

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA**  
DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE E ONCOLOGIA

**ALTERAZIONI EPIGENETICHE REVERSIBILI  
ASSOCIATE ALLA TRANSIZIONE EPITELIO  
MESENCHIMALE (EMT) INDOTTA IN CELLULE  
PROSTATICHE TUMORALI UMANE**

Coordinatore.

Professor Antonio Toniolo

Docente guida:

Dott. Ian Marc Bonapace

Tesi di Dottorato di:  
Dott.ssa Samantha Rizzo  
Matricola n°614027

XXVII CICLO - 2011/2014

... A Stefano, l'amore della mia vita  
e alla mia famiglia, che mi ha dato la vita.

# ***Indice***

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>CANCRO ALLA PROSTATA</b>	<b>2</b>
<b>TRANSIZIONE EPITELIO MESENCHIMALE (EMT)</b>	<b>3</b>
CLASSIFICAZIONE DELLA EMT	3
EMT di Tipo I: Sviluppo embrionale e organogenesi	4
EMT di Tipo II: Rigenerazione del tessuto e fibrogenesi	5
EMT di Tipo III: Progressione tumorale e metastasi	6
MARCATORI MOLECOLARI DI EMT	8
E-caderina	9
N-caderina e Vimentina	12
REGOLAZIONE ED INDUZIONE DEL PROCESSO DI EMT	14
FATTORI TRASCRIZIONALI IMPLICATI NELLA EMT	16
Famiglia Snai	17
Twist1	19
Famiglia Zeb	20
EMT E MICROAMBIENTE TUMORALE	21
RUOLO DEI FIBROBLASTI ASSOCIATI AL CANCRO (CAF)	22
<b>EPIGENETICA NEL PROCESSO DI EMT</b>	<b>25</b>
LA METILAZIONE DEL DNA	26
Uhrf1 e DNA-metiltransferasi (DNMTs)	28
LE MODIFICAZIONI ISTONICHE	30
Iston metiltransferasi (HMTs)	31
MicroRNAs	35
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>40</b>
Linee cellulari, colture primarie e modello sperimentale di EMT-MET “ex vivo”	41

<b>Estrazione DNA, RNA e proteine</b>	<b>41</b>
<b>Western Blotting</b>	<b>42</b>
<b>cDNA</b>	<b>43</b>
<b>Conversione del DNA con reazione di bisolfito e <i>Pyrosequencing</i></b>	<b>43</b>
<b><i>Illumina Infinium HD Methylation</i> (Infinium HumanMethylation Array)</b>	<b>44</b>
<b>Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)</b>	<b>45</b>
<b>RT-PCR semiquantitativa e PCR quantitativa</b>	<b>47</b>
<b>Analisi statistiche e densitometriche</b>	<b>48</b>
<b><i>RISULTATI</i></b>	<b>50</b>
<b>MODELLO SPERIMENTALE DI EMT-MET IN CELLULE TUMORALI PROSTATICHE LN-CaP e PC3.</b>	<b>51</b>
<b>ANALISI DI ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DEI MARCATORI MOLECOLARI INDUCENTI EMT.</b>	<b>53</b>
STUDIO DEL FENOMENO DI REVERSIBILITA' DEL PROCESSO DI EMT: LA MET	54
<b>ANALISI DI ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DEI FATTORI TRASCRIZIONALI INDUCENTI EMT</b>	<b>56</b>
STUDIO DELL'ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DEI FATTORI TRASCRIZIONALI NEL PROCESSO DI MET.	57
<b>PC3 CM-CAF REGOLA L'ESPRESSIONE DELLE DNMTs E DI UHRF1 DURANTE IL PROCESSO DI EMT</b>	<b>59</b>
ALTERAZIONI REVERSIBILI DELLE DNMTs E UHRF1 DURANTE IL PROCESSO DI MET	60

<b>ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DELLE ISTO-METILTRANSFERASI IN EMT</b>	<b>63</b>
ALTERAZIONI REVERSIBILI DELLE HMTs DURANTE IL PROCESSO DI MET	64
<b>L'EMT INDOTTA DA CM-CAF DETERMINA IPOMETILAZIONE DELLE SEQUENZE LINE-1</b>	<b>66</b>
DNMTs E LINE-1 NEL PROCESSO INVERSO DI MET	67
<b>IL PROCESSO DI EMT DETERMINA VARIAZIONI REVERSIBILI DI METILAZIONE IN PIÙ DI 100K CpGs</b>	<b>69</b>
<b>LA METILAZIONE DEL DNA E' ASSOCIATA AI CAMBIAMENTI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI RESPONSABILI DELLA EMT E DELLA MET</b>	<b>73</b>
<b>ANALISI DELLA CONDIZIONE EPIGENETICA DEL PROMOTORE DI CDH1 IN CELLULE PC3 IN EMT</b>	<b>79</b>
ANALISI DI <i>PYROSEQUENCING</i> DELLE REGIONI DEL PROMOTORE DI CDH1 DURANTE IL PROCESSO DI EMT	83
<b><i>DISCUSSIONE</i></b>	<b>85</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	<b>95</b>

# ***Introduzione***

Il cancro è un processo complesso che implica cambiamenti genetici ed epigenetici che risultano nell'attivazione di *pathways* oncogeniche e/o nell'inattivazione di segnali soppressivi tumorali. Durante la progressione tumorale, le cellule cancerogene possono allontanarsi dalla propria massa per invadere lo stroma adiacente, entrare nella circolazione ed eventualmente metastatizzare in organi distanti (Tamer T. et al, 2014). Uno dei meccanismi candidati a svolgere questa funzione è il processo di transizione epitelio mesenchimale (EMT), un programma di sviluppo embrionale nel quale le cellule tumorali perdono le loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale (Sanchez-Tillo E. et al, 2012; Peinado H. et al, 2007).

Diversi studi hanno incentrato la loro attenzione sul processo di EMT nei diversi tipi di tumori, compreso il cancro alla prostata, al quale è stata focalizzata l'attenzione in questo lavoro di tesi.

## **CANCRO ALLA PROSTATA**

Il carcinoma della prostata (PCa) è uno dei tumori maligni più frequenti del maschio, il numero assoluto dei nuovi casi di carcinoma prostatico è in relazione all'aumento della popolazione e all'invecchiamento della stessa, ma anche, ad un aumento dell'incidenza indipendente dall'età. Nei paesi industrializzati questo tipo di neoplasia è, negli uomini sopra i 50 anni, la terza causa di morte di cancro dopo i tumori del polmone e del colon-retto (Li L.C. et al, 2005).

La prostata è una ghiandola endocrina che risponde ad una serie di ormoni come androgeni, estrogeni e progesteroni attraverso i loro recettori specifici.

Il recettore androgeno (AR) media l'attività androgena, la quale è molto importante per lo sviluppo sia della prostata normale che del cancro prostatico. Il cancro alla prostata è inizialmente androgeno-dipendente ma può eventualmente diventare androgeno-indipendente, che è caratterizzato da una perdita eterogenea dell'espressione di AR dopo una terapia di deprivazione androgenica. La prostata, oltre ad esprimere androgeni, esprime due tipi di recettori estrogeni (ERS): ER $\alpha$  (ESR1) e ER $\beta$  (ESR2).



La perdita o l'aumento di espressione di entrambi questi recettori gioca un ruolo chiave nello sviluppo tumorale, la minor espressione di ESR1, è inoltre associata ad una prognosi peggiore; questo recettore è inoltre frequentemente metilato nel cancro alla prostata e lo stato di metilazione è associato con la progressione tumorale, inoltre l'inattivazione di ESR2 nel cancro prostatico primario è di natura epigenetica.

Il sistema “*grading*” secondo Gleason (sistema che permette l'assegnazione di punteggio riferito al livello di alterazione cellulare e strutturale del tessuto neoplastico rispetto a quello sano), ultimamente, è stato anche associato alla progressione morfologica del processo di EMT (Naussef J. and Henry D, 2011). Questo sistema, infatti, è correlato con la perdita dell'architettura epiteliale, che include la perdita della polarità cellulare e l'acquisizione di un fenotipo mesenchimale, caratterizzato da aggressività e invasività cellulare.

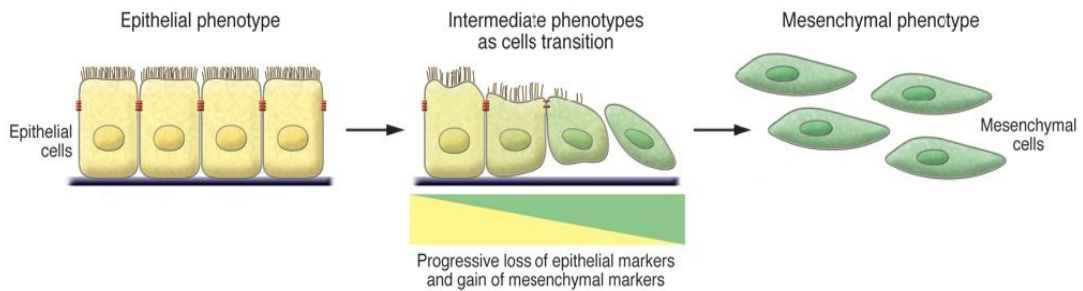
## **TRANSIZIONE EPITELIO MESENCHIMALE (EMT)**

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) rappresenta il processo dinamico e finemente regolato fondamentale per lo sviluppo embrionale, per il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti, per la fibrosi tissutale e per il cancro.

Le prime descrizioni della EMT risalgono al 1968, ad opera di Elisabeth Hay, che, per prima, descrisse una “trasformazione epitelio-mesenchimale” in un modello di sviluppo embrionale di pulcino. Il termine trasformazione venne in seguito rimpiazzato dal termine “transizione”, che riflette in parte la reversibilità di questo processo e la differenza dalla trasformazione neoplastica (Thiery J.P et al, 2002; Kalluri R. and Weinberg R., 2009).

## **CLASSIFICAZIONE DELLA EMT**

L'EMT è stata classificata in tre condizioni biologiche diverse, con esiti differenti a seconda del contesto biologico in cui essa si verifica. In tutte queste condizioni il processo di EMT porta allo sviluppo di un fenotipo mesenchimale partendo da cellule con caratteristiche epiteliali (Figura 1).



**Figura 1:** Il processo di EMT. Le cellule perdono progressivamente i loro marcatori epiteliali e acquisiscono marcatori mesenchimali.

La proposta di classificare il processo di EMT in tre differenti sottotipi biologici in base al contesto cellulare nei quali essa avviene, è stata discussa nel 2007 al meeting dell'EMT in Polonia e ad un successivo meeting al Cold Spring Harbor Laboratories.

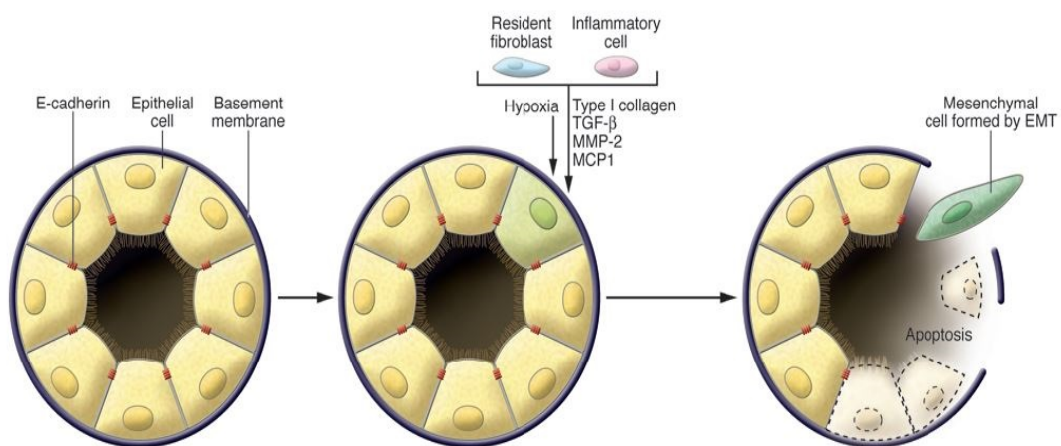
I processi di EMT che sono associati all'impianto, alla formazione dell'embrione, allo sviluppo dell'organo, appartengono all'EMT di tipo I; quelli associati al riparo delle ferite, alla rigenerazione tissutale e alla fibrogenesi, al tipo II; mentre l'EMT di tipo III avviene nelle cellule neoplastiche che vanno incontro a cambiamenti genetici e epigenetici (Thiery J.P et al, 2009).

### ***EMT di Tipo I: Sviluppo embrionale e organogenesi***

Nei primissimi stadi dell'embriogenesi l'impianto dell'embrione e l'inizio della formazione della placenta sono entrambi associati ad una EMT che coinvolge l'endoderma. In particolare le cellule del trofoblasto, precursori del citotrofoblasto, vanno incontro a EMT per facilitare l'invasione dell'endometrio e il conseguente corretto impianto dell'embrione. Durante lo sviluppo embrionale anche la fase di gastrulazione è interessata dal processo di EMT, attraverso il quale si arriva alla formazione dei tre foglietti embrionali, e le cellule epiteliali del neuroectoderma danno origine a cellule migratorie della cresta neurale. A livello biochimico la EMT associata a questi processi di sviluppo è dipendente dal *signaling* di Wnt, mediato dal TGF- $\beta$  (Vicovac L.& Aplin D., 1996)

**EMT di Tipo II: Rigenerazione del tessuto e fibrogenesi**

Questo tipo di EMT è associato alla fibrosi degli organi, (Figura 2) processo che interessa alcuni tessuti epiteliali ed è associato all'infiammazione e alla generazione di numerosi tipi di molecole da cellule infiammatorie e fibroblasti attivati (miofibroblasti), che rilasciano una certa quantità di segnali pro-infiammatori, che causano la perdita della polarità epiteliale attraverso la degradazione della membrana basale, attraverso componenti della matrice extracellulare come collagene I, laminina, elastina, fibronectina, e tenacina



**Figura 2:** EMT e Fibrosi

Gli organi interessati dalla EMT di questo tipo e dal processo di fibrogenesi sono soprattutto il rene, il fegato, i polmoni e l'intestino, spesso in associazione ad una condizione infiammatoria. Durante la EMT di tipo II, le cellule degli organi interessati mantengono una morfologia epiteliale e l'espressione di marcatori molecolari come la citocheratina e l'E-caderina, esprimendo allo stesso tempo anche il marcatore mesenchimale FSP1 (proteina specifica dei fibroblasti), la  $\alpha$ -SMA (isoforma dell'actina del muscolo liscio), il collagene I e la proteina citoscheletrica S100. Queste cellule, però, hanno già acquisito nuovi marcatori mesenchimali (Fuxe J. Et al, 2010), per cui si trovano in uno stadio intermedio definito "EMT parziale" (vedi Figura 3), nel quale essi sono espressi contemporaneamente a quelli epiteliali (Tam W.L et Weinberg R.A, 2013).

Esperimenti recenti, effettuati su topo, hanno dimostrato che anche le cellule endoteliali associate al microcircolo possono contribuire alla formazione di cellule mesenchimali durante la fibrosi, attraverso un processo analogo detto EndMT (Potenta S. et al, 2008).

Il comportamento di queste cellule indica che le cellule epiteliali, in condizione infiammatoria, possono richiamare cellule come macrofagi e fibroblasti residenti attivati che si accumulano nel sito danneggiato e rilasciano fattori di crescita, come TGF- $\beta$ , EGF e FGF che stimolano il processo di EMT (Cirri P et al, 2011).

Sotto l'influenza di queste molecole segnale, le cellule epiteliali insieme alle cellule infiammatorie, inducono la degradazione del collagene di tipo IV e della laminina della membrana basale, favorendo la migrazione delle cellule trasformate nell'interstizio circostante dove contribuiscono al fenotipo fibrotico (Strutz F. et al, 2002).

### ***EMT di Tipo III: Progressione tumorale e metastasi***

L'eccessiva proliferazione cellulare e l'angiogenesi sono caratteristiche evidenti dell'inizio e della successiva crescita di un tumore primario. La successiva acquisizione di invasività, inizialmente manifestata dall'invasione attraverso la membrana basale è considerata uno dei primi passaggi di un processo *multistep*, che può eventualmente terminare con la disseminazione metastatica. I controlli genetici e i meccanismi biochimici che sottolineano l'acquisizione di un fenotipo invasivo e la seguente diffusione sistemica delle cellule cancerogene, sono state e sono aree di intensiva ricerca. In molti di questi studi, l'attivazione di un programma di EMT è stato proposto come il meccanismo critico per l'acquisizione di un fenotipo maligno a partire da cellule tumorali epiteliali (Thiery J.P et al, 2009).

Questo tipo di EMT è stato quindi associato alla progressione dei carcinomi e alla metastatizzazione. In questi processi le cellule di carcinoma, soprattutto quelle presenti al fronte invasivo del tumore primario, mostrano frequentemente una down-regolazione dei marcatori del fenotipo epiteliale, come la E-caderina, ed una perdita delle giunzioni intercellulari che porta ad

una ridotta adesività intercellulare (Tamer T.O et al, 2014). Tutto ciò è spesso accompagnato da un'aumentata motilità cellulare e dall'espressione di marcatori mesenchimali come Vimentina, una proteina dei filamenti intermedi, e N-caderina, caderina neuronale (Sanchez-Tillo E. et al, 2012). Sono sovraespresse, anche altre proteine citoplasmatiche, come: l' $\alpha$ -Sma, la  $\gamma$ -Actina, la  $\beta$ -Filamina e la Talina, così come altre componenti della matrice extracellulare come la fibronectina ed il collagene (La Gamba D. et al, 2005). L'aumento di espressione di queste proteine può facilitare la formazione di pseudopodi e il rimodellamento del citoscheletro. Il processo di rimodellamento è anche regolato dalle MMPs (Matrix Metallo Proteinase), le quali permettono alle cellule tumorali di invadere il microambiente circostante e di dar luogo a metastasi a distanza (Catania O. et al, 2007)

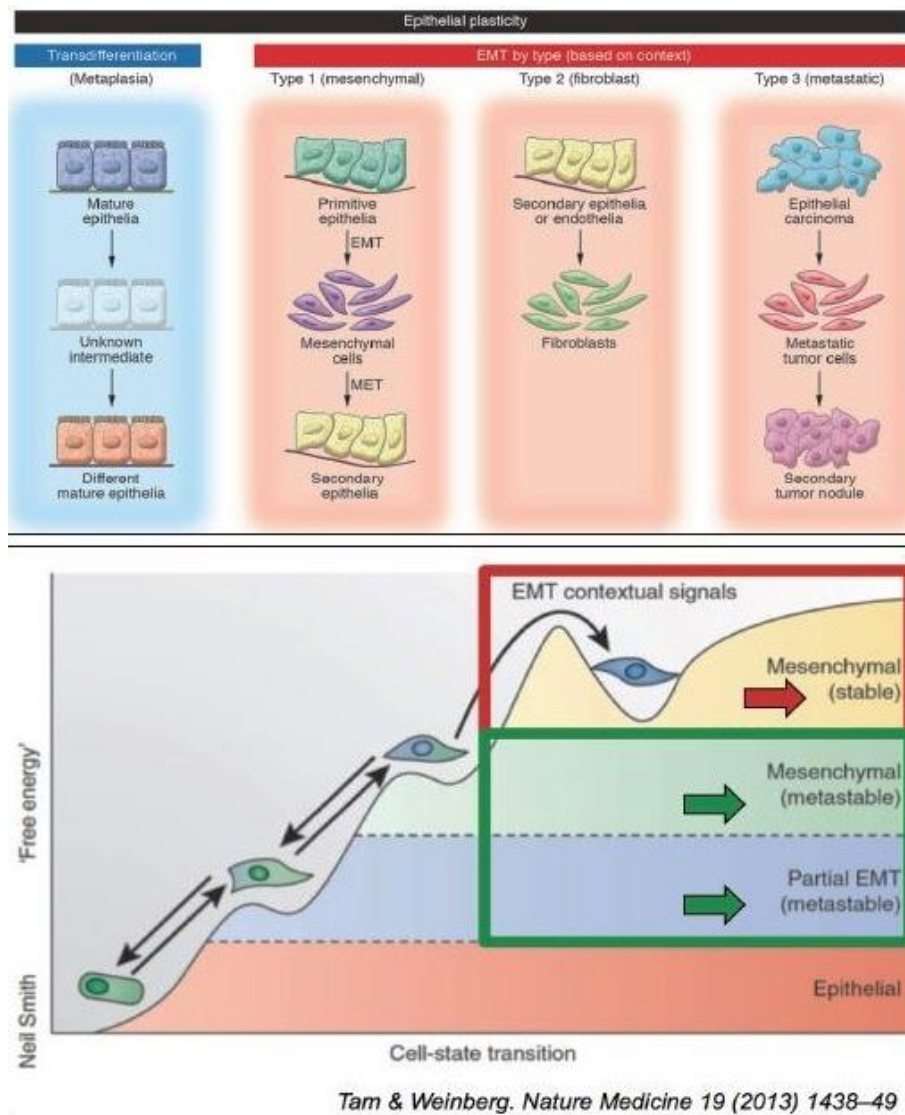
La EMT si configura, quindi, come un prerequisito importante per originare cellule tumorali capaci di infiltrare i tessuti circostanti e di metastatizzare. Tuttavia in alcuni casi, molti carcinomi invasivi e metastatici non sono sottoposti ad una completa transizione ad un fenotipo mesenchimale, ma bensì possiedono le caratteristiche molecolari e morfologiche tipiche di un epitelio ben differenziato, esprimendo alti livelli di E-caderina, e presentando giunzioni epiteliali e polarità apicale-basolaterale. Questo può essere dovuto al fatto che le cellule del carcinoma maligno possono iniziare una parziale EMT e rinvertire da mesenchimali a epiteliali nei siti di metastasi distali secondo un processo detto MET (transizione mesenchimale-epiteliale), infatti, questi tumori secondari nei siti distali mantengono le stesse caratteristiche istopatologiche del tumore primario, senza mostrare fenotipo mesenchimale (Chaffer C.L et al, 2006).

La transizione ad un fenotipo maligno aggressivo non è un evento "tutto o nulla", infatti è contraddistinto da fenomeni di stabilità e metastabilità cellulare (Figura 3). L'acquisizione di caratteristiche mesenchimali in cellule tumorali non è permanente, le cellule epiteliali che vanno incontro ad EMT, attraversano per primo uno stadio di EMT parziale, esprimendo ancora i marcatori epiteliali, ma contemporaneamente, co-esprimono i marcatori mesenchimali neoacquisti. (Tam WL. & Weinberg RA., 2013). Questo stadio

è seguito da uno stadio mesenchimale metastabile, che, in assenza di segnali che promuovono la repressione epigenetica di geni epiteliali chiave, come la E-caderina, permette alle cellule di ritornare ad un fenotipo epiteliale attraverso un fenomeno di transizione mesenchimale-epiteliale (MET). Mentre il guadagno di un fenotipo mesenchimale stabile dipende dalla presenza di potenti segnali promoventi l'EMT (Tam WL. & Weinberg RA., 2013). Si evidenzia, quindi, un quadro in cui il *landscape* epigenetico governa la plasticità della transizione epitelio-mesenchimale.

### **MARCATORI MOLECOLARI DI EMT**

All'interno dei carcinomi, le cellule neoplastiche possono trovarsi in diversi stati fenotipici che variano dallo stato epiteliale, tendenzialmente differenziato, a quello mesenchimale, condizione di non completo differenziamento. Nel tumore primario la quasi totalità delle cellule neoplastiche ha caratteristiche fenotipiche epiteliali. Alcune di esse, soprattutto quelle presenti sul fronte invasivo del carcinoma primario, richiedono, per potersi staccare ed entrare nel torrente circolatorio e/o nel sistema linfatico e provocare metastasi in un altro tessuto, lo *switch* fenotipico dalla condizione epiteliale a quella mesenchimale (Tomita K. Et al, 2000, Thiery J.P et al, 2009).



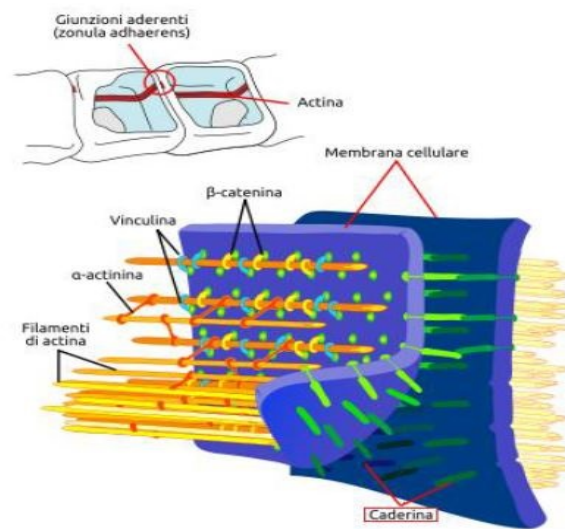
**Figura 3:** I differenti tipi di EMT determinano la plasticità del fenomeno di EMT, inoltre il processo di EMT è caratterizzato dallo stato di metastabilità e stabilità in cui le cellule tumorali vanno incontro durante la transizione epitelio-mesenchimale.

### ***E-caderina***

Il marcatore chiave della EMT è l'E-caderina, codificata dal gene CDH1, avente doppia funzione nelle cellule epiteliali: come molecola di adesione cellula-cellula e come regolatore negativo della cascata di segnale di Wnt, in particolare del suo mediatore centrale, la  $\beta$ -catenina.

L'E-caderina (detta anche *uvomorulina*), è espressa molto precocemente durante lo sviluppo embrionale; si tratta di una glicoproteina a singolo

passaggio transmembrana che appartiene alla famiglia delle caderine classiche, è localizzata nella membrana basolaterale delle giunzioni aderenti definendo la polarità apico-basale, inoltre media le adesioni intercellulari omofitiche e interagisce con proteine intracellulari per stabilire e coordinare la morfologia, polarità e funzione delle cellule epiteliali (Peinado H. et al, 2004)(Figura.4)



**Figura 4:** Localizzazione e funzione dell'E-caderina a livello delle giunzioni aderenti cellulari.

La proteina E-caderina, è costituita da una grossa porzione extracellulare amino-terminale di circa 550 aa composta da 5 domini immunoglobulinici (chiamati extracellular cadherin repeats- da EC1 a EC5), da una piccola porzione transmembrana e da una porzione intracellulare carbossi-terminale di circa 150 aa che, attraverso il reclutamento dell' $\alpha$  e  $\beta$ -catenina, svolge un ruolo fondamentale di ancoraggio ai microfilamenti di actina e di conseguenza al citoscheletro.

La porzione extracellulare è responsabile dell'adesione della molecola E-caderina con le cellule adiacenti. In particolare uno o più domini immunoglobulinici delle E-caderine, poste su cellule adiacenti, si legano con i corrispettivi domini tramite un'associazione "testa contro testa". Inoltre, il legame di ioni calcio nei siti specifici, ha la funzione di irrigidire la molecola e



di esporre i residui amminoacidici che formano l'interfaccia del dimero. La porzione intracellulare, invece, consente l'associazione delle caderine con il citoscheletro attraverso la mediazione con altre componenti delle giunzioni aderenti ed in particolare con le proteine chiamate armadillo: la p-120 catenina e la  $\beta$ -catenina, che legano rispettivamente il dominio prossimale alla membrana ed il dominio C-terminale della E-caderina (Strathdee G, 2002).

A differenza della moltitudine delle diverse varianti tessuto specifiche delle caderine, la  $\beta$ -caderina è una proteina altamente conservata evolutivamente. La  $\beta$ -catenina può svolgere funzioni differenti a seconda della localizzazione intracellulare; a livello della membrana plasmatica, quando legata alla E-caderina all' $\alpha$ -catenina, è un importante componente delle giunzioni aderenti. Diversamente, se libera e presente in eccesso nel citoplasma, a causa ad esempio di una sua diminuita degradazione o di una minore espressione di E-caderina, partecipa alla trasduzione di segnali proliferativi attivando geni regolativi della crescita responsivi alla  $\beta$ -catenina, come ad esempio la via del segnale di Wnt (Tripathi R. et al, 2007).

Normalmente la  $\beta$ -catenina libera nel citoplasma si assembla in un complesso multiproteico di degradazione composto dalle serina/treonina chinasi CK1 e GSK3 $\beta$ , dal complesso APC (adenomatous polyposis coli protein) e dalla la proteina scaffold Axina. L'alterazione funzionale di questo complesso di degradazione dovute ad una riduzione della funzionalità e/o dell'espressione di E-caderina, a mutazioni in  $\beta$ -catenina stessa o in presenza del legame di Wnt con il suo recettore Frizzled sulla membrana plasmatica, induce un accumulo citoplasmatico della  $\beta$ -catenina che, a sua volta, può traslocare nel nucleo attivando geni specifici che promuovono e/o stimolano la proliferazione cellulare, il differenziamento (come Myc e la ciclina D1) la EMT.

L'E-caderina, quindi, non solo è un importante mediatore dell'adesione cellula-cellula, ma contribuisce a regolare i processi cellulari come la proliferazione, migrazione, apoptosi e mantenimento della polarità delle cellule epiteliali. La perdita di tal proteina è consistentemente osservata nei

siti di EMT durante lo sviluppo tumorale e il cancro (Fuxe J. et al, 2010; Tamer T.O et al, 2014).

Le alterazioni genetiche del gene CDH1, causanti la perdita di funzione dell'E-caderina, sono state identificate in una varietà di tumori, in ogni caso la stessa E-caderina svolge un ruolo come regolatore pleiotropico del fenotipo cellulare; alcuni studiosi tendono a soprannominare questa proteina come "*master regulator of cell behavior*" (Olmeda D. et al, 2008).

Durante la progressione tumorale, l'E-caderina può essere silenziata o inattivata attraverso diverse modalità (Lin HH. et al, 2009). La perdita o la riduzione dell'espressione di E-caderina, può essere causata da mutazioni somatiche, delezioni cromosomali e dall'ipermetilazione del promotore di CDH1 o attraverso l'azione di fattori trascrizionali come: SNAIL1, SLUG, TWIST1 e ZEB1 di cui in seguito ne verrà approfondita l'importanza.

Nel tumore alla prostata e in alcune lesioni tumorali di mammella, la perdita di espressione del gene dell'E-caderina è dovuta alla metilazione del promotore di CDH1 (Flori AR et al 2004).

Un grosso numero di isole CpG nella regione prossimale 5' del promotore del gene E-caderina mostrano metilazione aberrante del DNA in almeno 8 differenti tipi di carcinoma umano, questo dato correla con la riduzione dell'espressione della proteina E-caderina (Flori AR. Et al, 2004).

La repressione trascrizionale di E-caderina è mediata anche attraverso specifici fattori trascrizionali, principalmente repressori, che interagiscono con le E-boxes localizzate nella regione prossimale del promotore del gene CDH1 (Peinado H. et al, 2004).

La perdita dell'espressione dell'E-caderina nella membrana plasmatica è accompagnata dall'induzione di marcatori mesenchimali come N-caderina, Vimentina; dalla sintesi di componenti della matrice extracellulare e dalla produzione di metalloproteasi (Sanchez-Tillo E. et al, 2012).

### ***N-caderina e Vimentina***

La N-caderina è una glicoproteina transmembrana codificata dal gene (CDH2), implicata nell'adesione cellulare, è composta da un dominio

extracellulare, una regione transmembrana a singolo passaggio e una coda citoplasmatica (Takeichi M. et al., 1988).

