimbato F.S. et al., 1980). Le cellule FRTL-5 sono state mantenute in coltura 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 μ g/ml), idrocortisone (10^{-8} M), transferrina (5 μ g/ml), Gly-L-His-L-Lys acetato (10 ng/ml) e somatostatina (10 μ g/ml), forniti dalla Sigma-Aldrich. Le FRTL-5 utilizzate nei nostri esperimenti sono un subclone (F1) gentilmente fornito dal Dr Kohn L.D. (Nhi MD-Bethesda), diploide tra il 5° e il 25° passaggio, non in grado di proliferare in assenza di TSH (Cirafici A.M. et al., 1992; Coppa A. et al., 1995; Napolitano G. et al., 2000).

I cloni stabili ottenuti transfettando stabilmente le cellule FRTL-5 con il plasmide pEGFPC3 o con pEGFPC3 contenente il cDNA umano di Smad4 *wt* o delle forme mutate

di Smad4, sono stati mantenuti in coltura nelle stesse condizioni delle FRTL-5 ma in presenza di 250 µg/ml di geneticina G418 (Invitrogen-Life Technologies).

La linea cellulare umana di carcinoma della mammella MDA-MB468 che presenta una delezione in omozigosi di Smad4 (Smad4 "null") (Schutte M. et al., 1996) e la linea cellulare di fibroblasti di rene di scimmia COS-1 sono state mantenute in coltura con il terreno di crescita Dulbecco modificato da Eagle (D-Mem) a cui sono stati aggiunti: 10% di siero fetale di vitello (*Fetal Calf Serum*, FCS), L-Glutamina (2 mM), penicillina e streptomina (0,1 mg/ml) forniti da Sigma-Aldrich. Le cellule cresciute a confluenza sono state diluite con un passaggio ogni tre giorni.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ a 37°C. I trattamenti delle cellule sono stati effettuati con l'isoforma umana ricombinante del TGF-β1 (Peprotech) alle concentrazioni indicate nei vari esperimenti.

Mutagenesi sito-specifica del gene SMAD4 e subclonaggio nel vettore di espressione pEGFPC3. La mutagenesi sito-specifica è una tecnica di biologia molecolare attraverso la quale è possibile introdurre una mutazione in un particolare sito di un gene, solitamente inserito in un plasmide. La mutazione introdotta può essere una sostituzione di base, una inserzione o una delezione di nucleotidi rispetto alla sequenza originaria. Le mutagenesi sito-specifiche che ci hanno permesso di creare le forme mutate del gene SMAD4, A226T (Ala → Thr, codone 226), N263S (Asn → Ser, codone 263), C324Y (Cys → Tyr, codone 324) e la P550S (Pro → Ser, codone 550), sono state eseguite utilizzando il QuikChange® XL Site-

Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) e il plasmide pcDNA3 (Invitrogen), contenente il gene *wild type* di Smad4 e il gene per la resistenza alla neomicina (geneticina, G428, Gibco-BRL). Il QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit sfrutta la tecnica della PCR e prevede l'uso di oligonucleotidi contenenti la mutazione desiderata, che vengono fatti ibridare con il gene inserito in un plasmide, permettendo alla polimerasi di sintetizzare il filamento (circolare) complementare, così che al termine del primo ciclo di PCR si possano avere plasmidi costituiti da un filamento con la mutazione (quello contenente l'oligonucleotide con mutazione) e dal filamento originario, con la sequenza *wild type*. Gli oligonucleotidi utilizzati nel nostro caso, ognuno contenente la specifica mutazione di Smad4 da introdurre nel gene *wt*, sono stati: A226T, 5'-CTTCCACAAGTCAGCCTACCAGTATACTGGGGGGC-3' For e 5'-GCCCCCAGTATACTGGTAGGCTGACTTGTGGAAG-3' Rev; N263S, 5'-GCTACTTACCATCATAGCAGCACTACCACCTGG-3' For e 5'-CCAGGTGGTAGTGCTGCTATGATG GTAAGTAGC-3' Rev; C324Y, 5'-CCTGCTCCTGAGTATTGGTATTCCATTGCTTACTTTG-3' For e 5'-CAAAGTAAGCAATGGAATACCAATACTCAGGAGCAGG-3' Rev; P550S, 5'-CCATGCCGATTGCAGACCCACAATCTTTAGACTGAGGTCTTTTAC-3' For, 5'-GTAAAAGACCTCAGTCTAAAGATTGTGGGTCTGCAATCGGCATGG-3' Rev. Dopo 15 cicli, il plasmide usato come stampo è stato eliminato per digestione enzimatica con 10 U dell'enzima di restrizione DpnI, specifico per il DNA metilato, in grado di degradare solo il plasmide copia, preservando quello mutato prodotto *in vitro* e, quindi, non metilato. Il prodotto ottenuto mediante le PCR è stato sottoposto a sequenziamento per selezionare i costrutti contenenti le forme mutanti di Smad4.

I geni mutati e *wild type* di SMAD4 inseriti nel plasmide pcDNA3, sono stati subclonati nel vettore di espressione pEGFPC3 (Clontech), contenente la GFP e il gene della resistenza alla neomicina, utilizzando l'enzima ligasi (Invitrogen). I costrutti così ottenuti sono stati utilizzati per la transfezione stabile delle cellule FRTL-5 (figura 11).

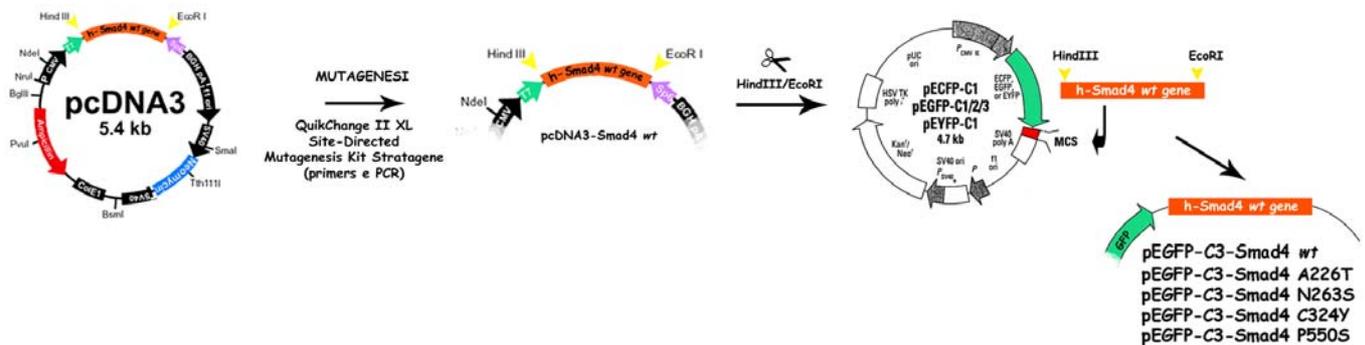


Figura 11. Mutagenesi sito-specifica di Smad4 e subclonaggio nel plasmide pEGFPC3 delle forme mutate e *wild type* di Smad4. Il gene *wt* di Smad4 è stato mutagenizzato mediante QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Le forme *wild type* e mutate del gene SMAD4 sono state inserite nel costrutto pEGFPC3 (Clontech) utilizzando l'enzima ligasi (Invitrogen).

Transfezione stabile. Le transfezioni stabili sono state effettuate usando la tecnica della lipofectamina (LipofectAMINE PLUS-GIBCO BRL, Life Technologies) e seguendo le istruzioni del produttore. Le cellule FRTL-5, 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 e la miscela dei 6H, sono state trasfettate stabilmente con un vettore di espressione pEGFPC3 contenente il cDNA umano di Smad4 *wt* o il cDNA delle mutazioni A226T, N263S, C324Y, P550S di Smad4, isolate nel nostro laboratorio da una casistica di tumori tiroidei di vario istotipo, etichettati dalla *Green Fluorescent Protein* (GFP) o il vettore

vuoto. I cloni A226T (1M, 2M), N263S (1M, 2P), C324Y 2M, P550S 8M sono stati ottenuti dopo selezione con 1000 µg/ml (Invitrogen-Life Technologies).

Sui cloni selezionati è stato effettuato uno screening mediante analisi Western Blot per l'espressione della GFP.

Saggi di luciferasi. I saggi di luciferasi sono stati eseguiti sulle cellule MDA-MB468, sulle cellule FRTL-5, e sui cloni stabilmente transfettati con Smad4 *wt* o con le mutazioni di Smad4 o con il plasmide pcDNA3 vuoto. Tutte le cellule sono state cresciute fino al 70% di confluenza in piastre multipozzetto da 24 pozzetti e sono state transfettate in modo transiente mediante la tecnica della lipofectamina.

La transfezione delle MDA-MB468 è stata eseguita con il costrutto pcDNA3-Smad4 *wt* o le mutazioni di Smad4 o con il plasmide pcDNA3 vuoto e, contemporaneamente, con il costrutto pCMV5 FLAG-Smad2 *wt* per mantenere l'equilibrio stechiometrico tra Smad2 e Smad4. Le cellule sono state, inoltre, transfettate con il costrutto pCMV-βGal e con il costrutto reporter pCMV5 3TP-Lux costituito da un gene della luciferasi posto sotto il controllo del promotore p3TP, caratterizzato da tre elementi consecutivi responsivi al TGF-β contenenti 12-O-tetradecanoyl-13-acetate, (*TPA*)-*Response Elements* o TREs, e di una porzione del promotore di uno dei principali geni bersaglio del TGF-β1, 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. e Kruijer W., 1990; Keeton M.R. et al., 1991). I saggi di luciferasi sono stati effettuati, inoltre, sulle MDA-MB468 transfettate con pcDNA3-Smad4 *wt* o con pcDNA3-Smad4 C324Y, o con i costrutti pcDNA3-Smad4 *wt* e pcDNA3-Smad4 C324Y in vari rapporti

stechiometrici (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1). Le cellule sono state transfettate contemporaneamente con i costrutti pCMV5 FLAG-Smad2 *wt*, pCMV- β Gal e pCMV5 3TP-Lux.

Le FRTL-5 e i cloni di Smad4 *wt* o delle sue mutazioni sono stati transfettati solo con i costrutti reporter pCMV5 3TP-Lux e pCMV- β Gal. La transfezione di tutte le cellule è stata eseguita utilizzando 1 μ g/pozzetto dei vari DNA per 4 ore. Dopo la transfezione, le cellule sono state trattate o non trattate per 24 ore con 10 ng/ml di TGF- β 1 diluito in mezzo contenente lo 0,1% 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.

Curve di crescita. Le curve di crescita sono state effettuate piastrando FRTL-5, il clone C324Y di Smad4 e il clone contenente il plasmide vuoto V1M in piastre Petri da 35 mm (100×10^3 cellule/piastra). Le cellule sono state trattate o non con 10 ng/ml di TGF- β 1 in mezzo F12 Coon Modified per 48 ore. Il numero delle cellule è stato determinato attraverso la conta al tempo 0 e al tempo 48 ore. Le altre curve di crescita sono state ottenute piastrando le cellule FRTL-5 e il clone C324Y di Smad4 in piastre Petri da 35 mm (100×10^3 cellule/piastra), in mezzo di coltura completo della miscela di 6H o in assenza della sola insulina o in assenza del solo TSH. Le conte delle cellule sono state eseguite dopo 24, 48, 72 e 96 ore.

Saggi di clonogenicità. Le cellule FRTL-5 e i cloni V1M e C324Y sono stati seminati in piastre petri da 35mm (300 cellule/piastra) in mezzo F12 modificato da Coon supplementato con lo 0,5% di siero di vitello e con 6H Mix, con o senza TGF- β 1 (10 ng/ml). Le cellule sono state fatte crescere a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ fino alla 6^a duplicazione per ottenere la formazione di cloni costituiti da almeno 50 cellule. Trascorso questo tempo, il mezzo è stato rimosso, è stato eseguito un lavaggio con PBS e, successivamente, i cloni sono stati fissati e colorati con 2 ml di una soluzione contenente glutaraldeide al 6% e crystal violetto allo 0,5%. Dopo un tempo di incubazione di 30 minuti la soluzione è stata rimossa e le piastrine sono state lavate immergendole delicatamente in una vaschetta contenente acqua corrente. Le piastrine sono state lasciate ad asciugare a temperatura ambiente (20°C).

Saggi di crescita in Soft Agar. Le cellule FRTL-5 e i cloni stabilmente transfettati con il plasmide pEGFPC3 vuoto o con la forma mutata C324Y di Smad4, sono state piastrate in soft agar per valutarne la capacità di crescita ancoraggio indipendente. Le piastre da 35 mm di diametro sono state preparate con 2 ml di agar 0,625% in mezzo F12 modificato da Coon supplementato con il 5% di siero di vitello e con la miscela di sei ormoni (6H) (BASE AGAR o MIX), ottenuto miscelando una soluzione di agar autoclavato 1,25% e mezzo 2X secondo un rapporto 1:1 (v/v). La base agar è stata lasciata a solidificare per 30 minuti in cappa sterile a temperatura ambiente.

Le cellule sono state risospese in mezzo F12 completo, trattate o meno con 10 ng/ml di TGF- β 1, e miscelate con la base agar, 0,4% finale (TOP AGAR), in modo tale da

avere 10×10^3 cell/1,2 ml/piastra. Una volta aliquotata la sospensione cellulare, le piastre sono state lasciate a solidificare ancora per 20 minuti in cappa sterile a temperatura ambiente e, successivamente, sono stati aggiunti 100 μ l/piastra di mezzo F12 completo. Le cellule sono state mantenute in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 a $37^\circ C$ per 20 giorni prima di procedere alla conta dei cloni mediante microscopio ottico.

Saggi di adesione. Preparazioni di fibronectina (FN), laminina (LM) o Collagene IV sono state diluite in PBS a 20-30 μ g/ml e 100 μ l di soluzione proteica sono stati distribuiti in piastre multipozzetto da 96 pozzetti (Costar, Cambridge, MA). Dopo un'incubazione di una notte a $4^\circ C$, 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 $37^\circ C$. Le cellule FRTL-5 e le cellule esperimenti Smad4 C324Y sono state staccate dalle piastre di coltura utilizzando tripsina (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. Le cellule dopo il piastramento (100 μ l/pozzetto), sono state lasciate aderire al fondo dei pozzetti ricoperti dai substrati FN, LM o Collagene IV, incubandole per 1 ora a $37^\circ C$ 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 crystal violetto, lavate con H₂O 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 µm; Costar Corporation, Cambridge, MA). Le cellule FRTL-5, e i cloni stabilmente transfettati con la mutazione C324Y di Smad4 e con il plasmide vuoto pEGFPC3 sono stati staccati utilizzando EGTA 1X e risospesi in mezzo privo di siero contenente lo 0,2% di BSA. Le cellule trattate o meno con TGF-β1 (10 ng/ml) sono state, quindi, seminate nel compartimento superiore delle Transwell (30x10³ cellule/100 µl) lasciate migrare attraverso il filtro di policarbonato utilizzando la LM (40 µg/ml in mezzo privo di siero contenente lo 0,2% di BSA) come chemoattrattante, 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 tre 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.

Preparazione dei lisati proteici e analisi Western Blot. Le cellule a sub-confluenza sono state lisate per 30 minuti a 4°C utilizzando il tampone di estrazione TNE (50mM Tris-HCl pH 7.8, 150mM NaCl, 1 mM di EDTA, 1% TRITON X-100) aggiunto di 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), della miscela di inibitori delle proteasi contenente leupeptina (1 µg/ml), aprotinina (2,5 µg/ml) idrocloruro di benzammide (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO) e la miscela di inibitori delle fosfatasi (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO). I lisati cellulari sono stati, quindi, centrifugati a 15000g per 5 minuti a 4°C e la concentrazione proteica è stata quantizzata utilizzando il metodo colorimetrico con il kit fornito dalla Bio-Rad (Bio-Rad laboratori, Hercules, CA). Quantità equivalenti di proteine dei diversi estratti cellulari (40 µg o 80 µg) sono state separate elettroforeticamente in un gel al 10% di (SDS)-poliacrilamide in condizioni riducenti e, quindi, trasferite elettricamente su filtri di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Dussel, Germania). Le membrane sono state bloccate con il tampone TBS-T (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 0,1% di Tween-20, pH 7,6) contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA) (tampone di blocco) e poi incubate con l'anticorpo policlonale specifico per la E-Caderina (Immunological Sciences), diluito 1:1000, o con l'anticorpo policlonale specifico per la "Green Fluorescent Protein" (GFP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:500.

Per verificare l'avvenuto caricamento in ogni pozzetto di uguali quantità di proteine è stato effettuato un Western Blot con un anticorpo monoclonale specifico per la β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:5000.

Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari, le membrane sono state lavate e incubate con anticorpi secondario coniugato alla perossidasi di rafano. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti nel tampone di blocco TBS-T. L'immunoreattività è stata rilevata utilizzando un kit in grado di potenziare la chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate-PIERCE, Rockford-U.S.A.) e visualizzata su lastre CL-Xposure Film (Pierce).

Individuazione e quantificazione delle bande. Le bande dei Western Blot sono state analizzate e la loro intensità media è stata determinata utilizzando il software Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). I dati sono stati raccolti come rapporti fra l'intensità media delle bande della E-Caderina e l'intensità media delle bande della β -actina, e importati in un foglio di calcolo (Excel, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Esperimenti di immunoprecipitazione. Le cellule COS-1 sono state transfettate con i costrutti pEGFPC3-Smad4 *wt* o pEGFPC3-Smad4 C324Y e contemporaneamente con il costrutto pCMV5 FLAG-Smad2 *wt* usando la tecnica della lipofectamina (LipofectAMINE PLUS-GIBCO BRL, Life Technologies). Le cellule sono state trattate o meno con 10 ng/ml TGF- β 1 per 1 ora e lisate per 30 minuti a 4°C utilizzando con il tampone di estrazione TNE (50mM Tris-HCl pH 7,8, 150mM NaCl, 1 mM di EDTA, 1% TRITON X-100) aggiunto di 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), della miscela di inibitori delle proteasi contenente leupeptina (1 μ g/ml), aprotinina (2,5 μ g/ml) idrocloruro di benzamide (1

$\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO) e la miscela di inibitori delle fosfatasi (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO). I lisati cellulari sono stati, quindi, centrifugati a 15000 g per 5 minuti a 4°C e la concentrazione proteica è stata quantizzata utilizzando il metodo colorimetrico basato sull'uso del Bio-Rad (Bio-Rad laboratori, Hercules, CA).

I lisati proteici totali (2 mg/campione) sono stati incubati per 30 minuti a 4°C con 1 μl di IgG anti-mouse/campione (0,4 $\mu\text{g/campione}$) allo scopo di rimuovere le proteine con elevata affinità per le beads ("preclearing") e immunoprecipitati utilizzando 20 $\mu\text{l/campione}$ di anticorpo monoclonale anti-FLAG coniugate a biglie di proteina G (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO, F2426), incubando per tutta la notte a 4°C. Al termine dell'incubazione l'immunoprecipitato è stato lavato 3 volte con 500 μl di TBS freddo e il pellet è stato risospeso in 50 μl del tampone Laemmli 2X (Tris HCl 125mM, SDS 4%, Glicerolo 20%, DTT 100 mM, Bromo Fenolo Blu 0,004%). I campioni sono stati bolliti per 5 minuti e, centrifugate per 30 secondi a 10000rpm a temperatura ambiente.

Le proteine sono state separate elettroforeticamente in un gel al 8% di (SDS)-poliacrilamide in condizioni riducenti e, quindi, trasferite elettricamente su filtri di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Dussel, Germania). Le membrane sono state bloccate con il tampone TBS-T (20mMTris-HCl, 137mM NaCl, 0,1% di Tween-20, pH 7,6) contenente il 3% di albumina sierica bovina (BSA) (tampone di blocco) e poi incubate con l'anticorpo policlonale specifico per la "Green Fluorescent Protein" (GFP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:500.

Estrazione di RNA e RT-PCR. Gli RNA totali sono stati estratti dalle cellule utilizzando il Tri Reagent (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO, T9424) e seguendo il protocollo fornito dal produttore. La qualità degli RNA è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%. L'RNA, inoltre, è stato analizzato allo spettrofotometro per valutarne il grado di purezza ($A_{260}:A_{280} > 1.8$) e quantificarne la concentrazione. Un microgrammo di RNA totale è stato convertito in cDNA per trascrizione inversa, utilizzando la retrotrascrittasi MuLV (Applied Biosystems, New Jersey USA Roche) e i random primer (Roche, Germania), seguendo le istruzioni del produttore. Le PCR sono state, quindi, eseguite secondo il seguente protocollo: 10 minuti a 94°C e, a seguire, 35 cicli di 1 minuto di denaturazione a 94°C, 1 minuto di appaiamento degli oligonucleotidi con il template alla "temperatura di melting" (T_m), e 1 minuto di estensione a 72°C nel caso di tutti i cicli eccettuato l'ultimo, per il quale il tempo di estensione a 72°C è stato prolungato da 1 a 7 minuti. I prodotti della PCR sono stati, quindi, analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, colorati con etidio bromuro e visualizzati sotto i raggi UV. Per valutare i livelli di espressione dei geni TSH-R e TG per RT-PCR sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi specifici per i geni del ratto: TSH-R, 5'-AGAGAAGCTATCGGCGTGA-3' For e TSH-R 5'-CAAGCCCGGTGAAGAGATAACTG-3' Rev; TG 5'-TGCCCACCCAGAATCAAGGAAC-3' For e 5'-TGAAGCCAAA GGTACCCACA ACTG-3' Rev. I risultati delle PCR sono stati normalizzati rispetto all'espressione del gene "house-keeping" GAPDH utilizzando i seguenti oligonucleotidi disegnati sulla sequenza del gene del ratto: GAPDH 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGCT-3' For, GAPDH 5'-ACAGCCTTGGCAGCACCAAGT-3' Rev.