La proteina CDH2 presenta una struttura simile a quella dell'E-caderina, ma è espressa principalmente dai tessuti neurali (è intimamente coinvolta nella adesione cellulare neuronale, svolge funzioni importanti nella segnalazione e differenziazione in particolar modo a livello delle sinapsi) e da quelli mesenchimali. Infatti, pare che l'overespressione di N-caderina, possa essere utilizzata come marcatore tumorale nei sarcomi (Islam S. et al, 2004). Altro elemento importante nella transizione epitelio mesenchimale è rappresentato dalla Vimentina, una proteina del citoscheletro appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi, la quale è espressa nelle cellule di origine mesenchimale. Un monomero di Vimentina ha un dominio centrale con struttura ad  $\alpha$ -elica, i domini terminali amminici sono posti in testa, mentre quello carbossilico (non-elicoideale) è posto in coda. Due monomeri di Vimentina si avvolgono uno con l'altro per formare una struttura dimerica definita *coiled-coil*; successivamente due dimeri si associano tra loro generando un tetramero che interagendo con altri tetrameri forma un foglio. Le sequenze di  $\alpha$ -elica sono composte principalmente da aminoacidi idrofobici che contribuiscono a formare una "zona idrofobica" sulla superficie dell'elica. Questo sigillo permette alle due eliche di unirsi tra loro e di modellarsi. Spesso è presente una distribuzione periodica di amminoacidi acidi e basici i quali sembrano giocare un ruolo importante nella stabilizzazione del dimerio *coiled-coil* (Ulirsch J. et al, .2012).

All'interno della cellula, la Vimentina è strettamente connessa al nucleo, al reticolo endoplasmatico e ai mitocondri, riveste un ruolo importante come supporto e ancoraggio degli organelli del citoplasma. Agisce inoltre nel cambio della conformazione e della struttura delle cellule, e nel rendere il loro citoscheletro più elastico e resistente, tramite la creazione di legami più forti con i microtubuli e i filamenti di actina. Quest'ultima proprietà risulta fondamentale per la migrazione delle cellule, perché senza questa, esse risulterebbero molto più fragili (Izmailova E. et al, 1999).

La rapida induzione di Vimentina è stata frequentemente osservata durante la EMT e numerosi studi hanno dimostrato che questo correla con il grado di incidenza del tumore e di sopravvivenza (Ulirsh J. et al, 2012). Le cellule di carcinoma che esprimono la Vimentina sono quelle del carcinoma renale, polmonare, ovarico, mammario, prostatico, dell'endometrio, della tiroide e delle ghiandole salivari (Sekimata M. et al, 2011).

Inoltre studi recenti hanno dimostrato lo stato di metilazione di questo gene è inversamente correlata all'espressione genica, in particolare nel cancro alla cervice e nella linea cellulare di cancro alla vescica (Jung S. et al, 2011).

### **REGOLAZIONE ED INDUZIONE DEL PROCESSO DI EMT**

Numerosi studi hanno confermato che in risposta ai segnali extracellulari che la cellula riceve, vengono espressi diversi fattori trascrizionali indotti o inducibili dal programma della EMT (Zheng H & Kang Y., 2013) che portano alla perdita di espressione dell'E-caderina.

Nei tessuti epiteliali, normali e neoplastici, il processo di EMT può essere indotto e regolato dalla convergenza di diversi segnali singoli o multipli, che le cellule ricevono dal microambiente circostante, ma anche da diversi fattori trascrizionali che legandosi a particolari sequenze del promotore di E-caderina, ne causano la repressione genica (Thiery J.P et al, 2009)

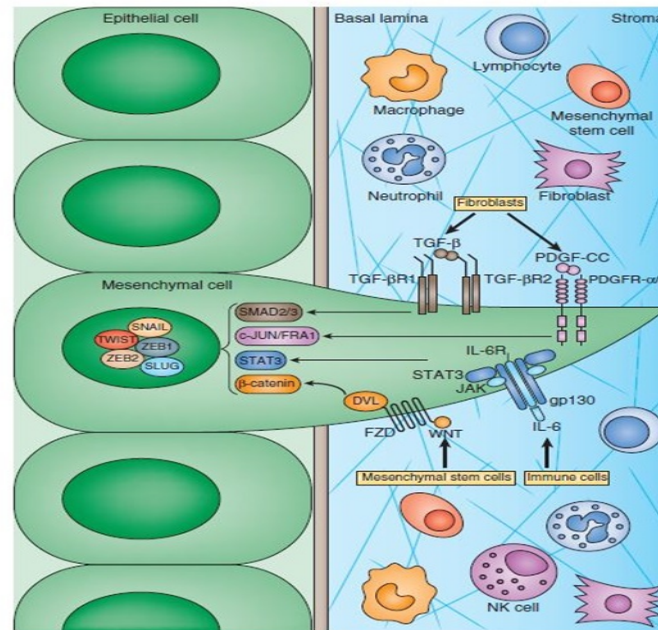
I fattori di crescita e di differenziazione, come i fattori di crescita degli epatociti (EGF), il fattore tumorale di necrosi alfa (TNF- $\alpha$ ) e il fattore di crescita trasformante (TGF- $\beta$ ); sono prodotti da cellule infiltrate o dalle stesse cellule tumorali e attivano una gamma diversificata di vie di trasduzione del segnale intracellulare, provocando l'espressione di una varietà di repressori trascrizionali (vedi oltre) (Figura.5).

Inoltre, è importante sottolineare che queste *pathways*, sono coinvolte nell'induzione e mantenimento di nicchie di cellule staminali e questo aspetto avvalorava maggiormente il *link* esistente tra il concetto di EMT e di staminalità. Tra tutti questi fattori, il TGF $\beta$  ha ricevuto maggior attenzione, come il maggiore induttore di EMT durante l'embriogenesi e la cancerogenesi (Lohr M. et al, 2001, Wang Y et Shang Y., 2012). TGF- $\beta$ , è una citochina

pleiotropica che regola lo sviluppo, il differenziamento e l'omeostasi della maggior parte di tessuti e tipi cellulari; inoltre coopera con i *pathways* di segnale di Wnt, Hedgehog, Notch e Ras, per l'indurre una completa EMT (Fuxe J. et al, 2010).

Una via di trasduzione del segnale importante, che media il processo della EMT, dopo legame col proprio ligando specifico, è la via di segnalazione di Wnt, mediata dalla  $\beta$ -catenina, che non solo è implicato nell'induzione di EMT nel cancro, ma regola anche il rinnovo delle cellule staminali. Un segnale aberrante di Wnt attraverso l'overespressione dei suoi ligandi o il silenziamento di inibitori endogeni del proprio segnale, è stato correlato a EMT in numerosi tipi di cancro umano (colon, mammella, melanoma e carcinomi prostatici). Inoltre, il segnale di Wnt è necessario per mantenere le cellule tumorali in uno stato di differenziazione e l'antagonista di questo segnale (DKK1) riduce la grandezza del tumore e la metastasi (Peiro S. et al, 2010).

Anche il fattore NF- $\kappa$ B è implicato nella EMT, in quanto promuove l'espressione del fattore di trascrizione Twist, il quale a sua volta lega le sequenze E-boxes e *down-regola* la E-caderina. Inoltre, può promuovere l'espressione di proteine mesenchimali, poiché, è anche in grado di legare sequenze regolatrici nel promotore della Vimentina.



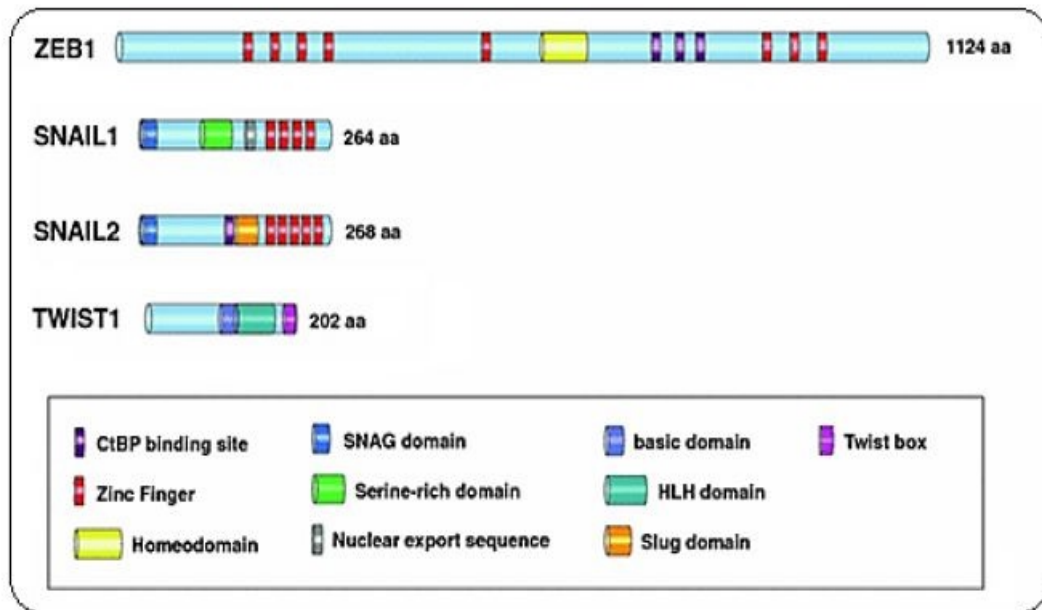
**Figura 5:** Schema riassuntivo delle pathways extracellulari che inducono il processo di EMT

### FATTORI TRASCRIZIONALI IMPLICATI NELLA EMT

Nell'EMT, il silenziamento genico di CDH1, è orchestrato da diversi fattori trascrizionali in grado di legarsi a specifiche sequenze di DNA, dette E-Boxes, presenti a livello del promotore del gene. Questi fattori, sono stati riconosciuti come EMT-ATFs (EMT- fattori attivi di trascrizione). Questi fattori trascrizionali sono: i membri della famiglia basic helix –loop-helix (bHLH), come TWIST1 e il gene E2A e E12/47, i membri della famiglia SNAIL, come ad esempio SNAIL1 e SNAIL2, e i membri della famiglia ZEB di repressori homeobox zinc finger (Micalizzi D.S.et al., 2010).

Tra tutti, quelli il cui meccanismo di azione è stato meglio studiato e analizzato in questo lavoro di tesi sono: SNAIL1, SLUG, TWIST1 e ZEB1 (Figura 6).

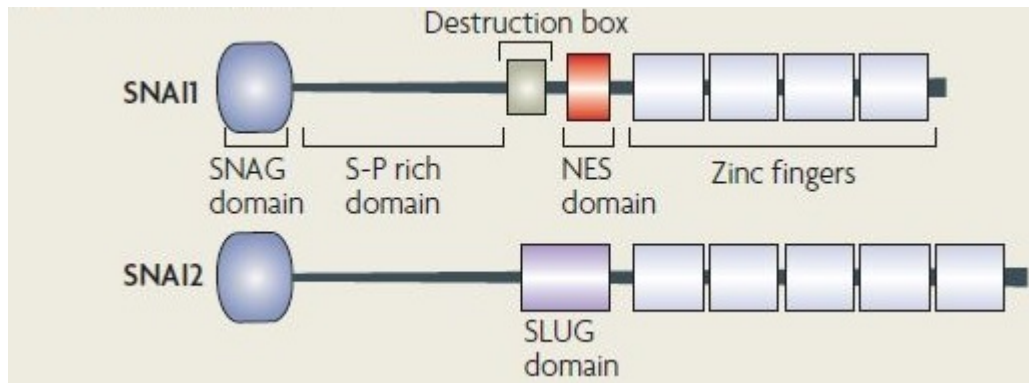
Tutti questi fattori di trascrizione agiscono attivando cascate metaboliche talvolta simili tra loro, talvolta differenti, ma tutti in grado di condurre all'effetto finale che porta alla down-regolazione di E-caderina, passaggio necessario e sufficiente per lo sviluppo dell'EMT (Wang Y and Shang Y, 2013).



**Figura 6:** Struttura molecolare degli EMT-ATFs e relativi domini interni. .

### ***Famiglia Snai***

La famiglia dei fattori trascrizionali Snai comprende tre membri: Snail1 (originariamente chiamato Snail), Snail2 (Slug) e Snail3 (Smuc) che condividono un'organizzazione comune e contengono domini zinc-fingers. Questi fattori presentano una regione al C-terminale altamente conservata, contenente dai 4 a 6 domini zinc-finger, che lega in modo specifico le sequenze consenso chiamate E-boxes nelle regioni regolative di geni target, come ad esempio CDH1. Questi domini zinc fingers differiscono nel numero tra Snail1 e Snail2: 4 (ZF1 a ZF4) nel primo e 5 (ZF1 a ZF5) nel secondo; per cui l'unica differenza tra queste zinc-fingers è la presenza unica della prima ZF in Snail2, mentre le altre 4 sono altamente conservate (Villarejo A. et al, 2013) E' presente inoltre una regione divergente N-terminale, responsabile della repressione trascrizionale e che può reclutare membri della famiglia delle deacetilasi (Figura 7).



**Figura 7:** Rappresentazione grafica della struttura di Snail1 e Snail2 in cui è possibile vedere la differenza a livello dei domini proteici.

I fattori Snail sono correntemente noti come repressori trascrizionali, la loro capacità repressoria dipende dallo SNAG domain che media il legame con diversi complessi tra cui Sin3A/HDAC1/HDAC2 e LSD1-coREST (Bolos V. et al, 2002). La porzione centrale della proteina presenta invece, una regione ricca in serine e proline, che è altamente divergente tra i due componenti principali della famiglia di Snail; in Snail2 è chiamata SLUG domain, la cui funzione non è ancora nota.

Snail1, presenta due differenti domini funzionali nella regione centrale: un dominio regolatorio che contiene una sequenza di esportazione nucleare (NES) riconosciuta dall'esportina CRM1 e un dominio di distruzione (DB).

La fosforilazione dei residui prolina/resina in entrambe le regioni e le potenziali modificazioni dei residui di lisina adiacenti sono implicati nella localizzazione cellulare, stabilità della proteina e nell'attività repressoria di Snail1.

Attraverso il dominio N-terminale SNAG, Snail1 interagisce con il dominio amminossidasi di LSD1 (Hystone Lysine-Specific Demethylase1) che a sua volta è legato al co-repressore trascrizionale denominato CoREST; si stabilizza così un complesso ternario che, tramite i domini zinc-fingers di Snail1, è guidato sul promotore di CDH1. Questo complesso, oltre ad avere un'azione repressiva, ha anche un ruolo importante per la stabilizzazione di Snail1, infatti, il dominio N-terminale di Snail1 se non impegnato in questo



complesso, risulta accessibile alla fosforilazione mediata di GS3K  $\beta$  e alla conseguente degradazione proteosomale.

Snail1, per di più, recluta e guida sul promotore altri corepressori come CtBP, il corepressore Sin3A e PCR2 (Polycomb repressor complex 2) e regola direttamente i marcatori epiteliali e mesenchimali.

I fattori di trascrizione della famiglia di Snail non solo reprimono direttamente i promotori dei geni epiteliali, grazie al legame specifico sull'5 '-CACCTG-3' del promotore di E-caderina, ma anche altri marcatori epiteliali indipendenti dai loro effetti su E-caderina, come ad esempio le claudine 1, 3, 4, 7, le occludine, le citocheratine, e le mucine (Guaita S. et al, 2002).

Oltre alla funzione repressoria sul gene CDH1, essi attivano l'espressione di geni mesenchimali come Vimentina, fibronectine MMP1,2,7 che promuovono la migrazione cellulare mediante l'interazione con altri fattori trascrizionali come TWIST1 e ZEB1 (Dave N et al, 2010).

Snail1 orchestra quindi, il bilancio tra i geni che positivamente e negativamente regolano i processi di 'adesione cellulare, motilità, ciclo e crescita cellulare (Vetter G. et al, 2009).

### ***Twist1***

E' classificato nella II classe della super famiglia dei fattori contenenti i domini basic/helix-loop-helix, fondamentale sia per il legame al DNA che per la dimerizzazione dei fattori stessi; presenta al C-terminale un dominio "Twist box" che è implicato sia nell'attivazione che nella repressione trascrizionale.

Il fattore Twist1 induce direttamente la EMT attraverso il suo effetto su altri EMT-ATFs; Twist1 reprime E-caderina non solo legandosi al suo promotore, ma anche attraverso l'induzione di Snail1 o Snail2, inoltre il knock-down di Snail2, blocca la capacità di Twist1 nel sopprimere E-caderina, in cellule HMLE (Casas E. et al, 2011, Dave N. et al, 2011).

L'espressione di Twist1, ad esempio, è maggiormente espressa nei tessuti prostatici tumorali rispetto ai tessuti normali (Kwok W.K et al, 2005), inoltre Twist1 è stato identificato come il "*master regulator*" di morfogenesi (Jang J. et al, 2004).

I fattori Twist, non sono sovraespressi nelle cellule tumorali, ma la loro reattività aumenta durante la progressione tumorale. Il knock-down di Twist1 in cellule tumorali mammarie, ad esempio, inibisce la loro capacità di metastatizzare, in modelli xenografici, ma non nella formazione di tumori primari (Yang J et al, 2004).

### **Famiglia Zeb**

Questa famiglia contiene due membri: ZEB1 e ZEB2, codificati indipendentemente dai geni ZFH1A e ZFH1B e caratterizzati dalla presenza di due cluster zinc fingers e di un *homeodomain* centrale, importanti per il legame con il DNA, e altamente conservato nelle varie specie.

I fattori ZEB interagiscono con il DNA attraverso il simultaneo legame dei 2 domini zinc fingers ai siti di legame ad alta affinità presenti a livello delle E-boxes (CACCT e CACCTG) sui promotori dei geni target, tra cui CDH1 (Sanchez-Tillo E. et al, 2012).

Questi fattori sono espressi fisiologicamente durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale, del muscolo cardiaco, del muscolo scheletrico e nelle cellule emopoietiche; inoltre, in questi tessuti, una mancanza funzionale in uno di questi fattori può essere parzialmente compensata dall'altro, indicando un ruolo comune per entrambi i fattori.

I fattori ZEB, legando le sequenze E-boxes del promotore di E-caderina, reclutano un set di corepressori e attivano marcatori mesenchimali come N-caderina e Vimentina; inoltre, ZEB1 è regolato dalla cooperazione funzionale tra Snail1 e Twist (Dave N. et al, 2011; Guaita S. et al, 2002).

Essendo un inibitore del fenotipo epiteliale, ZEB1, non è espresso nel tessuto epiteliale normale, e nel cancro alla prostata e alla mammella. Un alto livello di espressione di ZEB1, inoltre, correla significativamente con un alto grado del sistema *Gleason*, tanto da essere considerato un biomarcatore di metastasi. ZEB1, quindi, essendo un mediatore cruciale di EMT, contribuisce alla progressione maligna di vari tumori epiteliali, attraverso l'inibizione dell'espressione di E-caderina. ZEB2 è espresso nelle cellule

stromatiche in tessuti epiteliali, ma, è anche presente in cellule epiteliali positive a E-caderina in diversi organi.

L'espressione di un fattore trascrizionale come ZEB1, SNAIL1, SLUG o TWIST1 e/o la cooperazione di più di uno di essi durante il processo di EMT, ha reso e rende tuttora difficile capire la gerarchia molecolare e la collaborazione tra essi (Tan D. et al, 2011; Sanchez-Tillo E. et al, 2012).

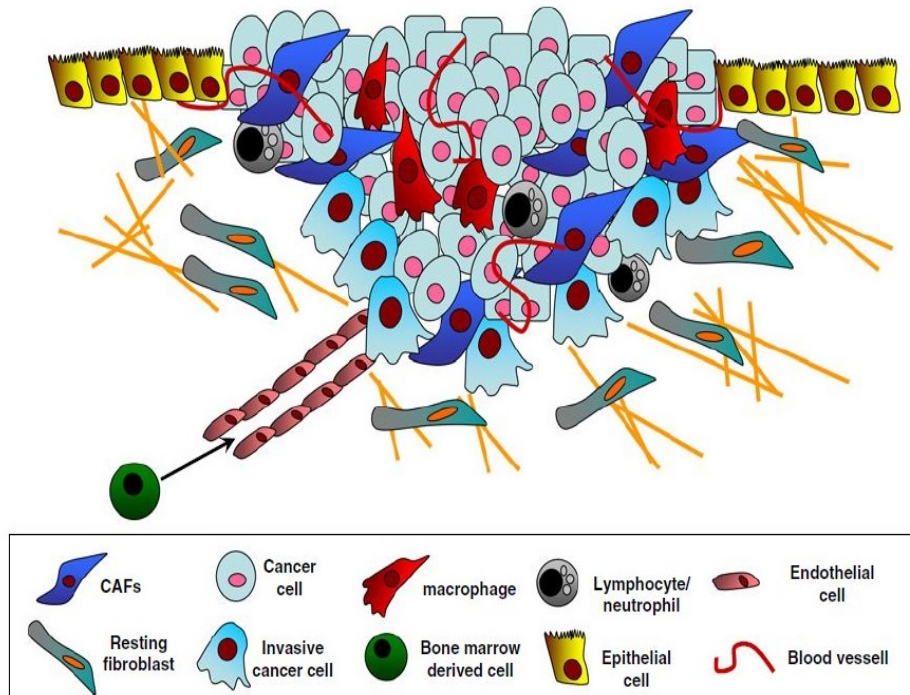
### **EMT E MICROAMBIENTE TUMORALE**

Diversi lavori si sono concentrati sullo studio della transizione epitelio mesenchimale a livello delle proprietà autonome delle cellule tumorali e dei meccanismi che regolano tale processo, come: l'induzione mediata da fattori trascrizionali e l'influenza dell'ambiente microtumorale.

L'interazione tra l'epitelio e lo stroma consentono, mediante l'invio reciproco di segnali, il mantenimento dell'omeostasi tissutale; se tal interazione è persa si va incontro alla formazione di un tumore.

Il microambiente tumorale subisce numerosi cambiamenti nel corso dello sviluppo del tumore influenzando fortemente sia l'evoluzione che la progressione del cancro (Dvorak H.F et al, 2011)

Lo stroma tumorale è un ambiente eterogeneo che consiste di matrice extracellulare, di cellule immunitarie e infiammatorie, di cellule endoteliali, di vasi sanguigni, nervi e soprattutto di fibroblasti di varia tipologia che rivestono un ruolo importante mediante la secrezione di fattori solubili, come fattori di crescita o citochine infiammatorie, o come la produzione di proteine per la costituzione della matrice extracellulare e di proteasi (De W.O et al, 2003; Pietras K. et al, 2010) (Fig. 8). Questi fibroblasti, se attivati, CAFs, sono coinvolti nello sviluppo di una nicchia di cellule cancerogene promuovendo la motilità di queste cellule e l'acquisizione quindi di uno stato mesenchimale; inoltre non possono essere rimossi per via apoptotica e la loro attivazione non è reversibile (Giannoni E. et al, 2010).



**Figura 8:** Microambiente stromale nel quale i fibroblasti associati al tumore (CAFs) evolvono. La degradazione della membrana basale promuove l'interazione delle cellule tumorali con i fibroblasti residenti, modificandone il loro fenotipo in CAFs. Essi, inoltre possono originare da cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo che differenziano in CAFs in risposta a stimoli di derivazione tumorale.

I CAFs sono estremamente abbondanti nello stroma di molti tumori, come ad esempio il tumore della mammella, della prostata e in carcinomi pancreatici. E' proprio l'importanza e il ruolo di questi fibroblasti associati al tumore di prostata (CAFs) come induttori di EMT e la differenza con i fibroblasti umani associati a iperplasie benigne (HPFs) che non inducono EMT che è stato oggetto di studio in questo lavoro di tesi.

### **RUOLO DEI FIBROBLASTI ASSOCIATI AL CANCRO (CAF)**

I CAFs (fibroblasti associati al cancro) rappresentano una sub-popolazione di cellule più abbondanti all'interno del microambiente tumorale in grado di promuovere la progressione tumorale favorendo processi come la crescita tumorale, l'angiogenesi, infiammazione, e la metastatizzazione (Madar S. et al, 2013).

I CAFs rappresentano la forma attiva dei fibroblasti associati al tumore, che hanno acquisito caratteristiche contrattili e secretorie; risultano fenotipicamente e funzionalmente distinguibili dai fibroblasti normali per la loro potenziata capacità di proliferare e per la presenza di fattori diversi rilasciati nella matrice extracellulare a loro adiacente; al contrario i fibroblasti non tumorali, presenti normalmente nel tessuto hanno il compito di mantenere l'omeostasi epiteliale attraverso la soppressione della proliferazione e di potenziali oncogeni (Begley LA. et al., 2008; Trimboli AJ. et al., 2009).

I CAFs, oltre a promuovere la crescita del tumore inducendo angiogenesi, reclutano cellule progenitrici midollari, rimodellano la matrice extracellulare (ECM), oltre che mediare la resistenza alla terapia anti-angiogenica (Crawford Y. et al., 2009).

Sono state formulate diverse ipotesi per spiegare l'origine dei CAFs ed, inoltre, il ruolo di questi sembra essere abbastanza controverso nei fenomeni di progressione tumorale, in quanto possono da un lato inibire e dall'altro promuovere la crescita maligna. Similmente alle cellule immunitarie, i CAFs reprimono i primi stadi della progressione tumorale, facilitando la formazione della *gap junctions* tra i fibroblasti attivati (Giannoni et al, 2010).

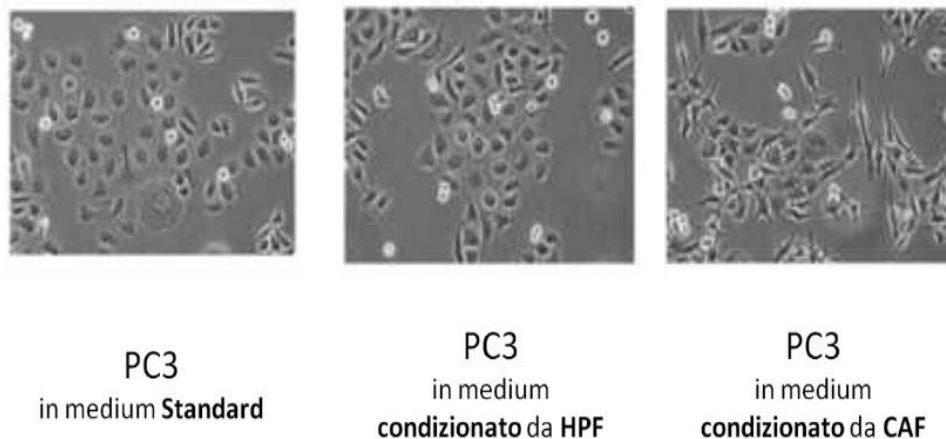
Il reclutamento dei fibroblasti e la loro attivazione in CAFs è possibile mediante la secrezione di fattori secreti dal tumore stesso (Giannoni E. et al., 2010 ; Cirri P.& Chiarugi P., 2011), ma possono anche derivare da fibroblasti residenti attraverso la cosiddetta transizione mesenchimale-mesenchimale (MMT) indotta da fattori di crescita tumorali,

Tra le loro molteplici attività a livello del microambiente, i CAFs possono indurre il differenziamento dei macrofagi verso un fenotipo di tipo M2 che è ritenuto un elemento favorente la crescita tumorale e quindi un indice di prognosi sfavorevole. È importante ricordare che i marcatori di attivazione più importanti presenti nei CAFs attivati sono  $\alpha$ -SMA, proteine fibroblasto-specifiche, recettore per PDGF- $\beta$  (platelet-derived growth factor) il quale risulta frequentemente sovra espresso e la proteina di attivazione dei fibroblasti (FAPs).

I Fibroblasti attivati sintetizzano alcune componenti dell'ECM, proteasi come MMP-2 e MMP9, promuovono modificazioni nella composizione dell'ECM e ne facilitano il rimodellamento.

Inoltre, i CAFs sintetizzano fattori di crescita, come il fattore di crescita degli epatociti (HGF), fattori di crescita insulin-like (IGF), fattore di crescita epidermicoEGF) e fattori di crescita dei fibroblasti (FGF2) che inducono segnali proliferativi nelle cellule adiacenti (Bhowmick N.A., 2004), sono anche in grado di modulare la risposta immunitaria dovuta alla secrezione di citochine pro-infiammatorie come interleuchina-1, -6, -8 e TNF- $\alpha$  (De W.O and Mareel M. 2003). Punto importante è rappresentato dal fatto che i CAFs sono costantemente presenti a livello stromale tumorale e non vengono rimossi tramite apoptosi, per cui portano, ancora una volta, ad una eccessiva deposizione di ECM (Giannoni E. et al., 2010; Cirri P. & Chiarugi P., 2011).

I CAFs sono una componente importante del microambiente tumorale e per il processo di EMT, infatti, è stato dimostrato e pubblicato, nel 2010, un lavoro effettuato dalla Professoressa Paola Chiarugi, in cui, una linea cellulare prostatica derivante da metastasi ossee (cellule PC3) acquista un'attività tumorigenica più elevata se co-iniettata in vivo insieme a CAFs, mentre se co-iniettata con fibroblasti di pazienti umani affetti da iperplasia benigna (HPFs) non promuove attività tumorigenica.(Figura 9). Inoltre, ripetendo questo tipo di condizionamento in una seconda linea cellulare di cancro prostatico (cellule LN-CaP), dotata di minor tumorigenicità rispetto alle PC3, non è stata indotta alcuna EMT.



**Figura 9:** Immagine di microscopia ottica che mostra la morfologia delle cellule PC3 incubate per 72 ore con medium standard (a) e con medium condizionati da HPFs (b) e CAFs (c). Si può notare, come, la morfologia delle cellule nelle prime due immagini sia molto simile e riconducibile ad un fenotipo epiteliale, mentre, nell'ultima immagine, le cellule hanno una morfologia molto più simile ai miofibroblasti e quindi con fenotipo mesenchimale indice di attivazione di un processo di EMT.

Diversi lavori pubblicati si sono occupati di EMT e dell'importanza dei CAFs come induttori di tal processo; tuttavia i risultati a livello delle variazioni di DNA, che avvengono durante tale processo, hanno prodotto risultati in conflitto. Feinberg e colleghi, non hanno evidenziato cambiamenti di metilazione del DNA durante il processo reversibile di EMT indotto da TGF $\beta$  in cellule AML12 di epatociti di topo, mentre Issa e colleghi hanno dimostrato in cellule epiteliali mammarie overesprese con TWIST1, una ipermetilazione focale e una ipometilazione globale del DNA.

## **EPIGENETICA NEL PROCESSO DI EMT**

La natura complessa del cancro e della transizione epitelio mesenchimale non può essere spiegata solo attraverso le componenti genetiche ma deve richiedere il contributo significativo di altri fattori, quali le modificazioni epigenetiche.

Col termine di epigenetica si indicano le modificazioni del DNA e della cromatina che influenzano il genoma e l'espressione genica, senza alterare la sequenza del DNA (Probst AV. et al., 2009). Lo stato epigenetico della cellula è controllato dall'attività di proteine in grado di aggiungere e rimuovere piccole modificazioni di natura chimica a livello degli istoni e direttamente al DNA.

Gli eventi epigenetici fondamentali coinvolti nella regolazione genica, implicati nei processi di sviluppo e progressione tumorale, sono: la metilazione del DNA, le modificazioni a carico degli istoni, con conseguente rimodellamento della cromatina e i microRNA (Kumar Singh P. and Campbell M.J., 2013).

### **LA METILAZIONE DEL DNA**

La metilazione del DNA è un meccanismo stabile di silenziamento genico, cruciale per la regolazione dell'espressione genica e per determinare la conformazione della cromatina. La metilazione del DNA si trova soprattutto all'interno dei dinucleotidi Citosina-Guanina (CpG), i quali tendono a formare aggregati noti come isole CpG, e nelle regioni cromosomiche composte da sequenze di DNA altamente ripetute, quali gli elementi retrotrasposonici e le zone centromeriche (Bird A., 2002; Jones P.A. and Baylin SB 2002). Le isole CpG sono per lo più situate all'estremità 5' dei promotori dei geni e sono presenti approssimativamente nel 60% dei promotori dei geni nell'uomo e rivestono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica e nel silenziamento di geni ripetuti.