Analisi statistiche.

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

RISULTATI

Mutagenesi sito-specifica del gene SMAD4.

Le forme mutate del gene SMAD4, A226T (Ala → Thr, codone 226), N263S (Asn → Ser, codone 263), C324Y (Cys → Tyr, codone 324) e la P550S (Pro → Ser, codone 550), sono state create *in vitro* mediante la tecnica di mutagenesi sito-specifica che consente di inserire una mutazione in un particolare sito di una molecola di DNA. La mutazione inserita può essere una sostituzione di base, una inserzione o una delezione di nucleotidi rispetto alla sequenza originaria. Le mutazioni di SMAD4 sono state ottenute a partire dal plasmide pcDNA3, contenente il gene *wt* di SMAD4 e il gene per la resistenza alla neomicina (geneticina, G428, Gibco-BRL), utilizzando il kit di mutagenesi sito-specifica QuikChange® XL (Stratagene) che sfrutta la tecnica della PCR e prevede l'uso di oligonucleotidi contenenti la mutazione desiderata da inserire nel gene *wt* di SMAD4. Il prodotto ottenuto mediante le PCR è stato sottoposto a sequenziamento per selezionare i costrutti contenenti le forme mutanti di Smad4.

Studio dell'attività trascrizionale delle mutazioni di Smad4.

Smad4 è un importante mediatore della via del segnale del TGF- β . Esso rappresenta un nodo di convergenza nella via delle Smad a valle dei recettori della superfamiglia del TGF- β , in grado di complessarsi con le R-Smad attivate da TGF- β e Activine, Smad2 e Smad3, e anche con le R-Smad attivate dalle BMP, Smad1, Smad5 e Smad8. Una volta avvenuta la formazione dell'oligomero R-Smad fosforilata/Smad4, il complesso trascrizionale trasloca nel nucleo, dove direttamente o mediante l'interazione con altri fattori di trascrizione, regola la trascrizione di specifici geni.

L'attività trascrizionale delle forme mutate della proteina Smad4 è stata valutata conducendo saggi di luciferasi e utilizzando il costrutto reporter p3TP-Lux il cui promotore, p3TP, è caratterizzato da 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 da una porzione del 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. e Kruijer W., 1990; Keeton M.R. et al., 1991).

I saggi di luciferasi sono stati condotti sulla linea cellulare umana di carcinoma della mammella MDA-MB468 che rappresenta un ottimo modello di studio Smad4 "null" in cui il gene SMAD4 è deletato in omozigosi (Schutte M. et al., 1996).

Le cellule sono state co-transfettate in modo transiente con la forma *wild type* di Smad4 o le sue mutazioni e con la forma *wild type* di Smad2, allo scopo di mantenere l'equilibrio stechiometrico fra i mediatori citoplasmatici della via del segnale del TGF- β . I controlli inseriti negli esperimenti di luciferasi, sono stati ottenuti transfettando in modo transiente le cellule con la mutazione di Smad4 R100T, nota per il suo comportamento da dominante negativo, e la mutazione D493H (Hahn S.A. et al., 1996), entrambe isolate da carcinoma umano di pancreas. Tutte le cellule sono state, inoltre, transfettate in transiente con il costrutto 3TP-Lux e trattate o meno con 10 ng/ml di TGF- β 1 per 24 ore.

I risultati ottenuti mostrati in figura 12 dimostrano che la mutazione C324Y di Smad4 è l'unica a determinare un'induzione della p3TP-Lux significativamente ridotta, rispetto a quella ottenuta transfettando la forma *wild type* di Smad4 o le altre

mutazioni esaminate. La riduzione dell'attività trascrizionale, dopo il trattamento con il TGF- β è, infatti, di 6,5 volte inferiore rispetto a quella ottenuta nelle cellule transfettate con Smad4 *wild type* e maggiore di 2,4 e di 3,5 volte rispetto a quella ottenuta transfettando le mutazioni di Smad4 R100T e D493H. Pertanto, la presenza della forma mutata C324Y in un sistema Smad4 "null" non è in grado di ripristinare completamente il *signaling* del TGF- β , ma non è neanche inattiva come le mutazione di Smad4 R100T e D493H, descritte in letteratura come mutazioni "dominanti negative".

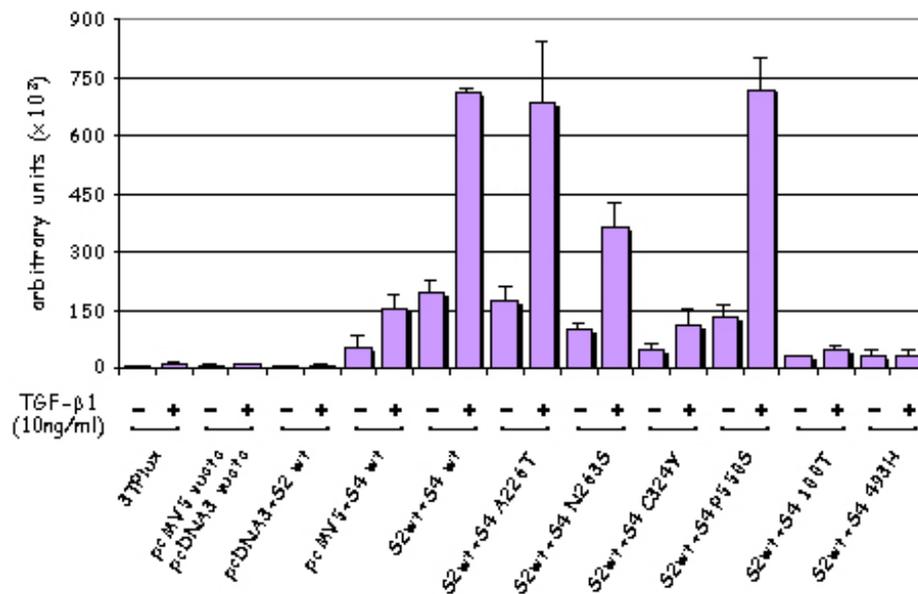


Figura 12. Attività trascrizionale delle mutazioni di Smad4 transfettate in modo transiente nelle cellule MDA-MB468. Le cellule sono state transfettate in modo transiente con i plasmidi contenenti le forme *wild type* di Smad2 e Smad4 o la forma *wild type* di Smad2 e le mutazioni di Smad4, e il costrutto reporter 3TP-Lux. Le cellule sono state trattate o meno con TGF- β 1 (10 ng/ml) per 24 ore e l'attività luciferasica è stata espressa in unità arbitrarie come valore assoluto.

Cloni stabili della linea cellulare FRTL-5 esprimenti le mutazioni del gene SMAD4.

Allo scopo di chiarire se le mutazioni di Smad4 oggetto di questo studio, possano essere responsabili di significative alterazioni funzionali e/o morfologiche nelle cellule tiroidee, le FRTL-5 sono state transfettate stabilmente con vettori di espressione contenenti la mutazione C324Y, o le altre mutazioni o la forma *wild type* di Smad4, o il plasmide vuoto. I costrutti utilizzati per la transfezione stabile delle FRTL-5 sono stati ottenuti subclonando le forme mutate o la forma *wild type* di Smad4 nel vettore di espressione pEGFPC3, contenente in posizione N-terminale la sequenza GFP (*Green Fluorescent Protein*), in modo tale da poter discriminare fra la forma endogena della proteina Smad4 e quella esogena transfettata.

La presenza di un gene per la resistenza alla neomicina nel vettore pEGFPC3, ha consentito la selezione dei cloni resistenti all'antibiotico G418 (geneticina, G418, Gibco-BRL). Lo screening dei cloni ottenuti, eseguito attraverso analisi Western Blot utilizzando l'anticorpo diretto contro la GFP (figura 13), ci ha permesso di selezionare i cloni iperesprimenti: V1M, wt 7P, wt 8P, 226 1M, 226 2M, 263 1M, 263 2P, 324 2M e 550 8M.

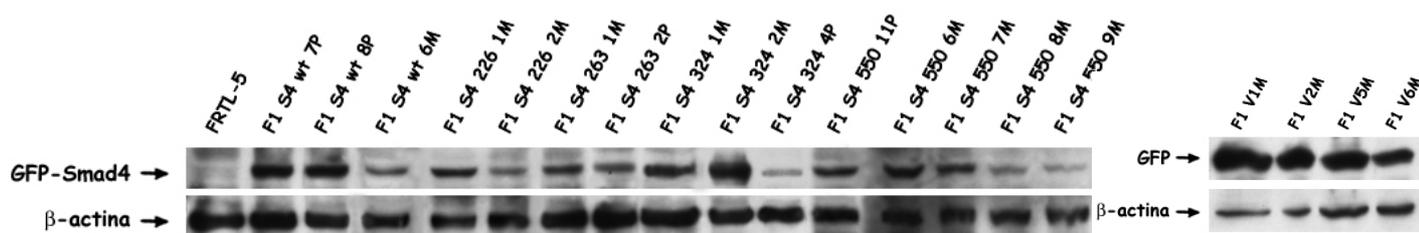


Figura 13. Iperespressione di Smad4 wt e delle mutazioni nei cloni di FRTL-5 transfettati stabilmente. Come descritto in "Materiali e Metodi", le proteine ottenute lisando le cellule, sono state separate attraverso corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti e trasferite elettricamente su nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo anti-GFP.

L'espressione dei geni di differenziazione tiroidea.

Le FRTL-5 rappresentano un modello cellulare normale che mantiene le proprietà differenziate tipiche del tessuto epiteliale tiroideo, come la dipendenza dal TSH per la crescita, la capacità di captare e concentrare lo ioduro dal mezzo esterno e l'espressione dei geni tiroideo-specifici come la Tireoglobulina (TG), la Tireoperossidasi (TPO), il recettore del TSH (TSH-R), e il Na^+/I^- symporter (NIS) (De Vita G. et al., 2005), diversamente dalle cellule trasformate che spesso perdono questi caratteri differenziativi (Meireles A.M. et al., 2007). Lo studio dei livelli di espressione dei geni di differenziazione tireoglobulina (TG) e del recettore del TSH, è stato effettuato nei cloni stabilmente transfettati con le mutazioni di Smad4, mediante la tecnica della RT-PCR. I dati ottenuti dimostrano che i livelli di espressione dei geni TG e TSH-R non sono modulati nei cloni stabili esperimenti le mutazioni di Smad4 né in condizioni basali né in seguito al trattamento con il TGF- β 1 (figura 14).

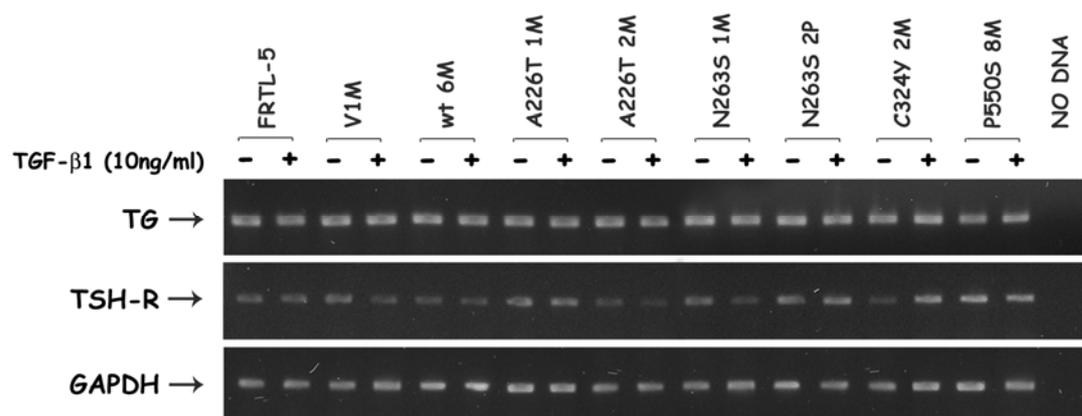


Figura 14. Espressione dei geni di differenziazione TG e TSH-R nei cloni esperimenti le mutazioni di Smad4 e nelle cellule FRTL-5. Gli RNA totali estratti dalle cellule trattate o meno con TGF- β 1 10 ng/ml per 24 ore, sono stati convertiti in cDNA per trascrizione inversa, utilizzando la retrotrascrittasi MuLV (Applied Biosystems, New Jersey USA Roche). La PCR è stata eseguita utilizzando oligonucleotidi specifici per i geni di ratto TG e TSH-R e per il gene "house-keeping" GAPDH usato per normalizzare.

L'attività trascrizionale delle mutazioni di Smad4 nei cloni stabili di FRTL-5.

La funzionalità della via di segnale del TGF- β nei cloni esprimenti le varie mutazioni, o la forma *wild type* di Smad4 (wt 7P, wt 8P), o il vettore vuoto (V1M) è stata studiata mediante saggi luciferasici. I cloni sono stati tutti transfettati in modo transiente con il costrutto reporter p3TP-Lux e l'attività luciferasica è stata determinata in condizioni basali o dopo trattamento con TGF- β 1 (10 ng/ml) per 24 ore. I dati riportati in figura 15, dimostrano che la mutazione C324Y presenta una significativa ($p < 0,05$) induzione dell'attività del gene reporter 3TP-Lux sia a livello basale (4 volte di induzione) che dopo trattamento con il TGF- β 1 (2 volte di induzione), rispetto al controllo rappresentato dalle FRTL-5 non transfettate, mentre le mutazioni A226T, N263S e P550S sono in grado di svolgere la loro attività trascrizionale in maniera comparabile alla forma *wild type* di Smad4.

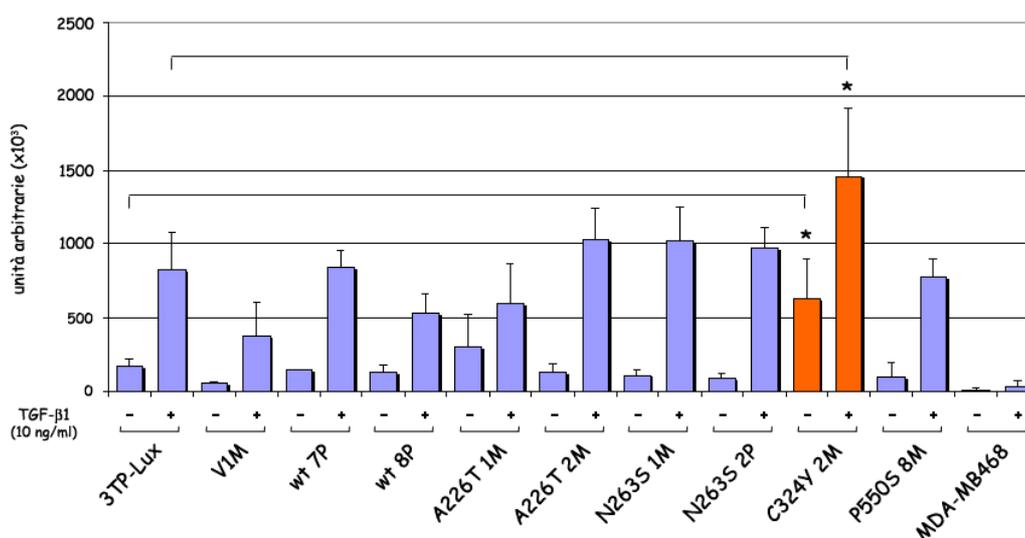


Figura 15. Attività trascrizionale delle mutazioni di Smad4 transfettate stabilmente nelle cellule FRTL-5. I cloni delle FRTL-5, stabilmente esprimenti le forme mutanti di Smad4, sono stati transfettati in modo transiente con il costrutto reporter 3TP-Lux e trattati o non con TGF- β 1 (10 ng/ml) per 24 ore. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte e l'attività luciferasica è stata espressa in unità arbitrarie come valore assoluto.

Sebbene nelle cellule Smad4 "null" la mutazione C324Y attivi debolmente il promotore del PAI-1, nelle cellule tiroidee, dove l'espressione del gene mutato si affianca a quella del gene *wt*, la risposta trascrizionale è addirittura aumentata. Si viene, probabilmente, a creare un particolare rapporto stechiometrico tra la forma *wild type* e quella mutata di Smad4, che favorisce la trasduzione del segnale piuttosto che inibirlo. La transfezione transiente delle cellule MDA-MB468 con la mutazione C324Y in differenti rapporti stechiometrici con la forma *wild type* di Smad4, dimostra che la risposta trascrizionale è tanto più intensa quando più alto è il rapporto della forma *wild type* rispetto alla forma mutata C324Y (rapporto 3:1) (figura 16). Pertanto, è ipotizzabile che la mutazione C324Y, coespressa in una cellula con la forma *wild type* di Smad4, conferisca alla via del TGF- β la funzione di "tumor promoter", piuttosto che quella di oncosoppressore. Sembra opportuno sottolineare che la mutazione C324Y è stata isolata da un linfonodo metastatico di un carcinoma papillifero della tiroide che non presentava alcuna mutazione di Smad4, e quindi potrebbe rappresentare un evento tardivo che spinge la cellula ad assumere un fenotipo metastatico.

Essa, inoltre, è localizzata a ridosso della sequenza che codifica il dominio SAD (aa 275-322) (*Smad Activating Domain*) importante per l'attivazione trascrizionale della proteina Smad4 (de Caestecker M.P. et al., 2000) e, proprio per tale motivo, potrebbe influenzarne la funzionalità.

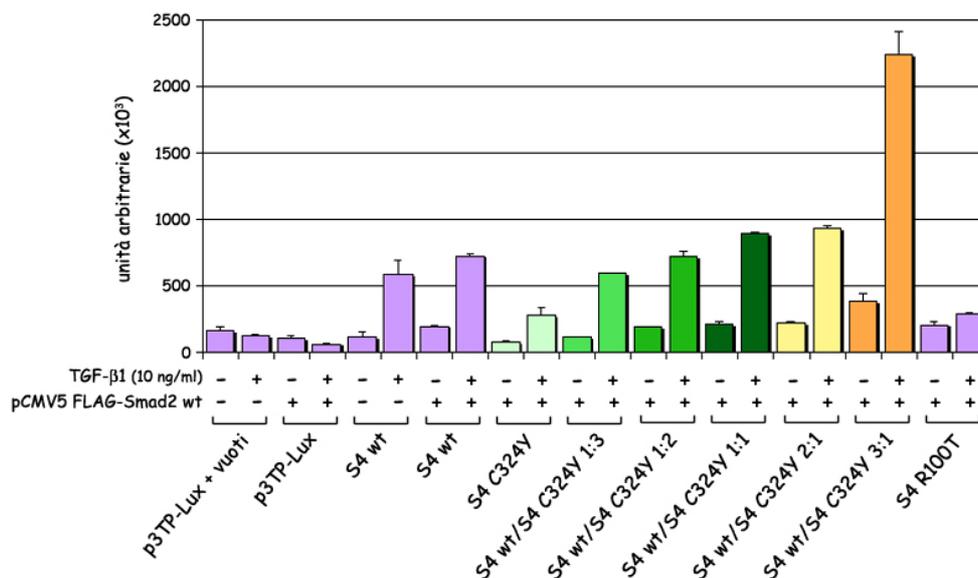


Figura 16. Attività trascrizionale della mutazione C324Y di Smad4 quando coespressa con la forma *wild type* della proteina in vari rapporti stechiometrici. Le cellule MDA-MB468 sono state transfettate in modo transiente con i plasmidi contenenti la forma *wild type* di Smad4 e/o la forma mutata C324Y nei vari rapporti stechiometrici indicati in figura. Tutte le cellule sono state transfettate con il costrutto contenente la forma *wild type* di Smad2 e il costrutto reporter 3TP-Lux. Le cellule sono state trattate o meno con TGF-β1 (10 ng/ml) per 24 ore e l'attività luciferasica è stata espressa in unità arbitrarie come valore assoluto.

Capacità del clone Smad4 C324Y di formare il complesso trascrizionale con Smad2 *wt*.

Il dominio MH2 della proteina Smad4 è direttamente coinvolto nella formazione del complesso trascrizionale con le R-Smad, pertanto, considerato che la mutazione di Smad4 C324Y ricade proprio in questo dominio proteico, sono stati eseguiti esperimenti di immunoprecipitazione al fine di verificare la capacità della proteina mutata di formare il complesso trascrizionale.

Gli esperimenti sono stati condotti sui lisati proteici estratti dalle cellule COS-1 transfettate in transiente con i costrutti pEGFPC3-Smad4 *wt* o pEGFPC3-Smad4 C324Y e contemporaneamente con il costrutto pCMV5 FLAG-Smad2 *wt*. Le proteine, estratte dalle cellule trattate o meno con 10 ng/ml di TGF-β1 per 1 ora, sono state

immunoprecipitate con l'anticorpo anti-FLAG, rilevate con l'anticorpo anti-GFP e analizzate mediante Western Blot. I dati ottenuti dimostrano che la proteina Smad4 C324Y è in grado di interagire con Smad2 *wt* in maniera comparabile alla forma *wild type* di Smad4 (figura 17).