Le principali funzioni della metilazione sono collegate alla repressione della trascrizione, essa, infatti, è fondamentale per mantenere silenti i genomi dei trasposoni e dei retrotrasposoni ed è importante nel mantenere uno stato trascrizionalmente inattivo (eterocromatina).

Esistono due tipi diversi di alterazioni di metilazione di DNA: l'ipometilazione e l'ipermetilazione. L'ipometilazione del DNA può essere di due tipi: globale o gene-specifica, e si riferiscono ad un decremento dei livelli di 5-metilcitosina (5mC) contenuta nel genoma, ed entrambi sono implicati nel cancro umano.



L'ipometilazione è riscontrabile principalmente a livello delle sequenze LINE-1 (Long Interspered Nuclear Elements). Le LINE-1 occupano circa il 17% del nostro genoma, lunghe circa 6kb contengono nella regione al 5' UTR un promotore senso (SP) e un promotore antisenso (ASP), due regioni di open reading frame (ORF1 e ORF2), mentre nella regione al 3' UTR ci sono la sequenza segnale di poliadenilazione e la coda polyA.

Il promotore senso è richiesto per la trascrizione e la retrotrasposizione, mentre il promotore antisenso guida la trascrizione nella direzione opposta, all'interno di geni adiacenti, producendo così trascritti chimerici. ORF1 codifica per una proteina di 40kDa con un duplice significato: il primo è necessario per il binding della molecola di RNA, mentre il secondo è di chaperon molecolare. ORF2 codifica per una proteina di 150kDa avente due funzioni: una endonucleasica e una di retrotrascrittasi. Le attività di questi due domini enzimatici sono richieste per la retrotrasposizione di LINE1 attraverso il meccanismo di "copia e incolla" che prevede come primo passaggio la trascrizione dell'mRNA e dalla retrotrascrizione, e come secondo l'inserzione nel genoma. (Schulz et al, 2002)

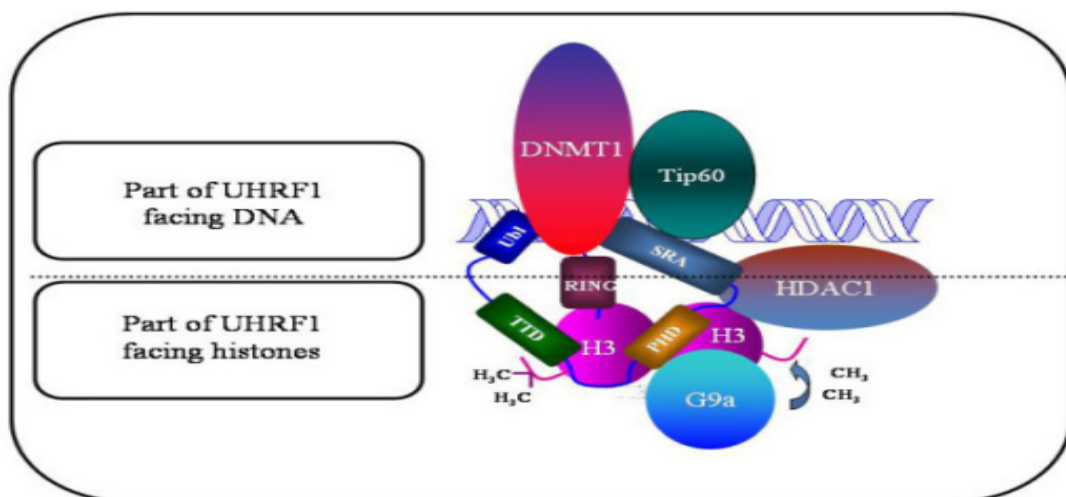
Oltre all'ipometilazione, l'ipermetilazione del DNA è frequentemente descritta e riscontrata nel tumore alla prostata. Diversi lavori hanno evidenziato che la presenza di geni ipermetilati come, CDH1, RAR $\beta$ 2, RASSF1A, GSTP1 e APC, quest'ultimo riveste anche un ruolo chiave nella *pathway* di staminalità, è fondamentale per distinguere le cellule tumorali da quelle normali (Schulz W. et al, 2004; Li L.C et al, 2005).

La metilazione del DNA avviene attraverso l'azione di enzimi specifici, chiamati DNA metiltransferasi (DNMTs), che sono veicolati sul DNA attraverso l'interazione con la proteina chaperon UHRF1 e metilano il DNA, che a sua volta è legato da proteine leganti il gruppo metile in grado di reclutare le Iston Deacetilasi (HDACs) che consentono una repressione dell'attività trascrizionale (Nishiyama A. et al 2013).

### ***Uhrf1 e DNA-metiltransferasi (DNMTs)***

UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and Ring Finger domains, detto anche Np95 o ICBP90, è una proteina modulare multi-dominio, della dimensione di 95kDa, in grado di svolgere importanti funzioni di regolazione epigenetica (Hashimoto H. et al, 2009).

Questa proteina è modulare multi-dominio in grado di mediare le interazioni, spesso associate alla replicazione, fra metilazione del DNA e modificazioni istoniche, interagendo direttamente con il DNA e gli istoni; è composto per cui da 5 diversi domini: UBL (Ubiquitin-Like domain), TTD (Tandem-Tudor domain), PHD finger, SRA (SET- and RING-associated domain) ed infine un RING domain al C-terminale, ognuno di questi domini adempie ad una specifica funzione (Unoki M. et al, 2009; Rothbart S. B. et al, 2012) (Figura 10).



**Figura 10:** Rappresentazione schematica di UHRF1 e dei domini strutturali in grado di legare sia il DNA che gli istoni.

Il dominio UBL (Ubiquitin-Like domain) si trova all'N-terminale ed è noto per il suo ruolo nella regolazione del traffico e della degradazione del proteasoma. Il TTD (Tandem Tudor domain) riconosce specifiche modificazioni post-traduzionali delle code istoniche come la di- e la tri-metilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9me<sub>2/3</sub>). Il TTD, in particolare grazie alla cooperazione con il dominio PHD, è in grado di legare stabilmente H3K9me<sub>3</sub>; mentre la

presenza dell'arginina 2 dell'istone H3 (H3R2) non metilata riduce la sua capacità legante (Rajakumara E. et al, 2011).

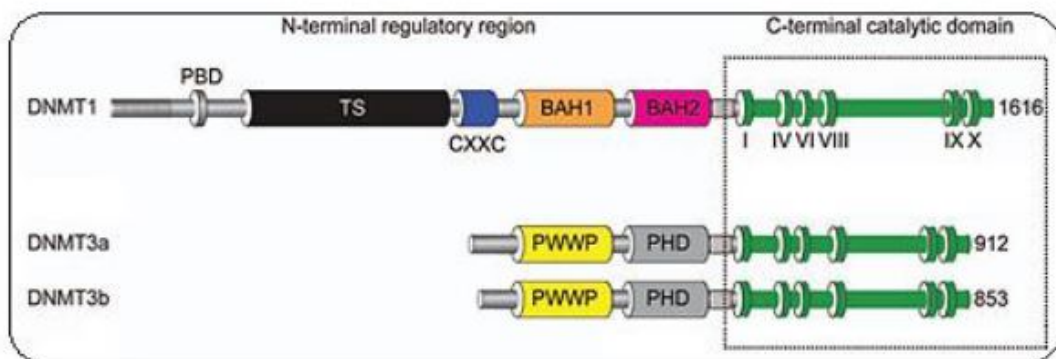
Il dominio PHD (Plant Homeo-Domain) è coinvolto nel rimodellamento della cromatina mediante il riconoscimento della coda N-terminale non modificata dell'istone H3 ed è associato alla formazione di etero-cromatina, ed alla conseguente repressione trascrizionale (Papait R. et al, 2008).

Il dominio SRA (SET and RING Associated domain) è un dominio cruciale, in quanto si trova solo nella famiglia UHRF, esso riconosce il DNA emimetilato e DNMT1, durante il processo di replicazione, agendo direttamente nella forca replicativa, e riconoscendo specificatamente le 5-metilcitosine con un meccanismo fin ora inedito, essa viene capovolta fuori dell'elica del DNA e viene posizionata in una tasca di legame specifica del dominio SRA (Sharif J. et al, 2007). Oltre al reclutamento di DNMT1, UHRF1 è anche in grado di interagire con i domini regolativi delle metil-trasferasi (DNMTs) "*de novo*" (DNMT3a e DNMT3b) o con la iston-metiltransferasi G9a (Babbio F. et al, 2012; Rothbart S.B et al, 2012).

Il dominio RING, presente nel C-terminale, è responsabile dell'attività E3-ubiquitino-ligasica con preferenza per l'istone H3, ed a seguire, per gli istoni H1 e H2B. L'ubiquitinazione degli istoni è una modificazione epigenetica importante nella regolazione della struttura della cromatina, nella sintesi del DNA e/o nella trascrizione genica. Recentemente è stato dimostrato che, in cellule in replicazione, la capacità di UHRF1 di ubiquitinare DNMT1 e/o la H3K23 sembrano essere necessarie per mantenere lo stato di metilazione del DNA (Nishiyama A. et al, 2013). Inoltre UHRF1, mediante il reclutamento di fattori quali SUV39H1, DNMT1 e HDAC1, risulta essere cruciale nel silenziamento genico di numerosi geni oncosoppressori.

UHRF1 è sovra-espressa in diversi tipi di cancro, quali, quello alla mammella, al polmone, alla prostata, alla vescica, al pancreas e alla cervice. UHRF1 è anche implicata nella progressione del ciclo cellulare in quanto promuove la transizione dalla fase G1 alla fase S; infatti inibendo l'espressione di UHRF1, si impedisce alla cellula di entrare in fase S causando l'arresto della crescita cellulare o l'apoptosi (Babbio F. et al, 2011).

La famiglia delle DNA-metiltransferasi (DNMTs) comprende principalmente due classi di enzimi: la DNMT1 che riconosce in modo specifico i siti di metilazione in un filamento di DNA emimetilato e li copia sul filamento figlio durante la replicazione, garantendo la fedeltà nel profilo di metilazione durante la mitosi e risulta quindi essere una DNMT di mantenimento; e le DNMT3a e 3b che invece sono implicate nella metilazione “*de novo*” che avviene durante lo sviluppo embrionale e il differenziamento cellulare e nella gametogenesi (Agarwal S. et al, 2013; Meilinger D. et al, 2009) (Figura 11).



**Figura 11:** Struttura molecolare delle DNMTs (Qin et al, 2011).

Le DNMTs sono reclutate a livello del DNA attraverso l'interazione con complessi di rimodellamento della cromatina e il silenziamento genico che ne consegue è il risultato del legame al DNA metilato delle proteine che riconoscono questa modificazione, definite come metil-binding protein (MBDs).

## LE MODIFICAZIONI ISTONICHE

Le modificazioni istoniche, con significato di attivazione o repressione trascrizionale, sono catalizzate da diversi complessi enzimatici, sono riconosciute come una pietra miliare della regolazione genica (Agger K., 2008). Tra le principali modificazioni istoniche si possono citare la

metilazione, l'acetilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione (Khorasanizadesh S., 2004). Queste modificazioni genetiche governano la regolazione del gene nei tessuti specifici per mezzo di un complesso macchinario di diversi DNA ed enzimi modificanti gli stoni, includendo le DNA-metiltrasferasi (DNMTs) già descritte precedentemente, le iston-deacetilasi (HDACs), le iston-metiltrasferasi (HMTs), le iston-acetiltransferasi (HATs), le iston-demetilasi (HDMTs) e gli enzimi rimodellanti la cromatina.

### ***Iston metiltransferasi (HMTs)***

La metilazione delle proteine istoniche, in specifici residui, gioca un ruolo importante nel mantenimento dello stato attivo e silente dell'espressione di un gene nei processi di sviluppo.

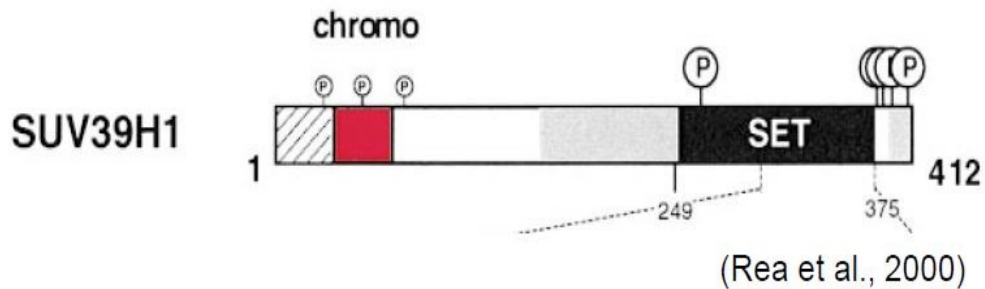
La metilazione dell'istone lisina è estremamente collegato sia agli eventi di attivazione di un gene che a quelli repressivi, nelle regioni eucromatiniche ed eterocromatiniche.

E' stato dimostrato che, un largo numero di enzimi contenenti il dominio SET, includendo SUV39H1/H2, EZH2 e G9a ed altri, trasferisce gruppi metilici agli istoni e ai fattori di trascrizione (Martin C. et al, 2005). SUV39H1 è l'istone-metiltransferasi responsabile del mantenimento della metilazione associata alla lisina 9 dell'istone H3 (Figura 14) (Fucks F et al, 2003).

La metilazione dell'H3K9 è un marcatore specifico dell'eterocromatina costitutiva e facoltativa, le quali rappresentano domini cromatinici trascrizionalmente silenti. Inoltre, la distribuzione nel nucleo di H3K9 metilato può avere diverse funzioni: 1) a livello citologico rende visibile le regioni eterocromatiche, 2) induce repressione trascrizionale dei geni presenti nelle regioni eucromatiche e 3) partecipa alla repressione trascrizionale determinata dall'errata attivazione dell'inizio di trascrizione.

La proteina umana SUV39H1 catalizza la trimetilazione della K9 dell'istone H3 indispensabile per il legame delle proteine HP1 e la successiva formazione di uno stato cromatinico, svolge quindi la funzione principale a livello delle regioni dell'eterocromatina pericentromerica, dove, l'H3K9me3 è indispensabile per la corretta organizzazione strutturale e funzionale di

questo dominio cromatinico (Fuks F. et al, 2003; Lehnertz C. et al., 2003). Cellule ES mancanti di entrambe le iston-metiltransferasi presentano difetti dell'eterocromatina, associata ad una forte instabilità genomica. (Figura 12).

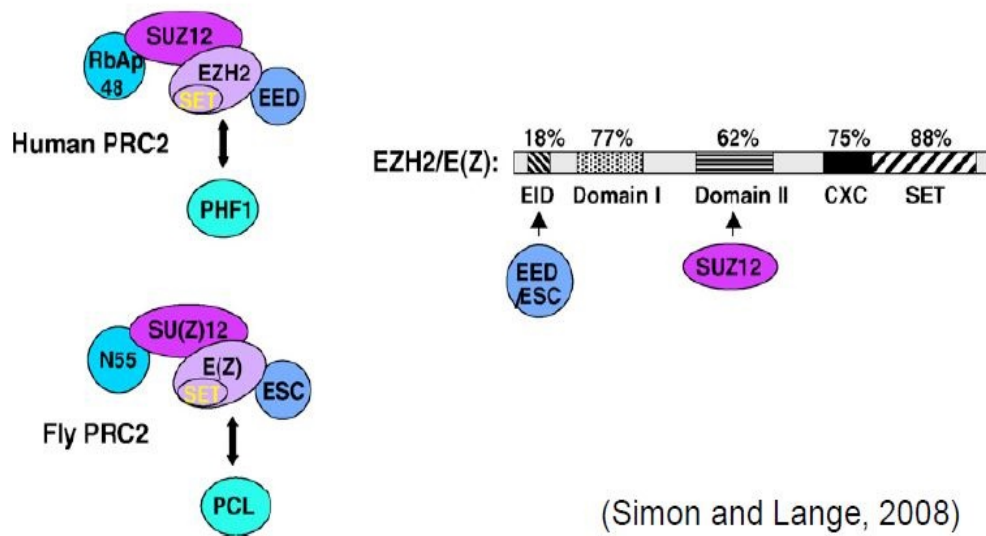


**Figura 12:** Rappresentazione schematica dei domini funzionali della proteina SUV39H1.

Studi recenti, hanno dimostrato che l'istone H3K27 trimetilato partecipa al silenziamento dell'espressione genica e nella repressione trascrizionale della E-caderina, attraverso il legame di Snail1 con Suz12 (componente del PRC2) ed EZH2, sia direttamente che indirettamente, sul promotore di CDH1 (Yang X., 2009; Peiro S., 2008), grazie alla funzione di EZH2 mediante l'aggiunta di un gruppo metile su H3K27me2.

L'espressione indotta da SNAIL in cellule epiteliali in EMT, richiede l'associazione del complesso PRC2 con il promotore di CDH1, inoltre l'espressione di SNAIL1 induce l'espressione di ZEB1 che interagisce con il corepressore CtBP e non richiede PRC2, questo fa sì che l'espressione di ZEB1, durante EMT, sia possibile solo dopo la down-regolazione di E-caderina (Herranz N. et al, 2008).

EZH2, insieme a SUZ12, EED e NURF55, è uno dei componenti del gruppo PRC2; esso catalizza la trimetilazione dell'istone H3K27 nei nucleosomi dei promotori adiacenti, agendo da repressore trascrizionale; H3K27 a sua volta si lega con il dominio di PRC1 per formare una struttura di eterocromatina (Tsang D. and Cheng A., 2011) (Figura 13).

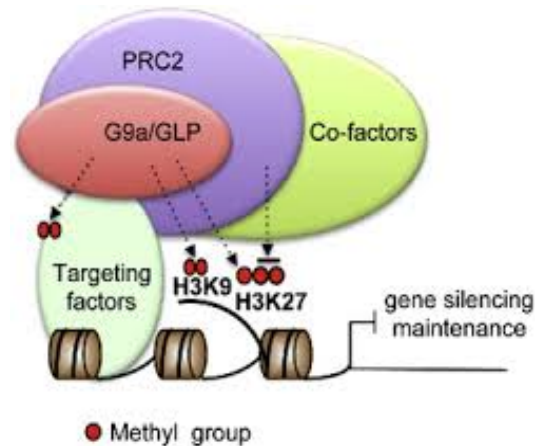


**Figura 13:** Rappresentazione grafica dei domini funzionali della proteina EZH2 e dei complessi PCR2 in *Drosophila melanogaster* e in umano.

EZH2 svolge anche una funzione cruciale nel mantenimento delicato del bilancio omeostatico tra l'espressione del gene e la repressione, una sua overespressione nel cancro è associata a un'incrementata proliferazione cellulare (Tsang D. et al, 2010; Herranz N. et al, 2008).

Studi recenti hanno dimostrato un ruolo nella metilazione istonica mediato da PRC2 nel silenziamento di E-caderina durante la progressione del cancro e hanno evidenziato un rapporto funzionale tra la disregolazione di EZH2 e la repressione di E-caderina durante la EMT e la metastasi del cancro (Cao Q. et al, 2008).

G9a (anche chiamata KMT1C e EHMT2) è il maggior enzima metiltrasferasico eucromatinico responsabile della funzione repressiva di H3K9me2, è importante inoltre, per promuovere la metilazione di DNA di E-caderina, in tre modelli di linee cellulari in cui la EMT è stata indotta da TGF- $\beta$ , e la sua interazione fisica e strutturale con PRC2 agisce anche sulla metilazione di H3K27 (Mozzetta C. et al, 2013) (Figura 14).



**Figura 14:** Rappresentazione grafica della funzione di G9a nel silenziamento genico.

SNAIL1 è in grado di associarsi a G9a e successivamente, l'aggiunta di un terzo gruppo metile su H3K9me<sub>2</sub>, da parte di SUV39H1, porta alla formazione di H3K9me<sub>3</sub> che conferisce uno stato repressivo stabile e resistente (Dong C. et al., 2012). La formazione di H3K9me<sub>3</sub> nella cromatina, associata ad un promotore genico, ha importanti conseguenze per il silenziamento a lungo termine, in quanto questa modifica sembra essere un preludio per il reclutamento di DNMTs che catalizzano poi la metilazione del DNA (Rothbart S.B. et al, 2012).

In certi casi, la contemporanea presenza di modificazioni con significato di repressione e di attivazione trascrizionale su promotori di geni specifici determina uno stato di “gene bivalente” o di promotore “avvelenato”; ad esempio nelle cellule staminali embrionali la coesistenza di H3K27me<sub>3</sub> e di H3K4me<sub>3</sub>, su specifici promotori, rende i geni silenti ma in uno stato intermedio tra la completa repressione e attivazione. (Ke X-S. et al, 2009).

I geni bivalenti non sono repressi stabilmente, ma rimangono sensibili alla regolazione dinamica di diversi segnali fisiologici. Questa condizione “bivalente” riguarda anche geni associati alla EMT e, presumibilmente, permette la regolazione dinamica dell'espressione genica e contribuisce alla plasticità di queste cellule epiteliali.

Di certo, la necessità di cambiamenti rapidi e dinamici, ma soprattutto reversibili, nella regolazione epigenetica a livello della cromatina, deve



essere associata con un sistema che permetta questi cambiamenti non a lungo termine, ed è sempre più accettato che la modificazione degli istoni risponde a questi particolari requisiti (Tam W.L and Weinberg R.A., 2013).

### ***MicroRNAs***

Infine, è importante sottolineare l'importanza che recentemente i microRNA (*miRNAs*) hanno assunto nel processo di EMT e di metastasi.

I *miRNAs* sono molecole di RNA non-codificanti, formate da circa 19-22 nucleotidi in grado di regolare l'espressione genica attraverso il silenziamento post-trascrizionale di geni bersaglio. Essi possono regolare alcuni meccanismi epigenetici intracellulari modulando, ad esempio, l'espressione di enzimi coinvolti nella modificazione degli istoni e nella metilazione del DNA. Essi rappresentano solo l'1% di tutto il genoma, ma sono importanti per influenzare il 30% dei geni

La modulazione dell'espressione genica da parte dei miRNAs si può associare con la progressione di diversi tipi di tumore (Ventura A.& Jacks T., 2009). Alcuni miRNAs sono sovra-espressi nelle cellule tumorali, mentre altri sono inibiti e, a seconda dei loro geni bersaglio, possono funzionare come soppressori tumorali o oncogeni (Lu J., 2005; Thompson J.M., 2006). I patterns di regolazione e di espressione dei miRNAs sono stati anche collegati alla EMT, in quanto, la loro azione può essere diretta contro fattori implicati nella regolazione della E-caderina.

## ***Scopo della Tesi***

La transizione epitelio mesenchimale (EMT) è un processo biologico finemente regolato alla base della formazione di metastasi (Thiery J.P. et al, 2009)

Le cellule neoplastiche, durante il corso della progressione tumorale maligna, sono in grado di attivare tale processo, attraverso l'azione di stimoli esterni determinati dal microambiente tumorale e/o dalle cellule associate al tumore (Kou-juey Wu et al, 2012).

L'EMT determina un cambiamento reversibile dello stato fenotipico; le cellule perdono le caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale, caratterizzato da maggior aggressività, invasività e motilità (Tam W.L and Weinberg R.A., 2013). Queste cellule, colonizzando nuovi territori embrionali, devono necessariamente dare origine a nuove tipologie cellulari attraverso un processo inverso conosciuto come transizione mesenchimale-epiteliale (MET).

L'ipermetilazione delle regioni del promotore di CDH1(E-caderina) e di altri geni coinvolti nel contatto cellula-cellula e cellula-membrana basale è fondamentale e indispensabile per l'attivazione del processo di EMT.

Il silenziamento genico di E-caderina è orchestrato da diversi fattori trascrizionali, quali: SNAIL-1, SLUG, TWIST-1 e ZEB1, in grado di legarsi a specifiche sequenze, dette E-Boxes, presenti a livello del promotore di CDH1(Sanchez-Tillo E. et al., 2012; Nauseef J.T. and Henry M.D., 2011).

In molti tumori lo stato di ipermetilazione di CDH1 e di altri geni, identifica una modificazione permanente del DNA che porta a una perdita irreversibile dell'espressione di questi geni durante il processo di EMT (Florl AR. et al, 2004).

Negli ultimi anni diversi studi si sono occupati del processo di EMT e delle variazioni dello stato di metilazione del DNA, ottenendo risultati contrapposti. Nel 2011 Feinberg, ha dimostrato che lo stato di metilazione di DNA, in cellule normali di epatociti di topo indotte in EMT mediante TGF- $\beta$ , non varia. Nel 2013, invece, Issa e collaboratori, hanno dimostrato che in cellule mammarie epiteliali umani immortalizzate, il processo di EMT irreversibile prodotto all'overespressione di TWIST1, determina una focale iper-

metilazione a livello dei corpi genici in associazione a una globale ipometilazione del DNA.

Questi lavori pubblicati, prendono essenzialmente in considerazione solo modelli in cui il processo di EMT è attivato da singoli fattori specifici diffusibili (come TGF $\beta$  o interleuchine) o mediante sovra-espressione di fattori di trascrizione (come TWIST1, Snail1, Zeb1/2), che non riflettono la complessità del rapporto tra la cellula tumorale ed i componenti del microambiente, tra cui l'azione dei fibroblasti associati al cancro (CAFs). Questi fibroblasti, rivestono notevole importanza nel determinare il destino di un tumore (D. Mollevi et al, 2011).

Dati recenti mostrano inoltre che, i cambiamenti dello stato di metilazione, durante i processi di EMT, possono regolare anche la staminalità delle cellule tumorali (Biddle A. et al, 2012). La metilazione permanente e focalizzata del DNA, può essere inoltre considerata, come un evento casuale ma necessario, che permette l'inattivazione permanente di alcuni geni in grado di generare una transizione aberrante che potrebbe portare a un evento irreversibile di EMT. L'esistenza e il ruolo di alterazioni dei livelli di metilazione del DNA durante EMT-MET è considerato quindi un aspetto molto controverso, inoltre, la riprogrammazione epigenetica relativa all'EMT rimane poco chiara, e non è ancora ben definito se l'EMT associata a geni è anche regolata epigeneticamente come parte di un unico dominio genomico (Kumar Singh P. et al, 2013; Tam W.L and Weinberg R.A., 2013).

In questo lavoro di tesi, lo scopo principale è stato lo studio delle alterazioni della metilazione del DNA e degli altri marcatori epigenetici, in un modello consolidato di EMT in cellule tumorali prostatiche (Giannoni E. et al 2010). In questo modello sperimentale, cellule prostatiche LN-CaP e PC3 sono state trattate con terreni prodotti da fibroblasti isolati da campioni tumorali ottenuti dopo prostatectomia eseguita su pazienti affetti da tumore prostatico maligno, con GLEASON  $\geq$  4 (terreno condizionato, CM-CAF), e con terreni condizionati da fibroblasti ottenuti da espianci chirurgici eseguiti su pazienti affetti da iperplasia benigna prostatica (terreno condizionato, CM-HPF), in

collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Chiarugi dell'Università di Firenze (Giannoni E. et al, 2010; Chiarugi P. et al, 2011).

La reciproca azione tra cellule tumorali di prostata PC3 e i fattori contenuti nel terreno condizionato da fibroblasti associati al tumore di pazienti affetti da tumori aggressivi (CM-CAF) per tre giorni, ma non con terreno condizionato da HPFs, ha indotto nelle cellule PC3 il processo di EMT; mentre le cellule LN-CaP non hanno attivato tale processo in entrambe le situazioni di condizionamento. Inoltre, il successivo allontanamento dal mezzo di coltura dei CAFs, con sostituzione di mezzo condizionato dalle cellule PC3 stesse per ulteriori tre giorni, determina la reversione del fenotipo, inducendo le cellule in transizione mesenchimale-epiteliale (MET).

Al fine di raggiungere questo scopo, sono stati analizzati i marcatori e i fattori trascrizionali che inducono e regolano il processo di EMT e MET, sono state analizzate inoltre le proteine responsabili della metilazione del DNA (DNMTs e UHRF1) e le HMTs (SUV39H1, EZH2, G9a). Dai risultati ottenuti, successivamente, è stato effettuato lo studio sullo stato di metilazione globale e specifico che interviene in questo processo; in particolare sono state eseguite analisi di *pyrosequencing* sulle sequenze LINE1, considerate come surrogato di metilazione globale del DNA. Sono state approfondite, analisi dello stato di metilazione globale e delle variazioni di metilazione del DNA che avvengono nel processo di EMT e di MET, mediante tecnica dell'Illumina 450K. Inoltre, è stato effettuato lo studio sulla metilazione in geni specifici coinvolti nel processo di EMT e in particolare su CDH1, N-CADERINA, VIMENTINA, ZEB1 e APC. In seguito, sono stati eseguiti esperimenti d'immunoprecipitazione della cromatina sul promotore di CDH1, per identificarne la condizione epigenetica, usando come anticorpi :DNMT1 e DNMT3a e le modificazioni istoniche: H3-k9me3 e -k27me3 (marcatori di repressione trascrizionale) e -k4me3 (marcatore di attivazione trascrizionale). E' stata inoltre effettuata un'analisi di *pyrosequencing* sul promotore di CDH1 per studiare e capire se, le variazioni dello stato di metilazione del DNA che avvengono durante il processo di EMT, siano necessarie per attivare e/o mantenere il processo.

## ***Materiali e Metodi***

## **Linee cellulari, colture primarie e modello sperimentale di EMT-MET “ex vivo”**

Le linee cellulari utilizzate sono state le PC3, cellule di carcinoma prostatico androgeno-indipendenti, le LN-CaP, cellule di carcinoma prostatico androgeno-dipendenti, e colture primarie di fibroblasti isolati da espunti tumorali dopo prostatectomia eseguita su pazienti affetti da cancro prostatico avanzato (*Gleson* 4+5) e denominate fibroblasti associati al tumore (CAFs) o da iperplasia prostatica benigna e definiti fibroblasti prostatici umani (HPFs). Le cellule PC3 e le colture primarie di CAFs e HPFs sono state mantenute in coltura con terreno con DMEM-High (EuroClone) e siero bovino fetale (FBS - EuroClone), mentre la linea cellulare LN-CaP con RPMI-1640 (EuroClone) e sempre in presenza della componente sierica. Ad entrambi i terreni è stata aggiunta L-glutamina [2mM] e penicillina/streptomina [2mM] (EuroClone). Il modello sperimentale di transizione epitelio mesenchimale (EMT) “ex vivo” in cellule prostatiche PC3 ed LN-CaP è stato sviluppato in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Paola Chiarugi dell’Università di Firenze sulla base del loro protocollo (Giannoni E. et al, 2010). Un numero di cellule compreso tra 1 e  $1,5 \times 10^6$  è stato trattato per 72 ore con un terreno lasciato per 48 ore in presenza di CAFs (CM-CAF = DMEM-High, L-glut, P/S) o di HPFs (CM-HPF = DMEM-High, L-glut, P/S). Il processo inverso di transizione mesenchimale epiteliale (MET) è stato indotto solo su cellule PC3 di controllo e in EMT mediante trattamento per ulteriori 72 ore con terreno condizionato “*Serum Starved*” o “*Recovery Medium*” (CM-SS o RM; DMEM-High, L-glut, P/S).

Le linee cellulari e le colture primarie sono state poi mantenute vitali in un incubatore impostato a 37°C al 5% CO<sub>2</sub>.