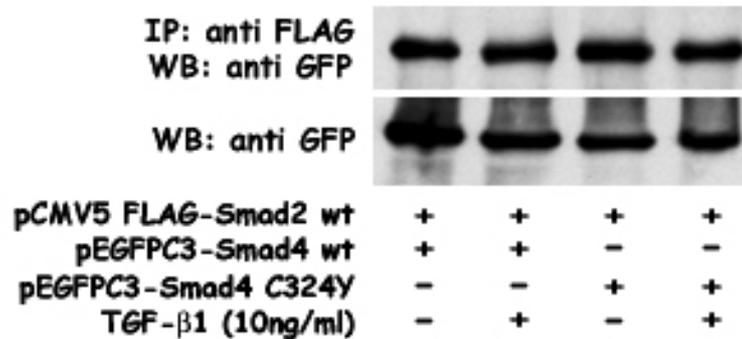


Figura 17. Capacità della forma mutata di Smad4 C324Y di interagire con Smad2 *wt*. Le cellule COS-1 sono state transfettate in modo transiente con i costrutti pEGFPC3-Smad4 *wt* o pEGFPC3-Smad4 C324Y e contemporaneamente con il costrutto pCMV5 FLAG-Smad2 *wt* e trattate o meno con 10 ng/ml di TGF-β1 per 1 ora. Le proteine estratte (2 mg) sono state immunoprecipitate con l'anticorpo anti-FLAG, separate attraverso una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti, e trasferite elettricamente su nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo anti-GFP.

Risposta proliferativa del clone Smad4 C324Y.

Il TGF-β svolge una importante azione di regolazione negativa della proliferazione delle cellule epiteliali, endoteliali ed ematopoietiche, bloccando la progressione del ciclo cellulare nella tarda fase G1 (Bachman K.E. e Park B.H., 2005). La capacità proliferativa dei cloni è stata studiata effettuando delle curve di crescita in varie condizioni di coltura.

Sono state piastrate 100×10^3 cellule e contate al tempo T_0 e dopo 48 ore in presenza o meno di 10 ng/ml di TGF-β1. I dati riportati in figura 18 dimostrano che l'inibizione della proliferazione del clone C324Y è significativamente inferiore rispetto a quella

delle FRTL-5 (24% vs 62%) e rispetto ai cloni stabilmente transfettati con il plasmide pEGFPC3 vuoto (45%) o con la forma *wild type* di Smad4 (54%).

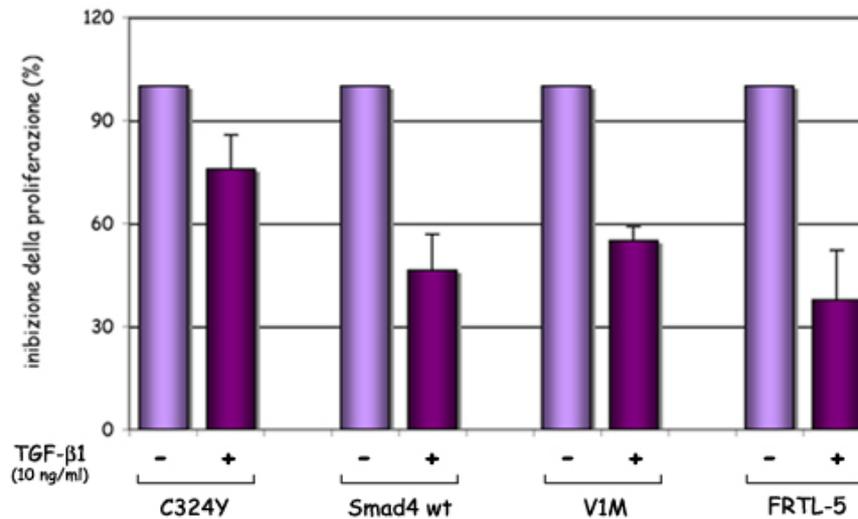


Figura 18. Saggio di proliferazione delle cellule FRTL-5 e dei cloni C324Y, V1M e Smad4 wt. Per ogni tipo cellulare sono state piastrate 100×10^3 cellule, mantenute in coltura in condizioni basali o in presenza di 10 ng/ml di TGF-β1 e contate dopo 48 ore. Nel grafico sono riportate le percentuali di inibizione dopo il trattamento con il fattore di crescita.

Le FRTL-5 rappresentano un modello tiroideo normale la cui proliferazione è strettamente dipendente dalla presenza nel mezzo di una miscela di 6 ormoni (6H), tra i quali i più importanti sono il TSH e l'insulina. La capacità proliferativa del clone C324Y è stata valutata anche in particolari condizioni di crescita, mantenendo le cellule in presenza della miscela 6H, in assenza della sola insulina o in assenza del solo TSH. Le curve di crescita sono state effettuate piastrandolo 100×10^3 cellule e contandole dopo 24, 48, 72 e 96 ore. I dati ottenuti dimostrano che il clone C324Y (figura 19 A e C) presenta una maggiore capacità di crescere in assenza di TSH, rispetto alle cellule di controllo FRTL-5 (figura 19 B). Tutti insieme questi dati dimostrano che la presenza della mutazione Smad4 C324Y conferisce alle cellule tiroidee non solo una resistenza all'azione di inibizione della proliferazione del TGF-β, ma anche una certa indipendenza dall'ormone tireotropo.

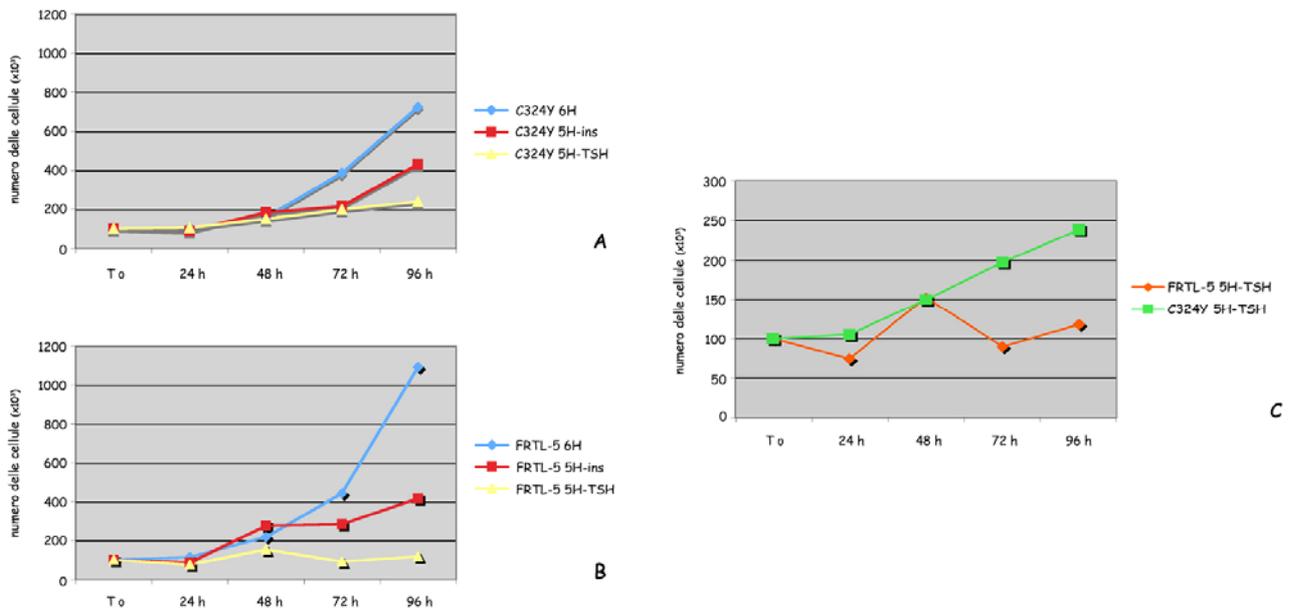


Figura 19. Curve di crescita del clone C324Y e FRTL-5 in particolari condizioni di deprivazione dei fattori di crescita. Le curve di crescita sono state effettuate piastrando 100×10^3 cellule e mantenendole in coltura in mezzo completo della miscela di 6 ormoni (6H) o in mezzo privo di insulina (5H-ins) o in mezzo privo di TSH (5H-TSH). Le cellule sono state contate dopo 24, 48, 72 e 96 ore.

Test di clonogenicità clone Smad4 C324Y.

La capacità delle cellule in esame di formare cloni è stata verificata mediante saggi di clonogenicità ovvero test di proliferazione *in vitro* in grado di valutare la capacità di una singola cellula di formare un clone costituito da almeno 50 cellule (Franken N.A.P. et al., 2006).

Le cellule FRTL-5 e i cloni contenenti la mutazione C324Y di Smad4 o il pEGFPC3 vuoto sono stati piastrati ad una diluizione elevata (300 cellule) in piastre Petri da 35 mm e mantenuti in coltura fino alla 6^a duplicazione, sia in condizioni basali sia in presenza di 10 ng/ml di TGF- β 1, e i cloni ottenuti sono stati colorati e contati dopo un periodo di 10 giorni. I risultati dimostrano (figura 20) che il clone C324Y forma una media di 188 colonie, la maggior parte delle quali di dimensioni inferiori a 50 cellule, mentre le cellule di controllo rappresentate dalle FRTL-5 e dal clone contenente il solo

plasmide vuoto formano una media di 90 colonie, tutti costituiti da più di 50 cellule, e che in presenza di TGF- β 1 tutte le cellule esaminate non sono in grado di formare i cloni.

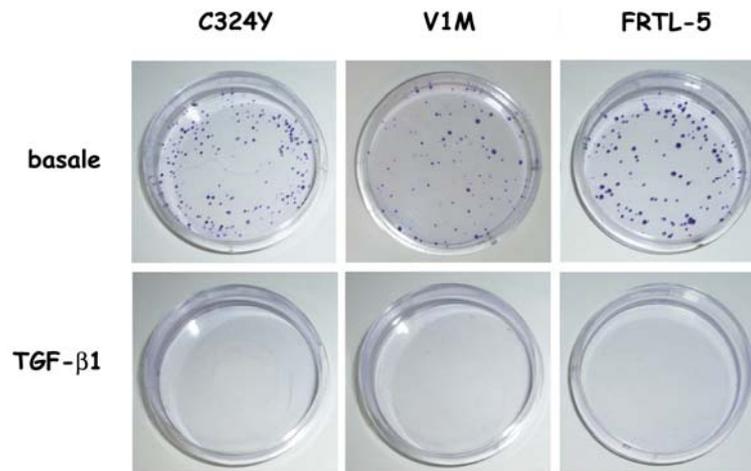


Figura 20. Saggio di clonogenicità sui cloni C324Y e V1M e sulle cellule FRTL-5. La capacità delle cellule di formare cloni in presenza o meno di TGF- β 1 10 ng/ml, è stata valutata attraverso saggi di clonogenicità. Come descritto in "Materiali e Metodi", le cellule sono state piastrate ad una forte diluizione e fatte crescere fino alla 6^a duplicazione. Dopo la fissazione e la colorazione con una soluzione di glutaraldeide 6% e crystal violetto 0,5%, i cloni sono stati fotografati e contati.

I risultati ottenuti dimostrano ulteriormente che il clone C324Y ha una maggiore tendenza proliferativa, rispetto ai controlli, e che la minore dimensione delle colonie possa essere imputata ad alterazioni delle interazioni omofiliche tra le cellule. Poiché la E-caderina è uno dei principali mediatori di questa interazione abbiamo effettuato analisi Western Blot per valutare i livelli di espressione di tale proteina. I dati ottenuti dimostrano che i livelli della E-caderina nel clone C324Y sono significativamente più bassi rispetto a quelli ottenuti nelle FRTL-5 e nel clone contenente il solo plasmide vuoto (figura 21). Nell'insieme i risultati ottenuti dimostrano che la mutazione C324Y di Smad4 conferisce alle cellule tiroidee alcune caratteristiche tipiche delle cellule trasformate, quali l'indipendenza dal controllo dei fattori di crescita, la riduzione di E-caderina che caratterizza l'avvio dell'EMT, che

lasciano pensare ad un suo ruolo importante nel processo di trasformazione neoplastica tiroidea.

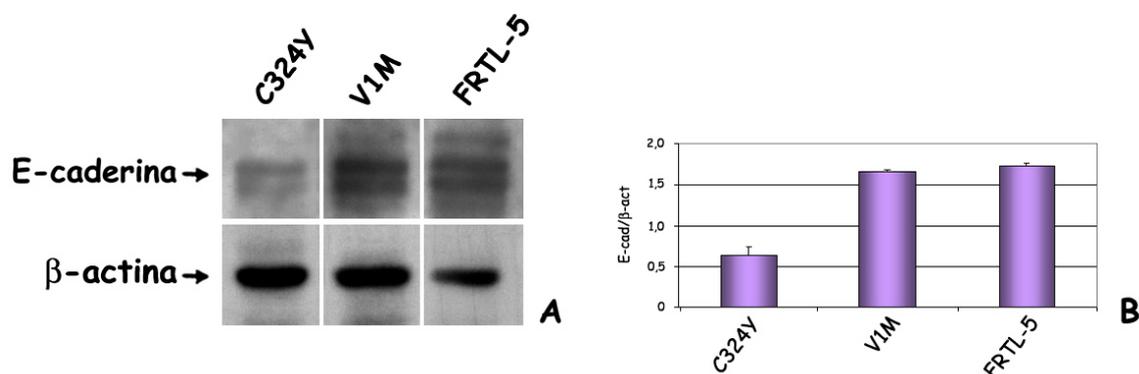


Figura 21. Espressione della E-caderina nei cloni C324Y e V1M e nelle FRTL-5. Le cellule sono state trattate con o senza con 10 ng/ml di TGF- β 1 per 24 ore. Come descritto in "Materiali e Metodi", le cellule sono state lisate, le proteine sono state separate attraverso una corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti, trasferite su nitrocellulosa e le membrane sono state incubate con l'anticorpo specifico per la E-caderina. L'immagine mostra che il clone C324Y ha una diminuita espressione delle E-caderina. Il pannello B mostra l'esame densitometrico delle bande.

Studio della capacità di crescita ancoraggio-indipendente del clone Smad4 C324Y.

La "crescita in soft agar", rappresenta uno dei metodi più usati per discriminare il comportamento delle cellule trasformate da quello delle cellule normali. Pertanto, abbiamo studiato la capacità di crescere in soft agar del clone Smad4 C324Y, del clone V1M contenente il plasmide vuoto e del controllo FRTL-5. Tutte le cellule sono state piastrate in soft agar in presenza o meno di 10 ng/ml di TGF- β 1, mantenute in coltura per circa 20 giorni e dopo questo periodo i cloni presenti sono stati contati al microscopio. I risultati ottenuti dimostrano che il clone C324Y ha una spiccata capacità di formare cloni, rispetto alle FRTL-5 che sono incapaci di crescere in condizione ancoraggio indipendente e rispetto al clone V1M, esprime il plasmide vuoto, che forma un numero bassissimo di colonie (figura 22). Pertanto, la mutazione

C324Y di Smad4, conferisce alle cellule che la esprimono stabilmente anche un fenotipo trasformato.

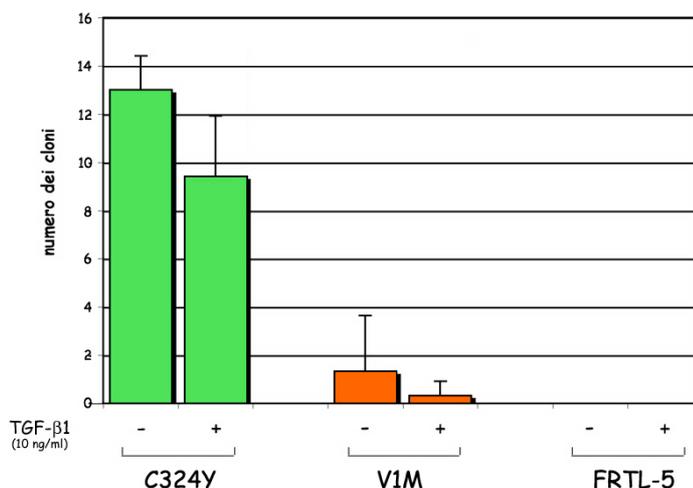


Figura 22. Saggio di crescita in soft agar dei cloni C324Y e V1M e delle cellule FRTL-5. Per ogni tipo cellulare sono state piastrate 100×10^3 cellule in soft agar e mantenute in coltura per 20 giorni a 37°C in presenza o meno di 10 ng/ml di TGF- β 1. Al termine di questo periodo i cloni sono stati contati al microscopio ottico.

Studio della capacità di aderire e di migrare del clone Smad4

C324Y.

L'acquisizione della capacità di crescere in condizioni ancoraggio indipendente costituisce un evento importante nei processi di invasione e di metastatizzazione, che correlano con la capacità delle cellule di migrare e invadere lo stroma circostante.

Al fine di determinare se la mutazione C324Y sia effettivamente in grado di favorire il comportamento invasivo, abbiamo condotto saggi di adesione e di migrazione *in vitro*.

I saggi di adesione sono stati effettuati piastrando le cellule FRTL-5, i cloni V1M, Smad4 *wt* e C324Y in pozzetti rivestiti con i substrati fibronectina (FN), laminina (LM) e collagene IV (IV) e lasciando aderire le cellule per 1 ora. I risultati ottenuti dimostrano che le cellule esprimenti la mutazione C324Y hanno una capacità di aderire

ai substrati FN, LM e collagene IV, significativamente inferiore (rispettivamente del 30, 38 e 37% vs FRTL-5) rispetto a quella ottenuta nei controlli FRTL-5, V1M e Smad4 *wt*, la cui adesione ai vari substrati è risultata comparabile (figura 23).

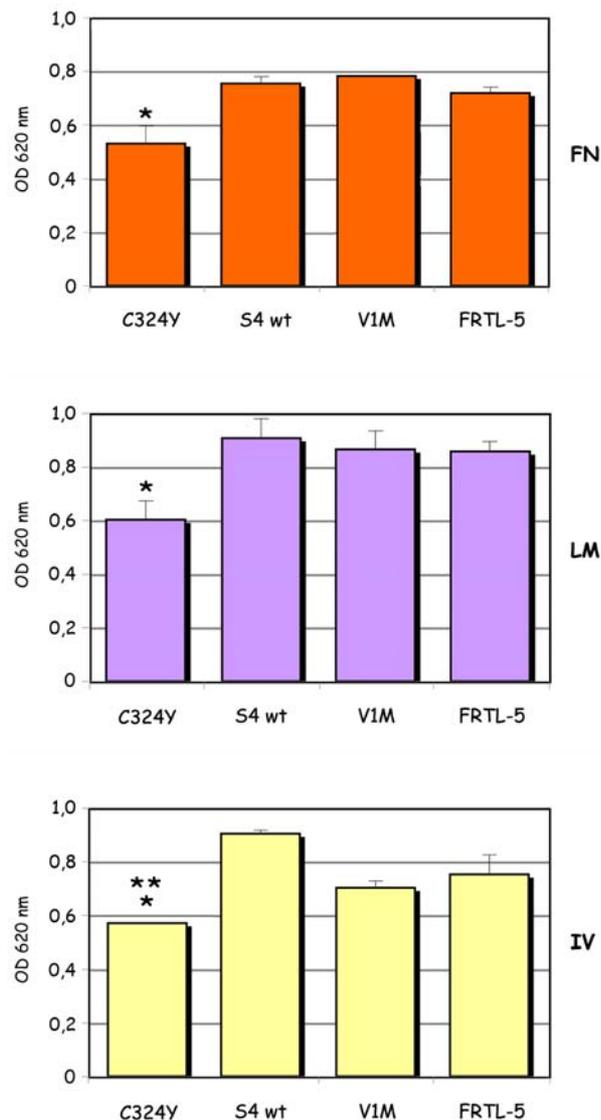


Figura 23. Adesione alla FN, alla LM e al collagene IV dei cloni C324Y e V1M, S4 *wt* e delle cellule FRTL-5. Le cellule sono state saggiate per la loro capacità di aderire al fondo di pozzetti ricoperti in precedenza con 2-3 μg /pozzetto di FN, LM, collagene IV o BSA. Come descritto in "Materiali e Metodi", a fine incubazione le cellule sono state fissate e colorate con il crystal 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 ($\text{OD} < 0,5$). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando lo *Student's t-test* e la significatività è stata calcolata rispetto ai controlli FRTL-5 e al clone esprime Smad4 *wt* (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

I saggi di migrazione sono stati condotti in presenza o meno di 10 ng/ml di TGF- β 1, utilizzando transwell e lasciando migrare le cellule verso il chemoattrattante LM per 8 ore. I risultati ottenuti dimostrano che il clone C324Y, migra fortemente e significativamente verso la LM e questo comportamento viene ulteriormente favorito dal trattamento con il TGF- β 1. Tutte le linee di controllo presentano scarsa o nulla capacità di migrare (figura 24).

In conclusione, anche i dati di adesione e migrazione dimostrano che la mutazione di Smad4 C234Y, è responsabile non solo dell'acquisizione di alcune caratteristiche delle cellule trasformate ma anche dell'acquisizione della capacità di migrare delle cellule trasformate, che è compatibile con il fenotipo metastatico nelle cellule che la esprimono.

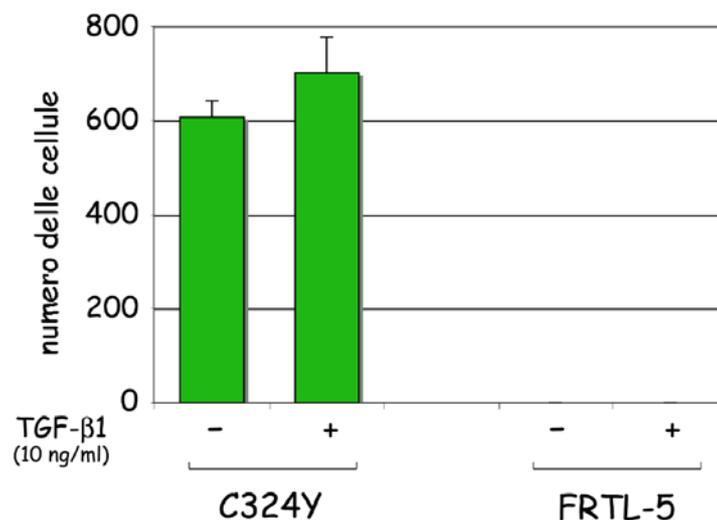


Figura 24. Test di chemiotassi del clone C324Y e cellule FRTL-5. Come descritto in "Materiali e Metodi", le cellule sono state risospese in mezzo senza siero contenente lo 0,2% di BSA e saggate per la loro capacità di migrare attraverso filtri di policarbonato usando come chemoattrattante la LM (40 μ g/ml). I dati graficati sono la media +SD del numero delle cellule migrate contate in 10 campi differenti, in tre esperimenti indipendenti.

DISCUSSIONE

Il TGF- β è un importante fattore di crescita, normalmente espresso e secreto nelle cellule epiteliali follicolari di tiroide, che svolge un ruolo importante 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. e 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 e i suoi mediatori tra cui le proteine Smad hanno un ruolo molto complesso nel processo di carcinogenesi, con attività sia di soppressori tumorali sia di oncogeni a seconda del particolare tipo di tumore e dello stadio della progressione maligna (Bachman K.E. e Park B.H., 2005). Il TGF- β svolge, senza dubbio, un importante ruolo anche nel controllo del processo metastatico sebbene, a tutt'oggi, non sia ancora stato chiarito completamente il suo meccanismo di azione.

La proteina Smad4 è una componente importante della via del segnale del TGF- β , e rappresenta un nodo di convergenza nella via delle Smad a valle dei recettori del TGF- β , complessandosi non solo con le R-Smad attivate dal TGF- β e dalle Activine, Smad2 e Smad3, ma anche con le R-Smad attivate dalle BMP, Smad1, Smad5 e Smad8 (Attisano L. e Lee-Hoeflich S.T., 2001). Smad4 è un gene oncosoppressore la cui delezione o inattivazione si osserva in circa il 50% dei carcinomi pancreatici e in più del 30% dei carcinomi gastro intestinali (Schutte M. et al., 1996). In un'ampia casistica di tumori tiroidei umani di vario istotipo, è stato dimostrato che Smad4 è

mutato con una frequenza del 27% (Lazzereschi D. et al., 2005). Le mutazioni di Smad4 ricadono prevalentemente nel dominio MH2 e nella regione *linker* (46,5%), che raramente è mutata negli altri tipi di tumore, e in minor numero nel dominio MH1 (6,5%), lasciando così ipotizzare che possa trattarsi di un *pattern* di mutazioni specifico dei tumori tiroidei. Le mutazioni di Smad4, oggetto di questo studio, sono state isolate da carcinomi papilliferi, che rappresentano i più frequenti tra i tumori maligni della tiroide (60-70% di tutti i carcinomi tiroidei), e dalle loro metastasi. In particolare abbiamo selezionato le mutazioni di Smad4 A226T, N263S, e P550S, provenienti da carcinomi papilliferi primitivi e la mutazione C324Y proveniente da una metastasi linfonodale. Le mutazioni A226T, N263S ricadono nella regione *linker* mentre le mutazioni C324Y e P550S ricadono nel dominio C-terminale MH2 della proteina.

I nostri dati hanno dimostrato che le mutazioni A226T, N263S e P550S non interferiscono con il segnale del TGF- β sia nel modello MDA-MB468, Smad4 "null" (Schutte M. et al., 1996), sia nei cloni ottenuti per transfezione stabile del modello cellulare normale FRTL-5 (Ambesi-Impiombato F.S. et al., 1980), mentre l'iperespressione della mutazione C324Y nelle cellule tiroidee, determina una significativa attivazione della via del segnale del TGF- β , sia in condizioni basali che dopo trattamento con il TGF- β . Poiché la mutazione C324Y è stata isolata da una metastasi linfonodale di un carcinoma papillifero tiroideo primario che non presentava nessuna mutazione, la presenza di tale mutazione potrebbe essere considerata un evento ad insorgenza tardiva con un ruolo importante nell'acquisizione del fenotipo metastatico. E' noto, infatti, che il TGF- β nelle cellule che vanno verso la progressione

tumorale non svolge più un effetto antiproliferativo o proapoptotico, ma piuttosto promuove l'invasività e la metastasi (Rahimi R.A. e Leof E.B., 2007). I saggi di proliferazione eseguiti sul clone C324Y, dimostrano, infatti, che esso è resistente all'inibizione della proliferazione indotta da TGF- β . Inoltre, se mantenuto in coltura in assenza di TSH il clone C324Y, pur rimanendo piuttosto dipendente da TSH ed insulina per la proliferazione, presenta una maggiore capacità di crescere, rispetto alle cellule di controllo FRTL-5. I nostri risultati, pertanto, dimostrano che la presenza di questa mutazione in un modello tiroideo normale, pur non modificando l'espressione di marcatori di differenziazione tiroidea, quali tireoglobulina o TSH-R, influenza significativamente la risposta proliferativa al TGF- β . E' stato ampiamente dimostrato che il TGF- β è uno dei maggiori regolatori del processo di transizione epitelio-mesenchimale o EMT (Leivronen S.K. et al., 2007), e che tale processo in condizioni patologiche rappresenta uno dei primi eventi che caratterizzano l'acquisizione del fenotipo metastatico. L'acquisizione di un fenotipo mesenchimale, infatti, conferisce alle cellule caratteristiche di maggiore mobilità. Uno degli eventi fondamentali di tale processo è rappresentato dalla riduzione dell'espressione di marcatori di differenziazione epiteliali, come la E-caderina (Miettinen P.J. et al., 1994).

I nostri risultati dimostrano che il clone C324Y esprime ridotti livelli di E-caderina, molecola implicata nelle interazioni omofile cellule-cellula. La riduzione di E-caderina segna l'avvio dell'EMT, ed è responsabile della scarsa capacità di queste cellule di formare cloni con un numero di cellule superiore a 50 quando sono coltivate in condizioni di estrema diluizione.

I nostri dati, inoltre, dimostrano che la presenza della mutazione C324Y nelle cellule tiroidee, è responsabile dell'acquisizione di un fenotipo trasformato, valutato come capacità di crescita in condizione ancoraggio indipendente. Tale capacità, infatti, è peculiare delle cellule tumorigeniche ed è strettamente legata al loro grado di malignità. Il clone C324Y è dotato di spiccata capacità di crescita in condizione ancoraggio indipendente, rispetto alle cellule FRTL-5, che in condizioni basali non formano nessun clone.

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). Gli esperimenti di adesività e i saggi di migrazione dimostrano che le cellule esprimenti la mutazione C324Y hanno una minore capacità di adesione verso i substrati fibronectina, laminina e collagene IV e una spiccata e significativa capacità di migrare verso la laminina rispetto al controllo FRTL-5.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che la mutazione C324Y di Smad4 conferisce alle cellule tiroidee alcune caratteristiche tipiche delle cellule trasformate, rappresentando un evento tardivo che spinge la cellula ad assumere un fenotipo metastatico.

In questi ultimi anni sono state definite la basi genetiche ed epigenetiche di molte patologie neoplastiche tiroidee, è noto che le alterazioni di oncogeni come RET/PTC,

NTRK e BRAF svolgono un ruolo importante nella genesi dei carcinomi papilliferi. La maggior parte dei pazienti affetti da tale patologia ha una buona prognosi, ma un certo numero di pazienti che presenta una estesa invasione locale e la presenza di metastasi a distanza, non risponde ai comuni trattamenti chemioterapici e ha pertanto una prognosi molto sfavorevole. La comprensione dei meccanismi specifici coinvolti nel processo di invasività e metastatizzazione tiroidea rappresenta un punto critico al fine di sviluppare nuove strategie terapeutiche specifiche per il trattamento di questi pazienti. I nostri risultati dimostrano che la mutazione di Smad4 C324Y svolge un ruolo importante non solo nel processo di trasformazione, ma anche di invasività e metastatizzazione tiroidea. Ulteriori studi sono in corso per chiarire il ruolo delle interazioni tra questa mutazione e vari oncogeni alterati nei carcinomi tiroidei nel controllo della migrazione e dell'adesività delle cellule tiroidee.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che Smad4 svolge un ruolo importante nel processo di carcinogenesi tiroidea. Tale ruolo dovrà, comunque, essere ulteriormente chiarito affinché Smad4 possa essere considerato un target diagnostico o terapeutico.

PARTE SPERIMENTALE II

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi dieci anni, l'incidenza del carcinoma tiroideo ha subito un significativo incremento (Davies L. e Welch H.G., 2006), diventando nel sesso femminile uno dei 10 tumori più frequenti negli Stati Uniti (Jemal A. et al., 2007). Numerosi studi condotti *in vivo* ed *in vitro*, hanno dimostrato che numerosi oncogeni ed oncosoppressori sono coinvolti, conferendo particolari comportamenti biologici, nella genesi di questi tumori. Il TGF- β svolge un importante ruolo nel processo di trasformazione tumorale della cellula tiroidea, e senza dubbio, anche nel controllo del processo metastatico sebbene, a tutt'oggi, non è ancora stato chiarito completamente il suo meccanismo di azione.

Le linee cellulari umane, derivate da tumori, rappresentano un ottimo modello per condurre studi sui meccanismi molecolari coinvolti nelle cancerogenesi, pertanto al fine di chiarire se alterazioni della via del segnale del TGF- β e, in particolare, alterazioni della proteina Smad4, siano coinvolte nella genesi dei carcinomi papilliferi tiroidei, che sono i più frequenti tra i tumori maligni della tiroide (60-70% di tutti i carcinomi tiroidei), abbiamo utilizzato alcune linee cellulari ottenute da carcinomi papilliferi tiroidei umani: TPC-1 e BCPAP. Su tali linee abbiamo studiato estensivamente l'espressione della via di segnale del TGF- β ed il suo funzionamento.

MATERIALI E METODI

Anticorpi e Reagenti. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: anti-Smad2/3 (BD Biosciences Pharmingen, CA), diluito 1:500; anti-Smad4 (Smad4 B8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:500 e anti β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:5000. Inoltre, sono stati usati i seguenti anticorpi policlonali: anti-T β RI e anti-T β RII (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluiti 1:600; anti fosfo-Smad2 (Smad2-P) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), diluito 1:1000 e anti-GFP ("Green Fluorescent Protein") (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluito 1:500.

Colture cellulari. Le linee cellulari tumorali umane di tiroide TPC-1 e BCPAP (Pang X.P. et al., 1989; Smanik P.A. et al., 1994; Iuliano R. et al., 2003) sono state mantenute in coltura nel mezzo Dulbecco modificato da Eagle (D-MEm) contenente il 10% di siero fetale di bovino (FBS), L-Glutamina (2 mM), penicillina e streptomina (0,1 mg/ml) forniti da Sigma-Aldrich. Le cellule FRTL-5 sono un clone della linea cellulare tiroidea normale di ratto Fischer depositata presso l' *American Type-Culture Collection* (ATCC # 8305), Rockville, Maryland. Questa linea cellulare, come già dimostrato da Ambesi-Impiombato F.S. et al., 1980, mantiene le caratteristiche funzionali di assorbimento dello ioduro, la capacità di sintetizzare la tireoglobulina (TG) e il metabolismo dei nucleotidi ciclici per periodi prolungati di tempo e ha un tipico tempo di raddoppiamento in coltura di circa 36 ore. Le FRTL-5 usate nel nostro laboratorio sono un subclone (F1) gentilmente fornito dal Dr Kohn L.D. (Nhi MD-Bethesda), diploide tra il 5° e il 25° passaggio, non in grado di proliferare in assenza di TSH (Cirafici A.M. et al., 1992; Coppa A. et al., 1995; Napolitano G. et al., 2000). Le cellule

sono state coltivate in mezzo F12 modificato da Coon, integrato con il 5% di siero di vitello (BS) e una miscela di 6 ormoni (6H) contenente: TSH (10 mU/ml), insulina (10 µg/ml), idrocortisone ($10^{-8}M$), transferrina (5 µg/ml), glicina-L-istidina-L-lisina acetato (10 ng/ml) e somatostatina (10 µg/ml). Le cellule sono state passate ogni 7-8 giorni e il cambio del mezzo è stato eseguito mediamente ogni 2-3 giorni. La linea cellulare di tumore tiroideo anaplastico, FRO (Motti M.L. et al., 2005), la linea cellulare di tumore tiroideo follicolare, FTC133 (Hoelting T. et al., 1995), e la linea cellulare di tumore della mammella MDA-MB468 (Shutte M. et al., 1996), sono state mantenute in coltura con mezzo DMem contenente il 10% di siero fetale di bovino (FBS), L-Glutamina (2 mM), penicillina e streptomina (0,1 mg/ml) forniti da Sigma-Aldrich. Tutte le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in un incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Le cellule sono state trattate con l'isoforma umana ricombinante del TGF-β1, acquistata dalla Peprotech, con le concentrazioni indicate nei vari esperimenti.

Saggi di proliferazione. L'effetto inibitorio del TGF-β1 sulla proliferazione cellulare è stato valutato piastrando 50×10^3 cellule in piastre da 35 mm. Dopo una notte di incubazione, le cellule sono state coltivate in mezzo fresco contenente o meno 10 ng/ml di TGF-β1 (Peprotech). Dopo 48 ore di trattamento, le cellule sono state contate utilizzando un emocitometro.

Costrutti. Smad4 etichettato con la GFP è stato ottenuto subclonando il gene SMAD4 umano nel vettore pEGFPC3 CLONTECH che permette la fusione "in frame"

del gene con il 3' della sequenza della GFP (vedi figura 11, parte sperimentale 1). Sono stati utilizzati, inoltre, i plasmidi pCMV5 p3TP-Lux, pCMV5- β Gal e pCMV5 FLAG-Smad2 *wt*.

Saggi di luciferasi. Le cellule FRTL-5, TPC-1 e BCPAP sono state seminate (70% di confluenza) in triplicato in piastre da 24 pozzetti e il giorno successivo sono state transfettate utilizzando la tecnica della lipofectamina (LipofectAMINE PLUS-GIBCO BRL, Life Technologies) seguendo le istruzioni del produttore. La transfezione è stata effettuata con i plasmidi pCMV5 3TP-Lux e pCMV5- β Gal, per un totale di DNA di 0,5 μ g/200 μ l/pozzetto. 24 ore dopo la transfezione, le cellule sono state trattate o meno con 10 ng/ml di TGF- β 1 diluito in mezzo contenente lo 0,1% di siero e lasciate ad incubare per altre 24 ore. L'attività luciferasica è stata misurata utilizzando il protocollo della luciferasi suggerito da Promega Corporation e normalizzata per l'efficienza di transfezione, utilizzando il vettore esprime la β -galattosidasi (Sambrook J. et al., 1989). Ogni risultato è la media di tre diversi esperimenti.

Western Blot. Le cellule a subconfluenza sono state stimulate o non per 30 minuti con 10 ng/ml di TGF- β 1 (Peprotech) e poi lisate per 30 minuti a 4°C, utilizzando il tampone di estrazione TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM di EDTA, 1% TRITON X-100) aggiunto di 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), della miscela di inibitori delle proteasi contenente leupeptina (1 μ g/ml), aprotinina (2,5 μ g/ml) e idrocloruro di benzammide (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), e della miscela di inibitori delle fosfatasi (Sigma-

Aldrich, Co.-St. Louis, MO). I lisati cellulari sono stati, quindi, centrifugati a 15000g per 5 minuti a 4°C e la quantificazione della concentrazione proteica è stata eseguita utilizzando un metodo colorimetrico Bio-Rad (Bio-Rad Laboratori, Hercules, CA). Le proteine (40 µg o 80 µg) dei diversi estratti cellulari sono state separate elettroforeticamente in un gel al 10% di (SDS)-poliacrilamide in condizioni riducenti e, quindi, trasferite elettricamente su filtri di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Dussel, Germania). Le membrane sono state bloccate con il 3% di albumina sierica bovina (BSA) in tampone TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,1% di Tween-20, pH 7,6) e poi incubate con anticorpi policlonali specifici per i recettori di tipo I e II del TGF-β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), l'anticorpo policlonale specifico per la forma fosforilata di Smad2 (Smad2-P) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), con l'anticorpo monoclonale specifico per Smad2/3 (BD Biosciences Pharmingen, CA), con l'anticorpo monoclonale specifico per Smad4 (Smad4 B8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Gli estratti proteici delle cellule TPC-1 e BCPAP transfettate in modo transiente, sono stati ottenuti seguendo lo stesso protocollo di estrazione descritto precedentemente. Le membrane, ottenute trasferendo elettricamente le proteine totali delle TPC-1 e BCPAP separate mediante corsa elettroforetica in gel di (SDS)-poliacrilamide al 10% in condizioni riducenti, sono state incubate sequenzialmente con un anticorpo policlonale specifico per la "Green Fluorescent Protein" (GFP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), e per la β-actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari, le membrane sono state lavate e incubate con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano, diluiti nel tampone di blocco TBS-T.

L'immunoreattività è stata rilevata utilizzando un kit in grado di potenziare la chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate-PIERCE, Rockford-U.S.A.) e visualizzata su lastre CL-Xposure Film (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Quantificazione delle bande. Le bande dei Western Blot sono state analizzate e l'intensità media delle bande è stata determinata utilizzando il software Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). I dati sono stati raccolti come rapporti fra l'intensità media delle bande di Smad4 e l'intensità media delle bande della β -actina, e importati in un foglio di calcolo (Excel, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Frazionamento subcellulare. Le frazioni proteiche citosoliche e nucleari sono state preparate risospendendo le cellule FRTL-5, TPC-1 e BCPAP, trattate o meno con 10 ng/ml di TGF- β 1 per 30 minuti, 1 o 2 ore, in 0,4 ml di tampone ipotonico (10 mM HEPES pH 7,4, 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂) contenente una miscela di inibitori delle proteasi (leupeptina, 1 μ g/ml, aprotinina, 2,5 μ g/ml e idrocloruro di benzamide, 1 μ g/ml, forniti dalla Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO). La frazione citosolica è stata ottenuta mediante centrifugazione a 200g per 10 minuti dopo aver separato i nuclei e le membrane cellulari, e chiarificato mediante centrifugazione a 13000rpm per 1 ora a 4°C. La frazione nucleare è stata ottenuta, invece, risospendendo il pellet rimasto dopo l'estrazione della frazione citosolica, con il tampone C (20 μ M HEPES pH 7,4, 25% glicerolo, 0,42 M NaCl, 1,5 μ M di MgCl₂, 0,2 μ M di EDTA), contenente gli inibitori delle proteasi leupeptina (1 μ g/ml), aprotinina (2,5 μ g/ml), idrocloruro di benzamide

(1 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), 86 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO), e 0,086 M ditiotreitolo, dopo aver eseguito diversi lavaggi con il tampone A (10 mM Hepes pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM di MgCl_2 , 0,1 μM di EDTA). Quantità equivalenti di proteine dei diversi campioni (40 μg /pozzetto per Smad2 e Smad2-P o 80 μg /pozzetto per Smad4) sono state separate elettroforeticamente in un gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) al 10% in condizioni riducenti e, quindi, trasferite elettricamente su filtri di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Dussel, Germania). Le membrane sono state, quindi, ibridate sequenzialmente con l'anticorpo policlonale specifico per Smad2-P, diluito 1:1000 (Cell Signaling), con l'anticorpo monoclonale per Smad2/3, diluito 1:500 (BD Transduction Laboratories) e con l'anticorpo monoclonale per Smad4, diluito 1:500 (Smad4 B8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La visualizzazione delle bande è stata ottenuta incubando le membrane con un kit in grado di potenziare la chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate-PIERCE, Rockford-U.S.A.) ed esponendole a lastre CL-Xposure Film (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

La verifica del caricamento di uguali quantità di proteine è stata ottenuta mediante colorazione del gel di poliacrilamide con Blu di Coomassie 0,2% in metanolo e acido acetico glaciale.

Esperimenti di immunofluorescenza. Le cellule FRTL-5, MDA-MB468, e le cellule TPC-1 e BCPAP sono state seminate in numero di 25×10^3 cellule per pozzetto su un vetrino con 8 pozzetti trattate o non con 10 ng/ml di TGF- β 1 diluito in mezzo contenente il 1% di siero fetale di bovino (FBS) per 1 ora e, quindi, fissate per 5

minuti a temperatura ambiente con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate per 2 minuti a temperatura ambiente con metanolo assoluto. Le cellule, quindi, sono state incubate per 1 ora con l'anticorpo primario monoclonale specifico per Smad4 (Smad4 B8) o con l'anticorpo primario policlonale specifico per la GFP (FL) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluiti 1:25 in PBS e, successivamente, sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG o anti-rabbit IgG coniugato alla fluorescina FITC o alla rodamina (Jackson ImmunoResearch Labs), diluiti 1:100 in PBS, incubando per 30 minuti a temperatura ambiente. La colorazione dei nuclei è stata ottenuta utilizzando il 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI, Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO). La fluorescenza è stata osservata con un microscopio Olympus BX51 e fotografata a 40X di ingrandimento ottico.