## **Estrazione DNA, RNA e proteine**

L'estrazione dalle cellule del DNA genomico è stata eseguita mediante aggiunta di un opportuno volume di *SNET buffer* (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl e 1% SDS) con 400 µg/ml Proteinasi K

[20mg/ml] (EuroClone) e 25 µg/ml RNase A [50mg/ml] (sigma-Aldrich). Le cellule in SNET buffer sono state incubate in agitazione a 55°C per tutta la notte. Il giorno seguente l'estrazione del DNA è stata effettuata attraverso l'aggiunta di 1 volume di una soluzione fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25-24-1v/v pH8 - Sigma-Aldrich) e centrifugazione a 14000rpm per 5 minuti. La fase acquosa di ogni campione è stata trasferita in una nuova eppendorf e il DNA è stato precipitato aggiungendo 1 volume di isopropanolo a cui è seguita una centrifugata a 8000rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Il pellet di DNA è stato lavato una volta con etanolo al 70% e centrifugato nuovamente a 8000rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo la rimozione dell'etanolo al 70% il DNA è stato lasciato asciugare per 5-10 minuti e risospeso in un opportuno volume di H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, infine, è stato quantificato allo spettrofotometro (OPTIZEN POP NanoBio) e valutato il rapporto OD 260/280 (compreso tra 1.8 e 2.0).

L'estrazione dell'RNA dalle cellule è stata eseguita mediante l'utilizzo della soluzione commerciale *TRIZOL® RNA Isolation Reagents* (Life Technologies) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Le proteine, invece, sono state isolate con un opportuno volume di *Laemmli buffer 2x* (Sigma-Aldrich).

I campioni di DNA e proteine sono stati conservati a -20°C, mentre quelli dell'RNA a -80°C.

## Western Blotting

Gli estratti proteici derivati dalle cellule e gli immunoprecipitati sono stati separati mediante elettroforesi SDS-PAGE su gel di poliacrilamide a diverse percentuali e trasferiti su membrana di nitrocellulosa (PROTRAN®-Whatman GmbH-Germany). Le membrane saturate per 1 ora in TBS 1X (25mM Tris-HCl, pH 8.0; 15mM NaCl; 2.7mM KCl), TWEEN 0,1% e latte 5% sono state incubate tutta notte in agitazione a 4°C con gli anticorpi primari, CDH1 (1:3000, 610181-BD Biosciences), N-Cad (1:3000, 610920-BD Biosciences), Vimentina (1:1000, GTX112661-Genetex), SNAIL1 (1:1000, #3879-Cell Signaling), SLUG (1:1000, #9585-Cell Signaling), ZEB1 (1:1000, #3396-Cell



Signaling), TWIST1 (1:1000, ab50887-Abcam), UHRF1 (1:5000, anticorpo gentilmente donato dall'istituto IGBMC di Strasburgo-Francia), DNMT1 (1:500, ab13537-abcam), DNMT3A (1:1000, #3598-Cell Signaling), DNMT3B (1:250, ab13604-abcam), EZH2 (1:2000, 612666-BD Biosciences), G9a (1:1000, #3306-Cell Signaling), SUV39H1 (1:1000, GTX112263-Genetex) Actina- $\beta$  (1:5000, ab6276-abcam). Successivamente, è stata eseguita un'incubazione di un'ora in TBS 1X-TWEEN 0,1% e latte 5% con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi (PIERCE Biotechnology) e specifici per la specie in cui l'anticorpo primario è stato prodotto. La reazione chemiluminescente è stata attivata con il kit ECL (Amersham) e le membrane sono state poi esposte a lastre autoradiografiche (Amersham) e sviluppate con sviluppatrice (Kodak). Tra l'anticorpo primario e il secondario, e prima dell'ECL, le membrane sono state sottoposte a lavaggi con TBS 1X-TWEEN 0,1%.

## **cDNA**

Una quantità di RNA messaggero pari a 1 $\mu$ g è stata retrotrascritta mediante l'enzima della trascrittasi inversa e utilizzando gli oligo dT, entrambi, presenti nel kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). La reazione di retrotrascrizione è stata allestita seguendo le specifiche fornite dal produttore, impostando l'apparato per PCR a 42°C per 1 ora e seguiti da 5 minuti a 85°C per l'inattivazione dell'enzima. Il cDNA così ottenuto è stato opportunamente preparato ed utilizzato per l'analisi mediante PCR quantitativa.

## **Conversione del DNA con reazione di bisolfito e pyrosequencing**

Il DNA genomico [1 $\mu$ g] è stato sottoposto alla conversione con bisolfito utilizzando l'EpiTect Kit (Qiagen) seguendo la procedura fornita dal produttore. Per ogni campione analizzato con tecnica di *pyrosequencing* è stata utilizzata una quantità di DNA genomico convertito pari a 100ng. La

metodica prevede una prima fase di amplificazione del DNA con mediante PCR con oligonucleotidi specifici per le LINE-1 e per il promotore del gene di CDH1 (vedi Tabella 1). I campioni di PCR sono stati allestiti in un volume finale di 50µl composte da, 5 µl di DNA convertito con bisolfito, 1 µl di oligonucleotidi [10µM] senso e antisenso, 5 µl 200uM dNTP mix (Promega), 10 µl 5x *Colorless GoTaq® Flexi Buffer*, 3 µl MgCl<sub>2</sub> [25mM], 0,25 µl *GoTaq DNA polymerase* (5U/µl-Promega), 2,5 µl 1x EvaGreen e 22,25 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Le reazioni sono state amplificate nell'apparato di PCR con le seguenti impostazioni: una denaturazione iniziale di 3 minuti a 95°C, seguita da una denaturazione di 25 secondi a 95°C, un allineamento di 25 secondi con temperature dipendenti dalle coppie di oligonucleotidi utilizzati (Vedi Tabella 1), un allungamento di 25 secondi a 72°C, operazione ripetuta per 45 cicli, ed infine, un allungamento finale di 5 minuti a 72°C. Circa 20µl di DNA amplificato sono stati trasferiti nei pozzetti della piastra di preparazione dei campioni in presenza di, 37µl *SEQ binding buffer*, 3µl *Streptavidin Sepharose™ High Performance* (GE Healthcare Biosciences Ab) e 20µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, ed il tutto è stato messo in agitazione per 15 minuti a 1400rpm. Successivamente ad ogni pozzetto è stato aggiunto un volume di 40µl di soluzione di sequenziamento costituito da, 38µl *SEQ Annealing buffer* e 2 µl *SEQ primer*. La piastra è stata inserita nel Pyromark Q96 Vacuum Workstation al fine di trasferire gli ampliconi a singolo filamento nella piastra di sequenziamento. La piastra di sequenziamento scaldata ad 80°C per 2 minuti e lasciare raffreddare a temperatura ambiente. Infine le piastre sono state caricate nel sequenziatore *Pyromark Q96 ID system* (Qiagen) per l'analisi completa delle sequenze.

### ***Illumina Infinium HD Methylation (Infinum HumanMethylation 450K Array)***

*Infinum HumanMethylation 450K Array* ha permesso di rivoluzionare il modo di studiare la metilazione del DNA, in particolare, è utilizzato per analizzare i profili di metilazione del DNA genomico di circa 485,577 loci. Questi loci ricoprono il 96% delle isole CpG conosciute e il 99% delle *NCBI Reference*

*Sequences genes*, con una media di circa 17 siti per isole CpG per gene e distribuite tra il sito a monte del punto di inizio di trascrizione (TSS1500 e TSS200), nel 5'UTR, nel primo esone, nel corpo del gene e nel 3'UTR. Le 485,577 citosine prese in esame nella metodica, in particolare, includono 482,421 (99.35%) CpG dinucleotidi, 3,091 (0.64%), *CNG targets* e 65 (0.01%) siti di *SNP*.

La metodica richiede solo 500ng di DNA genomico per il metodo manuale oppure 1000ng per quello automatizzato. Il DNA deve essere sottoposto alla conversione con reazione di bisolfito, amplificato, frammentato, precipitato e risospeso usando la metodica e le soluzioni fornite dal kit (Illumina®). I campioni di DNA da analizzare devono essere ibridati sulle *BeadChips* usando la stufetta *Illumina Hybridization*, lavati, e devono infine subire una fase estensione e marcatura; il tutto è stato effettuato seguendo le istruzioni fornite dal produttore del kit.

Le *BeadChips* sono state così analizzate mediante l'*Illumina HiScan* (Illumina®). I dati prodotti dalle analisi della metilazione del DNA genomico hanno permesso di determinare i livelli di metilazione di ogni CpG attraverso il calcolo del  $\beta$ value.

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

Cellule comprese tra i  $3-4 \times 10^6$  sono state fissate con formaldeide 1% per 10 minuti e poi lavate con PBS 1X freddo. La reazione è stata neutralizzata con glicina [0,125M] per 5 minuti, nuovamente lavate, raccolte in PBS 1X/PMSF [0,5mM] (Sigma-Aldrich) e centrifugate a 1000rpm per 5 minuti a 4°C. Al corrispondente volume di pellet cellulare sono stati aggiunti 5 volumi di *Lysis Buffer* (5mM PIPES, 85mM KCl, 0,5% NP40, antiproteolitici) e il tutto è stato mantenuto in ghiaccio per 10 minuti. L'operazione è stata ripetuta 2 volte, tra ogni fase è stata eseguita una centrifugazione a 3000rpm a 4°C per 5 minuti. I nuclei cellulari sono stati risospesi in 500-700 $\mu$ l di *Sonication Buffer* (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8 e antiproteolitici) e sonicati con sonicatore BRADSON 250 (Power 30%, impulso di 10 secondi con pausa di

1 minuto, ripetuto per 18/20 cicli). La cromatina sottoposta a sonicazione è stata controllata su un gel d'agarosio allo 0,8% al fine di valutare che la frammentazione fosse compresa tra le 400 -1000pb. Il DNA, dopo estrazione con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25-24-1v/v pH8 - Sigma-Aldrich), è stato quantificato con lo strumento *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies). La cromatina è stata centrifugata a 14000rpm per 10 minuti a 4°C e il surnatante incubato per 1 ora su ruota a 4°C in presenza di Proteina G (KPL). Dopo una breve centrifugazione di 5 minuti a 14000rpm a 4°C per eliminare la proteina G, alla cromatina recuperata sono stati aggiunti 10 volumi di Dilution Buffer (0,01% SDS, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl pH8, 1,1% TRITON-X100, 167mM NaCl, antiproteolitici). Un volume pari all'1-2% della cromatina totale è stato prelevato come Input. La cromatina di  $5 \times 10^5$  cellule (corrispondente a circa 10-15µg di DNA) è stata incubata con gli anticorpi IgG1 (5µl, sc-2027-Santa Cruz Biotechnology), DNMT1 (10µl, ab13537-abcam), DNMT3a (5µl, 39206-Active Motif), Ezh2(AC-22) (40µl, #3147-Cell Signaling), H3K9me3 (5µl, 61013-Active Motif), H3K27me3 (5µl, 39155-Active Motif), H3K4me3 (5µl, 39915-Active Motif). A parte e contemporaneamente è stata preparata la proteina G saturata in Dilution Buffer, BSA [1µg/µl] e SalmonSperm [1µg/µl]. Cromatina e proteina G sono state incubate su ruota a 4°C per tutta notte. Le reazioni cromatina/anticorpo sono state unite a 30µl di proteina G saturata e nuovamente incubati su ruota per 2 ore a 4°C. Successivamente, sono stati sottoposti a 5 lavaggi con Buffer A (0,1% SDS, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8, 1% TRITON-X100, 150mM NaCl, antiproteolitici), ad altri 4 con Buffer B (0,1% SDS, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8, 1% TRITON-X100, 500mM NaCl, antiproteolitici) ed un ultimo con TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA), ognuno di 700µl ed intervallati da centrifugazioni a 14000rpm per 30 secondi a 4°C per pellettare i complessi proteina G/anticorpo/cromatina. La cromatina è stata poi eluita su ruota per 15 minuti a temperatura ambiente con 500µl di Elution Buffer (1% SDS, 100mM NaHCO<sub>3</sub>, antiproteolitici), e seguita da un'incubazione a 65°C per 16 ore al fine di eliminare il fissaggio della cromatina con formaldeide, il tutto eseguito dopo l'aggiunta di NaCl alla concentrazione finale di [200mM].

Infine gli eluati sono stati incubati per 2 ore a 42°C con Proteinasi K [20µg/µl] (EuroClone) e RNAsi [20µg/µl] (Sigma-Aldrich). Il DNA è stato purificato mediante estrazione in fenolo/cloroformio/alcol isoamilico e precipitato con 50µl di sodio acetato, 10µg di glicogeno (Life Technologies) e 2,5 volumi d'etanolo 100%. I pellet di DNA sono stati asciugati e risospesi in un opportuno volume di H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

### **RT-PCR semiquantitativa e PCR quantitativa**

L'RT-PCR semiquantitativa è stata utilizzata per analizzare il DNA derivato da esperimenti di ChIP. Le reazioni di PCR sono state allestite in un volume finale di 25µl composte da, 1µl di campione di DNA, 1,25µl di oligonucleotidi [10µM] senso e antisenso (Vedi Tabella 1), 1µl di dNTPs [10mM], 5µl di 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1,5µl MgCl<sub>2</sub> [25mM], 0,25µl GoTaq® Hot Start Polymerase (5U/µl - Promega) e 13,75µl di H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Le reazioni sono state amplificate nell'apparato di PCR con le seguenti impostazioni: una denaturazione iniziale di 3 minuti a 95°C, seguita da una denaturazione di 30 secondi a 95°C, un allineamento di 30 secondi con temperature dipendenti dalle coppie di oligonucleotidi utilizzati (Vedi Tabella 1), un allungamento di 30 secondi a 72°C, operazione ripetuta tra 28 e 35 cicli, ed infine, un allungamento finale di 5 minuti a 72°C. I prodotti di PCR sono stati osservati con un transluminatore UV (TCX-20.M – EuroClone) e le immagini acquisite su PC (Olidata) con il programma Kodac1D 3.5 e camera Kodac EDAS 290; il tutto, dopo corsa elettroforetica in un gel d'agarosio al 2%.

Per la PCR quantitativa, invece, sono state allestite nelle Multiplate® PCR Plates LOW 96-well White (Bio-Rad). In ogni pozzetto è stata preparata una reazione con volume finale di 20µl composto di: 5µl di cDNA campione [2ng/µl], 1µl di oligonucleotidi [10µM] senso e antisenso (Vedi Tabella 1), 10µL iTaq™ Universal Sybr Green 2X (Bio-Rad) e 3µl di H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Le piastre sono state infine rivestite con adesivo ottico Microseal® 'B' Film (Bio-Rad) e analizzate con il programma Opticon-Monitor3 che gestisce il lettore ottico di un apparato MJ-Research-Chromo 4 (Bio-Rad). Le impostazioni utilizzate

per le amplificazioni e le temperature di allineamento sono state variate in funzione degli oligonucleotidi e dei campioni di DNA sottoposti ad analisi.

### **Analisi statistiche e densitometriche**

Il T-test è stato eseguito sui campioni derivati dall'analisi di *pyrosequencing* mentre l'analisi densitometrica è stata effettuata con il *software ImageJ* (NIH.gov).

PCR quantitativa		
Gene	Sequenza	Tm (°C)
GAPDH for	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	56
GAPDH rev	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	53
CDH1 for	ATGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	59
CDH1 rev	ACGAGCAGAATCATAAGGCG	56
N-CAD for	GCAGAGACTTGCGAAACTCC	57
N-CAD rev	CACCATTAAGCCGAGTGATGG	57
VIMENTINA for	GAGTCCACTGAGTACCGGAG	57
VIMENTINA rev	ACGAGCCATTTCTCCTTCA	57
SNAIL1 for	CCCCAATCGGAAGCCTAACT	58
SNAIL1 rev	GACAGAGTCCAGATGAGCA	57
SLUG for	TGCATATTCGGACCCACACA	58
SLUG rev	GGTCTGCAGATGAGCCCTC	58
TWIST1 for	GCAAGATTCAGACCCTCAAGC	57
TWIST1 rev	CCCCTCCATCCTCCAGACC	60
ZEB1 for	CTGATTCCCCAGGTGGCATA	58
ZEB1 rev	GGGCGGTGTAGAATCAGAGT	57
UHRF1 for	CTGGTACGACGCGGAGAT	57
UHRF1 rev	CGACAGTCGTTACAGAGAATCA	55
DNMT1 for	GAGCTACCACGCAGACATC	56
DNMT1 rev	CGAGGAAGTAAGAAGCGGTTG	57
DNMT3a for	CTCGAGTCCACCCCTGTGAT	59
DNMT3a rev	CTTTGCCCTGCTTTATGGAG	55
DNMT3b for	AAGAGTTGGGCATAAAGGTAGG	56
DNMT3b rev	GCTGGATTCACATTTGAGAGAT	54
EZH2 for	TTGTTGGCGGAAGCGTGAAAATC	60
EZH2 rev	TCCCTAGTCCC GCGCAATGAGC	65
SUV39H1 for	GCTATGACTGCCCAAATCGT	56
SUV39H1 rev	ACAGCTCCTCCACGTAGTCC	59
G9a for	TGCGTGCTGTTATTCCTGTC	56
G9a rev	TGATCTTCTGTGCGGATG	55
ChIP		
Promotore	Sequenza	Tm (°C)
ACTINA-β for	CCAACGCCAAAACCTCTCCC	57
ACTINA-β rev	AGCCATAAAAGGCAACTTTTCG	55
CDH1-1 for	GAACTCAGCCAAGTGTAAGGC	56
CDH1-1 rev	AGACGCGGTGACCCTCTA	58
CDH1-2 for	TAGAGGGTCACCGGTCTAT	58
CDH1-2 rev	GACTTCGCGAAGCTCACAG	57
Pyrosequencing		
Promotore	Sequenza	Tm (°C)
CDH1met for	AGTAATTTTAGGTTAGAGGGTTA	50
CDH1met rev	ACCACAACCAATCAACAAC	52
CDH1 Pyroseq	ATTTTAGGTTAGAGGGTTAT	47
LINE-1 met for	GAGTTAGGTGTGGGATATAGT	52
LINE-1 met rev	CAAAAAATCAAAAAATTCCTTTCC	52
LINE-1 Pyroseq	GGTGTGGGATATAGTT	44

Tabella 1: Elenco Oligonucleotidi

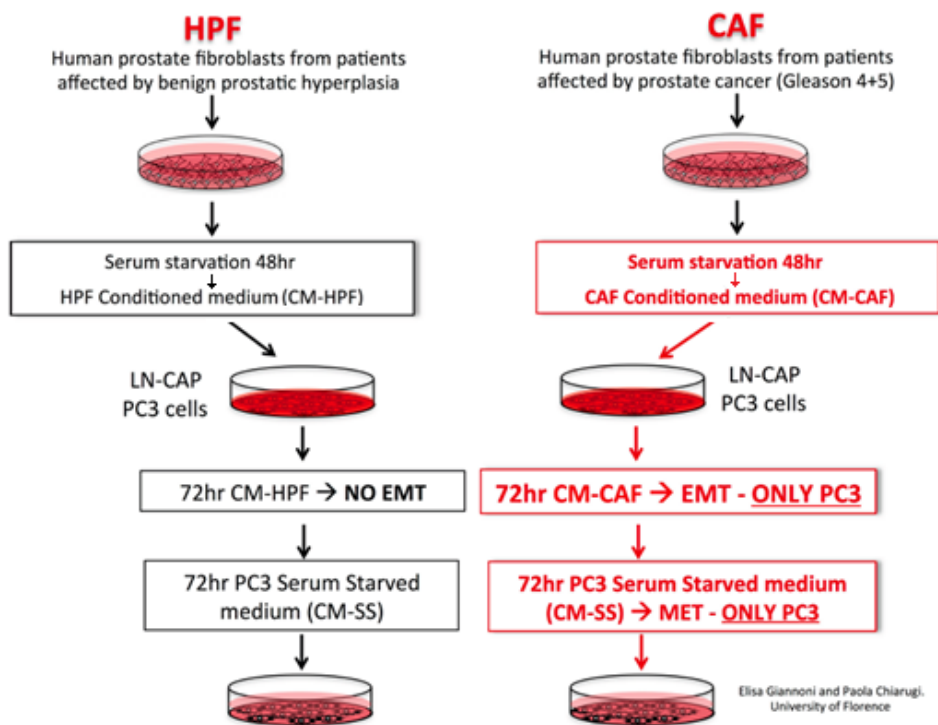
## ***Risultati***



## **MODELLO SPERIMENTALE DI EMT-MET IN CELLULE TUMORALI PROSTATICHE LN-CaP e PC3.**

Per ottenere il processo di EMT e MET, è stato utilizzato il modello consolidato di cellule prostatiche trattate con terreni prodotti da fibroblasti isolati da campioni tumorali ottenuti dopo prostatectomia eseguita su pazienti affetti da tumore prostatico maligno, con GLEASON  $\geq 4$  (terreno condizionato, CM-CAF), e da espianti chirurgici eseguiti su pazienti affetti da iperplasia benigna prostatica (terreno condizionato, CM-HPF), in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Chiarugi dell'Università di Firenze (Giannoni E. et al, 2010; Chiarugi P. et al, 2011).

Il terreno condizionato da CAF e da HPF è stato ottenuto mediante la crescita di questi differenti fibroblasti in terreno di coltura mancante esclusivamente della componente sierica (serum starvation) per un periodo di 48 ore, come mostrato in figura 1 (si veda M&M per i dettagli) e successivamente aggiunto alle linee cellulari tumorali PC3 ed LN-CaP per un tempo di 72 ore (3 giorni). Delle due linee, solo le PC3 vanno incontro al processo di EMT, come testimoniato dall'attivazione dei fattori coinvolti nel processo (vedi Figura 2). Per ottenere l'evento inverso, il processo di MET, in queste cellule, è stato sostituito il terreno condizionato dai CAF (CM-CAF) e dagli HPF (CM-HPF) con terreno ottenuto da cellule PC3 mantenute in coltura in assenza di siero per 48 ore (CM-SS PC3 o recovery medium, RM) per ulteriori 3 giorni.



**Figura 1:** Schema del protocollo sperimentale utilizzato per l'induzione del processo di EMT "ex vivo" sulle linee cellulari di cancro prostatico androgeno indipendenti, PC3, e androgeno dipendenti, LN-CaP. Il processo di EMT nelle due linee cellulari è stato stimolato attraverso i trattamenti per 72 ore con terreni condizionati derivati da fibroblasti associati al tumore (CM-CAF), e da fibroblasti prostatici umani (CM-HPF; terreno di controllo). Solo le cellule PC3 trattate con CM-CAF attivano tale processo. Per indurre il processo inverso di MET, invece, le cellule PC3-HPF (controlli) e PC3-CAF sono state trattate con terreno condizionato ottenuto da PC3 mantenute in coltura in assenza di siero per 48 ore (CM-SS PC3) per ulteriori 3 giorni.

## **ANALISI DI ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DEI MARCATORI MOLECOLARI INDUCENTI EMT.**

Per valutare se il condizionamento di linee cellulari di cancro prostatico LN-CaP e PC3 mediante l'utilizzo di CM-HPF e CM-CAF potesse indurre il fenomeno dell'EMT, sono stati analizzati i livelli di espressione proteica e trascrizionale dei marcatori molecolari responsabili dell'induzione di tale processo. In particolare, si è deciso di valutare geni specifici come CDH1, custode del fenotipo epiteliale, ed N-caderina e Vimentina che, invece, caratterizzano il fenotipo mesenchimale. Inoltre, gli stessi marcatori molecolari sono stati analizzati durante la reversibilità del fenomeno di EMT, la MET, allo scopo di valutare il loro comportamento.

Nelle cellule LN-CaP, analizzando il dato di espressione proteica, si osservano elevati livelli proteici di E-caderina (CDH1), sia nei trattamenti con terreno condizionato CM-HPF che con CM-CAF. Al contrario, le proteine N-caderina e Vimentina risultano non espresse in entrambi i trattamenti (Figura 2A e B, WB e analisi densitometrica). I dati di espressione genica in queste cellule, invece, mostrano solo una lieve riduzione nel caso del RNA messaggero di CDH1 durante il trattamento con CM-CAF; mentre non si evidenziano particolari alterazioni nell'espressione dei geni N-caderina e Vimentina (Figura 2C, PCR quantitativa).

Diversamente nelle cellule PC3 condizionate con CM-CAF è possibile osservare la contemporanea variazione dei livelli di espressione proteica e di RNA messaggero di CDH1, N-caderina e Vimentina se confrontate con il trattamento con CM-HPF, infatti, la diminuzione di CDH1 è contrapposta all'aumento di N-caderina e Vimentina (Figura 2A e C, rispettivamente WB e PCR quantitativa). L'espressione proteica di CDH1, infatti, nel trattamento con CM-CAF produce una drammatica modulazione negativa di E-caderina rispetto al trattamento con CM-HPF (Figura 2B, analisi densitometrica; PC3 EMT). Questo dato è ulteriormente confermato dall'analisi di PCR quantitativa in cui è possibile osservare una completa repressione trascrizionale del gene (Figura 2C, PCR quantitativa, PC3 EMT). La proteina N-caderina, nel trattamento con CM-HPF, è poco espressa, ma, durante il

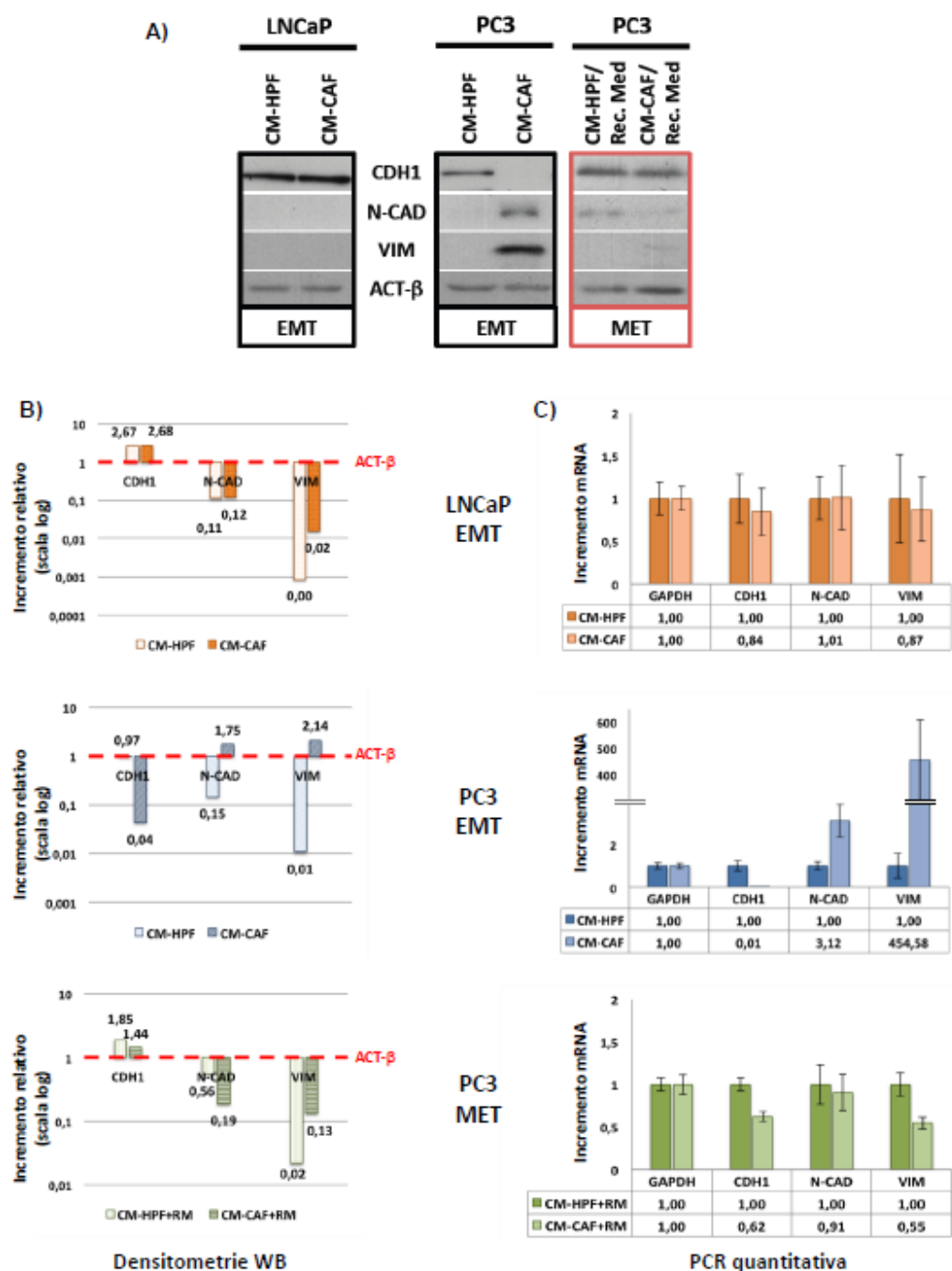
processo di EMT, aumenta di circa 11 volte (trattamento con CM-CAF), e di circa tre volte a livello trascrizionale. La Vimentina mostra anch'essa un aumento significativo dell'espressione della proteina e dell'RNA messaggero; in particolare, nelle cellule in EMT, si osserva, un incremento trascrizionale di circa 450 volte (vedi figura 2B e C, rispettivamente grafici delle densitometrie dei WB e delle PCR quantitativa).

Dai nostri risultati possiamo quindi affermare, che il processo di EMT indotto da CM-CAF avviene solo nelle cellule PC3 e richiede la completa repressione del gene CDH1 e il conseguente aumento, in termini proteici e trascrizionali, di N-caderina e Vimentina.

### **STUDIO DEL FENOMENO DI REVERSIBILITA' DEL PROCESSO DI EMT: LA MET**

Dalle analisi di WB e PCR quantitativa nelle cellule PC3 indotte a MET (condizionate con CM-CAF+RM), si osserva la riattivazione di E-caderina, sia in termini proteici che di RNA messaggero (Figura 2A, B e C; PC3 MET). L'espressione proteica di N-caderina e Vimentina, durante il processo di MET, non evidenzia variazioni significative rispetto al trattamento con CM-HPF+RM (Figura 2A e B, PC3 MET), mentre per quanto riguarda l'espressione del messaggero, (Figura 2C, PC3 MET) si osserva una diminuzione di circa la metà dell'espressione trascrizionale di Vimentina rispetto al CM-HPF+ RM e una lieve riduzione di N-caderina.

I risultati così ottenuti hanno confermato l'attivazione del processo di MET nella linea cellulare PC3, a supporto del concetto che la transizione epitelio-mesenchimale può avvenire solo in cellule che attivano un programma genetico in grado di avviare questo processo, e che tal processo è reversibile, a dimostrazione della riespressione del gene di E-caderina (Figura 2C; PC3 MET).



**Figura 2:** Analisi degli EMT markers in cellule LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. A) WB di CDH1, N-CADERINA e VIMENTINA in cellule LN-CaP e PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT), e PC3 trattate con CM-HPF/Rec Med e CM-CAF/Rec Med al fine di indurre il processo inverso di MET. B) Grafici relativi alle analisi densitometriche effettuate sulle bande dei WB degli EMT markers di LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. C) Grafici dei livelli di RNA messaggero di CDH1, N-CAD e VIM ottenuti dopo analisi di PCR quantitativa su cDNA prodotti da campioni di cellule LN-CaP e PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF e PC3 trattate con CM-HPF+RM e CM-CAF+RM. ACTINA- $\beta$  (WB) e GAPDH (PCR quantitativa) sono stati usati come geni normalizzatori.

## **ANALISI DI ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DEI FATTORI TRASCRIZIONALI INDUCENTI EMT**

Dopo aver dimostrato l'attivazione dei processi di EMT e MET nelle linee cellulari PC3, è stato analizzato il comportamento di diversi fattori regolativi di tal processo: in particolare è stata analizzata l'espressione proteica e trascrizionale di SNAIL1, SLUG, ZEB1 e TWIST1.