RT-PCR. Gli RNA totali sono stati estratti dalle cellule utilizzando il Tri Reagent (Sigma-Aldrich, Co.-St. Louis, MO, T9424) e seguendo il protocollo fornito dal produttore. La qualità degli RNA è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al fine di confermare l'integrità del RNA e l'assenza di bande di peso molecolare elevato che di norma rappresentano contaminazioni da parte di DNA genomico. L'RNA, inoltre, è stato analizzato allo spettrofotometro per valutarne il grado di purezza ($A_{260}:A_{280} > 1.8$) e quantificarne la concentrazione. Un microgrammo di RNA totale è stato convertito in cDNA per trascrizione inversa, utilizzando la retrotrascrittasi MuLV (Applied Biosystems, New Jersey, USA) e i random primer (Roche, Germania), e seguendo le istruzioni del produttore. Le PCR sono state, quindi, eseguite attenendosi ad un protocollo che prevedeva una

denaturazione iniziale di 10 minuti a 94°C, e, a seguire, 35 cicli di 1 minuto di denaturazione a 94°C, 1 minuto di appaiamento degli oligonucleotidi con il template alla "temperatura di melting" (T_m), e 1 minuto di estensione a 72°C nel caso di tutti i cicli eccettuato l'ultimo, per il quale il tempo di estensione a 72°C è stato prolungato da 1 a 7 minuti. Al fine di garantire che nessuna contaminazione dei campioni si fosse verificata, in ogni PCR è stato incluso un "bianco" al quale non era stato aggiunto DNA. I prodotti della PCR sono stati, quindi, analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, colorati con etidio bromuro e visualizzati sotto i raggi UV. Le sequenze degli oligonucleotidi specifici per Smad4, utilizzati per le PCR, sono: Smad4-A 5'- CCTTGCAACGTTAGCTGTTG-3' For, 5'-CTTCAGTGGACAACGATG-3' Rev; Smad4-B 5'-CACTGCAGAGTAATGCTCC-3' For, 5'-GTCCACGTATCCATCAAC-3' Rev; Smad4-C 5'-GATGTTTCAGGTAGGAGAG-3' For, 5'-CCAACGGTAAAAGACCTCAG-3' Rev. I risultati delle PCR sono stati normalizzati rispetto all'espressione del gene "house-keeping" GAPDH utilizzando i seguenti oligonucleotidi disegnati sulla sequenza del gene del ratto: GAPDH 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' For, GAPDH 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' Rev.

Saggi di "Wound Healing". Le cellule TPC-1 e BCPAP sono state piastrate a confluenza in capsule di Petri da 35 mm di diametro. Al tempo 0 il monostrato di cellule è stato interrotto utilizzando un puntale di una pipetta P200 al fine di produrre una "ferita" in linea retta, e i frammenti di cellule sono stati rimossi mediante lavaggio della piastra prima di procedere all'aggiunta del mezzo senza siero. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4%

per 30 minuti a temperatura ambiente, esaminate con microscopio a contrasto di fase Observer 21 (Zeiss) e fotografate ad un ingrandimento 5X. Le immagini acquisite sono state ulteriormente analizzate quantitativamente utilizzando un software (Axiovision 4.6) in grado di stimare l'estensione della zona colonizzata dalle cellule durante l'intervallo di tempo considerato.

Transfezioni in transiente. Le cellule TPC-1 e BCPAP sono state piastrate in capsule di Petri di 100 mm di diametro ad una confluenza del 60-80% e sono state, poi, transfettate in modo transiente con i vettori vuoti o con i vettori pEGFPC3-Smad4 *wt* e pCMV5 FLAG-Smad2 *wt*, utilizzando la tecnica della lipofectamina (LipofectAMINE LipofectAMINE PLUS-GIBCO BRL, Life Technologies) e seguendo le istruzioni del produttore. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state utilizzate negli esperimenti di immunofluorescenza, nei saggi di luciferasi, nei saggi di proliferazione e negli esperimenti di *Wound Healing*.

Analisi statistiche. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando lo *Student's t-test* (* $P < 0.05$, significatività statistica, ** $P < 0.001$, alta significatività statistica).

RISULTATI

L'espressione di Smad4 nelle linee cellulari umane di carcinomi papilliferi tiroidei TPC-1 e BCPAP.

L'inattivazione o l'alterazione dell'espressione di Smad4 è stata frequentemente osservata in molti tipi di tumori. Le mutazioni del gene SMAD4 e la perdita di espressione della proteina sono eventi spesso associati all'insorgenza del fenotipo maligno e alla progressione tumorale (Hahn S.A. et al., 1996; Pasche B., 2001). L'espressione di Smad4 è stata analizzata nelle 2 linee cellulari umane di carcinoma papillifero della tiroide, TPC-1 e BCPAP, mediante analisi Western Blot condotta sui lisati proteici totali utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per la proteina Smad4 (Smad4 B8). Le linee cellulari FRTL-5 e linfociti B sono state introdotte negli esperimenti come controlli positivi mentre la linea MDA-MB468 è stata utilizzata come controllo negativo. La figura 25 A mostra che il livello di espressione di Smad4 è fortemente ridotto nelle TPC-1 e nelle BCPAP, rispetto al controllo FRTL-5. L'analisi densitometrica, effettuata valutando l'intensità media delle bande di Smad4 rispetto a quella delle bande di β -actina, ha confermato la significativa ipoespressione di Smad4 che è risultata del 69% nelle TPC-1 e del 75% nelle BCPAP, rispetto alle FRTL-5 (figura 25 B).

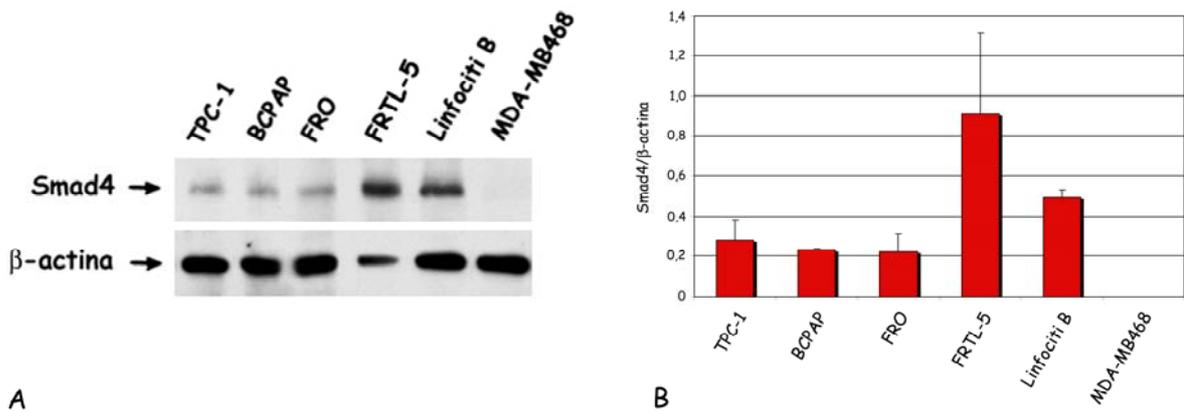


Figura 25. Espressione di Smad4 nelle linee cellulari di carcinomi papilliferi tiroidei TPC-1 e BCPAP. Le cellule sono state lisate, le proteine sono state separate in SDS-PAGE 10% effettuata in condizioni riducenti (pannello A), trasferite su nitrocellulosa e le membrane sono state incubate con l'anticorpo specifico per Smad4 (Smad4 B8). L'immagine mostra una significativa riduzione dell'espressione di Smad4 nelle linee cellulari TPC-1 e BCPAP come confermato dall'analisi densitometrica riportata nel pannello B.

L'espressione del gene Smad4 è stata studiata mediante la tecnica della RT-PCR utilizzando tre paia di oligonucleotidi in grado di amplificare le regioni corrispondenti alla porzione 5' (SMAD4-A for e SMAD4-A rev; 624 bp), centrale (SMAD4-B for e SMAD4-B rev; 626 bp) e 3' (SMAD4-C for e SMAD4-C rev; 682 bp) del trascritto (figura 26 A). Le PCR sono state effettuate sul cDNA delle linee cellulari tiroidee, TPC-1 e BCPAP, sul cDNA di una linea cellulare di carcinoma anaplastico della tiroide, FRO, e su una serie di controlli (linfociti B, MCF7). I risultati ottenuti dimostrano la presenza di amplificati specifici in tutte le linee esaminate, pertanto, riteniamo che la significativa ipoespressione della proteina Smad4, sia imputabile ad eventi epigenetici o post traduzionali che alterano o la normale produzione o la stabilità della proteina stessa (figura 26 B).

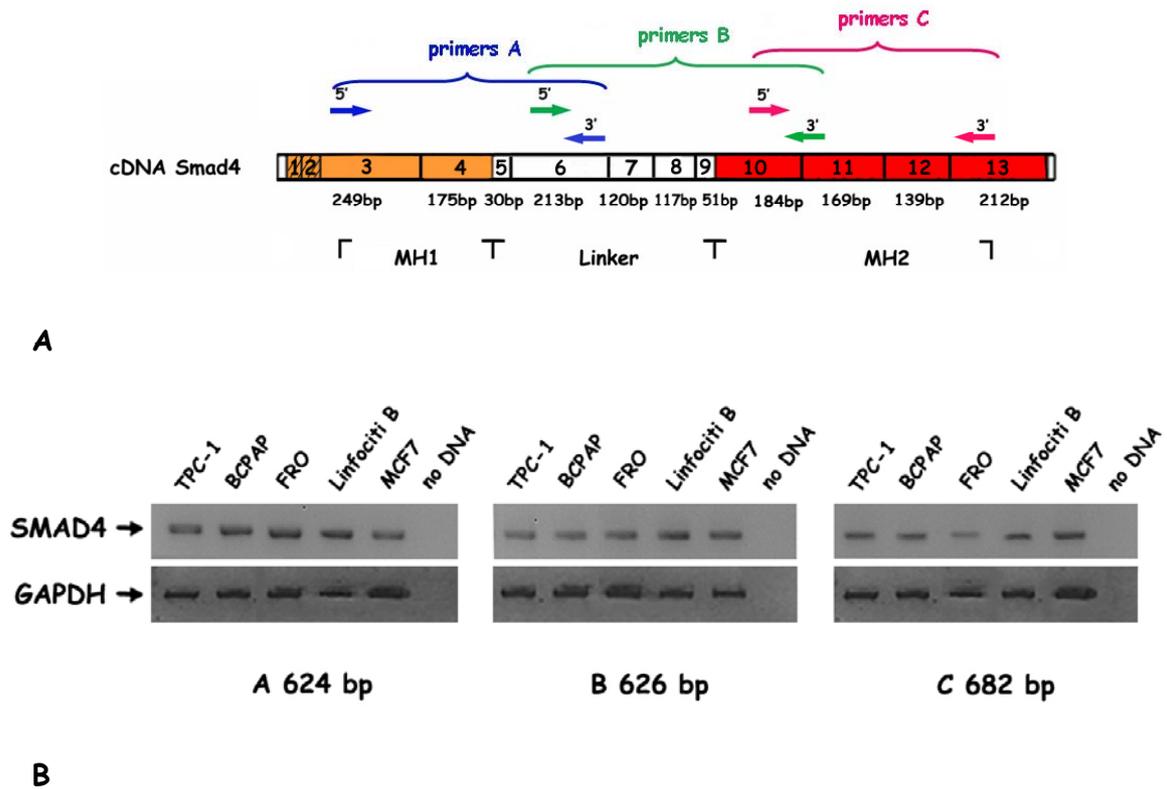


Figura 26. Espressione del gene SMAD4 nelle cellule TPC-1 e BCPAP. Nel pannello A è mostrato lo schema degli oligonucleotidi utilizzati, specifici per le regioni del trascritto di SMAD4 5' (SMAD4-A for e SMAD4-A rev; 624 bp), centrale (SMAD4-B for e SMAD4-B rev; 626 bp) e 3' (SMAD4-C for e SMAD4-C rev; 682 bp). Gli RNA totali estratti dalle cellule sono stati convertiti in cDNA per trascrizione inversa, utilizzando la retrotrascrittasi MuLV (Applied Biosystems, New Jersey USA) (pannello B). Oligonucleotidi specifici per il gene "house-keeping" GAPDH sono stati usati per normalizzare.

Attivazione della via del segnale del TGF- β nelle linee cellulari

TPC-1 e BCPAP.

La capacità di trasduzione del segnale TGF β -mediato nelle cellule TPC-1 e BCPAP è stata verificata mediante saggi di luciferasi, utilizzando il costrutto reporter p3TP-Lux il cui promotore, p3TP, è caratterizzato da 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 da una porzione del 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. e Kruijer W., 1990; Keeton M.R. et al., 1991).

Le cellule sono state transfettate in modo transiente con il costrutto reporter p3TP-Lux, e l'attività luciferasica è stata determinata in condizioni basali o dopo trattamento con 10 ng/ml di TGF- β 1 per 24 ore. I dati riportati nella figura 27 dimostrano che l'ipoespressione di Smad4 è responsabile di una significativa riduzione dell'attività trascrizionale dopo trattamento con il 10 ng/ml di TGF- β 1 per 24 ore, sia nelle TPC-1 sia nelle BCPAP (3,8 e 3,5 volte di induzione, rispettivamente) rispetto alle FRTL-5 (30 volte di induzione).

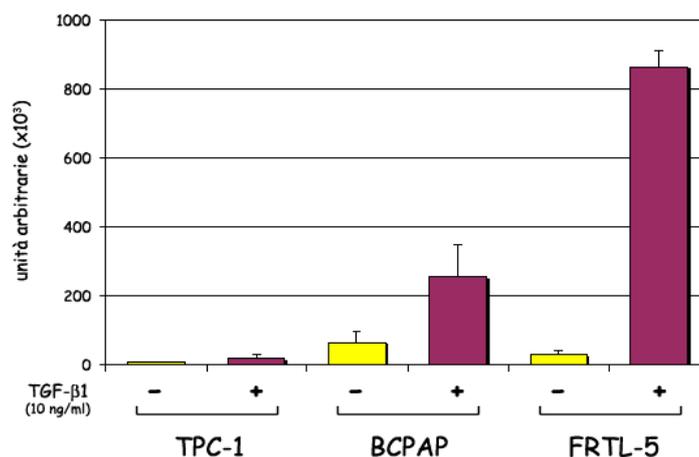


Figura 27. Attivazione della via del segnale del TGF- β nelle cellule TPC-1, BCPAP e FRTL-5. Le cellule TPC-1, BCPAP e FRTL-5, sono state transfettate in transiente con il costrutto reporter 3TP-Lux e trattate o meno con TGF- β 1 (10 ng/ml) per 24 ore. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte e l'attività luciferasica è stata espressa in unità arbitrarie come valore assoluto.

Espressione dei recettori T β RI e T β RII e della proteina Smad2 nelle linee TPC-1 e BCPAP.

Le componenti della via del segnale del TGF- β e i meccanismi molecolari che intervengono nella trasmissione dei segnali TGF β -mediati dai recettori di membrana ai geni bersaglio, sono stati ormai ben definiti. E' noto, infatti, che la trasduzione

intracellulare del segnale del TGF- β è avviata dalla formazione del complesso eterotetramerico recettoriale T β RI/T β RII a cui segue la fosforilazione attivante del T β RI da parte del T β RII. Il T β RI attivato riconosce e fosforila Smad2 e/o Smad3 (R-Smad) che traslocano nel nucleo, associate al partner comune Smad4, necessario per la formazione dei complessi trascrizionali funzionali. Mutazioni specifiche del T β RI, del T β RII e delle proteine Smad sono state riportate frequentemente in diversi tipi di tumore (Pasche B., 2001).

I livelli di espressione del T β RII, del T β RI e della R-Smad, Smad2, sono stati, pertanto, valutati attraverso analisi Western Blot. Come mostrato dalla figura 28 A, i risultati ottenuti dimostrano che il T β RII e il T β RI sono presenti nelle linee cellulari tiroidee in esame.

La funzione principale dell'eterodimero recettoriale è quella di fosforilare la R-Smad, Smad2 e/o Smad3. I Western Blot sui lisati proteici totali, utilizzando anticorpi specifici per Smad2/3 e per Smad2-P dimostrano che nelle linee cellulari TPC-1 e BCPAP la proteina Smad2 non solo è espressa a livelli comparabili ai controlli, ma viene anche normalmente fosforilata, dopo stimolazione di 30 minuti con 10 ng/ml di TGF- β 1 (figura 28 B). I risultati finora ottenuti, pertanto, dimostrano che nelle linee tiroidee esaminate, l'ipoespressione della proteina Smad4 non modifica in alcun modo la funzionalità del recettore di tipo I, che è in grado di fosforilare regolarmente il suo substrato, ma è responsabile dell'assenza della risposta trascrizionale al TGF- β , come dimostrato dai saggi di luciferasi condotti utilizzando il costrutto 3TP-Lux.

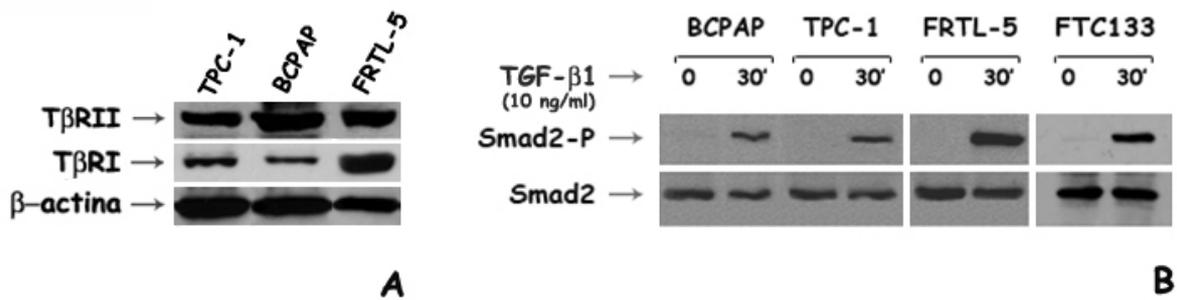


Figura 28. Espressione dei recettori TβRII e TβRI e della proteina Smad2 nelle linee cellulari TPC-1, BCPAP. Come descritto in "Materiali e Metodi", le proteine ottenute lisando le cellule trattate o meno con 10 ng/ml di TGF-β1 per 30 minuti, sono state risolte attraverso corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti e trasferite elettricamente su nitrocellulosa. I controlli positivi introdotti in questi esperimenti sono rappresentati dalle linee cellulari FRTL-5 e FTC133. Le membrane sono state incubate con gli anticorpi anti-TβRII e anti-TβRI (A) o con gli anticorpi anti-Smad2-fosforilato (anti-Smad2-P) e anti-Smad2 (B). L'avvenuto caricamento in ogni pozzetto di uguali quantità di proteine è stato valutato utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per la β-actina.

La traslocazione nucleocitoplasmatica delle proteine Smad.

La proteina Smad2, in seguito alla fosforilazione, interagisce con Smad4 in modo da formare il complesso trascrizionale attivato, Smad2-P/Smad4, che, una volta traslocato nel nucleo, svolge un ruolo cruciale nella regolazione trascrizionale dei specifici geni bersaglio, sia agendo direttamente sia mediante l'interazione con altri fattori di trascrizione (Shi Y. e Massagué J., 2003). I meccanismi molecolari che controllano la localizzazione subcellulare delle proteine Smad in risposta al TGF-β non sono ancora completamente conosciuti. Le R-Smad si localizzano e si accumulano nel nucleo in risposta al trattamento con il TGF-β e alla fosforilazione da parte dei recettori che determina l'esposizione della sequenza di localizzazione nucleare (NLS) (Xiao et al., 2000a, 2000b), mentre la localizzazione nucleare di Smad4, mediata anche essa dalla sequenza NLS, è favorita dalla formazione del complesso trascrizionale con Smad2/3 fosforilata, che blocca l'attività della sequenza di esporto nucleare, NES, costitutivamente attiva (Pierreux C.E. et al., 2000).

Al fine di chiarire se il trattamento con il TGF- β 1 delle linee tiroidee in esame, determinasse o meno la traslocazione nucleare di Smad2 e Smad4, abbiamo eseguito esperimenti di immunofluorescenza sulle cellule TPC-1, BCPAP e FRTL-5, stimulate o non per 1 ora con 10 ng/ml di TGF- β 1, utilizzando un anticorpo specifico per Smad2/3. Come mostrato nella figura 29 B, la localizzazione di Smad2 in seguito al trattamento con il TGF- β 1, risulta nucleocitoplasmatica nelle TPC-1 e nelle BCPAP e nucleare nelle FRTL-5.

Nelle stesse cellule è stata studiata la localizzazione di Smad4, inserendo anche un controllo negativo rappresentato dalle cellule MDA-MB468. I risultati ottenuti dimostrano che la traslocazione nucleare di Smad4 è debolissima nelle TPC-1 e BCPAP, ed è la causa della mancata risposta di queste cellule al trattamento con TGF- β (figura 30 A e B).

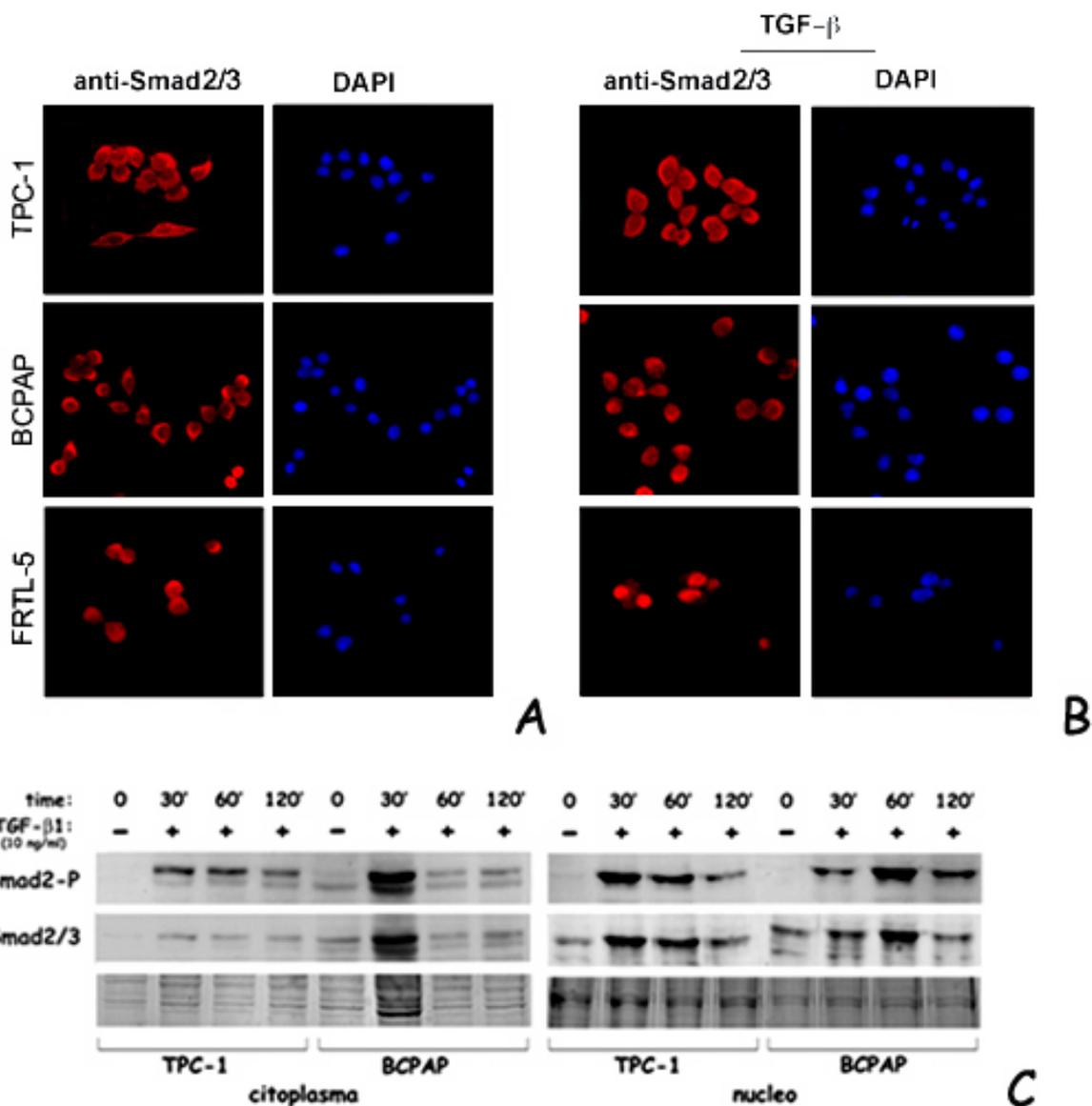


Figura 29. La localizzazione subcellulare della proteina Smad2. Espressione di Smad2/3 nelle cellule TPC-1, BCPAP e FRTL-5 trattate per 1 ora con 10 ng/ml di TGF-β1 (pannello B) o con il solo mezzo (pannello A). I nuclei sono stati colorati con il 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI). Le immagini sono state acquisite ad un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 ad un ingrandimento 40X. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (C) I livelli di espressione di Smad2-P, Smad2 sono stati valutati mediante analisi Western Blot sulle frazioni proteiche ottenute come descritto in "Materiali e Metodi" dalle cellule trattate o meno con 10 ng/ml di TGF-β1 per 30, 60 e 120 minuti. L'avvenuto caricamento in ogni pozzetto di uguali quantità di proteine è stato valutato mediante colorazione dei gel di poliacrilamide con Blu di Coomassie.

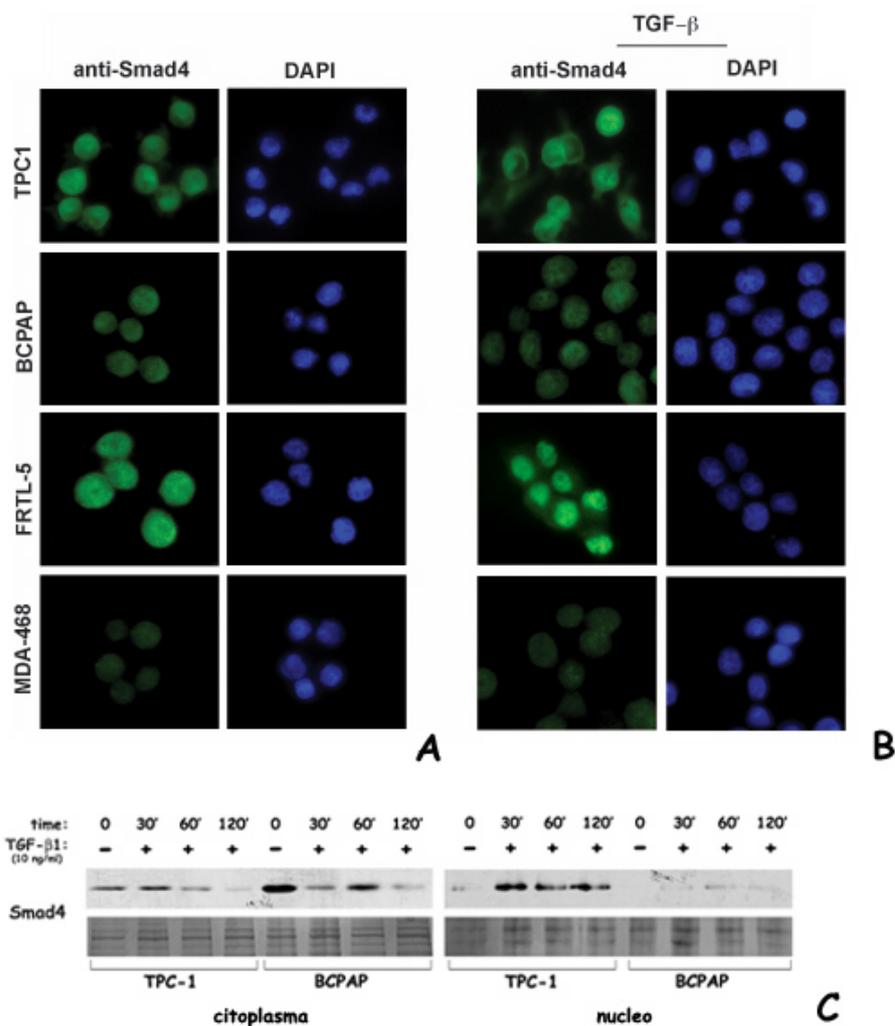


Figura 30. La localizzazione subcellulare della proteina Smad4. Espressione di Smad4 nelle cellule TPC-1, BCPAP, FRTL-5 e MDA-MB468, trattate per 1 ora con 10 ng/ml di TGF-β1 (pannello B) o con il solo mezzo (pannello A). I nuclei sono stati colorati con il 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI). Le immagini sono state acquisite ad un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 ad un ingrandimento 40X. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (C) I livelli di espressione di Smad4 sono stati valutati mediante analisi Western Blot sulle frazioni proteiche ottenute come descritto in "Materiali e Metodi" dalle cellule trattate o meno con 10 ng/ml di TGF-β1 per 30, 60 e 120 minuti. L'avvenuto caricamento in ogni pozzetto di uguali quantità di proteine è stato valutato mediante colorazione dei gel di poliaccrilamide con Blu di Coomassie.

I livelli di espressione di Smad2, Smad2-P e Smad4 sono stati valutati nelle linee in esame, anche attraverso analisi Western Blot effettuate sulle frazioni proteiche citoplasmatiche e nucleari, estratte da queste cellule in condizioni basali e dopo trattamento con il TGF-β per vari tempi, utilizzando anticorpi specifici per Smad2 fosforilato (Smad2-P), Smad2/3 e Smad4. Come mostrato nella figura 29 C e

30 C, è evidente sia la traslocazione nucleare della proteina Smad2-P, sia l'ipoespressione e la localizzazione nucleocitoplasmatica della proteina Smad4 nelle cellule TPC-1 e BCPAP, dopo trattamento con 10 ng/ml di TGF- β 1. Pertanto, i nostri risultati dimostrano che l'ipoespressione di Smad4 determina una riduzione della traslocazione nucleare del complesso trascrizionale Smad2/Smad4 ed è responsabile della forte riduzione dell'induzione del gene target PAI-1.

Recupero dell'attivazione della via del segnale del TGF- β nelle cellule TPC-1 e BCPAP transfettate con la forma *wild type* di Smad4.

Al fine di stabilire se l'ipoespressione di Smad4 nelle linee di carcinoma papillifero della tiroide possa determinare resistenza all'azione del TGF- β , abbiamo transfettato in modo transiente le TPC-1 e BCPAP con un vettore di espressione contenente Smad4 *wt* etichettato dalla *Green Fluorescent Protein* (GFP) (figura 31) e abbiamo valutato lo stato di attivazione della via del segnale del TGF- β , la localizzazione subcellulare di Smad4, la risposta all'azione antiproliferativa del TGF- β e il comportamento migratorio di queste cellule.

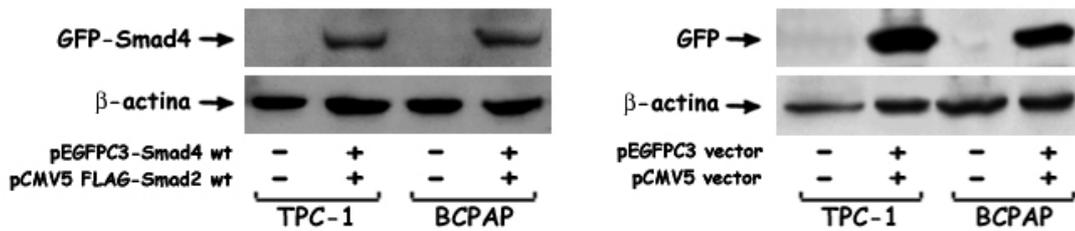


Figura 31. Espressione di GFP-Smad4 e della GFP nelle cellule TPC-1 e BCPAP transfettate con i costrutti pEGFPC3-Smad4 *wt* e pEGFPC3 vuoto. Come descritto in "Materiali e Metodi", le proteine ottenute lisando le cellule, sono state separate attraverso corsa elettroforetica (SDS-PAGE) effettuata in condizioni riducenti e trasferite elettricamente su nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate con l'anticorpo specifico per la *Green Fluorescent Protein* (GFP). L'avvenuto caricamento in ogni pozzetto di uguali quantità di proteine è stato valutato utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per la β-actina.

I dati riportati in figura 32 dimostrano che l'attività luciferasica rilevata nelle cellule trasfettate con Smad4 *wt*, dopo trattamento con TGF-β, è significativamente più alta rispetto a quella riscontrata nel controllo, rappresentato dalle stesse cellule transfettate con il vettore vuoto (10 e 7 volte di induzione, rispettivamente per TPC-1 e BCPAP). Tale attivazione è ulteriormente aumentata se, per mantenere un corretto rapporto stechiometrico tra le proteine, nelle cellule in esame transfettiamo anche Smad2 *wt* (11 e 8 volte rispettivamente).

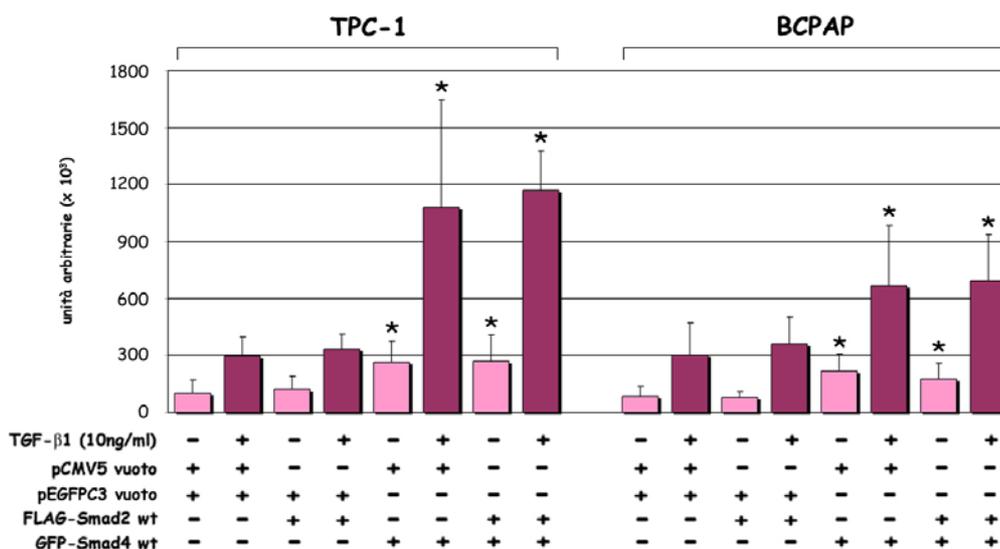


Figura 32. Attivazione della via del segnale del TGF-β nelle cellule TPC-1 e BCPAP transfettate con i costrutti contenenti Smad4 wt e/o Smad2 wt. Le cellule TPC-1 e BCPAP sono state transfettate in transiente con il costrutto reporter 3TP-Lux e con i costrutti pEGFPC3-Smad4 wt e/o con pCMV5 FLAG-Smad2 wt e trattate o meno con TGF-β1 (10 ng/ml) per 24 ore. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte e l'attività luciferasica è stata espressa in unità arbitrarie come valore assoluto. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando lo *Student's t-test* e la significatività è stata calcolata rispetto al controllo ottenuto dalle cellule transfettate con i costrutti pEGFPC3 e pCMV5 (* p<0,05).

La traslocazione nucleocitoplasmatica delle proteine Smad è un evento fondamentale nella trasduzione del segnale, infatti, l'attivazione delle risposte mediate dal TGF-β richiede proprio la formazione del complesso trascrizionale Smad2/Smad4 e la sua localizzazione nel nucleo. L'ipoespressione di Smad4 nelle TPC-1 e nelle BCPAP è responsabile del livello estremamente basso di traslocazione nucleare di questa proteina. Per verificare se nelle cellule transfettate con Smad4 wt al ripristino dell'attività trascrizionale corrispondesse anche la localizzazione nucleare di Smad4, abbiamo eseguito esperimenti di immunofluorescenza utilizzando un anticorpo specifico per la "Green Fluorescent Protein" (GFP), con la quale è etichettata Smad4 transfettato. I dati in figura 33 A dimostrano che GFP-Smad4, dopo trattamento con 10 ng/ml di TGF-β1, trasloca chiaramente nel nucleo, mentre, nelle cellule transfettate con il vettore vuoto pEGFPC3, la GFP ha una localizzazione

nucleocitoplasmatica (figura 33 B). In conclusione i nostri risultati dimostrano chiaramente che l'ipoespressione di Smad4 nelle cellule TPC-1 e BCPAP determina una insufficiente attivazione della via del segnale, ed è, pertanto, responsabile di una perdita di risposta all'azione del TGF- β .

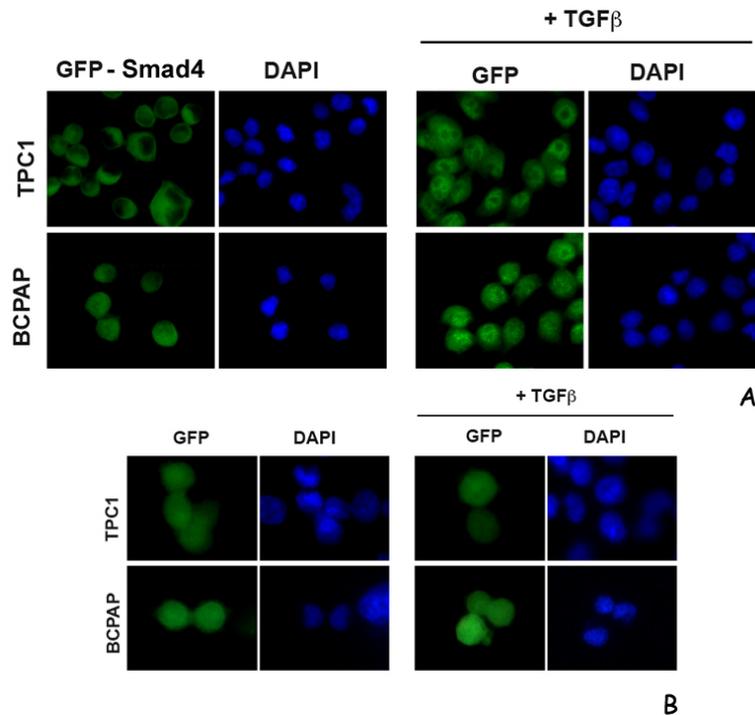


Figura 33. La localizzazione subcellulare di GFP-Smad4 *wt* e della GFP nelle cellule TPC-1 e BCPAP transfettate. Le cellule TPC-1, BCPAP, transfettate con pEGFPC3-Smad4 *wt* (A) o con pEGFPC3 vuoto (B) sono state seminate in vetrini con 8 pozzetti (NUNC), incubate per 1 ora con 10 ng/ml di TGF- β 1 o con il solo mezzo. I nuclei sono stati colorati mediante incubazione con il 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI). Le immagini sono state acquisite ad un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 ad un ingrandimento 40X. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Ruolo di Smad4 nel controllo della proliferazione nelle cellule TPC-1 e BCPAP.

Il TGF- β è un potente inibitore della proliferazione delle cellule tiroidee che agisce bloccando il ciclo cellulare nella tarda fase G1 inducendo l'espressione dei geni che codificano per gli inibitori di chinasi ciclina dipendente, come p15 (Hannon G.J. e

Beach D., 1994), p21 (Datto M.B. et al., 1995) e p27 (Polyak K. et al., 1994), e inibendo direttamente l'espressione di c-Myc (Pietenpol J.A. et al., 1990).

Le linee cellulari di carcinomi papilliferi tiroidei TPC-1 e BCPAP presentano mutazioni del gene che codifica il recettore del TSH e sono in grado di proliferare anche in assenza del fattore di crescita, diversamente dalla linea cellulare differenziata FRTL-5. Il profilo genotipico e molecolare delle linee cellulari TPC-1 e BCPAP è stato ben caratterizzato negli ultimi anni ha permesso di individuare le mutazioni di alcuni oncogeni coinvolti nella carcinogenesi tiroidea. La linea cellulare diploide TPC-1 presenta un riarrangiamento RET/PTC1 mentre la linea cellulare aneuploide BCPAP presenta la mutazione missenso del gene BRAF, V600E (Meireles A.M. et al., 2007).

L'effetto antiproliferativo del TGF- β sulle cellule TPC-1, BCPAP è stato valutato mediante conte cellulari nelle cellule trattate e non con 10 ng/ml di TGF- β 1 per 48 ore. I nostri risultati dimostrano (figura 34 A) che la proliferazione di entrambe le linee cellulari è solo parzialmente inibita dal trattamento con il TGF- β (25% per TPC-1 e 12% per le BCPAP) rispetto al nostro controllo rappresentato dalle cellule FRTL-5, la cui proliferazione risulta, invece, inibita del 72%.

Allo scopo di verificare il ruolo di Smad4 nel controllo della risposta proliferativa sono stati effettuati saggi di proliferazione sulle cellule TPC-1 e BCPAP transfettate in modo transiente con i costrutti pEGFPC3-Smad4 *wt*, pCMV5 FLAG-Smad2 *wt* o con i relativi vettori vuoti e trattate o non con 10 ng/ml di TGF- β 1 per 24 e 48 ore. Come mostrato in figura 34 B, l'inibizione della proliferazione delle TPC-1 transfettate con Smad4 *wt* è risultata pari al 41% a 24 ore e al 69% a 48 ore, valore

significativamente aumentato sia rispetto al controllo non transfettato che rispetto alle cellule transfettate con il plasmide vuoto, in cui l'inibizione risulta del 20% a 24 ore e del 36% a 48 ore. I risultati ottenuti nelle BCPAP dimostrano, invece, un evidente recupero dell'inibizione della proliferazione solo a 48 ore (22%) rispetto al controllo (5%) (figura 34 C).

Pertanto, i nostri dati dimostrano che l'overespressione di Smad4 nelle cellule TPC-1 e BCPAP è in grado di ripristinare la risposta all'inibizione della proliferazione TGF- β mediata. La diversa risposta proliferativa delle due linee è, probabilmente, da imputare al diverso assetto oncogenico delle due linee (Meireles A.M. et al., 2007).