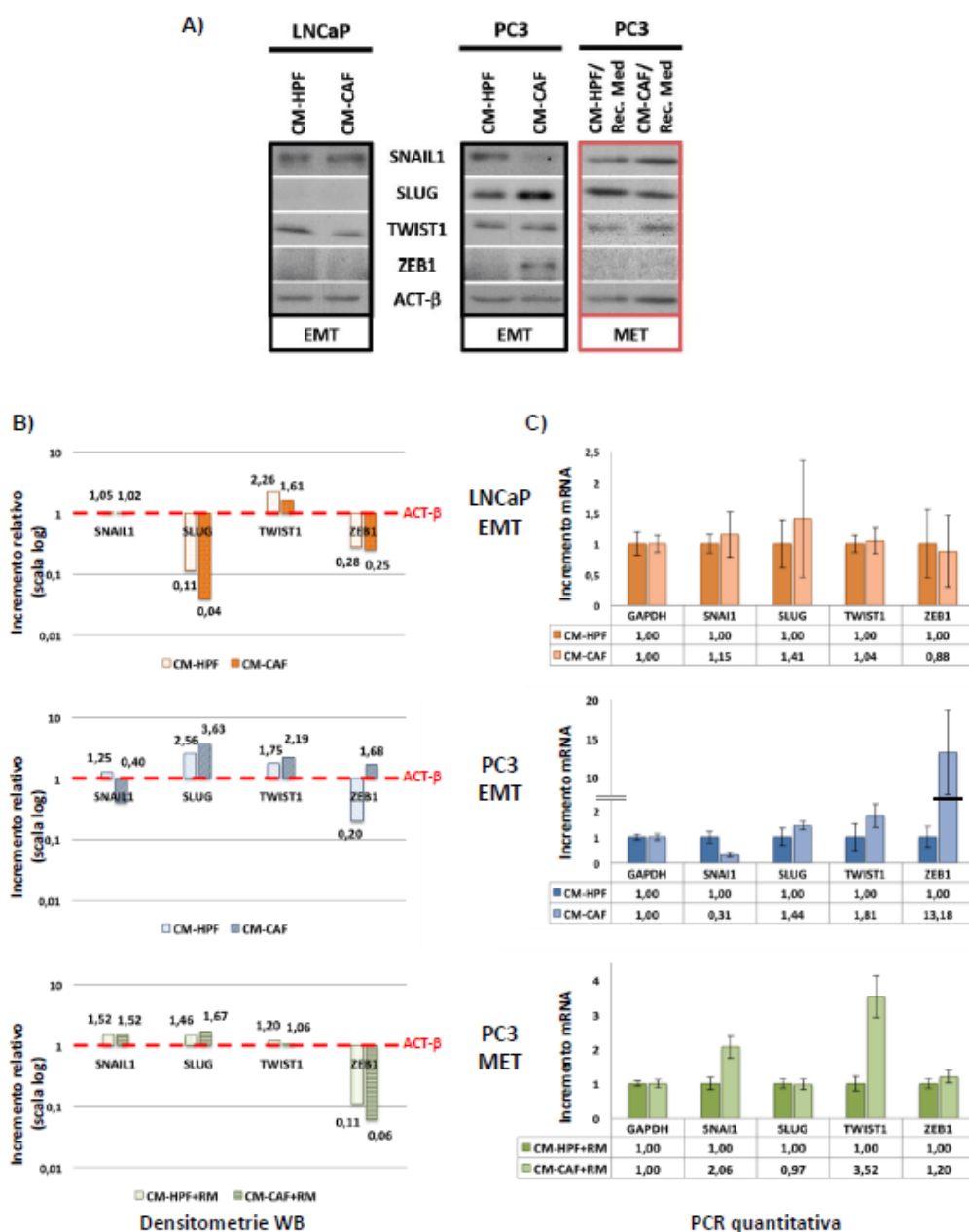
In Figura 3A è stato osservato, nelle cellule PC3, un aumento dei livelli di espressione proteica di SLUG e di ZEB1 (colonna PC-3 EMT trattate con CM-CAF), rispettivamente, di circa 1,5-2 volte per SLUG e di circa 9 volte per ZEB1 se confrontate con le cellule di controllo CM-HPF (Figura 3B densitometrie linea PC3 EMT). Inoltre, l'RNA messaggero di ZEB1, ha mostrato un incremento trascrizionale di circa 13 volte, mentre per l'RNA messaggero di SLUG non è stata osservata alcuna variazione dei suoi livelli (Figura 3C analisi PCR quantitativa linea PC3 EMT). Differentemente per SNAIL1 è stata osservata una forte riduzione sia della proteina, sia dell'RNA messaggero; mentre il fattore trascrizionale TWIST1 non ha mostrato variazioni significative (Figura 3A, B e C colonna e linea PC3 EMT).

In cellule LN-CaP trattate con CM-HPF e CM-CAF non sono stati osservati cambiamenti nei livelli proteici e di mRNA in nessuno degli EMT-factors analizzati (Figura 3A, B e C; LN-CaP EMT). Inoltre dal WB in figura 3 è possibile osservare come i fattori trascrizionali che regolano la EMT mostrano una diversa distribuzione proteica tra LN-CaP e PC3, in entrambe le linee cellulari sono espressi TWIST1 e SNAIL1, mentre SLUG è presente solo nelle PC3.

Da questi risultati possiamo evidenziare che ZEB1 e, in minima parte, SLUG potrebbero essere i principali EMT-factors che regolano il processo di EMT nelle cellule PC3 e confermare che le LN-CaP non sono in grado di attivare il programma di EMT.

**STUDIO DELL'ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DEI FATTORI TRASCRIZIONALI NEL PROCESSO DI MET.**

Nelle cellule PC3 CM-HPF/RM e CM-CAF/RM (condizione che induce MET), l'analisi di WB e le relative densitometrie hanno mostrato che i livelli proteici di SNAIL1, SLUG e ZEB1 ritornano alla condizione osservata nelle cellule di controllo (Figura 3A e B PC3 MET). L'analisi di PCR quantitativa degli RNA messaggeri di SLUG e ZEB1 ha evidenziato lo stesso comportamento osservato per le relative proteine, ovvero, del recupero dell'espressione basale nelle cellule trattate con CM-CAF/RM, mentre gli RNA messaggeri di TWIST1 e SNAIL1 hanno mostrato un incremento, rispettivamente, di circa 3,5 e di 2 volte se confrontate con le cellule trattate con CM-HPF/RM (Figura 3C; PC3 MET).



**Figura 3:** Analisi degli EMT factors in cellule LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. A) WB di SNAIL1, SLUG, TWIST1 e ZEB1 in cellule LN-CaP e PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT), e PC3 trattate con CM-HPF/Rec Med e CM-CAF/Rec Med al fine di indurre il processo inverso di MET. B) Grafici relativi alle analisi densitometriche effettuate sulle bande dei WB degli EMT markers di LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. C) Grafici dei livelli di RNA messaggero di SNAIL1, SLUG, TWIST1 e ZEB1 ottenuti dopo analisi di PCR quantitativa su cDNA prodotti da campioni di cellule LN-CaP e PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF e PC3 trattate con CM-HPF+RM e CM-CAF+RM. ACTINA-β (WB) e GAPDH (PCR quantitativa) sono stati usati come geni normalizzatori.



## **PC3 CM-CAF REGOLA L'ESPRESSIONE DELLE DNMTs E DI UHRF1 DURANTE IL PROCESSO DI EMT**

Avendo analizzato e studiato i fattori che inducono e regolano il processo di EMT e di MET, è stato investigato lo stato di metilazione del DNA per valutare se, durante questi processi, potessero avvenire alterazioni nello stato di metilazione del DNA. Per studiare lo stato di metilazione del DNA, è stata eseguita l'analisi dell'espressione proteica e trascrizionale degli enzimi coinvolti nel mantenimento del DNA, le DNMTs, nello specifico DNMT1, metiltransferasi di mantenimento, e delle metiltransferasi "de novo"; DNMT3a e DNMT3b.

Inoltre è stata effettuata l'analisi del livello genico e proteico di UHRF1, un regolatore epigenetico, che costituisce un importante elemento di coordinazione nella metilazione del DNA e nelle modificazioni istoniche, in grado di reclutare la DNMT1 a livello delle forche replicative, per verificare se fosse direttamente coinvolto nella regolazione delle DNMTs durante il processo di EMT e MET.

Nelle cellule LN-CaP l'espressione a livello di RNA e proteina di UHRF1 e DNMT1 è costante in entrambi i trattamenti e non subisce modificazioni durante il processo di EMT (Figura 4A, B e C, LN-CaP EMT). Inoltre, nelle stesse cellule, non si osservano variazioni del livello proteico e trascrizionale di DNMT3a in entrambi i trattamenti, mentre per quanto riguarda DNMT3b, non si osserva variazione significativa durante il trattamento con CM-CAF (Figura 5A, B e C; LN-CaP EMT).

Nella linea cellulare PC3, dai risultati ottenuti mediante WB e PCR quantitativa, dopo trattamento con CM-HPF e CM-CAF, si osserva una maggior espressione di UHRF1 in questa linea cellulare rispetto alle LN-CaP. Durante il processo di EMT, UHRF1 si riduce di circa 2.5 volte (Figura 4B), mentre a livello trascrizionale questa riduzione non è rilevata. Per quanto riguarda DNMT1, il dato di WB evidenzia in queste cellule un alto livello di espressione proteica presente già nel controllo (CM-HPF) e una riduzione di circa 2 volte durante la EMT (Figura 4B; densitometrie, PC3 EMT). I dati di espressione proteica e di RNA messaggero delle DNMTs *de novo* nelle

cellule PC3, durante il processo di EMT, mostrano l'aumento di espressione proteica di DNMT3a di circa 2 volte, come mostrato dall'analisi densitometrica, mentre non è osservato un aumento così significativo a livello trascrizionale, invece i livelli di espressione proteica di DNMT3b si riducono sensibilmente, di circa 4 volte e della metà a livello del RNA messaggero se paragonate con il controllo (Figura 5B e C, rispettivamente; PC3 EMT).

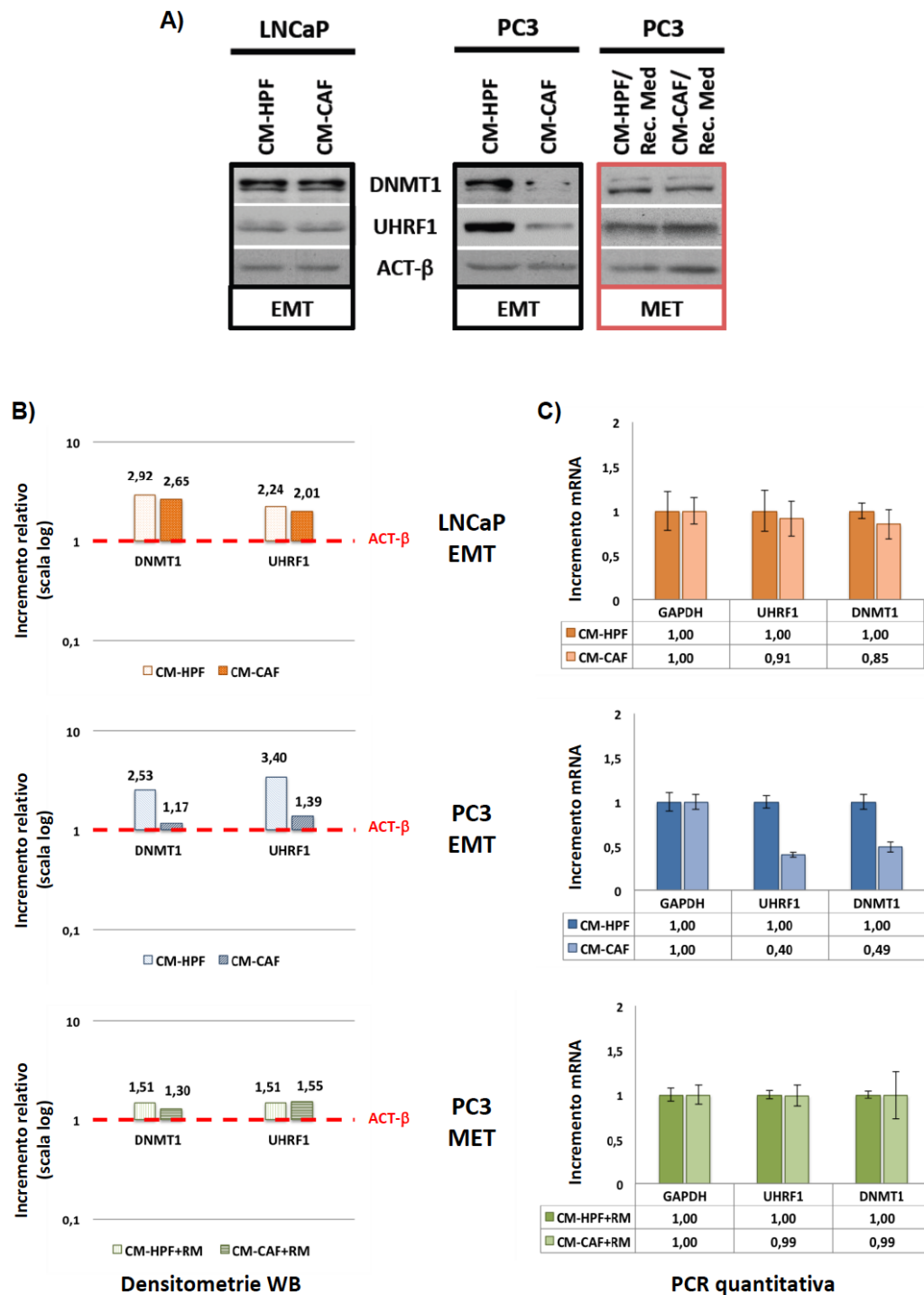
In conclusione le cellule PC3 in EMT, (trattamento con CM-CAF), insieme ad una forte riduzione di UHRF1 e DNMT1, responsabili del mantenimento della metilazione, mostrano un leggero incremento di espressione di DNMT3a e non di DNMT3b; questo potrebbe quindi essere indice di un'alterazione dello stato di metilazione del DNA, e la presenza di una, se pur debole metilazione de novo potrebbe essere necessaria per attivare o regolare il processo di EMT.

#### **ALTERAZIONI REVERSIBILI DELLE DNMTs E UHRF1 DURANTE IL PROCESSO DI MET**

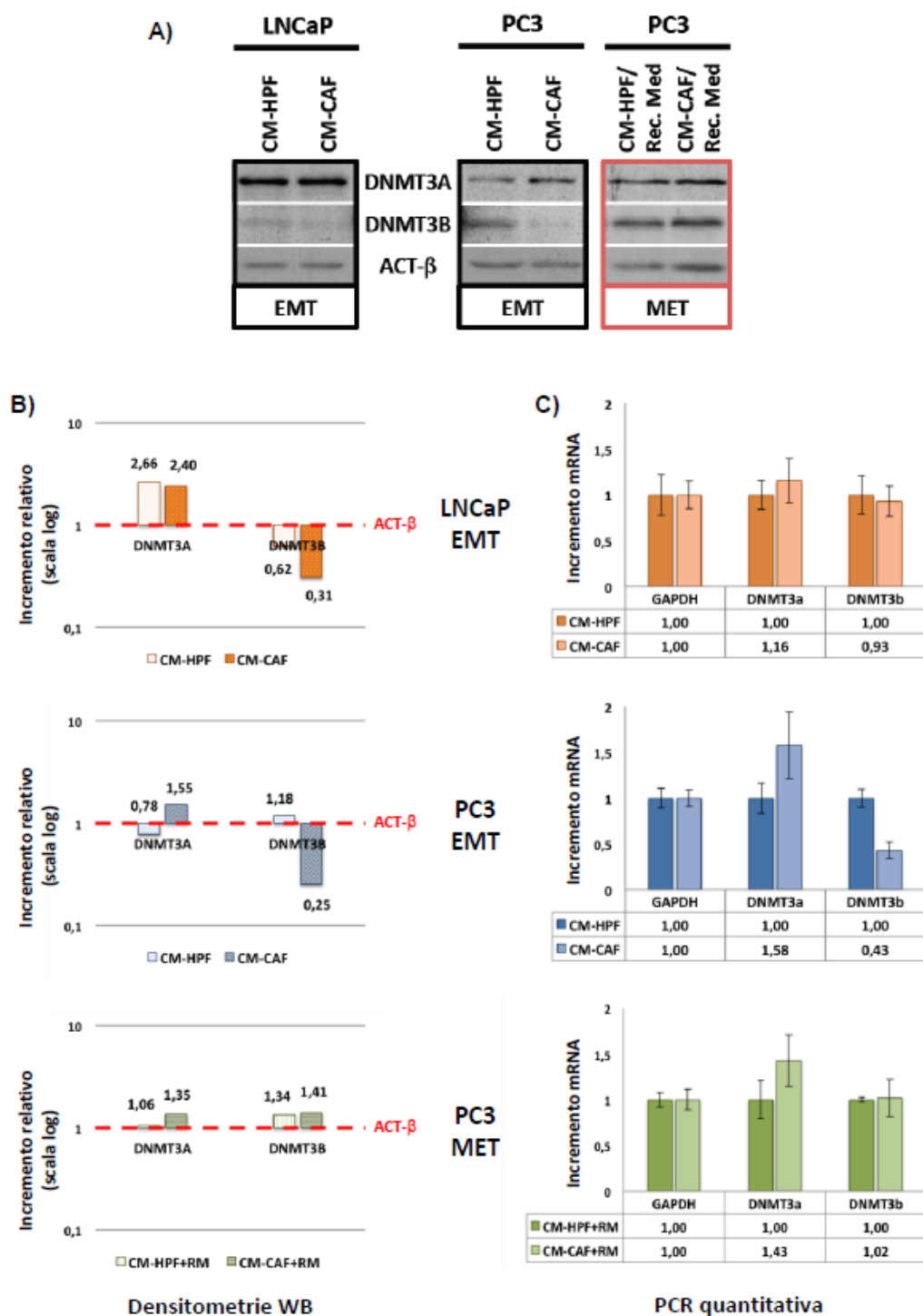
Per valutare le possibili variazioni nello stato di metilazione del DNA durante il processo inverso, sono stati analizzati sia per WB e PCR quantitativa le DNMTs e UHRF1.

Come mostrato in figura 4 (WB e PCR quantitativa PC3 MET), i livelli di espressione proteica e trascrizionale sia di UHRF1 che DNMT1, in cellule PC3 in MET, ritornano ai valori riscontrati nel trattamento di PC3 con CM-HPF. Analogamente a questo risultato si osserva che, durante la MET, i livelli trascrizionali e proteici di DNMT3A e 3B ritornano ai livelli presenti nelle cellule di controllo (Figura 5A, B e C; PC3 MET).

Questi risultati, sottolineano la reversibilità dell'espressione delle proteine coinvolte nel controllo della metilazione del DNA durante i processi di EMT e MET .



**Figura 4:** Analisi degli complessi di mantenimento della metilazione del DNA (DNMT1/UHRF1) in cellule LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. A) WB di DNMT1 e UHRF1 in cellule LN-CaP e PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT), e PC3 trattate con CM-HPF/Rec Med e CM-CAF/Rec Med al fine di indurre il processo inverso di MET. B) Grafici relativi alle analisi densitometriche effettuate sulle bande dei WB degli EMT markers di LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. C) Grafici dei livelli di RNA messaggero di DNMT1 e UHRF1 ottenuti dopo analisi di PCR quantitativa su cDNA prodotti da campioni di cellule LN-CaP e PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF e PC3 trattate con CM-HPF+RM e CM-CAF+RM. ACTINA-β (WB) e GAPDH (PCR quantitativa) sono stati usati come geni normalizzatori.



**Figura 5:** Analisi delle DNMTs *de novo* (DNMT3a e DNMT3b) in cellule LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. A) WB di DNMT3a e DNMT3b in cellule LN-CaP e PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT), e PC3 trattate con CM-HPF/Rec Med e CM-CAF/Rec Med al fine di indurre il processo inverso di MET. B) Grafici relativi alle analisi densitometriche effettuate sulle bande dei WB degli EMT markers di LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. C) Grafici dei livelli di RNA messaggero di DNMT3a e DNMT3b ottenuti dopo analisi di PCR quantitativa su cDNA prodotti da campioni di cellule LN-CaP e PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF e PC3 trattate con CM-HPF+RM e CM-CAF+RM. ACTINA- $\beta$  (WB) e GAPDH (PCR quantitativa) sono stati usati come geni normalizzatori.

## **ANALISI DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE PROTEICA E TRASCRIZIONALE DELLE ISTO-METILTRANSFERASI IN EMT**

Alterazioni del grado di metilazione a livello del genoma sono correlate anche con variazioni epigenetiche a carico degli istoni. Questo perché alcune modificazioni che si trovano sulle code istoniche sono riconosciute da complessi enzimatici, tra questi ad esempio UHRF1, in grado poi di reclutare le DNMTs, soprattutto la DNMT1.

Le iston-metiltransferasi, HMTs, sono enzimi in grado di provocare diverse modificazioni a livello delle code degli istoni e una loro sovra-espressione è correlata ad alterazione dello stato epigenetico a carico di geni specifici quali ad esempio CDH1. A questo scopo, sono stati valutati il grado di espressione proteica e trascrizionale di tre enzimi appartenenti alla famiglia delle HMTs: SUV(39)H1, EZH2 e G9a.

I valori di espressione proteica (Figura 6A) e trascrizionale (Figura 6C) delle tre iston-metiltransferasi SUV39H1, EZH2 e G9, nelle cellule LN-CaP, non mostrano alcuna variazione rilevante, anche se si osserva una maggior espressione proteica di SUV39H1 in entrambi i trattamenti, rispetto alla proteina G9a.

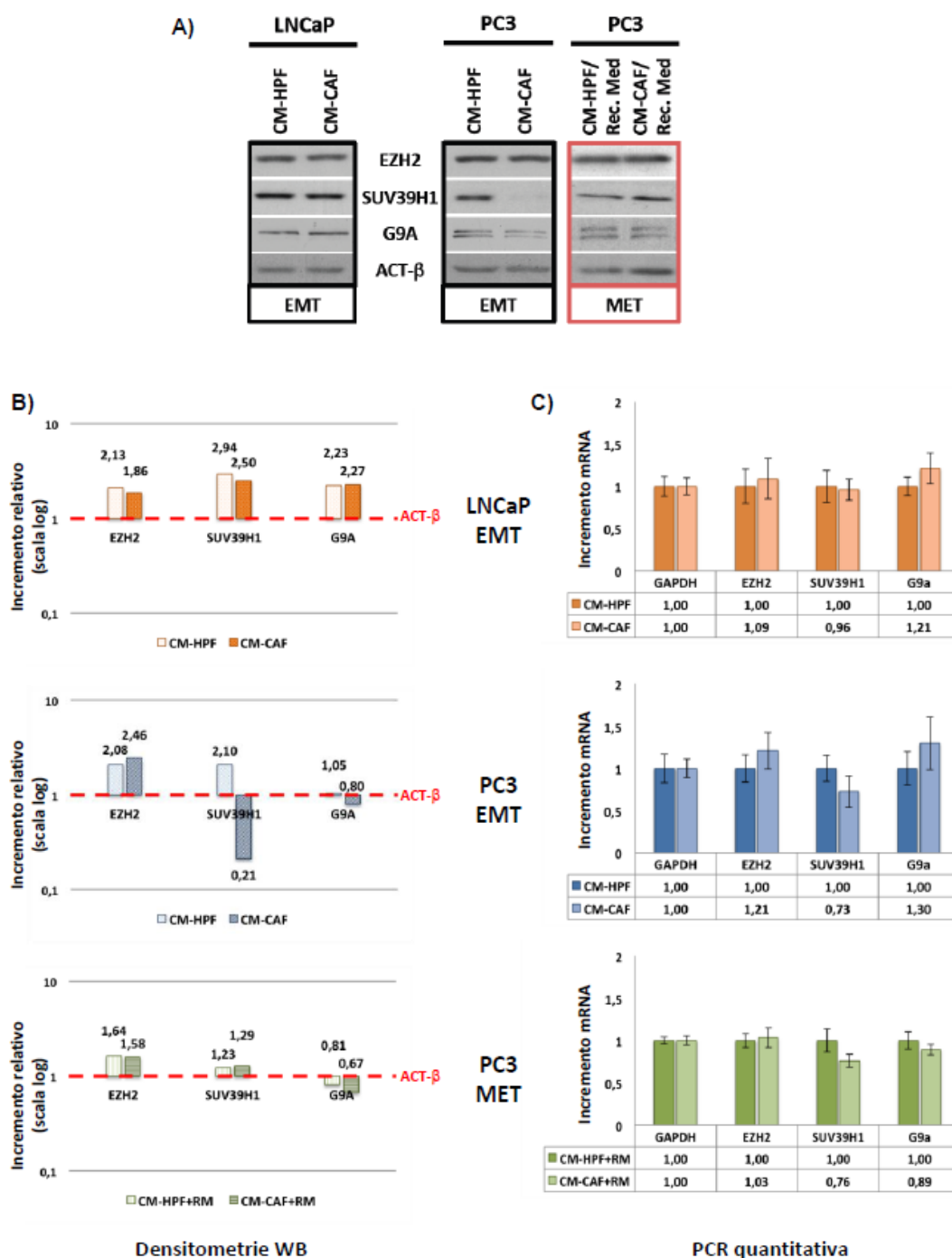
Nelle cellule PC3, il processo di EMT (trattamento con CM-CAF) induce una riduzione di circa 10 volte dell'espressione proteica di SUV39H1 (Figura 6B, analisi densitometrica ; PC3 EMT), mentre non si evidenzia una riduzione significativa a livello trascrizionale (Figura 6C). Per quanto riguarda EZH2, nonostante i livelli proteici siano più elevati rispetto alle altre HMTs, non si hanno variazioni significative durante il trattamento con CM-CAF; il livello proteico e trascrizionale di G9a, durante il processo di EMT, mostra un leggero aumento della proteina e del RNA messaggero, ma non significativo se paragonato con quello osservato per SUV39H1.

La forte riduzione dell'espressione della proteina SUV39H1 è un risultato importante, in quanto questo enzima è reclutato sulla lisina 9 dell'istone H3 dove media l'aggiunta del terzo gruppo metile permettendo la formazione del marker di repressione trascrizionale H3K9me3 che, come vedremo in seguito, risulterà essere un risultato importante.

**ALTERAZIONI REVERSIBILI DELLE HMTs DURANTE IL PROCESSO DI MET**

I dati di WB e PCR quantitativa ottenuti dopo induzione del processo di MET, nelle cellule PC3, mostrano il completo recupero della proteina SUV39H1 e una, seppur lieve, contrapposta riduzione del suo RNA messaggero; mentre G9a ed EZH2 non subiscono variazioni significative durante tale processo (Figura 6A, B e C, rispettivamente; PC3 MET).

In conclusione, questi risultati suggeriscono che la variazione dell'espressione proteica di SUV39H1 durante i processi di EMT-MET potrebbe richiedere meccanismi di regolazione post-traduzionale.



**Figura 6:** Analisi delle HMTs in cellule LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. A) WB di EZH2, SUV39H1 e G9a in cellule LN-CaP e PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT), e PC3 trattate con CM-HPF/Rec Med e CM-CAF/Rec Med al fine di indurre il processo inverso di MET. B) Grafici relativi alle analisi densitometriche effettuate sulle bande dei WB degli EMT markers di LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. C) Grafici dei livelli di RNA messaggero di EZH2, SUV39H1 e G9a ottenuti dopo analisi di PCR quantitativa su cDNA prodotti da campioni di cellule LN-CaP e PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF e PC3 trattate con CM-HPF+RM e CM-CAF+RM. ACTINA-β (WB) e GAPDH (PCR quantitativa) sono stati usati come geni normalizzatori.

## L'EMT INDOTTA DA CM-CAF DETERMINA IPOMETILAZIONE DELLE SEQUENZE LINE-1

Dopo aver osservato che l'induzione di EMT si correla con la diminuzione del livello di espressione genica dell'enzima deputato al mantenimento della metilazione del DNA, la DNMT1 (Figura 4), il nostro interesse è stato quello di analizzare lo stato di metilazione globale del genoma.

A tale scopo in collaborazione con il Laboratorio di Anatomia Patologica della Dott.ssa Daniela Furlan dell'Università dell'Insubria di Varese, sono state eseguite analisi quantitative dei livelli di metilazione di 4 dinucleotidi CpG (C1-C2-C3-C4) presenti all'interno di una porzione del 5'UTR delle sequenze retrotrasponibili LINE-1 (Figura 7A), mediante le tecniche di conversione delle citosine metilate del DNA (5mC) con bisolfito, seguita da *pyrosequencing*. La metilazione di queste sequenze può essere considerata come un surrogato dello stato di metilazione del genoma di una cellula.

Il *pyrosequencing* ha permesso di stabilire che, nelle 4 citosine analizzate, la percentuale di metilazione del DNA del genoma presenta, rispettivamente, una media compresa tra il 20 e il 30% nelle cellule LN-CaP trattate con CM-HPF e tra il 60 e il 65% in cellule PC3 CM-HPF (Figura 7B e C). Inoltre, nelle cellule LN-CaP si osserva che il trattamento con CM-CAF non altera i livelli di metilazione di tutte le citosine analizzate (Figura 7B); mentre nelle cellule PC3 in fase di EMT è stata riscontrata una riduzione media della metilazione importante di C1, C2, C3 e C4 (livelli di metilazione media pari a, rispettivamente, 51%-45%-55%-48%) e compresa tra il 16 e il 23%. Inoltre l'evento di ipometilazione delle citosine delle LINE-1 nei CM-CAF presenta un elevato grado di significatività se paragonata il livello di metilazione dei controlli ( $P \leq 0,005$ ) (Figura 7C, PC3 CM-HPF vs CM-CAF).

In conclusione, quindi, questa diminuzione di metilazione del DNA nelle sequenze LINE-1, in cellule PC3 durante il processo di EMT, è in accordo con la ridotta espressione degli enzimi implicati nel mantenimento della metilazione del DNA riscontrato nelle analisi precedenti. I livelli di metilazione del DNA durante la EMT e MET sono stati ulteriormente confermati mediante *chip* Illumina 450K (vedi oltre).