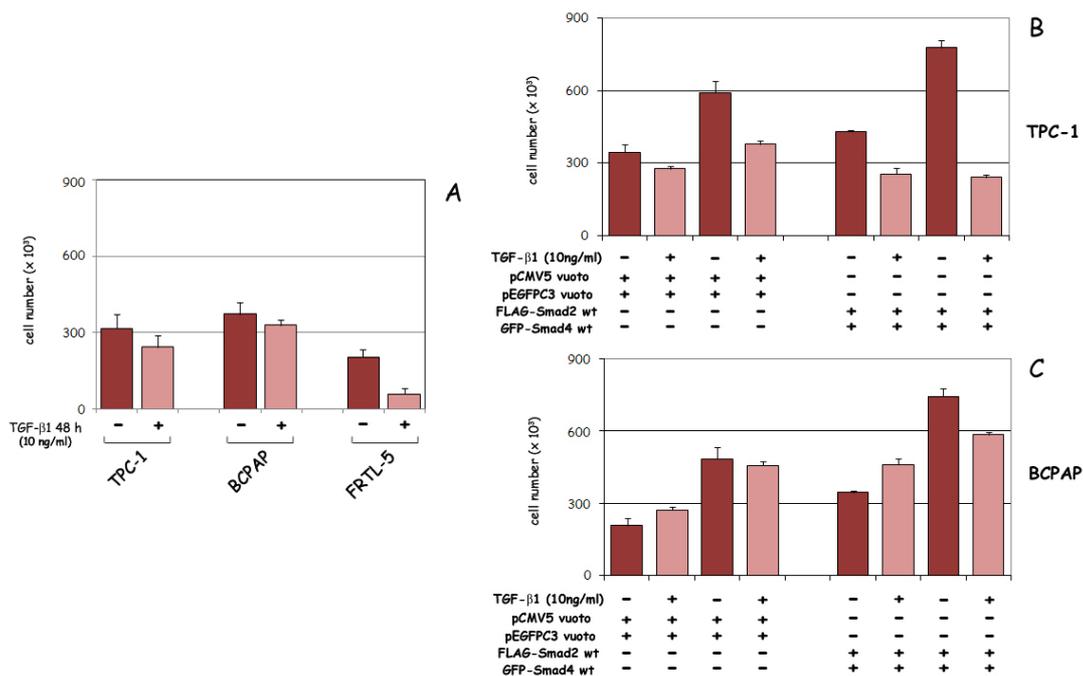


Figura 34. Saggi di inibizione della proliferazione delle cellule TPC-1 e BCPAP. Le cellule non transfettate (A) e transfettate in transiente con pEGFPC3-Smad4 *wt* e pCMV5 FLAG-Smad2 *wt* o con i plasmidi vuoti pEGFPC3 e pCMV5 (B e C), sono state piastrate (50×10^3 cellule/piastra), mantenute in coltura in condizioni basali o in presenza di 10 ng/ml di TGF- β 1 e contate dopo 48 ore.

Ruolo di Smad4 nel controllo della migrazione nelle cellule TPC-1 e BCPAP.

Il processo mediante il quale le cellule tumorali invadono e metastatizzano coinvolge complesse interazioni tra le cellule tumorali e l'ambiente extracellulare. La capacità di migrare 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). Le linee cellulari TPC-1 e BCPAP, che derivano da carcinomi papilliferi umani, esprimono un fenotipo invasivo, pertanto, la capacità migratoria di queste cellule è stata studiata attraverso il test del "wound healing". In condizioni fisiologiche il processo di riparo della ferita o "wound healing" è un processo altamente regolato che determina la migrazione cellulare attraverso l'intervento di diversi fattori e coinvolge non solo geni che codificano il collagene o gli enzimi che lo modificano, ma anche quelli che codificano fattori coinvolti nella produzione/organizzazione della matrice extracellulare (ECM) (Echtermeyer F. et al., 2001). Il TGF- β è un fattore di crescita responsabile della sintesi e degradazione della ECM che riveste un ruolo importante anche nei processi di riparazione dei tessuti e, quindi, nel controllo della migrazione.

Poiché le TPC-1 e BCPAP sono cellule trasformate abbiamo testato, mediante saggi di "wound healing", la loro capacità di migrare. Gli esperimenti sono stati condotti sia in condizioni basali che dopo transfezione transiente con il costrutto pEGFPC3-Smad4 *wt* o con pEGFPC3 vuoto.

Tutte le cellule da esaminare sono state seminate a confluenza e la loro capacità di migrare nel solco prodotto nel monostrato cellulare, è stata valutata dopo 24 ore,

analizzando le piastre al microscopio Observer 21 (Zeiss) e stimando, attraverso uno specifico software, l'estensione della zona colonizzata dalle cellule durante l'intervallo di tempo considerato.

Come mostrato nella figura 35 A, le cellule TPC-1 e BCPAP hanno uno spiccato e significativo ($p < 0,001$) atteggiamento migratorio, rispetto al controllo rappresentato dalle FRTL-5 che invece appare pressoché immobile.

Le cellule TPC-1 e BCPAP transfettate con la forma *wild type* di Smad4, invece, mostrano una forte riduzione della capacità migratoria, valutata misurando opportunamente la dimensione del solco dopo 24 ore, rispetto al controllo rappresentato dalle stesse cellule transfettate con il solo vettore vuoto. L'iperespressione di Smad4 *wt*, infatti, determina nelle TPC-1 solo una modesta riduzione della larghezza del solco dopo 24 ore (22%) rispetto a quella osservata nelle cellule transfettate con il vettore vuoto (50%) ($p < 0,001$). Analoghi risultati si osservano nelle BCPAP, dove la riduzione della larghezza del solco nelle cellule transfettate è pari al 14% vs il 62% osservato in quelle transfettate con il vettore vuoto ($p < 0,001$) (figura 35 B). Pertanto, la maggiore dimensione del solco si associa con una minore capacità migratoria delle cellule.

I nostri risultati dimostrano che nelle cellule di carcinoma papillifero della tiroide, l'iperespressione di Smad4 *wt*, non solo è responsabile del recupero dell'azione di inibizione della proliferazione mediata dal TGF- β , ma anche di una significativa riduzione della capacità migratoria delle cellule.

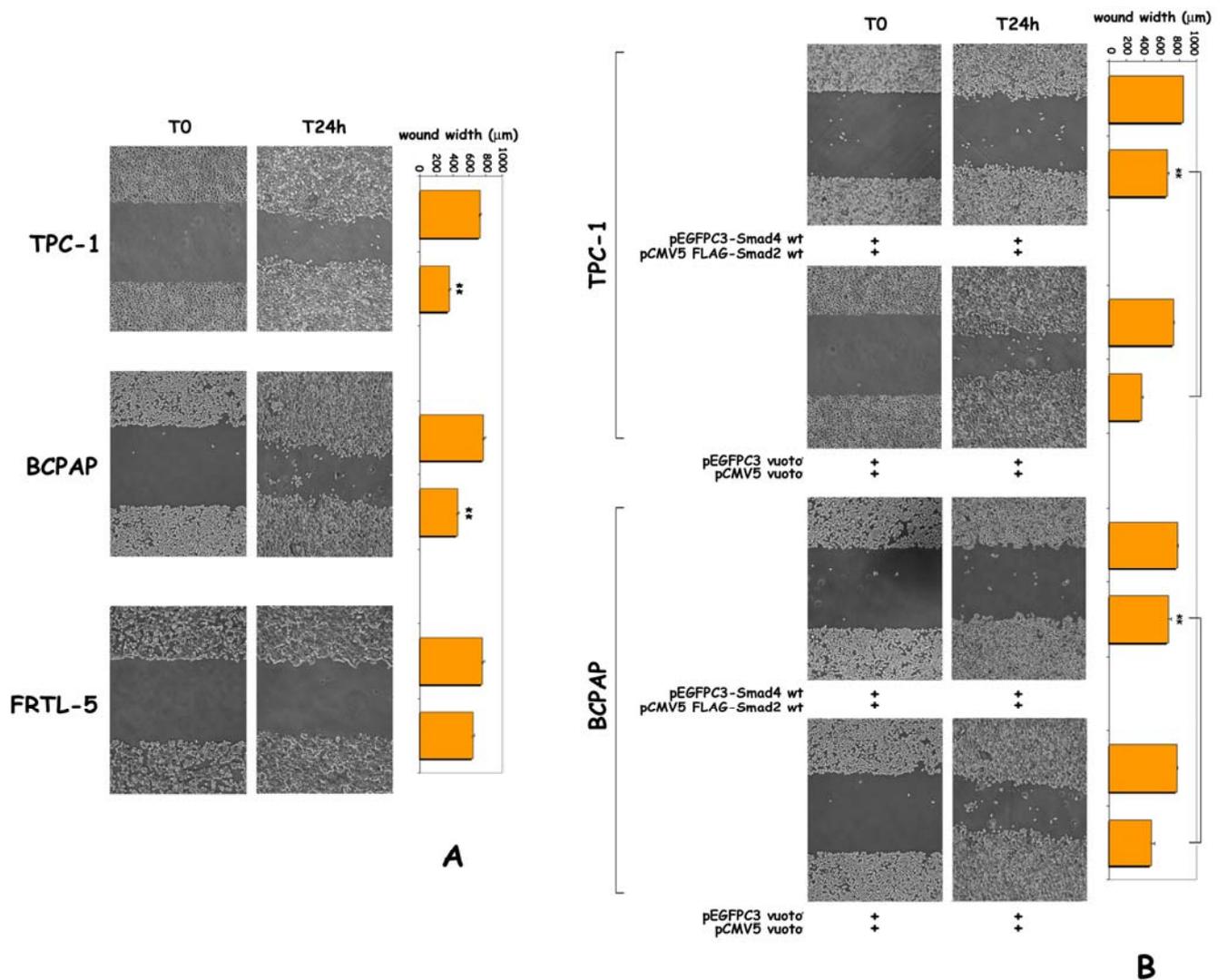


Figura 35. Saggi di "Wound Healing". Le cellule non transfettate (A) e transfettate in transiente con pEGFPC3-Smad4 *wt* e pCMV5 FLAG-Smad2 *wt* o con i plasmidi vuoti pEGFPC3 e pCMV5 (B), sono state seminate a confluenza e nel monostrato è stato prodotto un solco utilizzando un puntale di una pipetta P200. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 30 minuti a temperatura ambiente e le piastre sono state poste sotto un microscopio a contrasto di fase Observer 21 (Zeiss) e fotografate ad un ingrandimento 5X. L'estensione della zona colonizzata dalle cellule durante l'intervallo di tempo considerato è stata valutata utilizzando uno specifico software (Axiovision 4.6). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando lo *Student's t-test* (** p<0.001).

DISCUSSIONE

Il TGF- β è un importante citochina coinvolta nel controllo di una straordinaria gamma di processi biologici. Sebbene l'inibizione della proliferazione cellulare è una delle funzioni primarie del TGF- β , questo fattore è coinvolto nella regolazione di numerose altre funzioni cellulari come l'embriogenesi, la differenziazione, l'apoptosi, l'angiogenesi, l'immunosoppressione, e la riparazione delle ferite (Truty M.J. e Urrutia R., 2007).

Visto il ruolo multifunzionale del TGF- β , qualsiasi alterazione della sua via del segnale può avere molte conseguenze patologiche. Nel corso del graduale processo di transizione verso la malignità, virtualmente tutte le cellule diventano, almeno parzialmente, resistenti all'inibizione della crescita TGF β -mediata. La resistenza è dovuta a mutazioni inattivanti oppure alla perdita di espressione di geni codificanti uno o più componenti della via del segnale del TGF- β . La maggior parte dei tumori del pancreas e oltre l'80% dei tumori del colon, presentano, infatti, mutazioni che interessano almeno un componente del *pathway* del TGF- β (Villanueva A. et al., 1998; Grady W.M. et al., 1999). Mutazioni o delezioni del gene SMAD4 sono tra le alterazioni meglio caratterizzate nei tumori pancreatici. In circa il 30% di tutti questi tumori, infatti, SMAD4 è deletato in omozigosi, mentre è inattivato in un altro 20%, e mostra una perdita allelica del suo cromosoma in quasi il 90% di tali tumori (Truty M.J. e Urrutia R., 2007). Per tale motivo, Smad4 viene considerato a tutti gli effetti un oncosoppressore.

Il TGF- β è normalmente espresso e secreto dalle cellule epiteliali follicolari della tiroide e vari studi hanno dimostrato che, oltre a controllare numerose funzioni nelle cellule di tiroide di ratto (Morris J.C. 3rd et al., 1998; Colletta G. et al., 1989; Cirafici

A.M. et al., 1992; Coppa A. et al., 1995; Carneiro C. et al., 1998; Mincione G. et al., 1999), di maiale (Franzén A. et al., 1999) e umane (Wyllie F.S. et al., 1991), esso agisce come un potente inibitore della proliferazione. La forte azione di inibizione della proliferazione esercitata dal TGF- β 1 sulle cellule tiroidee, sembra modulare gli effetti del TSH e di altri fattori di crescita e contribuisce all'omeostasi cellulare in questa ghiandola.

L'ipoespressione del T β RII nei tumori tiroidei umani, conferma il suo ruolo di oncosoppressore in questo organo (Lazzereschi D. et al., 1997). E' stato ampiamente dimostrato che la mancanza di risposta all'azione inibitoria esercitata dal TGF- β può portare alla perdita del controllo della crescita e all'iperplasia, come è stato osservato nei gozzi tiroidei multinodulari (MNTG) (Grubeck-Loebenstein B. et al., 1989; Bidey S.P. et al., 1999).

Gli studi sulle alterazioni genetiche che portano al cancro della tiroide hanno fornito, nel corso degli anni, importanti risultati, alcuni dei quali di potenziale applicazione clinica ed hanno consentito di identificare mutazioni dell'oncogene *Ras*, riarrangiamenti dell'oncogene *Ret* (localizzato sul cromosoma 10, che genera diverse varianti di PTC in circa il 20% del carcinoma papillare) (Karga H. et al., 1991; Grieco M. et al., 1990) e alterazioni dell'espressione dei geni codificanti i recettori delle tirosin-chinasi, come *Met* e *TRK* (Di Renzo M.F. et al., 1992; Pierotti M.A. et al., 1995). Recenti lavori suggeriscono fortemente che anche alterazioni genetiche della via del segnale della PI3K/Akt, svolgono un ruolo rilevante nella tumorigenesi della tiroide (Hou P. et al., 2007).

Tuttavia, molti degli eventi molecolari coinvolti nella tumorigenesi tiroidea restano oscuri. Evidenze sperimentali suggeriscono che la ipoespressione dei recettori e delle altre componenti della via del segnale del TGF- β possa svolgere un importante ruolo nella progressione del cancro della tiroide. In un elevato numero di carcinomi della tiroide, infatti, è stata osservata una riduzione del livello di espressione del RNA del T β RII (Lazzereschi D. et al., 1997). Inoltre, in un ampio gruppo di tumori tiroidei di vario istotipo, sono state osservate mutazioni e/o alterazioni dell'espressione e della localizzazione della proteina Smad4/DPC-4 (Lazzereschi D. et al., 2005).

In questo studio abbiamo concentrato la nostra attenzione sul carcinoma papillifero tiroideo, che rappresenta uno dei più comuni tumori della tiroide, indagando sul ruolo svolto da Smad4 nella cancerogenesi tiroidea e come soppressore del comportamento invasivo in due linee cellulari umane di carcinoma papillifero della tiroide, TPC-1 e BCPAP. Abbiamo caratterizzato la via di trasduzione del segnale del TGF- β dimostrando una ipoespressione di Smad4 in queste cellule, probabilmente causata da fenomeni epigenetici e correlata con una riduzione della trasduzione del segnale del TGF- β , sebbene le componenti della via T β RII, T β RI e Smad2 siano espresse e il T β RI sia funzionale in entrambe le linee esaminate. La perdita di espressione di Smad4 è ritenuta responsabile della resistenza al TGF- β che nelle cellule tumorali determina la mancata risposta all'azione antiproliferativa del TGF- β (Pasche B., 2001). Gli studi condotti negli ultimi anni hanno sottolineato l'importanza dello *shuttling* nucleocitoplasmatico delle Smad nella regolazione della trasduzione del segnale TGF β -mediato. In risposta al TGF- β , il recettore di tipo I fosforila e attiva le

R-Smad, Smad2 e/o Smad3, in modo che possano formare complessi con Smad4 e accumularsi nel nucleo (Massagué J. e Wotton D., 2000).

L'ipoespressione di Smad4 nelle cellule TPC-1 e BCPAP è correlata non solo con la perdita dello *shuttling* nucleocitoplasmatico di Smad4, ma anche con la resistenza all'azione antiproliferativa del TGF- β . Analoghi risultati sono stati riscontrati anche in una linea cellulare umana di carcinoma della cervice SiHa (Lee S.-h. et al., 2001). La ridotta espressione di Smad4 nelle linee cellulari TPC-1 e BCPAP è associata anche con una spiccata capacità di migrare, prerequisito importante per il comportamento invasivo e metastatico delle cellule tumorali.

Le cellule tumorali spesso acquisiscono un vantaggio sulle cellule non trasformate contrastando l'azione oncosoppressoria del TGF- β e contemporaneamente stimolando la sua attività oncogenica. Una delle caratteristiche più interessanti del TGF- β , infatti, è la sua apparente dicotomia che gli permette di funzionare come un potente oncosoppressore nelle cellule non trasformate e come un *tumor promoter* nelle cellule maligne, favorendo un fenotipo più aggressivo (Truty M.J. e Urrutia R., 2007).

I nostri risultati dimostrano che l'espressione della proteina Smad4 svolge un ruolo molto importante nella regolazione della risposta biologica al TGF- β nelle cellule tiroidee, contribuendo sia al controllo della proliferazione che al controllo della migrazione, revertendo parzialmente il fenotipo maligno delle TPC1 e delle BCPAP. I nostri dati indicano che Smad4 in questi tumori svolge un ruolo significativo nel controllo del comportamento migratorio delle cellule e che per la sua potenzialità potrebbe essere considerato un ottimo bersaglio diagnostico e/o terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

Alexandrow M.G. and Moses H.L. (1995). "Transforming growth factor β and cell cycle regulation". *Cancer Res* **55**: 1452-1457.

Ambesi-Impiombato F.S., Parks L., Coon H.G (1980). "Culture of hormone dependent functional epithelial cells from rat thyroids". *PNAS* **77**: 3455-3459.

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**: 24731-24734.

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.

Bai S., Shi X., Yang X. & Cao X. (2000). "Smad6 as a transcriptional corepressor". *J Biol Chem* **275**: 8267-8270.

Bai R.Y., Koester C., Ouyang T., Hahn S.A., Hammerschmidt M., Peschel C., and Duyster J. (2002). "SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF β signalling". *Nat Cell Biol* **4**: 181-190.

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): 315-320.

Becks G.P., Logan A., Phillips I.D., Wang J.F., Smith C., DeSousa D., Hill D.J. (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**: 325-338.

Bidey S.P., Hill D.J. and Eggo M.C. (1999). "Growth factors and goitrogenesis". *J. Endocrinol.* **160**: 321-332.

Birchmeier C., Birchmeier W., Brand-Saberi B. (1996). "Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression". *Acta Anat (Basel)* **156**(3): 217-226.

Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease". *N Engl J Med* **342**: 1350-1358.

Blobe G.C., Schiemann W.P., Pepin M.C., Beauchemin M., Moustakas A., Lodish H.F., O'Connor-McCourt M.D. (2001). "Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* **276**(27): 24627-24637.

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**: 307-310.

Brabant G., Hoang-Vu C., Cetin Y., Dralle H., Scheumann G., Mölne J., Hansson G., Jansson S., Ericson L.E., Nilsson M. (1993). "E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies". *Cancer Res* **53**(20): 4987-4993.

Brand T. and Schneider M.D. (1995). "Inactive type II and type I receptors for TGF β -dependent transcription". *J Biol Chem* **270**: 8274-8284.

Calonge M.J., Massague J. (1999). "Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells". *J Biol Chem* **274**: 33637-33643.

Carneiro C., Alvarez C.V., Zalvide J., Vidal A. and Domínguez F. (1998). "TGF- β 1 actions on FRTL-5 cells provide a model for the physiological regulation of thyroid growth". *Oncogene* **16**: 1455-1465.

Cheifetz S., Bellón T., Calés C., Vera S., Bernabeu C., Massagué J., Letarte M. (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells". *J Biol Chem* **267**(27): 19027-19030.

Chen X., Rubock M.J., and Whitman M. (1996). "A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signalling". *Nature* **383**: 691-696.

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". *Biophys Res Commun* **187**: 225-233.

Colletta G., Cirafici A.M., and Di Carlo A. (1989). "Dual effect of transforming growth factor β on rat thyroid cells: inhibition of Thyrotropin-induced proliferation and reduction of thyroid-specific differentiation markers". *Cancer Res.* **49**: 3457-3462.

Coppa A., Mincione G., Mammarella S., Ranieri A., and Colletta G. (1995). "Epithelial rat thyroid cell clones, escaping from transforming growth factor β negative growth control, are still inhibited by this factor in the ability to trap iodide". *Cell Growth & Differentiation* **6**: 281-290.

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): 200-208.

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**: 3439-3446.

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**: 135-149.

Dai G., Levy O., Carrasco N. (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter". *Nature* **379**: 458-460.

Damante G. and Di Lauro R. (1994). "Thyroid-Specific Gene-Expression". *Biochim Biophys Acta-Gene Structure and Expression* **1218**: 255-266.

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**: 307-356.

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**: 5545-5549.

Davies L. & Welch H.G. (2006). "Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002". *Jama* **295**: 2164-2167.

de Caestecker M.P., Parks W.T., Frank C.J., Castagnino P., Bottaro D. P., Roberts A.B. et al. (1998). "Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases". *Genes Dev* **12**: 1587-1592.

de Caestecker M.P., Piek E., Roberts A.B. (2000). "Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer". *J Natl Cancer Inst* **92**(17): 1388-1402.

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): 1074-1081.

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): 3091-3100.

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**: 1061-1076.

Derynck R., Akhurst R.J., Balmain A. (2001). "TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression". *Nat Genet* **29**(2): 117-129.

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 Vita G., Bauer L., Correa da Costa V.M., De Felice M., Baratta M.G., De Menna M., and Di Lauro R. (2005). "Dose-Dependent Inhibition of Thyroid Differentiation by RAS Oncogenes". *Mol Endocrinol* **19**(1): 76-89.

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**: 729-735.

Di Renzo M.F., Olivero M., Ferro S., Prat M., Bongarzone I., Pilotti S., Belfiore A., Costantino A., Vigneri R., Pierotti M.A., et al. (1992). "Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas". *Oncogene* **7**(12): 2549-2553.

Duh Q.Y., Gum E.T., Gerend P.L., Raper S.E., Clark O.H. (1985). "Epidermal growth factor receptors in normal and neoplastic thyroid tissue". *Surgery* **98**(6): 1000-1007.

Dumont J.E., Maenhaut C., Pirson I., Baptist M., Roger P.P. (1991). "Growth factors controlling the thyroid gland". *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **5**: 727-754.

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**: 125-132.

Dumont N. and Arteaga C.L. (2003). "Targeting the TGFbeta signaling network in human neoplasia". *Cancer Cell* **3**: 531-536.

Ebisawa T., Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T., Miyazono K. (2001). "Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation". *J Biol Chem* **276**(16): 12477-12480.

Echtermeyer F., Streit M., Wilcox-Adelman S., Saoncella S., Denhez F., Detmar M., and Goetinck P. (2001). "Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4". *J Clin Invest* **107**: 9-14.

Elliott R.L. and Blobe G.C. (2005). "Role of Transforming Growth Factor Beta in Human Cancer". *Journal of Clinical Oncology-Biology of Neoplasia* **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): 1398-1400.

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): 179-184.

Farid N.R., Shi Y., Zou M. (1994). "Molecular basis of thyroid cancer". *Endocr Rev* **15**(2): 202-232.

Felici A., Wurthner J.U., Parks W.T., Giam L.R., Reiss M., Karpova T.S., McNally J.G., and Roberts A.B. (2003). "TLP, a novel modulator of TGF- β signaling, has opposite effects on Smad2- and Smad3-dependent signalling". *EMBO J.* **22**: 4465-4477.

Fluge Ø., Bruland O., Akslen L.A., Lillehaug J.R., Varhaug J.E. (2006). "Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas". *Thyroid* **16**(2): 161-175.

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**: 39137-39145.

Franken N.A.P., Rodermond M.H., Stap J., Haveman J. & van Bree C. (2006). "Clonogenic assay of cells *in vitro*". *Nature protocols* **1**(5): 2315-2318.

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**: 4300-4310.

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". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **207**: 682-689.

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**: 3676-3680.

Funaba M., Zimmerman C.M., & Mathews L.S. (2002). "Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase". *J Biol Chem* **277**: 41361-41368.

Garcia-Rostan G., Zhao H., Camp R.L., Pollan M., Herrero A., Pardo J., Wu R., Carcangiu M.L., Costa J., Tallini G. (2003) "ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer". *J Clin Oncol* **21**(17): 3226-3235.

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): 281-289.

Gassmann P., Enns A., Haier J. (2004). "Role of tumor cell adhesion and migration in organ specific metastasis formation". *Onkologie* **27**(6): 577-582.

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.

Germain S., Howell M., Esslemont G.M., and Hill C.S. (2000). "Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif". *Genes & Dev* **14**: 435-451.

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**: 183-193.

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**: 168-177.

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

Grady W.M., Myeroff L.L., Swinler S.E., Rajput A., Thiagalingam S., Lutterbaugh J.D., Neumann A., Brattain M.G., Chang J., Kim S.J., Kinzler K.W., Vogelstein B., Willson J.V., Markowitz S. (1999). "Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers". *Cancer Res* **59**: 320-324.

Grieco M., Santoro M., Berlingieri M.T., Melillo R.M., Donghi R., Bongarzone I., Pierotti M.A., Della Porta G., Fusco A., Vecchio G. (1990). "PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas". *Cell* **60**(4): 557-563.

Grubeck-Loebenstein B., Buchan G., Sadeghi R., Kissonerghis M., Londei M., Turner M., Pirich K., Roka R., Niederle B., Kassal H., Waldhäusl W. and Feldmann M. (1989). "Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter". *J. Clin. Invest.* **83**: 764-770.

Hahn S.A., Schutte M., Hoque A.T.M.S., Moskaluk C.A., daCosta L.T., Rozenblum E., Weinstein C.L., Fischer A., Yeo C.J., Hruban R.H., and Kern S.E. (1996). "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1". *Science* **271**: 350-353.

Hannon G.J. and Beach D. (1994). "P15 INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest". *Nature* **371**: 257-261.

Hata A., Lagna G., Massague J. & Hemmati-Brivanlou A. (1998). "Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor". *Genes Dev* **12**: 186-197.

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- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins". *Nature* **390**: 465-471.

Hoelting T., Siperstein A.E., Clark O.H., Duh Q.Y. (1994). "Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer *in vitro* and *in vivo*". *J Clin Endocrinol Metab* **79**(2): 401-408.

Hoelting T., Tezelman S., Siperstein A.E., Duh Q.Y., Clark O.H. (1995). "Biphasic effects of thyrotropin on invasion and growth of papillary and follicular thyroid cancer *in vitro*". *Thyroid* **5**(1): 35-40.

Hou P., Liu D., Shan Y., Hu S., Studeman K., Condouris S., Wang Y., Trink A., El-Naggar A.K., Tallini G., Vasko V., and Xing M. (2007). "Genetic alterations and their relationship in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway in thyroid cancer". *Clin Cancer Res* **13**(4): 1161-1170.

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**: 5146-5149.

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**: 173-179.

Hyttinen M.D., Penttinen C., Keski-Oja J. (2004). "Latent TGF- β binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF- β activation". *Crit Rev Clin Lab Sci* **41**: 233-264.

Huang S.S., Ling T.Y., Tseng W.F., Huang Y.H., Tang F.M., Leal S.M., Huang J.S. (2003). "Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF- β 1 requires LRP-1". *FASEB J* **17**: 2068-2081.

Iacobuzio-Donahue C.A., Song J., Parmigiani G., Yeo C.J., Hruban R.H., and Kern S.E. (2004). "Missense Mutations of MADH4: Characterization of the Mutational Hot Spot and Functional Consequences in Human Tumors". *Clinical Cancer Research* **10**: 1597-1604.

Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata M., Miyazono K. (1997). "Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily". *Nature* **389**: 622-626.

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**: 2500-2510.

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**: 283-294.

Izzi L. & Attisano L. (2004). "Regulation of the TGF-beta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation". *Oncogene* **23**(11): 2071-2078.

Iuliano R., Trapasso F., Le Pera I., Schepis F., Sama I., Clodomiro A., Dumon K.R., Santoro M., Chiariotti L., Viglietto G., Fusco A. (2003). "An adenovirus carrying the rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the growth of human thyroid carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*". *Cancer Res.* **63**: 882-886.

Javelaud D., Mauviel A. (2005). "Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis". *Oncogene* **24**(37): 5742-5750.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J. & Thun M.J. (2007). "Cancer statistics". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **57**: 43-66.

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**: 375-378.

Kaminska B., Wesolowka A., Danilkiewicz M. (2005). "TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis". *Acta Biochim Pol* **52**(2): 329-337.

Kang Y., He W., Tulley S., Gupta G.P., Serganova I., Chen C.-R., Manova-Todorova K., Blasberg R., Gerald W.L., and Massagué J. (2005). "Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway". *Proc Natl Acad Sci* **102**: 13909-13914.

Karga H., Lee J.K., Vickery A.L. Jr, Thor A., Gaz R.D., Jameson J.L. (1991). "Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab* **73**(4): 832-836.

Kavsak P., Rasmussen R.K., Causing C.G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G.H., Wrana J.L. (2000). "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation". *Mol Cell* **6**(6): 1365-1375.

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): 23048-23052.

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**: 1037-1050.

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): 2519-2521.

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.

Kretschmar M., Doody J., & Massague J. (1997). "Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- β family mediator Smad1". *Nature* **389**: 618-622.

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**: 1357-1360.

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): 2071-2076.

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): 5344-5354.

Leal S.M., Huang S.S., Huang J.S. (1999). "Interactions of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with the type V transforming growth factor- β receptor in mink lung epithelial cells". *J Biol Chem* **274**: 6711-6717.

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): 973-981.

Lee P.S., Chang C., Liu D. & Derynck R. (2003). "Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor- β family signalling". *J Biol Chem* **278**: 27853-27863.

Lee S.-h., Cho Y.-S., Shim C.-s., Kim J.-s., Choi J.-j., Oh S.-h., Kim J.-w., Zhang W. and Lee Je-ho (2001). "Aberrant expression of Smad4 results in resistance against the growth-inhibitory effect of transforming growth factor- β in the SiHa human cervical carcinoma cell line". *Int. J. Cancer*: **94**: 500-507.

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**: 2459-2462.

Leivronen S.-K. and Kähäri V.-M. (2007). "Transforming growth factor- β signaling in cancer invasion and metastasis". *Int. J. Cancer* **121**: 2119-2124.

Levy L. and Hill C.S. (2006). "Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer". *Cytokine & Growth Factor Rev* **17**: 41-58.

Lin X., Liang M., Liang Y.Y., Brunnicardi F.C., Feng X.H. (2003). "SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4". *J. Biol. Chem.* **278**: 31043-31048.

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.

Liu Q., Huang S.S., Huang J.S. (1997). "Function of the type V transforming growth factor β receptor in transforming growth factor β -induced growth inhibition of mink lung epithelial cells". *J Biol Chem* **272**: 18891-18895.

Lo R.S., Massague J. (1999). "Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated Smad2". *Nat Cell Biol* **1**(8): 472-478.

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.

Long J., Wang G., He D., Liu F. (2004). "Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification". *Biochem. J.* **379**: 23-29.

López-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**(4): 557-568.

Luo K., Lodish H.F. (1997). "Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues". *EMBO J* **16**(8): 1970-1981.

Luo K., Stroschein S.L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S., and Zhou Q. (1999). "The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signalling". *Genes & Dev* **13**: 2196-2206.

Lutz M., Knaus P. (2002). "Integration of the TGF- β pathway into the cellular signalling network". *Cellular Signalling* **14**: 977-988.

MacGrogan D., Pegram M., Slamon D., and Bookstein R. (1997). "Comparative mutations analysis of DPC-4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas". *Oncogene* **15**: 1111-1114.

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): 607-614.

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.

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

Massagué J. (1998). "TGF- β signal transduction". *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.

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

Massagué J., Wotton D. (2000). "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system". *EMBO J.* **19**(8): 1745-1754.

Massagué J., Seoane J. and Wotton D. (2005). "Smad transcription factors". *Genes & Dev* **19**: 2783-2810.

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**: 3947-3952.

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.

Meireles A.M., Preto A., Rocha A.S., Rebocho A.P., Máximo V., Pereira-Castro I., Moreira S., Feijão T., Botelho T., Marques R., Trovisco V., Cirnes L., Alves C., Velho S., Soares P., and Sobrinho-Simões M. (2007). "Molecular and Genotypic Characterization of Human Thyroid Follicular Cell Carcinoma-Derived Cell Lines". *Thyroid* **17**(8): 707-715.

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**: 2021-2036.

Mincione G., Coppa A., Lazzereschi D., Turco A., Baccheschi G., Di Marcantonio M.C. and Colletta G. (1999). "TGF- β control of thyroid cell proliferation and differentiation". *Recent Res. Devel. Cancer* **1**: 131-145.

Miyaki M. and Kuroki T. (2003). "Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer". *Biochem Biophys Res Comm* **306**: 799-804.

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): 1385-1394.

Moses H.L., Branum E.L., Proper J.A., Robinson R.A. (1981). "Transforming growth factor production by chemically transformed cells". *Cancer Res* **41**: 2842-2848.

Moses H.L. and Serratt R. (1996). "Regulation of differentiation by TGF- β ". *Curr Opin Genet Dev* **6**: 581-586.

Motti M.L., Califano D., Baldassarre G., Celetti A., Merolla F., Forzati F., Napolitano M., Tavernise B., Fusco A., Viglietto G. (2005). "Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas". *Carcinogenesis* **26**(6): 1021-1034.

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**: 367-374.

Naito A., Iwase H., Kuzushima T., Nakamura T., Kobayashi S. (2001). "Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasma". *J Surg Oncol* **76**(3): 176-180.

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.

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**: 629-644.

Namba H., Gutman R., Matsuo K., Alvarez A., Fagin J. (1990 a). "H-Ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms". *J Clin Endocrinol Metab* **71**(1): 223-229.

Namba H., Rubin S., Fagin J. (1990 b). "Point mutations of Ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis". *Molecul Endocrinol* **4**(10): 1474-1479.

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 neoformation in collagen gel separable from cell proliferation". *Exp Cell Res* **220**(2): 257-265.

Nishimura R., Hata K., Ikeda F., Matsubara T., Yamashita K., Ichida F., Yoneda T. (2003). "The role of Smads in BMP signaling". *Front Biosci* **1**(8): 275-284.

Oft M., Heider K.H., Beug H. (1998). "TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis". *Curr Biol* **8**: 1243-1252.

Ogawa Y., Schmidt D.K., Dasch J.R., Chang R.-J., and Glaser C.B. (1992). "Purification and characterization of transforming growth factor- β 2.3 and - β 1.2 heterodimers from bovine bone". *J Biol Chem* **267**: 2325-2328.

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**: 2051-2060.

Ohshima T., & Shimotohno K. (2003). "Transforming growth factor- β -mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4". *J Biol Chem* **278**: 50833-50842.

Padgett R.W., Das P., and Krishna S. (1998). "TGF- β signaling, Smads, and tumor suppressors". *BioEssays* **20**: 382-391.

Pang X.P., Hershman J.M., Chung M., and Pekary A.E. (1989). "Characterization of tumor necrosis factor- α receptors in human and rat thyroid cells and regulation of the receptors by thyrotropin". *Endocrinology* **125**: 1783-1788.

Pasche B. (2001). "Role of Transforming Growth Factor Beta in Cancer" *Journal of Cellular Physiology* **186**: 153-168.

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**: 359-363.

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 β 1 transgene expression". *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4254-4258.

Pierotti M.A., Bongarzone I., Borrello M.G., Mariani C., Miranda C., Sozzi G., Greco A. (1995). "Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas". *J Endocrinol Invest* **18**(2): 130-133.

Pierreux C.E., Nicolás F.J., Hill C.S. (2000). "Transforming growth factor β -independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus". *Mol Cell Biol* **20**(23): 9041-9054.

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**: 777-785.

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.

Roelen A.J.B., Cohen O.S., Raychowdhury M.K., Chadee D.N., Zhang Y., Kyriakis J.M., Alessandrini A.A., Lin H.Y. (2003). "Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation". *Am J Physiol Cell Physiol* **285**(4): 823-830.

Rahimi R.A. and Leof E.B. (2007). "TGF- β Signaling: A Tale of Two Responses". *Journal of Cellular Biochemistry* **102**: 593-608.

Ross S., Hill C.S. (2008). "How the Smads regulate transcription". *The Int J of Biochemistry & Cell Biology* **40**: 383-408.

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). "PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value". *J Clin Endocrinol Metab* **90**(1): 463-468.

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): 4048-4052.

Sapkota G., Alarcon C., Spagnoli F.M., Brivanlou A.H., & Massague J. (2007). "Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker". *Mol Cell* **25**: 441-454.

Savagner P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition". *Bioessays* **23**(10): 912-923.

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**: 27367-27377.

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**: 2527-2530.

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): 279-288.

Sekelsky J.J., Newfeld S.J., Raftery L.A., Chartoff E.H., Gelbart W.M. (1995). "Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**(3): 1347-1358.

Seoane J., Le H.V., Shen L., Anderson S.A., and Massagué J. (2004). "Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation". *Cell* **117**: 211-223.

Shi Y. and Massagué J. (2003). "Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus". *Cell* **113**: 685-700.

Shi W., Sun C., He B., Xiong W., Shi X., Yao D., Cao X. (2004). "GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF β type I receptor". *J Cell Biol* **164**: 291-300.

Smanik P.A., Fithian L.J., and Jhiang S.M. (1994). "Thyroid peroxidase expression and DNA polymorphisms in thyroid cancer". *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **198**: 948-954.

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**: 541-573.

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**: 26449-26455.

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* **111**: 1369-1372.

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**: 2266-2282.

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.

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**: 4834-4842.

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 Hill C.S. (2004). "New insights into TGF- β -Smad signalling". *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**(5): 265-273.

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

Truty M.J. and Urrutia R. (2007). "Basics of TGF- β and pancreatic cancer". *Pancreatology* **7**: 423-435

Tseng W.F., Huang S.S., Huang J.S. (2004). "LRP-1/T β R-V mediates TGF- β 1-induced growth inhibition in CHO cells". *FEBS Lett* **562**: 71-78.

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): 1187-1194.

Tucker R.F., Shipley G.D., Moses H.L., Holley R.W. (1984). "Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor". *Science* **226**: 705-707.

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.

Vasko V., Espinosa A.V., Scouten W., He H., Auer H., Liyanarachchi S., Larin A., Savchenko V., Francis G.L., de la Chapelle A., Saji M. and Ringel M.D. (2007). "Gene expression and functional evidence of epithelial to mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion". *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 2803-2808.

Villanueva A., Garcia C., Paules A.B., Vicente M., Megias M., Reyes G., Devillalonga P., Agell N., Lluís F., Bachs O., Capella G. (1998). "Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells". *Oncogene* **17**: 1969-1978.

Vitagliano D., Portella G., Troncone G., Francione A., Rossi C., Bruno A., Giorgini A., Coluzzi S., Nappi T.C., Rothstein J.L., Pasquinelli R., Chiappetta G., Terracciano D., Macchia V., Melillo R.M., Fusco A., Santoro M. (2006). "Thyroid targeting of the Nras (Gln61Lys) oncogene in transgenic mice results in follicular tumors that progress to poorly differentiated carcinomas". *Oncogene* **25**: 5467-5474.

Wakefield L.M. and Roberts A.B. (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis". *Curr Opin Genet Dev* **12**: 22-29.

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**: 435-444.

Watanabe M., Masuyama N., Fukuda M. and Nishida E. (2000): "Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal". *EMBO Reports* **1**: 176-182.

Wong C., Rougier-Chapman E.M., Frederick J.P., Datto M.B., Liberati N.T., Li J.M., and Wang X.F. (1999). "Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor β ". *Mol Cell Biol* **19**: 1821-1830.

Wotton D., Lo R.S., Lee S., and Massagué J. (1999). "A Smad transcriptional corepressor". *Cell* **97**: 29-39.

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): 1003-1014.

Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. & Massagué J. (1994). "Mechanism of activation of the TGF- β receptor". *Nature* **370**: 341-347.

Wu J.W., Krawitz A.R., Chai J., Li W., Zhang F., Luo K., and Shi Y. (2002). "Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: Insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling". *Cell* **111**: 357-367.

Wurthner J.U., Frank D.B., Felici A., Green H.M., Cao Z., Schneider M.D., McNally J.G., Lechleider R.J., Roberts A.B. (2001). "Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone". *J Biol Chem* **276**: 19495-19502.

Wyllie F.S., Dawson T., Bond J.A., Goretzki P., Game S., Prime S., and Wynford-Thomas D. (1991). "Correlated abnormalities of transforming growth factor- β 1 response and p53 expression in thyroid epithelial cell transformation". *Mol. Cell. Endocrinol.* **76**: 13-21.

Zawel L., Dai J.L., Buckaults P., Zhou S., Kinzler K.W., Vogelstein B., and Kern S.E. (1998). "Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators". *Mol Cell* **1**: 611-617.

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**: 2369-2372.

Zhang Y., Feng X.H., and Derynck R. (1998). "Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription". *Nature* **394**: 909-913.

Zhang S., Fei T., Zhang L., Zhang R., Chen F., Ning Y., Han Y., Feng X.H., Meng A., Chen Y.G. (2007). "Smad7 antagonizes TGF-beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation". *Mol Cell Biol* **27**(12): 4488-4499.

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**: 2859-2863.

Xiao Z., Liu X., Henis Y.I., and Lodish H.F. (2000 a). "A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad3 determines its ligand-induced nuclear translocation". *PNAS* **97**: 7853-7858.

Xiao Z., Liu X., Lodish H.F. (2000 b). "Importin beta mediates nuclear translocation of Smad3". *J Biol Chem* **275**(31): 23425-23428.

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): 1057-1069.

Xu L., Chen Y.G., and Massagué J. (2000). "The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGF β -dependent phosphorylation". *Nat Cell Biol* **2**: 559-562.

Xu L., Kang Y., Col S., and Massagué J. (2002). "Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus". *Mol. Cell* **10**: 271-282.

Xu L., Alarcon C., Col S., and Massagué J. (2003). "Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import". *J. Biol. Chem.* **278**: 42569-42577.

Xu L. (2006). "Regulation of Smad activities". *Biochim Biophys Acta* **1759**(11-12): 503-513.

Yahata T., de Caestecker M.P., Lechleider R.J., Andriole S., Roberts A.B., Isselbacher K.J., and Shioda T. (2000). "The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors". *J Biol Chem* **275**: 8825-8834.

Yamamura Y., Hua X., Bergelson S., Lodish H.F. (2000). "Critical role of smads and AP-1 complex in TGFbeta-dependent apoptosis". *J Biol Chem* **275**: 36295-36302.

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 di tutte le R-Smad
DPC-4	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
GH	Growth Hormone
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IL-2	Interleuchina-2
I-Smad	Inhibitor Smad

JNK	Jun N-terminal Kinase
LM	Lamina
MAPK	Mitogen Activated Protein (MAP) Kinases
MMPs	Metalloproteasi
NIS	Na ⁺ /I ⁻ symporter
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
p38 (MAPK)	p38 Mitogen Activated Protein (MAP) Kinases
PI3-kinase	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPAR- γ 1	Peroxisome Proliferator-Activater Receptor γ 1
Rb	Retinoblastoma
R-Smad	Receptor regulated Smad
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
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
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
T β RV	Type V TGF- β Receptor
TG	Tireoglobulina
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloprotease-1
TPO	Tireoperossidasi
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
TSH-R	Thyroid-Stimulating Hormone-Receptor
TTF-1	Thyroid transcription factor-1
TTF-2	Thyroid transcription factor-2