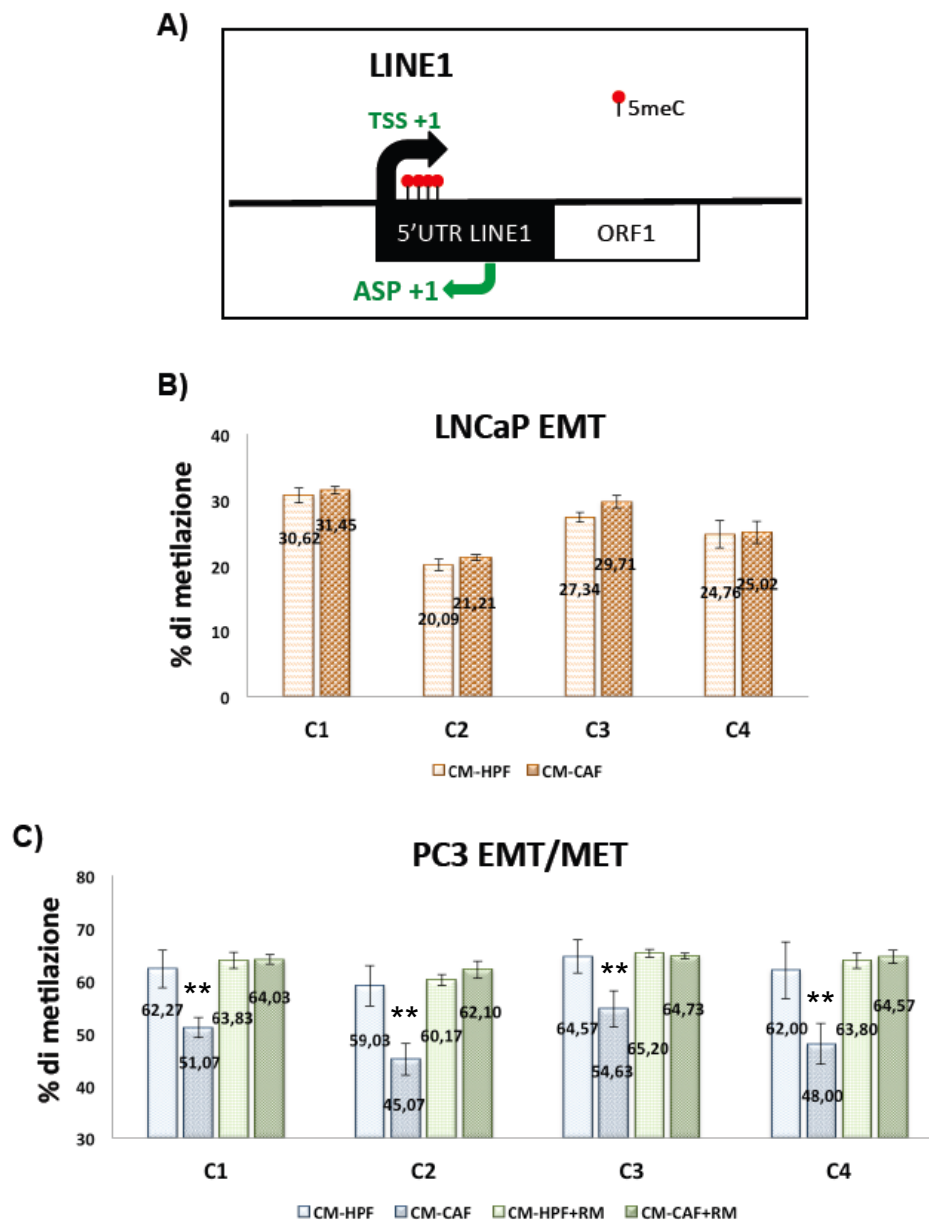


## **DNMTs E LINE-1 NEL PROCESSO INVERSO DI MET**

Per valutare il comportamento della metilazione del DNA durante il processo inverso di EMT, l'analisi sulle sequenze LINE-1 è stata effettuata sulle cellule PC3 in MET. Nel grafico in figura 7C è possibile osservare che, durante la MET, i valori medi di metilazione del DNA delle 4 citosine analizzate ritornano a valori paragonabili con quelli dei controlli (trattamento con CM-HPF+RM), ovvero, 64% per C1, 62% per C2, e 65% per C3 e C4. Inoltre è possibile osservare che i valori medi di metilazione di CM-HPF+RM, CM-CAF+RM e CM-HPF sono tra loro paragonabili e la variazione globale non è significativa (Figura 7C).

In conclusione è possibile affermare che durante la MET, il ripristino della metilazione delle LINE-1 è esattamente opposto all'ipometilazione osservata durante la EMT, ciò conferma che il processo non solo è reversibile, ma che le alterazioni dei livelli di metilazione potrebbero essere conseguenti ai processi di repressione e di attivazione trascrizionale delle DNMTs (Figura 4 e 5).

Al momento della stesura della presente tesi, sono ancora in corso analisi per verificare i livelli di espressione trascrizionale e proteica delle TET1, 2,3 (Ten-Eleven Translocation) e dei livelli di idrossimetilazione del DNA nelle due condizioni EMT e MET. La riduzione di metilazione, infatti, potrebbe essere determinata anche (o prevalentemente) da variazioni di espressione delle TET, oltre che dalla riduzione di DNMT1 e UHRF1.



**Figura 7:** Livelli di metilazione del DNA su sequenze LINE in cellule LN-CaP e PC3 in EMT e PC3 in MET. A) Disegno dell'architettura delle sequenze LINE con l'indicazione della regione di analisi e la posizione delle citosine analizzate per *pyrosequencing*. B) Grafici della media dei livelli di metilazione sulle 4 citosine presenti nelle LINE e analizzate per *pyrosequencing* dopo reazione di conversione con bisolfito in campioni di DNA genomico derivato da cellule LN-CaP in EMT e di CTRL. C) Grafici della media dei livelli di metilazione sulle 4 citosine presenti nelle LINE1 e analizzate per *pyrosequencing* dopo reazione di conversione con bisolfito in campioni di DNA genomico derivato da cellule PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT) e PC3 trattate con terreno privo di siero dopo EMT (CM-HPF/Rec Med e CM-CAF/Rec Med). Le cellule PC3 trattate con CM-CAF mostrano una riduzione significativa di circa il 20% dei livelli di metilazione del DNA su tutte le citosine analizzate (\*\*,  $P \leq 0.005$ ; *versus* CM-HPF). L'analisi di *pyrosequencing* è il risultato della media di tre esperimenti indipendenti.

## IL PROCESSO DI EMT DETERMINA VARIAZIONI REVERSIBILI DI METILAZIONE IN PIÙ DI 100K CpGs

Le cellule PC3 in EMT presentano la concomitante perdita del complesso enzimatico implicato nel mantenimento della metilazione del DNA (DNMT1/UHRF1), un leggero aumento dell'espressione di DNMT3a (Figura 5), implicata nella *de-novo* metilazione, e una sostanziale riduzione della metilazione del DNA delle sequenze LINE-1 (Figura 7C, PC3 CM-HPF vs CM-CAF).

L'analisi dello stato di metilazione globale del DNA durante i processi di EMT e di MET nelle cellule PC3, è stata effettuata, in collaborazione con il Professor Alessandro Weisz, del Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica dell'Università degli Studi di Salerno, utilizzando la tecnica della "*bisulfite- Sequencing*" (Bis-Seq) mediante il kit commerciale Illumina 450K Bead Chip. Il kit Illumina 450K è in grado di analizzare lo stato di metilazione di oltre 485 mila isole CpGs distribuite all'interno dell'intero genoma, permettendo una misurazione quantitativa della metilazione del DNA di circa il 96% delle isole CpG note, con una copertura aggiuntiva nelle *CpG shores* e nelle loro regioni fiancheggianti.

La figura 8A rappresenta l'analisi di regressione lineare dei 4 diversi trattamenti oggetto del nostro studio; è possibile osservare come nei due grafici in alto sia presente un coefficiente di correlazione lineare vicino al valore 1. In particolare nell'analisi tra le cellule PC3 HPF e PC3 HPF+RM, considerate come nostri controlli (CTRL), l'alto grado di correlazione lineare è indice di un'assenza di variazioni di metilazione del DNA indotta dai trattamenti (Figura 8A, grafico di sinistra in alto e Figura 7C, LINE CM-HPF vs CM-HPF+RM). L'analisi di correlazione lineare tra le cellule PC3-HPF e PC3 CAF+RM, invece, è concorde con il fatto che le cellule CAF+RM sono andate incontro al processo di MET, e non presentano sostanziale variazione di metilazione del DNA se confrontate con i controlli (Figura 8A, grafico 2; e Figura 7C, LINE CM-HPF vs CM-CAF+RM). Invece i grafici dell'analisi delle variazioni di metilazione delle singole CpG osservate durante la EMT (PC3 CM-HPF vs PC3 CM-CAF) e nel processo inverso di MET (PC3 CM-CAF vs

PC3 CM-CAF+RM) presentano una distribuzione completamente speculare, (Figura 8A, grafici in basso), indicando che il profilo di metilazione di molte CpGs risulta invertita durante tali processi.

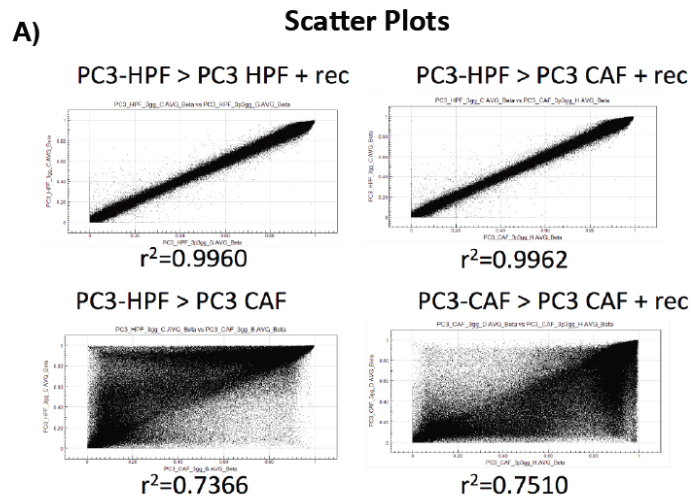
L'analisi bioinformatica dei campioni analizzati, inoltre, ha permesso di stabilire il numero delle CpGs all'interno del genoma che hanno subito variazioni dei livelli di metilazione nei processi di EMT e di MET. Come indicato nella tabella e nel grafico, rispettivamente in figura 8B e 8C (grafico a torta in alto), in oltre 107000 CpG su >485000 sono stati osservati cambiamenti dello stato di metilazione e, nello specifico, il 10% circa si ipermetila (11148) e il 90% si ipometila (96534). Nel gruppo delle 11148 CpGs che subiscono un'ipermetilazione, il 30% si trova nelle regioni intergeniche comprendenti sequenze di DNA genomico altamente ripetute (come: LINE, SINE, ALU, etc.); mentre il restante 70% è associato alle regioni intrageniche. Le regioni intrageniche, invece, corrispondono al corpo genico (*gene body*) (44%), al 3'UTR (5%) e al promotore (51%), in quest'ultima la maggior metilazione del DNA è stata osservata nelle aree di regolazione trascrizionale, ovvero, nel TSS1500, nel TSS200 e nel 5'UTR (92%) e solo 8% nel primo esone (Figura 8C, colonna Hyper).

Per quanto riguarda l'ipometilazione, la percentuale maggiore (67%) è presente nelle regioni intrageniche e principalmente nelle zone del promotore, con un 52%. Nel dettaglio della regione del promotore il 42% è associato al TSS1500, il 23% al TSS200, e rispettivamente il 12% e il 23% nel primo esone e nel 5'UTR. Le regioni del DNA genomico altamente ripetute (intergeniche) rappresentano il 33% delle regioni ipometilate (Figura 8C, colonna Hypo).

Invece, l'analisi condotta sulle cellule che hanno effettuato la MET ha evidenziato che solo 22 su oltre 107000 CpG, ovvero lo 0,02%, non riacquista la condizione di metilazione iniziale (Figura 8B, linea MET della tabella), di cui 8 CpG risultano ipometilate, e 3 ipermetilate.

In conclusione possiamo affermare che nelle cellule PC3 la contemporanea presenza di ipermetilazione e di ipometilazione del DNA, durante il processo di EMT, sembra essere una condizione necessaria a conferma che tal

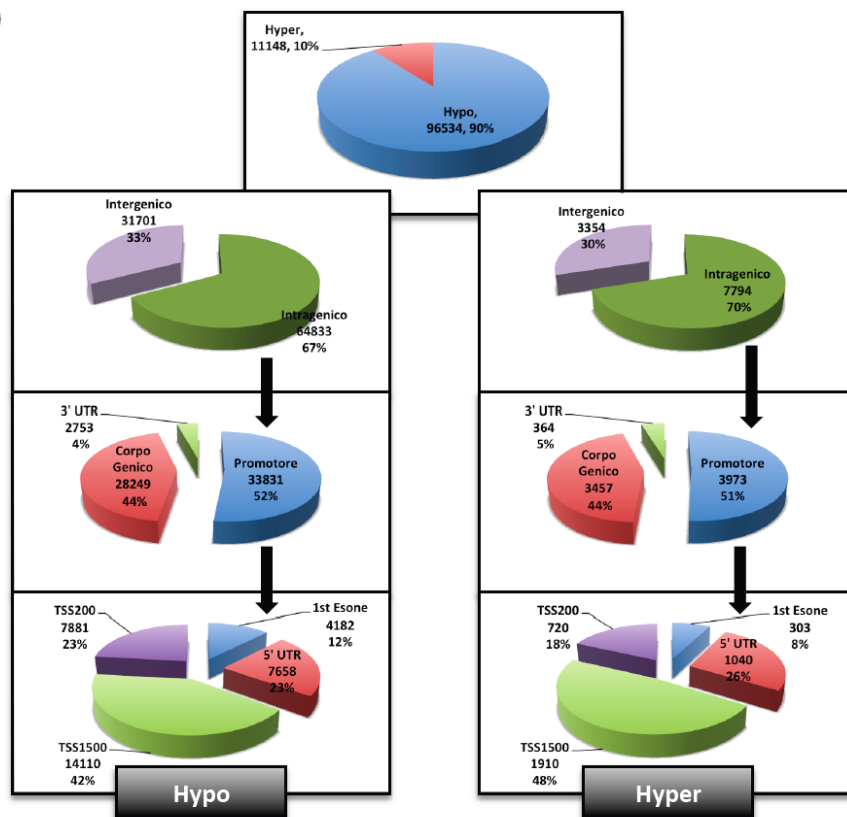
processo sia altamente specifico. Quindi la corretta attivazione del processo di EMT sembra richiedere la concomitante ipometilazione del DNA, dovuta alla perdita dell'espressione di DNMT1 e di DNMT3b, e ipermetilazione del DNA che potrebbe essere associata all'incremento dell'espressione di DNMT3a su geni specifici che regolano il mantenimento del fenotipo epiteliale.



**B)**

	Detection pValue $\leq 0.01$ IDiff Score $\geq 30$	$\Delta\beta \geq 0.2$		$\Delta\beta \geq 0.5$	
		Hypo	Hyper	Hypo	Hyper
CTR	15	4*	1	0	0
EMT	159010	96534	11148	21852	1963
MET	22	8**	3	0	0

**C)**



**Figura 8:** Analisi Illumina 450k su DNA genomico di cellule PC3 in EMT, MET e relativi controlli. A) Grafici a dispersione della correlazione lineare delle variazioni di metilazione del DNA ottenuti dopo confronto tra cellule di controllo (PC3-HPF vs PC3-HPF/Recovery, grafico in alto a sinistra), tra cellule di controllo e cellule PC3 che hanno effettuato il processo inverso di MET (PC3-HPF vs PC3-CAF/Recovery, grafico in alto a destra), tra cellule di controllo e cellule in cui è stato indotta il processo di EMT (PC3-HPF vs PC3-CAF, grafico in basso a sinistra) e, infine, tra cellule in EMT e cellule in MET (PC3-CAF vs PC3-CAF/Recovery, grafico in alto a destra). Le cellule di controllo PC3-HPF e PC3-HPF/Recovery e in MET, PC3-CAF/Recovery (grafici in alto), nei confronti, non presentano variazioni di distribuzione nella metilazione delle isole CpGs analizzate (valore di correlazione lineare di  $\approx 1$ ). I confronti tra i due processi, di EMT e di MET (grafici in basso), mostrano, invece, un minor valore del coefficiente di correlazione lineare e una distribuzione inversa della metilazione all'interno delle isole CpGs analizzate. B) Tabella riassuntiva della variazione di metilazione sulle isole CpGs analizzate all'interno dei vari confronti. I controlli mostrano variazione di metilazione differenziale su 15 citosine, in MET ne sono state osservate solo 22, mentre in EMT 159010 ( $p \leq 0.01$  con IDiff Score1  $\geq 30$ ). All'interno dei controlli, 4 sono ipometilate e 1 ipermetilata, in EMT, su 107000 CpGs osservate variare, 96534 e 11148 sono, rispettivamente, ipometilate e ipermetilate mentre in MET, 8 risultano ipometilate (di cui 4 in comune con i CTRL) e 3 ipermetilate ( $\beta$ value  $\geq 0,2$ ). C) Grafici a torta sulle isole CpGs ipo- (sinistra) e iper-metilazione (destra) all'interno delle diverse regioni genomiche (intrageniche e intergeniche). Le regioni intrageniche ipo- e iper-metilate sono state suddivise in regioni del promotore, corpo genico e 3'UTR. Le regioni del promotore a loro volta sono state ulteriormente suddivise in TSS1500 (promotore distale), TSS200 (promotore prossimale), 5'UTR e 1<sup>a</sup> esone (corpo del gene).

## **LA METILAZIONE DEL DNA E' ASSOCIATA AI CAMBIAMENTI DELL'ESPRESSIONE DEI GENI RESPONSABILI DELLA EMT E DELLA MET**

Lo studio della metilazione del DNA condotto sulle LINE1 (Figura 7) e sull'intero DNA genomico (Figura 8; Illumina 450K) ha evidenziato che il processo di EMT induce un'importante alterazione dello stato metilazione di un gran numero di CpGs e che queste alterazioni epigenetiche sono reversibili nel processo inverso di MET. Grazie a questa metodica e ad una accurata analisi bioinformatica è stato possibile caratterizzare gli eventi di ipo- e iper-metilazione sulle singole CpGs in base al loro posizionamento all'interno del genoma e durante i processi di EMT e di MET. Tale analisi ha permesso di generare mappe grafiche dei cambiamenti del profilo di metilazione del DNA di un elevato numero di geni. (Dati non mostrati).

Di tutti questi geni, è stato effettuato uno studio su quelli che caratterizzano il processo di EMT, in particolare l'analisi di CDH1, (custode del fenotipo epiteliale) e di VIMENTINA, N-CAD e ZEB1, (fenotipo mesenchimale), inoltre

è stato analizzato il gene APC, caratterizzante il fenotipo staminale, al fine di valutare il comportamento della metilazione delle singole CpGs, nella regione del promotore e nel corpo genico, di questi geni presi in esame.

Nelle cellule PC3 in EMT (confronto CM-HPF vs CM-CAF) la generazione delle mappe grafiche dei geni trascrizionalmente attivi, come N-CAD, VIM (Figura 9B e C) e ZEB1 (Figura 10B), ha permesso di stabilire che, sulle citosine analizzate, sono presenti entrambi gli eventi di ipo- (indicati in blu) e iper-metilazione (in rosso). In N-CAD e VIM l'evento principale si associa a una robusta ipometilazione delle citosine presenti nel corpo del gene (Figura 9B, citosine in grigio dalla 11 alla 17; e Figura 9C, citosine in grigio dalla 14 alla 22). Diversamente da N-CAD che non mostra variazioni di metilazione del DNA nella regione del promotore (Figura 9B, citosine in verde dalla n.1 alla n.4) Vimentina, presenta un'ipermetilazione nella regione distale del promotore (citosine in verde scuro dalla n.1 alla n.3) e una debole ipometilazione delle citosine associate alla regione prossimale al sito di trascrizione (TSS e citosine dalla n.4 alla n.8 in verde chiaro). Per quanto riguarda ZEB1 si osserva un'ipometilazione in un limitato numero di CpGs all'interno della regione del promotore (Figura 10B, citosine 4, 5, 6, 7 e 14) e una alternanza di ipo- (citosine 17, 21 e 25) e di iper-metilazione nel corpo del gene (citosine 19 e 27). L'analisi di N-CAD, VIM e ZEB1, durante l'evento di MET (confronto CM-CAF vs CM-CAF+RM), ha mostrato un andamento opposto dei profili di metilazione del DNA rispetto a quello osservato nel processo di EMT (Figure 9B, 9C e 10B, tabelle mappe delle CpGs dei geni di N-CAD, VIM e ZEB1, linea MET).

Il gene CDH1, che è trascrizionalmente represso durante il processo di EMT (Figura 2), presenta una globale ipermetilazione del suo locus genico (cromosoma 16) durante la transizione epitelio mesenchimale (Figure 9A, tabella mappa linea EMT). Nel dettaglio, le citosine dal numero 2 alla numero 6 (in verde), e associate alla regione del promotore, risultano iper-metilate, in particolare la 2 è fortemente metilata. Le CpGs nel corpo del gene mostrano anch'esse un sostanziale incremento di metilazione, quelle negli esoni 1 e 2 (7-9 e 13 in giallo) subiscono una debole ipermetilazione, mentre quelle

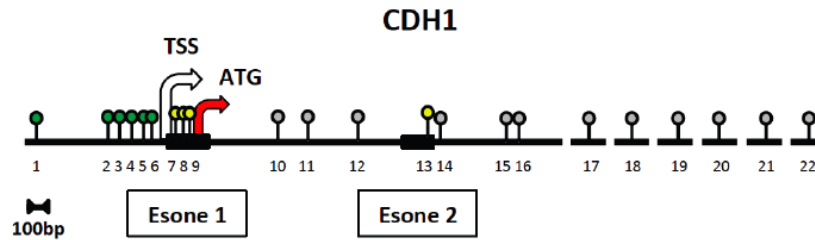
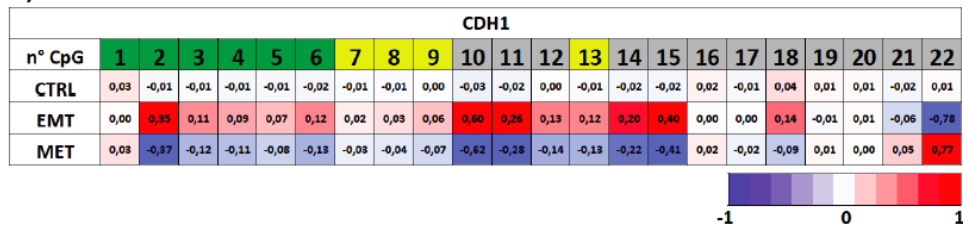


presenti negli introni (10-12, 14, 15 e 18, in grigio) sono maggiormente ipermetilate rispetto alle precedenti. Le uniche due citosine che vanno incontro a una ipometilazione sono la 21 e la 22. Durante la MET, viceversa, le regioni metilate (colore rosso) vanno incontro a demetilazione (colore blu) (Figure 9A, tabella mappa linea MET).

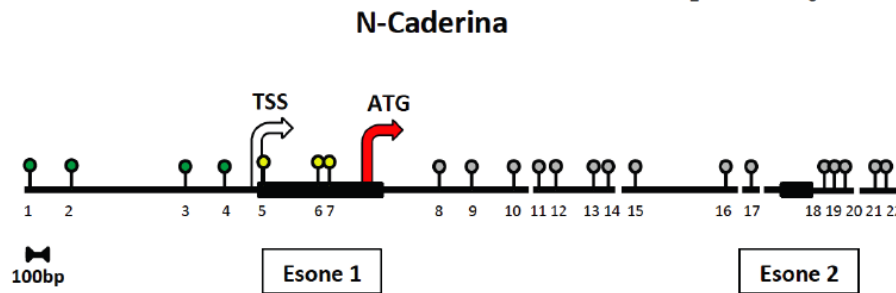
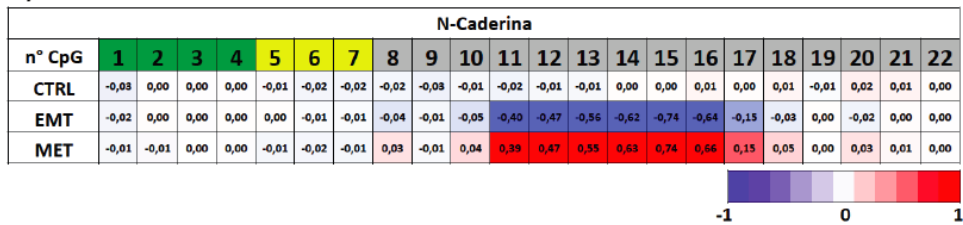
Dopo aver studiato i geni coinvolti nei processi di EMT e di MET, è stato deciso di prendere in considerazione un gene implicato nella *pathway* di staminalità, APC. Come si osserva nella tabella in figura 10A, linea EMT, le citosine che subiscono variazioni dei livelli di metilazione sono quelle che vanno dal numero 1 alla numero 8 (regione del promotore). All'interno di queste CpGs, quelle in posizione 3 e 4, si ipometilano, le restanti, invece, si ipermetilano; mentre l'evento è opposto durante la MET.

La variazione dei profili di metilazione sulle singole citosine nei processi di EMT e MET correla con i cambiamenti dei livelli trascrizionali dei geni di CDH1, N-CAD, Vimentina e ZEB1. La metilazione del DNA risulta quindi essere una modificazione epigenetica specifica e reversibile.

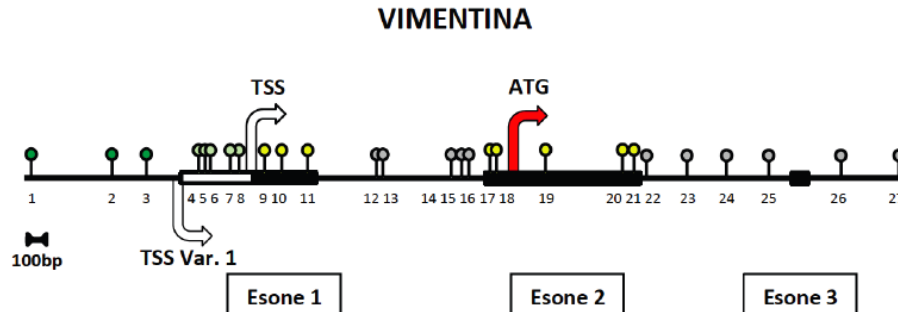
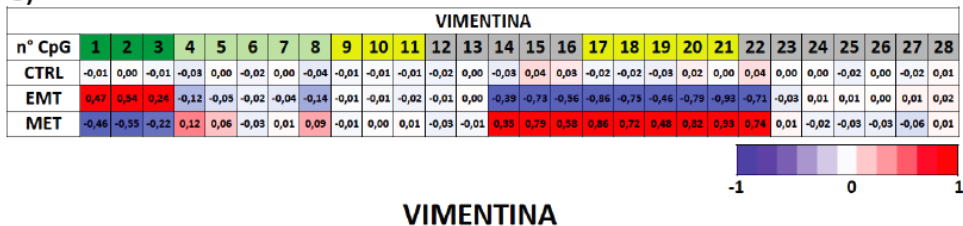
A)



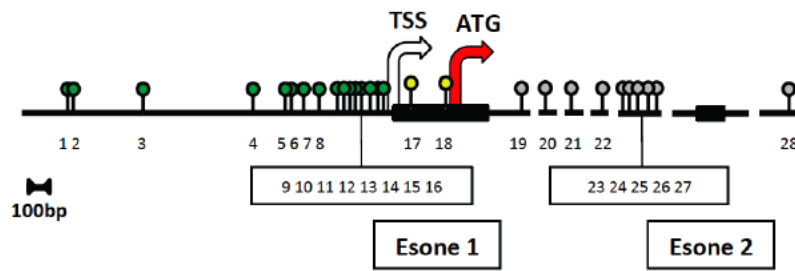
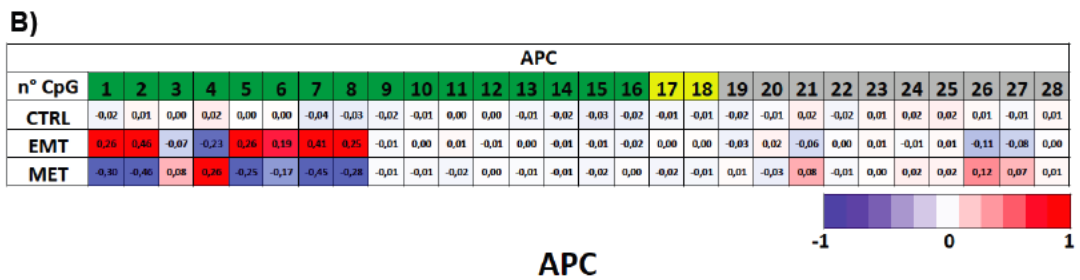
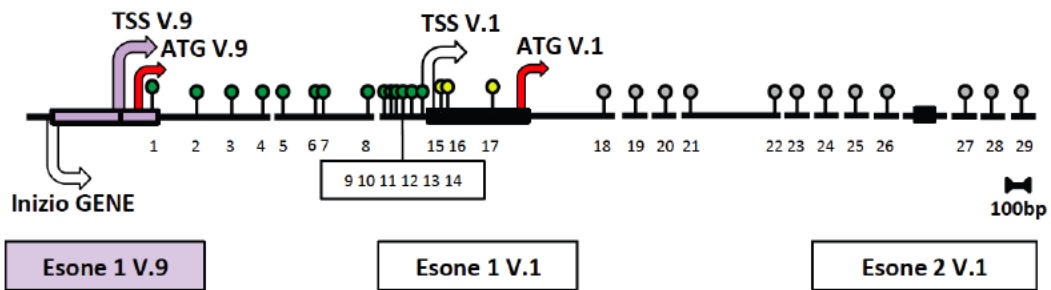
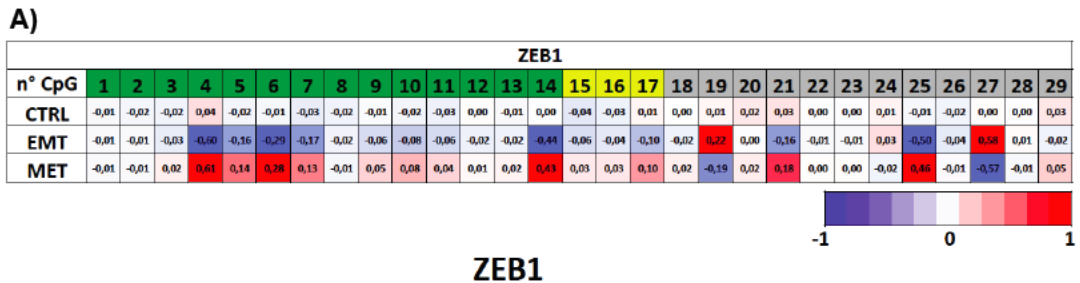
B)



C)



**Figura 9:** Ipo- e iper-metilazione dei geni di CDH1, N-Caderina e Vimentina in cellule di controllo, in EMT e in MET. A) Tabella grafica del profilo di metilazione delle singole CpGs nella regione cromosomica del gene di CDH1 ottenute dall'analisi Illumina 450K. La tabella è stata generata calcolando il  $\Delta\beta$ value tra le cellule PC3 di controllo (CM-HPF vs CM-HPF/RM), tra cellule di controllo con PC3 in EMT (CM-HPF vs CM-CAF) e tra cellule in EMT con quelle in MET (CM-CAF vs CM-CAF/RM). I valori del  $\Delta\beta$ value sono compresi tra -1 (scala colore di blu = ipometilazione) e +1 (scala colore di rosso = ipermetilazione), valori vicini a zero, invece, indicano assenza di variazione di metilazione. Nel disegno della struttura del locus genico di CDH1, oltre al sito di inizio trascrizione (TSS) e all'ATG, sono rappresentate graficamente le citosine analizzate a livello del promotore (in verde), degli esoni (in giallo) e negli introni (in grigio). B) Tabella grafica del profilo di metilazione delle singole CpGs nella regione cromosomica del gene di N-Caderina ottenute dall'analisi Illumina 450K. La tabella è stata generata calcolando il  $\Delta\beta$ value tra le cellule PC3 di controllo (CM-HPF vs CM-HPF/RM), tra cellule di controllo con PC3 in EMT (CM-HPF vs CM-CAF) e tra cellule in EMT con quelle in MET (CM-CAF vs CM-CAF/RM). I valori del  $\Delta\beta$ value sono compresi tra -1 (scala colore di blu = ipometilazione) e +1 (scala colore di rosso = ipermetilazione), valori vicini a zero, invece, indicano assenza di variazione di metilazione. Il disegno della struttura del locus genico di N-Caderina, oltre al TSS e all'ATG, mostra graficamente le citosine analizzate a livello del promotore (in verde), degli esoni (in giallo) e negli introni (in grigio). C) Tabella grafica del profilo di metilazione delle singole CpGs nella regione cromosomica del gene di Vimentina generata dopo analisi Illumina 450K. La tabella è il risultato del calcolo del  $\Delta\beta$ value tra le cellule PC3 di controllo (CM-HPF vs CM-HPF/RM), tra cellule di controllo con PC3 in EMT (CM-HPF vs CM-CAF) e tra cellule in EMT con quelle in MET (CM-CAF vs CM-CAF/RM). I valori del  $\Delta\beta$ value sono compresi tra -1 (scala colore di blu = ipometilazione) e +1 (scala colore di rosso = ipermetilazione), valori vicini a zero, invece, indicano assenza di variazione di metilazione. Nel disegno della struttura del locus genico di Vimentina, oltre al TSS e all'ATG, è possibile osservare un TSS alternativo e corrispondente a quello della variante 1 del gene. Le citosine a monte del TSS della variante 1 e tra quest'ultimo e il TSS di Vimentina sono considerate quelle nella regione del promotore (in verde scuro e verde chiaro), mentre le restanti sono quelle negli esoni (in giallo) e negli introni (in grigio).



**Figura 10:** Ipo- e iper-metilazione dei geni di ZEB1 e APC in cellule di controllo, in EMT e in MET. A) Tabella grafica del profilo di metilazione delle singole CpGs nella regione cromosomica del gene di ZEB1 ottenute dall'analisi Illumina 450K. La tabella è stata generata calcolando il  $\Delta\beta$ value tra le cellule PC3 di controllo (CM-HPF vs CM-HPF/RM), tra cellule di controllo con PC3 in EMT (CM-HPF vs CM-CAF) e tra cellule in EMT con quelle in MET (CM-CAF vs CM-CAF/RM). I valori del  $\Delta\beta$ value sono compresi tra -1 (scala colore di blu = ipometilazione) e +1 (scala colore di rosso = ipermetilazione), valori vicini a zero, invece, indicano assenza di variazione di metilazione. Nel disegno della struttura del locus genico di ZEB1, oltre al TSS della variante 1 e al suo ATG, è possibile osservare che il reale inizio del gene corrisponde con l'esone 1 della variante 9 di ZEB1 (non considerato). Le citosine a monte del TSS della variante 1 e nell'esone 1 della variante 9 sono considerate quelle nella regione del promotore (in verde), mentre le restanti sono quelle negli esoni della variante 1 (in giallo) e nei relativi introni (in grigio). B) Tabella grafica del profilo di metilazione delle singole CpGs nella regione cromosomica del gene di APC ottenute dall'analisi Illumina 450K. La tabella è stata generata calcolando il  $\Delta\beta$ value tra le cellule PC3 di controllo (CM-HPF vs CM-HPF/RM), tra cellule di controllo con PC3 in EMT (CM-HPF vs CM-CAF) e tra cellule in EMT con quelle in MET (CM-CAF vs CM-CAF/RM). I valori del  $\Delta\beta$ value sono compresi tra -1 (scala colore di blu = ipometilazione) e +1 (scala colore di rosso = ipermetilazione), valori vicini a zero, invece, indicano assenza di variazione di metilazione. Il disegno della struttura del locus genico di APC, oltre al TSS e all'ATG, mostra graficamente le citosine analizzate a livello del promotore (in verde), degli esoni (in giallo) e negli introni (in grigio).

## **ANALISI DELLA CONDIZIONE EPIGENETICA DEL PROMOTORE DI CDH1 IN CELLULE PC3 IN EMT**

L'ipermetilazione delle CpGs all'interno del promotore del gene di CDH1 e la conseguente repressione trascrizionale osservata in cellule PC3 dopo il trattamento CM-CAF (Figura 2 e 9A), ed, inoltre, l'alterazione dell'espressione di DNMT1, DNMT3a e SUV39H1 (Figura 4, 5, 6), sono dati importanti che hanno suggerito di approfondire lo studio sulle modificazioni epigenetiche coinvolte durante il processo di EMT.

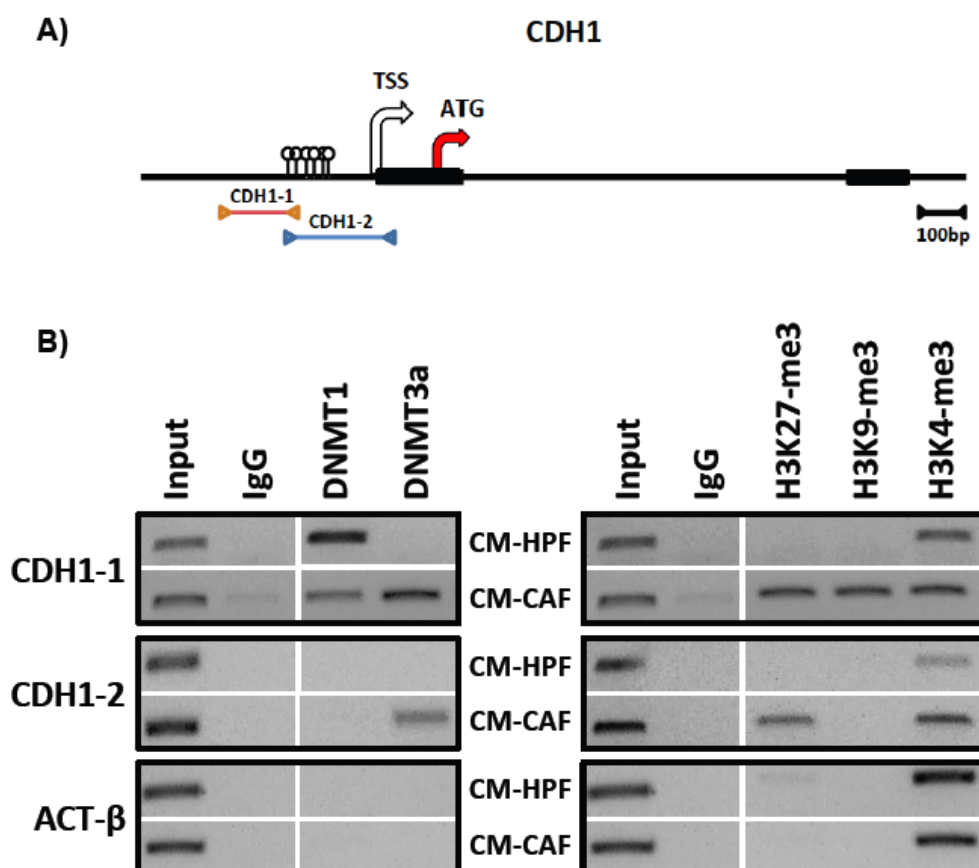
Si è deciso, quindi, di isolare il DNA genomico di cellule PC3 di CTRL (CM-HPF) e indotte in transizione epitelio mesenchimale (CM-CAF) mediante tecnica d'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). In particolare, la cromatina è stata precipitata con anticorpi contro le proteine DNMT1 e DNMT3a, e le modificazioni epigenetiche associate all'istone H3, rispettivamente, K27me3, K9me3 (marcatori di repressione trascrizionale) e K4me3 (marcatore di attivazione trascrizionale).

La successiva analisi di PCR semiquantitativa sui campioni di DNA derivati dalla ChIP, invece, è stata eseguita per definire il profilo delle alterazioni epigenetiche e delle DNMTs associate a due specifiche regioni del promotore di CDH1 (Figura 11A; CDH1-1 in arancione e CDH1-2 in azzurro). Dalla corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione di PCR dei campioni immunoprecipitati da cellule PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF è possibile osservare una sostanziale riduzione dell'intensità della banda di DNMT1 sulla regione 1 del promotore di CDH1 nelle cellule in EMT se paragonate con quelle di controllo; mentre la regione prossimale al TSS di CDH1 (CDH1-2) non mostra il legame di DNMT1 (Figura 11B, immagine gel di sinistra colonna DNMT1). La DNMT3a, diversamente dalla DNMT1, nelle cellule di controllo non è legata al promotore di CDH1 (linee CM-HPF assenza di bande nella colonna DNMT3a), viceversa, nelle PC3 trattate con CM-CAF, compare una banda a livello di entrambe le regioni del promotore di CDH1 (Figura 11B, immagine gel di sinistra colonna DNMT3a). Sul promotore di un gene trascrizionalmente attivo, come quello dell'actina  $\beta$ , come atteso, non è stato osservato alcuna interazione delle due DNA metiltransferasi in nessuna delle condizioni sperimentale investigate (Figura 11B, immagine gel di sinistra colonna DNMT-1 e -3a).

L'analisi del promotore di CDH1 sulle immunoprecipitazioni delle modificazioni epigenetiche mostra che la tri-metilazione della lisina 4 dell'istone H3, marcatore di attivazione trascrizionale, viene mantenuta in tutte le condizioni sperimentali (Figura 11B, bande colonna H3K4-me3 immagine gel di destra). Invece, per quanto riguarda la tri-metilazione delle lisine 9 e 27 dell'istone H3, marcatori associati a repressione trascrizionale, è stata osservata la comparsa di bande nei soli campioni derivati da cellule PC3 in EMT (Figura 11B, bande colonne H3K9-me3 e H3K27-me3 immagine gel di destra). In particolare, la regione del promotore di CDH1-1 presenta la contemporanea presenza di H3-K9me3 e -K27me3, mentre la regione CDH1-2 mostra l'arricchimento di H3K27-me3 (Figura 11B, bande linee CM-CAF). Nell'analisi di PCR di un promotore trascrizionalmente attivo (actina  $\beta$ )

è possibile osservare una banda nei soli campioni di H3K4-me3 (Figura 11B, gel di destra, linee CM-HPF e CM-CAF).

Il processo di EMT indotto da CAFs determina la repressione trascrizionale dell'E-caderina (Figura 2) attraverso la contemporanea presenza sulla regione del promotore di CDH1 di marcatori epigenetici di attivazione e repressione trascrizionale, quali, H3-K4me3 e -K27me3, e del legame di DNMT3a.



**Figura 11:** Profilo epigenetico del promotore di CDH1 in cellule PC3 indotte in EMT con terreno condizionato derivato da CAF. A) Disegno del promotore del gene di CDH1 sul quale sono state indicate le regioni del promotore analizzate (CDH1-1 segmento in arancione e CDH1-2 segmento in azzurro). B) PCR semiquantitativa delle regioni di DNA dei promotori genici di CDH1 e Actina  $\beta$  dopo immunoprecipitazione della cromatina con anticorpi contro le DNMTs (DNMT-1 e -3a) e le modificazioni istoniche H3-K27me3, -K9me3 e -K4me3 in cellule PC3 trattate con CM-HPF e CM-CAF.

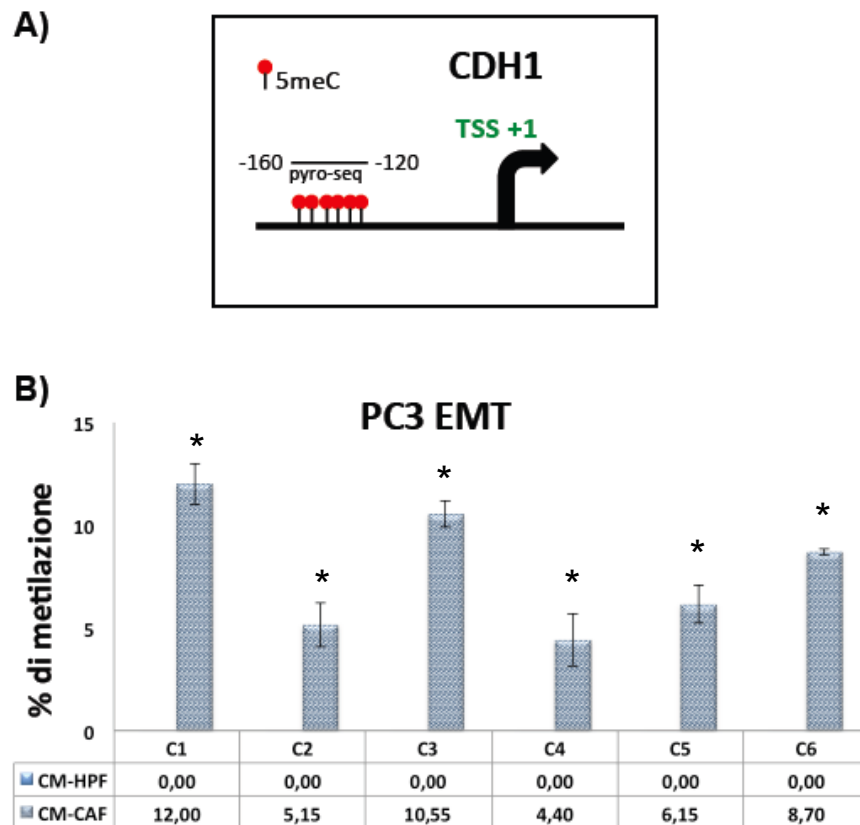


## **ANALISI DI *PYROSEQUENCING* DELLE REGIONI DEL PROMOTORE DI CDH1 DURANTE IL PROCESSO DI EMT**

Avendo osservato il legame di DNMT3a sul promotore di CDH1 nelle cellule in EMT (Figura 11), si è deciso, sempre in collaborazione con il reparto di Anatomia Patologica e della Dott.ssa Daniela Furlan, di effettuare lo studio sui cambiamenti dei livelli di metilazione del DNA mediante *pyrosequencing* su 6 citosine di un'isola CpG presente all'interno del promotore di CDH1 (Figura 12A, schema posizione citosine).

Il DNA genomico proveniente da cellule PC3 di controllo e trattate con CM-CAF è stato sottoposto a trattamento di conversione con bisolfito, e, successivamente, amplificato con opportuni oligonucleotidi ed analizzato per la regione di interesse. Il grafico in figura 12B mostra dei livelli medi di metilazione delle sei citosine analizzate, in particolare, si osserva che le cellule trattate con CM-HPF mostrano una percentuale di metilazione pari a zero su tutte e 6 le citosine analizzate. Nelle cellule in cui è stato indotto il processo di EMT, invece, si osserva, seppur in maniera variabile, un incremento medio dei livelli di metilazione delle 6 citosine, rispettivamente del 12%(C1), 5%(C2), 11%(C3), 4%(C4), 6%(C5) e 9%(C6).

In conclusione, la "*de novo*" metilazione del DNA sull'isola CpG del gene di CDH1 indotta dal trattamento con terreno condizionato prodotto da CAFs, e quindi durante il processo di EMT, sembra essere mediata dal legame di DNMT3a a livello del suo promotore.



**Figura 12:** Livelli di metilazione del DNA di un'isola CpGs all'interno del promotore genico di CDH1 in cellule PC3 indotte in EMT e relativi controlli. A) Struttura del promotore di CDH1 con l'indicazione della posizione delle 6 citosine analizzate per *pyrosequencing*. B) Grafici della media dei livelli di metilazione delle 6 citosine analizzate per *pyrosequencing* dopo reazione di conversione con bisolfito in campioni di DNA genomico derivato da cellule PC3 trattate con terreni CM-HPF e CM-CAF (EMT). Le cellule PC3 trattate con CM-CAF mostrano un aumento globale di metilazione di tutte le citosine analizzate che è di circa 8%. La metilazione delle singole citosine dei CM-CAF mostra un incremento significativo rispetto a quella osservata nei CM-HPF (\*,  $P \leq 0.05$  versus CM-HPF). L'analisi di *pyrosequencing* è il risultato della media di tre esperimenti indipendenti.

## ***Discussione***

La transizione epitelio mesenchimale (EMT) è processo che svolge un ruolo di fondamentale importanza durante lo sviluppo embrionale, il riparo delle lesioni e la progressione tumorale (Kalluri R. & Weinberg R.A., 2009). Le cellule in EMT perdono le loro caratteristiche epiteliali con conseguente rottura delle giunzioni cellulari attraverso la perdita delle Caderine di tipo I, in particolare, l'E-Caderina (codificata dal gene CDH1), e acquisiscono capacità migratorie, di invasività e motilità tipiche di un fenotipo mesenchimale mediante l'acquisizione di marcatori come N-Caderina e Vimentina (Thiery JP., 2002). Un'altra caratteristica di questo processo è la sua reversibilità, infatti, le cellule che sono in EMT possono andare incontro al processo inverso, la transizione mesenchimale epiteliale (MET) che porta alla riacquisizione di un fenotipo epiteliale (Weinberg R.A. et al, 2008; Thiery JP., 2009). La natura dinamica del processo di EMT, quindi, potrebbe suggerire che, ad una attivazione spazio temporale di un programma trascrizionale specifico, si può anche associare una fine regolazione dell'epigenoma della cellula attraverso le variazioni dello stato di metilazione del DNA e delle modificazioni istoniche (Carmona F.J. et al, 2014 ).

Il presente lavoro di tesi si inserisce in questo contesto di ricerca, in particolare, con l'obiettivo di valutare ciò che accade durante il processo di EMT e MET, a livello molecolare e funzionale, in un modello consolidato *ex vivo* di EMT (Giannoni E et al, 2010) in due linee cellulari di carcinoma prostatico (LN-CaP e PC3) (Figura 1). Il modello sperimentale prevede il trattamento delle cellule con terreni condizionati da fibroblasti isolati da campioni tumorali ottenuti dopo prostatectomia eseguita su pazienti affetti da tumore prostatico maligno, con GLEASON  $\geq 4$  (terreno condizionato, CM-CAF), e da fibroblasti ottenuti da espianchi chirurgici eseguiti su pazienti affetti da iperplasia prostatica benigna (terreno condizionato, CM-HPF).

I CAFs rappresentano una popolazione eterogenea di cellule presenti nello stroma di numerosi tumori e sono in grado di secernere diversi fattori di crescita (HGF, EGF), citochine pro-infiammatori (interleuchine, interferoni, TNFs e TGFs) e proteine appartenenti alla famiglia delle metallo-proteinasi della matrice (MMPs) (Cirri P. and Chiarugi P., 2011; Acer M.B. et al, 2011).

Un'altra caratteristica importante dei CAFs consiste nel fatto che questi fibroblasti possono essere direttamente attivati dalle cellule tumorali attraverso il rilascio nel microambiente tumorale di TGF- $\beta$ 1 e IL-6 (Giannoni E. et al, 2010).

Il modello di EMT indotto da fibroblasti associati al tumore (CAF), utilizzato in questo lavoro di tesi, si distacca notevolmente dai diversi lavori pubblicati in cui, tale processo, è indotto mediante l'azione di singoli fattori specifici e/o diffusibili (TGF $\beta$ , NF-kB e interleuchine) o la sovra-espressione di fattori di trascrizione come: TWIST1, SNAIL1, ZEB1 e ZEB2 (Cano A. et al, 2000; Kwok W.K. et al, 2005; Aigner K. et al, 2007; Byles V. et al, 2012) in quanto riflette maggiormente la complessità del rapporto esistente tra la cellula tumorale ed i componenti del microambiente.

La repressione trascrizionale di CDH1 rappresenta l'evento fondamentale che identifica l'avvenuto processo di EMT nelle cellule (Cano A. et al, 2007; Giannoni E. et al, 2010). I dati ottenuti dal trattamento delle cellule con terreno condizionato da CM-CAF dimostrano che i marcatori *signature* del processo di EMT, quali E-caderina N-caderina e Vimentina subiscono una variazione dei livelli proteici e trascrizionali, solo nelle cellule PC3, in cui si osserva una forte repressione di E-caderina contrapposta all'aumento di espressione di N-caderina e di Vimentina (Figura 2). La repressione dei marcatori mesenchimali e il recupero della funzionalità del gene CDH1 nel trattamento con terreno di recovery (CM-CAF+RM) in cellule PC3 indotte in EMT (Figura 2), invece, confermano l'elevata plasticità e completa reversibilità di tale processo (Ocaña O.H. et al, 2012; Wu K.J. et al, 2012; Tam W.L. & Weimberg R., 2013).

L'espressione di E-caderina, durante la EMT, è controllata negativamente da diversi fattori trascrizionali quali: SNAIL1, SLUG, TWIST1, ZEB1, ZEB2 (Postigo A. et al, 2012; Moreno-Bueno G. et al, 2006). Tutti questi fattori trascrizionali sono in grado di legarsi al promotore di E-caderina attraverso specifiche sequenze di DNA, E-boxes (Peinado H. et al, 2004). Tuttavia non è possibile stabilire quali di questi fattori inducenti EMT svolga un ruolo principale nella tumorigenesi. Diversi lavori hanno dimostrato che, nelle

diverse cellule tumorali, questi fattori trascrizionali sono soggetti ad una fine regolazione spazio-temporale e, al tempo stesso, a reciproche cooperazioni (Dave N. et al, 2011; Tran D.D. et al, 2011).

La sovra-espressione di SLUG e ZEB1, in PC3 condizionate da CM-CAF, evidenzia il ruolo di questi fattori come possibili induttori di EMT (Figura 3; PC3 EMT). Dati di letteratura dimostrano che, in cellule di cancro prostatico in fase metastatica, è presente una forte espressione della proteina ZEB1 (Drake J.M. et al., 2009), questo dato concorda con la situazione osservata anche nel nostro modello. Durante la EMT indotta da CAF è stata anche osservata un'importante riduzione trascrizionale e proteica di SNAIL1 (Figura 3). Questo dato potrebbe dipendere da diverse ipotesi: 1) SNAIL1 e SLUG presentano, nei vari tumori e all'interno delle stesse linee cellulari tumorali (PC3 vs LN-CaP), un differente *pattern* di espressione che potrebbe determinare una loro reciproca regolazione; 2) ZEB1 potrebbe ridurre la capacità di SNAIL1 di legarsi alle E-boxes, in particolare, quelle di CDH1 (Baulida J et al, 2002) inducendo la sua degradazione e/o controllo trascrizionale (De Herreros A.G. et al, 2010); e 3) il nostro modello sperimentale potrebbe attivare *miRNAs* specifici contro l'mRNA di Snail1. Tuttavia, avendo osservato l'induzione della EMT a 3 giorni, non è possibile escludere che SNAIL1 possa svolgere un ruolo fondamentale nelle prime fasi di questo processo (Vetter G. et al, 2009). Le caratteristiche di plasticità e reversibilità del processo di EMT sono ulteriormente rafforzate dal recupero degli *EMT-factors* ai livelli osservati nelle cellule di controllo (CM-HPF+RM) (Figura 3). I risultati fino ad ora mostrati, evidenziano che le CAF sono in grado di attivare i meccanismi molecolari che regolano la stabilizzazione del fenotipo mesenchimale e l'induzione del processo di EMT (Whiteland H. et al., 2013; Stoyianni A. et al., 2012; Giannoni E. et al., 2012).

Durante il processo di EMT, inoltre, il promotore di E-caderina può essere soggetto a diverse modificazioni epigenetiche che coinvolgono la metilazione del DNA e delle code istoniche (Lombaerts M. et al, 2006, Dumont N et al, 2008). Tali cambiamenti epigenetici possono contribuire alla trasformazione maligna e alla progressione tumorale anche nel caso del tumore alla prostata

(Li L.C. et al, 2005). La repressione trascrizionale di CDH1, indotta dagli *EMT-factors* (vedi sopra), può richiedere l'azione di diverse attività enzimatiche come le DNA metiltransferasi (DNMTs) e le iston-metiltransferasi (HMTs) (Lombaerts M. et al, 2006, Herranz N. et al 2008; Dong C. et al 2012; Dong C. et al 2013).

L'attivazione del processo di EMT indotto da CAFs determina la diminuzione dell'espressione di DNMT1, enzima deputato al mantenimento della metilazione del DNA (Figura 4, PC3 EMT). La DNMT1 svolge un ruolo fondamentale durante la fase S del ciclo cellulare, infatti, grazie all'interazione con UHRF1, forma un complesso funzionale capace di ristabilire la metilazione del DNA sui filamenti di nuova sintesi (Sharif J. et al, 2007). Come DNMT1, anche UHRF1 durante la EMT presenta una forte riduzione dei livelli proteici e trascrizionali (Figura 4). Questa riduzione dell'espressione genica di DNMT1 e UHRF1 può essere causata o dal fatto che il processo di EMT determina la riduzione del numero di cellule che entrano nella fase S del ciclo cellulare (Liu J. et al, 2010; Hugo H.J. et al, 2013); oppure che le cellule possono attivare processi di apoptosi selezionando così solo le cellule che esprimono bassi livelli di UHRF1 e DNMT1. Un'altra ipotesi che potrebbe spiegare la ridotta espressione di UHRF1 e DNMT1 in PC3 in EMT, consiste nell'aumentata trascrizione di *microRNAs* contro i messaggeri delle due proteine, ad esempio, miR-146 e mir-152 (dati non mostrati) (Azizi M. et al, 2014; Zhou L. et al, 2013; Singh P.K. et al, 2013).

Si è deciso di estendere lo studio analizzando anche gli enzimi implicati nella *de novo* metilazione del DNA, in particolare, la DNMT-3a e -3b. Le analisi di PCR quantitativa e di WB in figura 5 hanno evidenziato la riduzione dei livelli di DNMT3b e, in contrapposizione, l'incremento di circa 1,5/2 volte di DNMT3a. I dati sembrano confermare che in PC3 in transizione epitelio mesenchimale la DNMT3a possa svolgere un ruolo fondamentale in questo processo (Tan E.J. et al, 2014), mentre la ridotta espressione di DNMT3b potrebbe essere dovuta ad una regolazione post-trascrizionale attraverso *splicing* alternativo oppure attraverso l'azione effettuata da specifici *miRNAs*

(Zhang H. et al, 2010; Shapiro I.M. et al, 2011). La riduzione di DNMT3b, inoltre, è stata dimostrata indurre ipometilazione dei promotori genici Rb, RAR $\beta$  e APC, e di reprimere la crescita e la migrazione cellulare (Yaqinuddin A. et al, 2008). Tutte le DNA metiltransferasi, così come UHRF1, recuperano a livello dei controlli nel processo inverso di MET (Figure 4 e 5), ad ulteriore conferma della completa reversibilità del processo di EMT.

La repressione trascrizionale nelle cellule tumorali in EMT può anche essere regolata dalle modificazioni epigenetiche associate alle code istoniche. Ad esempio, Issa e colleghi hanno dimostrato che la EMT indotta dalla sovra-espressione di TWIST1 in cellule epiteliali umane di carcinoma mammario, è controllata dal complesso *Polycomb* (Malouf G.G. et al, 2013). G9a e SUV39H1, altre iston-metiltransferasi implicate rispettivamente nella di- e tri-metilazione della lisina 9 dell'istone H3, possono interagire con SNAIL1 durante il processo di EMT indotto da TGF- $\beta$  e mediano il silenziamento di CDH1 (Dong C. et al, 2013, Dong C. et al, 2012; Hoffman M.J. et al; 2007). Le cellule PC3, trattate con terreno CM-CAF, sono state analizzate per valutare il comportamento delle iston-metiltransferasi EZH2, G9a e SUV39H1. Dai risultati è interessante notare che, mentre l'RNA messaggero di Suv39h1 mostra solo una lieve riduzione, l'espressione proteica è fortemente ridotta. Viceversa, nella MET, la proteina SUV39H1 recupera completamente (Figura 6). Questo risultato potrebbe essere indicativo di un'attivazione dei meccanismi che inducono degradazione della proteina. G9a ed EZH2, invece, non mostrano variazioni durante il processo EMT-MET (Figura 6).

Recenti studi hanno dimostrato che il processo di EMT induce cambiamenti epigenetici; tuttavia è ancora difficile stabilire il loro ruolo nel differenziamento embrionale e nella progressione tumorale. In particolare, la riprogrammazione epigenetica permette alle cellule staminali embrionali in EMT di migrare e raggiungere nuovi territori tissutali con i quali interagiscono per acquisire nuove caratteristiche fenotipiche e funzionali (Thiery J.P. et al, 2009). Feinberg e colleghi hanno dimostrato che, in cellule normali di epatociti di topo che vanno incontro a EMT indotto da TGF- $\beta$ , i



cambiamenti epigenetici coinvolgono solo le code istoniche e non la metilazione del DNA. Nella progressione tumorale, invece, le cellule che attivano il processo di EMT presentano un aumento della metilazione del DNA su promotori dei geni di CST6 e CDH1 (Dumont N. et al, 2008). Il processo di EMT irreversibile prodotto all'over-espressione di TWIST1, invece, determina una puntuale ipermetilazione a livello dei corpi genici e una globale ipo-metilazione del DNA (Malouf G.G. et al, 2013). A conferma che la condizione genetica durante la progressione tumorale potrebbe condizionare la capacità di determinare la transizione epitelio mesenchimale è stata dimostrata nelle cellule LN-CaP indotte da CAFs (Giannoni E- et al, 2010). La mancata attivazione del processo di EMT (Figure 2 e 3) e l'assenza di variazione delle HMTs e DNMTs (Figure 4, 5 e 6), e dei livelli di metilazione sulle sequenze LINE-1 (Figura 7), indicano l'incapacità di queste cellule di indurre EMT, la quale potrebbe essere associata o al loro grado di tumorigenicità oppure all'incapacità di attivare i fibroblasti (Giannoni E- et al, 2010; Hayward S.W. et al, 2001, Olumi A.F. et al, 1999).

Il trattamento con terreno condizionato CM-CAF produce la diminuzione del livello di espressione genica di DNMT1 (Figura 4) che, contemporaneamente, determina una riduzione dei livelli di metilazione del DNA delle sequenze retrotrasponibili LINE-1 (Figura 7), le quali, essendo abbondanti all'interno del genoma, possono essere considerate come rappresentative dei livelli globali di metilazione del DNA (Lisanti S. et al, 2013; Flor A.R. et al, 2004). L'analisi di *pyrosequencing* di 4 dinucleotidi CpG (C1-C2-C3-C4) presenti all'interno di una porzione del 5'UTR delle LINE-1 ha permesso di stabilire che tale riduzione è compresa tra il 16 e il 23% e ritorna ai valori medi dei controlli nei trattamenti con CM-HPF+RM. La successiva tecnica di Illumina 450K, invece, ha esteso l'analisi dello stato di metilazione a oltre 485 mila isole CpGs distribuite all'interno dell'intero genoma, permettendo una misurazione quantitativa della metilazione del DNA di circa il 96% delle isole CpG note. La distribuzione e le variazioni dei livelli di metilazione del DNA nelle cellule PC3 in EMT sono coerenti con i dati presenti in letteratura (Carmona F.J. et al, 2014; Malouf G.G. et al, 2013), e ritornano a sovrapporsi

nuovamente con quelli delle cellule di controlli durante il processo di MET (Figura 8). Nel dettaglio, 107000 CpG su 485000 subiscono variazioni di metilazione del DNA, di cui 11148 (10%) si ipermetilano e 96534 (90%) si ipometilano. Il 70% delle CpGs ipermetilate, ovvero, 7794 si trovano nelle regioni intrageniche, di queste il 95% è compreso tra corpo genico e promotore. Delle CpGs ipometilate, invece, 64833 (67%) sono nelle regioni intrageniche, e il 96% si divide tra corpo genico e promotore. Nelle cellule in MET solo lo 0,02% delle CpGs non riacquista la condizione di metilazione iniziale (Figura 8).

L'ipo- e l'iper-metilazione del DNA e le variazioni dell'espressione delle DNMTs, quindi, svolgono un ruolo essenziale nella progressione tumorale (Liu F. et al; 2014; Baylin e Jones, 2002), in particolare, è presente un'ipometilazione globale del genoma alla quale spesso si associa una ipermetilazione di geni come GSTP1, APC, RAR $\beta$ 2 e CDH1 (Flor A.R. et al, 2004). Il gene di CDH1, infatti, durante il processo di EMT risulta fortemente ipermetilato (Dumont N et al, 2008; Lombaerts M. et al, 2006). Le importanti variazioni dei profili di metilazione di specifiche CpGs all'interno delle regioni intrageniche in PC3 in EMT-MET (Figura 8) sono state ulteriormente investigate a livello di alcuni promotori di geni implicati in questi processi, come: CDH1, N-caderina, Vimentina e ZEB1, e di un gene implicato nella *pathway* di staminalità come APC (Figure 9 e 10). La metilazione di APC, infatti, si correla con quella di CDH1 in tumori alla mammella in cui è attivo il complesso Wnt/ $\beta$ -catenina (Prasad C.P. et al, 2008). La regione cromosomica del gene CDH1 è ipermetilata in EMT, risultato che conferma i dati presenti in letteratura. L'indagine di Pyrosequencing su un'isola CpGs del promotore di E-caderina ha confermato che, nelle cellule PC3 trattate con CM-CAF, la media della percentuale di metilazione delle 6 citosine analizzate, varia da un valore pari a zero a circa 8% (Figura 12). Inoltre, DNMT3a è fortemente legata nella stessa regione del promotore di CDH1 (Figura 11). Quindi la metilazione di CDH1 potrebbe dipendere dall'aumento della proteina DNMT3a (Figura 5)(Tan E-J. et al, 2014). Gli *EMT-markers*, N-Caderina e Vimentina, subiscono un'ipometilazione globale che

principalmente interessa il corpo genico (Figura 9), mentre ZEB1, uno dei fattori trascrizionali della EMT, è ipometilato a livello del suo promotore (Figura 10). Lo stato di ipometilazione osservato sui tre geni si correla con l'attivazione trascrizionale indotta dal terreno CM-CAF (Figure 2 e 3). Tuttavia la metilazione del DNA di Vimentina può svolgere un duplice ruolo, o come indice di sopravvivenza, nel caso del cancro alla mammella (Ulirsch J. et al, 2012), oppure per distinguere i tessuti tumorali da quelli sani (Jung S. et al, 2011). Lo stato di ipermetilazione della regione del promotore di APC, dimostrato da Schulz e colleghi, è stato osservato nel modello sperimentale di EMT studiato in questa tesi (Figura 10). I risultati ottenuti dall'analisi dei geni oggetto di questo studio, durante la MET, hanno evidenziato ancora una volta la reversibilità del processo di EMT (Figure 9 e 10). Inoltre, la riduzione della metilazione del DNA indotta dall'EMT e la plasticità del processo inverso di MET fa supporre che, la demetilazione del DNA, necessita di meccanismi attivi mediati dalla famiglia enzimatica delle TET (Liu F. et al, 2014).

Il processo di EMT indotto in cellule tumorali da TGF $\beta$  e/o dalla sovra-espressione di TWIST1 richiede cambiamenti delle modificazioni epigenetiche di H3-K27me3, -K4me3 e -K9me2/me3, a livello del promotore di E-caderina (Malouf G.G. et al, 2013; Dong C. et al, 2013, Dong C. et al, 2012). Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina su CDH1, in cellule PC3 trattate con CM-CAF, mostrano la comparsa di marcatori di repressione trascrizionale H3K27me3 e H3K9me3 (Figura 11). La presenza di H3K9me3 sembrerebbe essere in contrapposizione con l'assenza della proteina SUV39H1 osservata nei WB in figura 6, ciò fa supporre che, probabilmente, la tri-metilazione sulla lisina 9 dell'istone H3 possa essere compensata dalla iston-metiltransferasi SETDB1 (Sun Y. et al, 2014). In cellule tumorali la contemporanea presenza di H3K27me3 e H3K4me3, è considerata un marcatore di staminalità, in quanto abbondantemente presente in cellule staminali (Ke X.S. et al, 2009) , inoltre il promotore di CDH1, in cellule PC3 in EMT, le presenta entrambe (Figura 11). La repressione di geni epiteliali quindi potrebbe anche avvenire attraverso

l'acquisizione di uno stato "bivalente", caratterizzato da plasticità e reversibilità (Ke X.S et al, 2009). Tale condizione epigenetica, oggi, è ritenuta responsabile dello stato di espressione metastabile tra una condizione completamente attiva e una completamente spenta (Bernstein B.E. et al., 2006).

I dati presentati in questo lavoro di tesi, tuttavia, non chiariscono completamente il ruolo svolto dai cambiamenti di metilazione del DNA che avvengono durante il processo di EMT-MET, perciò sarebbe utile indagare se tale metilazione sia necessaria per indurre tale processo oppure ne sia solo la conseguenza.

Per rispondere a questa domanda, infatti, sono in corso esperimenti di silenziamento di DNMT3a in queste cellule, successivamente indotte in EMT con CAFs, per valutare il comportamento dei marcatori molecolari di EMT e lo stato di metilazione globale del DNA; inoltre, poiché la transizione epitelio mesenchimale è un processo precoce, sono in corso le stesse analisi, nelle cellule PC3, durante un *time-course* del processo, con tempistiche di 6, 12, 24, e 48 ore; e infine, vista la plasticità del processo di EMT, sono state effettuate l'analisi di idrossimetilazione del DNA accoppiata alla *RNA-seq* su questi campioni, allo scopo di generare un quadro completo delle alterazioni epigenetiche reversibili che controllano il processo di EMT-MET.

## ***Bibliografia***

A

- Acloque H., Adams M.S., Fishwick K., Bronner-Fraser M. & Nieto M.A.: “Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease”. *J. Clin. Invest.* **119**, 1438–1449(2009)
- Agarwal S., Amin K., Jadadeesh S., Baishay G., Rao P., Barua N., Bhattacharya S. and Banerjee P.: “Mahanine restores RASSF1A expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells”. *Molecular Cancer*, **12**:99 (2013)
- Agger K., Christensen J., Cloos P.A. & Helin K.: “The emerging functions of histone demethylases”. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 159–168(2008)
- Aigner K., Dampier B., Descovich L., Mikula M., Sultan A, Schreiber M, Mikulits W., Brabletz T., Strand D., Obrist P., Sommergruber W., Schweifer N., Wernitznig A., Beug H., Foisner R., Eger A.: “The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity”. *Oncogene* **26**(49),6979-88(2007)
- Allavena P, Sica A., Solinas G., Porta C., Mantovani A.: “The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages”. *Crit Rev Oncol Hematol* **66**,: 1–9(2008)
- Allinen M., Beroukhim R., Cai L., Brennan C., Lahti-Domenici J., Huang H., et al: “Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer”. *Cancer Cell* **6**, 17–32(2004)
- Arita K., Ariyoshi M., Tochio H., Nakamura Y and Shirakawa M.: “Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism”. *Nature* **455**, 818–821(2009)

Azizi M., Teimoori-Toolabi L., Arzanani MK., Azadmanesh K., Fard-Esfahani P., Zeinali S.: "MicroRNA-148b and microRNA-152 reactivate tumor suppressor genes through suppression of DNA methyltransferase-1 gene in pancreatic cancer cell lines". *Cancer Biol Ther.* **15**(4):419-27(2014)

**B**

Babbio F., Pistore C., Curti L., Castiglioni L., Kunderfranco P., Brino L., Oudet P., Seiler R., Thalman GN., S .Pinton, Mello-Grand M, Chiorino G., Catapano CV., Carbone GM., Bonapace IM.: "The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic-crosstalks and is involved in prostate cancer progression". *Oncogene* **31**(46):4878-87(2012)

Bachelder RE., Yoon S.O., Franci C., Garcia de Herreros A., Arthur M.Mercurio: "MercurioGlycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition". *J Cell Biol.* **168**(1):29-33(2005)

Barrallo-Gimeno A., Nieto M.A.: "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer". *Development.* **132**(14):3151-61(2005)

Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Kramer A., Tort F., Zieger K. et al.: "DNA damage response as a candidate anticancer barrier in early human tumorigenesis". *Nature*, 434:864–70(2005)

Bastian P.J., Yegnasubramanian S., Palapattu G.S., Rogers C.G., Lin X., De Marzo A.M., et al: "Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation". *Eur Urol.***46**:698–708(2004)

- Battle E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J., García De Herreros A.: “ The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells”. *Nat Cell Biol.* **2**(2):84-9(2000)
- Begley L.A., Kasina S., MacDonald J., Macoska J.A.: “ The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy”. *Cytokine* **43**, 194–199(2008)
- Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X, Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S.L., Lander E.S.: “A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells”. *Cell* **125**, 315–326(2006)
- Bestor T.H.: “The DNA methyltransferases of mammals”. *Hum.Mol. Genet.* **9**: 2395-2402(2008)
- Biddle A. and Mackenzie Ian C.: “Cancer stem cell and EMT in carcinoma”. *Cancer Metastasis Review* **31** 285-293(2012)
- Birchmeie W. and Behrens J.: “Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness”. *Biochim. Biophys. Acta*, **1198**, 11-26(1994)
- Bird A.: “DNA methylation patterns and epigenetic memory”. *Genes Dev.* *Jan*, **16**(1): 6-21(2002)
- Bhat-Nakshatri P., Appaiah H., Ballas C., Pick-Franke P., Goulet G., Badve S., Srour EF., Nakshatri H.: “SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype”. *BMC Cancer.* **6**;10:411(2010)



Byles V., Zhu L., Lovaas JD., Chmielewski LK., Wang J., Faller DV., Dai Y.: “SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis”. *Oncogene* **31**(43):4619-29(2012)

Bhowmick NA., Neilson EG., Moses HL.: “Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression”. *Nature* **18**;432(7015):332-7(2004)

Bonapace I.M. et al.: “Np95 is regulated by E1A during mitotic reactivation of terminally differentiated cells and is essential for S phase entry”. *J Cell Biol.* **157**(6):909-14(2002)

Bostick M. et al.: “UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells”. *Science* **317**, 1760–1764(2007)

Brasc, J., Harrison J.O, Honig B., Shapiro L.: “Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion”. *Trends in cell*, **22**, 6, 299-310(2012)

Bryant RJ., Cross N., Eaton CL., Hamdy FC., Cunliffe VT.: “EZH2 promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells”. *Prostate*; **67**, 547-56(2007)

Bronner C., Fuhrmann G., Chédin FL., Macaluso M., Dhe-Paganon S.: “UHRF1 Links the Histone code and DNA Methylation to ensure Faithful Epigenetic Memory Inheritance”. *Genet Epigenet.* **2**:29-36(2012)

## **C**

Cano A., Pérez-Moreno, Rodrigo I., Locascio A., Blanco MJ., Barrio MG., Portillo F., Nieto MA.: “The transcription factor snail controls

- epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression". *Nat Cell Biol.* **2**(2):76-83(2000)
- Cao Q., Yu J., Dhanasekaran S., Kim J.H., Mani R., Tomlins SA., Mehra R., Laxman B., Cao X., Klee C. et al: "Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer". *Oncogene* **27**(58):7274-7284(2008)
- Carmona F.J., Davalos V., Vidal E., Gomez A., Heyn H., Hashimoto Y., Vizoso M. Martinez-Cardus A., Sayols S., Ferreira H., Sánchez-Mut J.V., Morán S., Margelí M., Castella E., Berdasco M., Stefansson O., Eyfjord J.E., Gonzalez-Suarez E., Dopazo J, Orozco M., Gut IG, Esteller M.: "A comprehensive DNA methylation profile of epithelial-to-mesenchymal transition". *Cancer Res.* **1**;74(19):5608-19(2014)
- Casas E., Kim J., Bendesky A., Ohno-Machado L., Wolfe CJ., Yang J.: "Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis". *Cancer Res.* **71**(1):245-54(2011)
- Catania O., Chen G. et al.: "Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology". *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(3): F905-11(2007)
- Chaffer C., Brennan J.P., Slavin J.L., Blick T., Thompson E.W and Williams E.D.: "Mesenchymal-to-epithelial transitions facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2". *Cancer Research*, **66** (23), 11271-11278 (2006)
- Christiansen J.J. and Rajasekaran A.K.: "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis". *Cancer Reserch* **66**(17): 8319-26(2006)

Cirri P. and Chiarugi P.: “Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin”. *Am J Cancer Res.* **1**(4):482-97(2011)

Cobaleda C., Pérez-Caro M., Vicente-Dueñas C., Sánchez-García I.: “Function of the Zinc-Finger Transcription Factor SNAI2 in Cancer and Development”. *Annu Rev Genet.* **41**:41-61. *Mol Cancer* **11**:52(2007)

Crawford Y., Kasman I., Zhong C., Wu L., Modrusan X., Kaminker Z. and Ferrara N.: “PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment”. *Cancer Cell* **15**, 21–34(2009)

## **D**

De Craene B. & Berx G.: “Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression”. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 97–110(2013)

De W.O. and Mareel M.: “Role of tissue stroma in cancer cell invasion”. *The Journal of Pathology*, **200**(4), 429–447(2003)

Drake JM., Strohschein GM., Bair TB., Moreland JM., Henry MD.: “ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells”. *Mol Biol Cell.* 2207-17(2009)

Dumont N., Wilson M.B, Yongping Crawford G., Reynolds P., Sigaroudinia M., and. Tlsty TD.: “Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers”. *PNAS* **105**, 39 :14867-14872(2008)

Dvorak HF., Weaver VM, Tlsty TD., Bergers G.: “Tumor microenvironment and progression”. *J Surg Oncol.* **103**(6):468-74(2011)

**E**

Escobar-Cabrera JE., Berumen Safe LCa, Safe GA and García Alcocer GA.,  
Je et al. J.: “The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer  
Cells”. *Genet Syndr Gene Ther*, 4:1(2013)

Easwaran HP., Schermelleh L., Leonhardt H., Cardoso MC.: “Replication-  
independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases”.  
*EMBO* :1181-6 (2004)

Erez N., Truitt M., Olson P. and Hanahan D.: “Cancer-Associated Fibroblasts  
are activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-  
Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner”. *Cancer  
Cell* **17**, 135–147(2010)

Espada J., Peinado H., Lopez-Serra L., Setién F., Lopez-Serra P., Portela A.,  
Renart J., Carrasco E., Calvo M., Juarranz A., Cano A., Esteller M.:  
“Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a  
DNA methylation-independent context”. *Nucleic Acids Res.*  
**39**(21):9194-205(2011)

**F**

Feinberg A.P and Vogelstein B.: “Hypomethylation distinguishes genes of  
some human cancers from their normal counterparts”. *Nature* **1983**;  
301:89–92(2011)

Fellinger K., Rothbauer U., Felle M., Längst G., Leonhardt H.: “Dimerization  
of DNA methyltransferase 1 is mediated by its regulatory domain”.  
*Cell Biochem.* **106**(4):521-8(2009)

Flori AR, Muller M., Seifert H., Acckermann R Hader C., Engers R. and  
Schulz WA: “Coordinate hypermethylation at specific genes in

prostate carcinoma precedes LINE1 hypomethylation". *British Journal of Cancer* **91**, 985-994(2004)

Frauer C, Hoffmann T., Bultmann S., Casa V., Cardoso MC., Antes I. and Leonhardt H.: "Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain"(*PLoS One* **6**(6):e21306(2011)

Friedl P.: "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration". *Curr Opin Cell Biol* **16**(1): 14-23(2004)

Fuks F., Hurd P.J., Deplus R. and Kouzarides T.: "The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase". *Nucleic Acids Res.* **3** 2305–2312(2003)

Fuxe J., Vincent T. and Garcia de Herreros : "Transcriptional crosstalk between TGF- $\beta$  and stem cell pathways in tumor cell invasion". *Cell Cycle* **9**:12, 2363-2374(2010)

## **G**

Gheldof A., Hulpiau P., Van Roy F., De Craene B., Berx G.: "Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors". *Cell Mol Life Sci.* **69** (15):2527-41(2012)

Giannoni E., Bianchini F., Masieri L., Serni S., Torre E., Calorini L., Chiarugi P.: "Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness". *Cancer Res.* **1**;70(17):6945-56(2010)

Giannoni E., Bianchini F., Calorini L., Chiarugi P.: "Cancer associated fibroblast exploit reactive oxygen species through a proinflammatory signature leading to epithelial mesenchymal

transition and stemness”. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**,2361–2371(2011)

Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV.: “Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition”. *Cell.* **110**:315–325(2002)

Goll MG., Bestor TH.: “Eukaryotic cytosine methyltransferases”. *Annu Rev Biochem.* **74**:481-514(2005)

## H

Hayward S.W., Wang Y., Cao A. et al: “Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line”. *Cancer Res* **61**:8135-42(2001)

Hao N., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R., Yang SM.: “Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors”. *Clin Dev Immunol*(2012)

Haoudi A., Semmes OJ., Mason J.M., Cannon R.: “Retrotransposition-Competent Human LINE-1 Induces Apoptosis in Cancer Cells With Intact p53”. *J Biomed Biotechnol.*; **4**:85–94(2004)

Hashimoto H., Horton JR., Zhang X., Bostick M., Jacobsen SE., Cheng X.: “The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix”. *Nature* **455**:826–9(2008)

Hermann A., Gowher H., Jeltsch A.: “Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases”. *Cell Mol Life Sci.* **61**(19-20): 2571-87(2004)

Herranz N., Pasini D., Diaz V., Franci C., Gutierrez A., Di Croce L., Helin K., Antonio Garcia de Herreros and Peiro S.: “Polycomb Complex 2 is

required for E-cadherin Repression by the Snail Transcription Factor". *Molecular and Cellular Biology* :4772-4781(2008)

Hlubek F., Löhberg C., Meiler J., Jung A., Kirchner T., Brabletz T.: "Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator". *J Biochem.***129**(4): 635-41(2001)

Hugo HJ., Kokkinos M., Blick T., Ackland M.L., Thompson E.W., Newgreen D.F.: "Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study". *Cells Tissues Organs* **193**(1-2):23-40(2011)

Hugo HJ., Pereira L., Suryadinata R., Drabsch Y., Gonda T.J., Soo E., Ramsay R., Sarcevic B., Newgreen D.F. and Thompson E.: "Direct repression of MYB by ZEB1 suppresses proliferation and epithelial gene expression during epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells". *Breast Cancer Res*, **15** (6):R113(2013)

## I

Ishikawa F., Koseki H., Nakanishi K., Shimamura S, Nakanishi M, Nishiyama A and Yamaguchi L.: "UHRF1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication". *Nature*(2013)

Islam S., Kim J.B., et al. "Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion". *J Cell Biochem* 78(1): 141-50(2000)

Iwatsuki M., Mimori K., Yokobori T., Ishi H., Beppu T., Nakamori S., Baba H., Mori M.: " Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance". *Cancer Sci*; **101**(2):293-9(2010)

Izmailova E.S., Wieczorek E., Perkins E. Brent and Zehner Z.E.: "A GC-box is required for expression of the human vimentin gene". *Gene*, 235: 69-75 (1999)

## J

Jones P.A., Baylin SB.: "The fundamental role of epigenetic events in cancer". *Nat Rev Genet.*; **3**:415–428(2002)

Joyce J.A. Pollard J.W.: "Microenvironmental regulation of metastasis". *Nat. Rev. Cancer* **9**:239–252(2009)

Jung S., Kim J, Jeong D., Oh T., Kim C.H. et al : " The role of Vimentin as a methylation biomarker for early diagnosis of cervical cancer". *Mol Cells* **31**: 405-411(2011)

Jungck M., Grünhage F., Spengler U., Dernac. A., Mathiak M., Caspari R., Friedl W., Sauerbruch T.: "E-cadherin expression is homogeneously reduced in adenoma from patients with familial adenomatous polyposis: an immunohistochemical study of E-cadherin, beta-catenin and cyclooxygenase-2 expression". *Int J Colorectal* **5**:438-45(2004)

## K

Kaer K., Speek M.: "Retroelements in human disease". *Gene*; **518**(2):231-41(2013)

Kalluri R. and Zeisberg. M.: "Fibroblasts in cancer". *Nat Rev Cancer*; **6**: 392–401(2006)

Kalluri R. and Weinberg R.A.: "The basics of epithelial-mesenchymal transition". *J Clin Invest* **11**, **6**: 1420-8(2009)



- Ke X.S, Rostad K., Li W.C., Lin B., Halvorsen O.J., Haukaas S.A. et al :  
“Genome-Wide Profiling of Histone H3Lysine 4 and Lysine 27  
Trymetilation Reveals an Epigenetic Signature in Prostate  
Carcinogenesis”. *Plos one*, **4** 3,1-13(2009)
- Keil P. et al.: “DNA methylation of E-cadherin is a priming mechanism for  
prostate development”. *Dev Biol.* 00048-7(2014)
- Keller R. and Shook D.: “Mechanisms, mechanics and functions of epithelial-  
mesenchymal transitions in early development”. *Mech Dev*; **120**:  
1351-1383(2003)
- Khorasanizadeh S.: “The nucleosome: from genomic organization to genomic  
regulation”. *Cell.* 116:259–272(2004)
- Kleer C.G., Cao Q., Varambally S. et al: “EZH2 is a marker of aggressive  
breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast  
epithelial cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*; **100**, 11606-11(2003)
- Klose R.J., Zhang Y.: “Regulation of histone methylation by  
demethylination and demethylation”. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:307-  
318(2007)
- Kouklis PD., Hatzfeld M., Brunkener M., Weber K, Georgatos SD.: “In vitro  
assembly properties of vimentin mutagenized at the beta-site tail  
motif”. *J Cell Sci.* 106 (Pt 3):919-28(1993)
- L**
- LaGamba D., Nawshad A. et al. “Microarray analysis of gene expression  
during epithelial-mesenchymal transformation”. *Dev Dyn* 234(1):  
132-42(2005)

- Lamouille S., Xu J., Derynck R.: "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition". *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**(3):178-96(2014)
- Lang S. H., Hyde C. et al.: "Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma". *Prostate* **52** (4):253-63(2002)
- Lee J.M., Dedhar S. et al: "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease". *J Cell Biol* **172**, 7: 973-81(2006)
- Levenson J.M. and Sweatt J.D.: "Epigenetic mechanisms in memory formation". *Nat Rev Neurosci* **2**: 108-18(2005)
- Li L.C., Carroll P.R. and Dahiya R. "Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment". *Journal of the National Cancer Institute*, **97**, 2(2005)
- Lisanti S., Omar W.A., Tomaszewski B., De Prins S., Jacobs G., Koppen G., Mathers J.C., Langie S.A.: "Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues". *PLoS One.* **18**;8(11)(2013)
- Liu F., Zhou Y., Zhou D., Kan M., Niu X., Zhang Z., Zhang D., Tao L., He L., Zhan L., Liu Y.: "Whole DNA methylome profiling in lung cancer cells before and after epithelial-to-mesenchymal transition". *Diagn Pathol.* **20**; 9:66(2014)
- Lin H.H., Ke H.L., Wu W.J., Lee Y.H., Chang L.: "Hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, and RASSF1A genes in pathologically normal urothelium predict bladder recurrence of bladder cancer after transurethral resection". *Urol Oncol.* **30**(2):177-81(2012)

Liu X. et al.: “UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9”. *Nat. Commun.* 4, 1563(2013)

Lohr M., Schmidt C., Ringel J., Kluth M., Muller P., Nizze H., et al.: “Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma”. *Cancer Research*, 61, 2, 550–555(2001)

Lo HW., Hsu SC., Xia W., Cao X., Shih JY., Wei Y, .Abbruzzese JL, .Hortobagyi GN, Hung MC.: “Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression!”. *Cancer Res.* 67(19): 9066-76(2007)

Lombaerts M., van Wezel T., Philippo K., Dierssen JW., Zimmerman R., Oosting J., van Eijk R., Eilers P., van de Water B., Cornelisse C.J., Cleton-Jansen AM.: “ E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines”. *Br J Cancer.* 13;94(5):661-71(2006)

## **M**

Madar S., Goldstein I., Rotter V.: “Cancer associated fibroblasts, more than meets the eye”. *Trends Mol Med.*19(8):447-53(2013)

Malouf G., Taube J.H., Lu Y., Roysarkar T., Panjarian S., Estecio M., Jelinek J., Yamazaki J., Raynal N.J., Long H., Tahara T., Tinnirello A., Ramachandran P., Zhang X.Y., Liang S., Mani S., Issa JP.: “Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-

mediated epithelial-mesenchymal transition". *Genome Biol.* **24**;14(12)(2013)

Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., et al.: "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells". *Cell* **133**:704–715(2008)

Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F.: "Cancer-related inflammation". *Nature*; **454**: 436–444(2008)

Martin C. and Zhang Y.: " The diverse functions of histone lysine methylation". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6.838:849 (2005)

Mauro L., Catalano S., Bossi G., Pellegrino M., Barone I., Morales S., Giordano C., Bartella V., Casaburi I., Andò S.: "Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression". *Cancer Res.* **67**(7):3412-21(2007)

McDonald O.G., Wu H., Timp W., Doi A. and Feinberg A.P.: " Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition". *Nature Structural & Molecular Biology*, **18**, 8: 867-873 (2011)

Meilinger D., Fellingner K., Bultmann S., Rothbauer U., Bonapace IM., Klinkert WE., Spada F., Leonhardt H.. "Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells". *EMBO*; **10**(11): 1259-64(2009)

Metzger E. et al : “LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor–dependent transcription”. *Nature* **437**: 436–439 (2005)

Micalizzi D.S., Farabaugh S.M. & Ford H.L.: “Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression”. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 117–134(2010)

Miremadi A., Oestergaard M.Z., Pharoah P., Caldas C.: “Cancer genetics of epigenetic genes”. *Hum Mol Genet* **16** Spec No 1: R28–49(2007)

Mongroo P., Rustgi A.: “The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition”. *Cancer Biol Ther.* ; **10**:219–222(2010)

Moustakas A. & Heldin C.H.: “Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression”. *Cancer Sci.* **98**, 1512–1520(2007)

## N

Nady N. et al.: “Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1 protein”. *J. Biol. Chem.***286**, 24300–24311(2011)

Nieto MA.: “The snail superfamily of zinc-finger transcription factors”. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**(3):155-66(2002)

## O

Olmeda D., Montes A., Moreno-Bueno G., Flores JM., Portillo F., Cano A.: “Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines”. *Oncogen*, **27**(34):4690-701(2008)

Olumi A.F., Grossfeld G., Hayward S.W., Carroll PR., Tlsty TD, Cunha G.: “Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium”. *Cancer Res*; **59**:5002-11(1999)

Onder T.T., Gupta P. B., Mani S A. et al. “Loss of E-cadherin Promotes Metastasis via multiple downstream trascriptional pathways”. *Cancer Research* :3645-3654(2008)

Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R. et al.: “Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion”. *Cell* **121**, 335–348(2005)

Ouyang G., Wang Z., Fang, Liu J., Yang CJ.: “Molecular signaling of the epithelial-mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells”. *Cell Mol Life Sci*; **67**(15):2605-18(2010)

## **P**

Papait R., Pistore C., Negri D., Pecoraro D., Cantarini L., Bonapace IM.: “Np95 is implicated in pericentromeric heterochromatin replication and in major satellite silencing”. *Mol Biol Cell*. 1098-106(2007)

Peinado H., Olmeda D. and Cano A.: “Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?”. *Nature Reviews/Cancer*(2007)

Peiró S., Escrivà M., Puig I., Barberà MJ, Dave N., Herranz N., Larriba MJ., Takkunen M., Francí C., Muñoz A., Virtanen I, Baulida J., A.G. de Herreros: “Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression”. *Nucleic Acids Res*. **34**(7):2077-84(2006)

- Pérez-Mancera PA., González-Herrero I., Pérez-Caro M., Gutiérrez-Cianca N., Flores T., Gutiérrez-Adán A., Pintado B., Sánchez-Martín M., Sánchez-García I.: "SLUG in cancer development". *Oncogene*. **24** (19):3073-82(2005)
- Pietras K., Ostman A.: "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma". *Exp. Cell Res.* **316**:1324–1331(2010)
- Poblete CE., Fulla J., Gallardo M., Muñoz V., Castellón EA., Gallegos I., Contreras HR.: "Increased SNAIL expression and low syndecan levels are associated with high Gleason grade in prostate cancer". *J Oncol.* (2014)
- Polyak K. & Weinberg, R. A.: "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits" *Nat. Rev. Cancer* **9**, 265–273(2009)
- Postigo AA., Dean DC.: "ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP". *Proc Natl Acad Sci* **96**(12):6683-8(1999)
- Potentia S., Zeisberg E. and Kalluri R.: "The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression". *Br J Cancer* **99** (9): 1375-9(2008)
- Prasad CP., Mirza S., Sharma G., Prashad R., DattaGupta S., Rath G., Ralhan R.: "Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast". *Life Sci.* **29**;83(9-10):318-25(2008)
- Probst AV., Dunleavy E., Almouzni G.: "Epigenetic inheritance during the cell cycle". *Nat Rev Mol Cell Biol.* (**3**):192-206(2009)

**Q**

Qin Q., Xu Y., He T., Qin C., Xu J.: “Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms”. *Cell Res.* **22**(1):90-106(2012)

**R**

Reik W.: “Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development”. *Nature* **447**(7143):425-32(2007)

Rothbart SB., Krajewski K., Nady N., Tempel W., Xue S., Badeaux AI., Baryte-Lovejoy D., Martinez JY., Bedford MT., Fuchs SM., Arrowsmith CH., Strahl BD.: “Association of UHRF1 with methylated H3K9 directs the maintenance of DNA methylation”. *Nat Struct Mol Biol* : 1155-60(2012)

Rothbart SB., Dickson BM., Ong MS., Krajewski K., Houlston S., Kireev DB., Arrowsmith CH., Strahl BD.: “Multivalent histone engagement by the linked tandem Tudor and PHD domains of UHRF1 is required for the epigenetic inheritance of DNA methylation”. *Genes Dev*: 1288-98(2013)

Rottach A., Frauer C., Pichler G., Bonapace I.M., Spada F. and Leonhardt H.: “The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification”. *Nucleic Acids Res.* **38**,1796–1804(2010)

**S**

Sabatino L., Fucci A., Pancione M., Carafa V., Nebbioso A., Pistore C., Babbio F., Votino C., Laudanna C., Ceccarelli M., Altucci L., Bonapace IM., Colantuoni V.: “UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencig



and mediates colorectal cancer progression". *Oncogene*: **31**(49):5061-72(2012)

Sánchez-Tilló E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling DS., Dean DC., Castells A., Postigo A.: "EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness". *Cell Mol Life Sci.* **69**(20):3429-56(2012)

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

Sayan AE., Griffiths TR., Pal R., Browne GJ., Ruddick A., Yagci T., Edwards R., Mayer NJ., Qazi H., Goyal S., Fernandez S., Straatman K., Jones GD., Bowman KJ., Colquhoun A., Mellon JK., Kriajevska M., Tulchinsky E.: "SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer". *Cell Biology* **106**(35):14884-9(2009)

Schmalhofer O., Brabletz S. and Brabletz T.: "E-cadherin,  $\beta$ -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer". *Cancer Metastasis Rev* **28**:151-166(2009)

Schroder F.H, Hugosson J., Roobol M.J., Tammela T.L, Ciatto S. et al : "Screening and prostate-cancer mortality in a randomized european study". *N.Engl J.Med* **360**, 1320-1328(2009)

Sharma S., Kelly T.K., Jones PA.: " Epigenetics in cancer". *Carcinogenesis*.; **31**:27–36(2009)

- Shen A., Zhang Y., Yang H., Xu R., Huang G.: "Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma". *J Surg Oncol.* **105**(8):830-4(2012)
- Sekimata M., Murakami-Sekimata A. and Homma Y.: "CpG methylation prevents YY1-mediated transcriptional activation of the vimentin promoter". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **414**:767-772(2011)
- Singh P.K. and Campbell M.J.: "The interactions of miRNAs and epigenetic modifications in Prostate cancer". *Cancers*, **5**, 998-1019(2013)
- Smith B. N. and Odero-Marah VA.: "The role of Snail in prostate cancer". *Cell Adh Migr.* **6**(5): 433–441(2012)
- Šošić D., Richardson JA., Yu K., Ornitz DM., Olson EN.: "Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kB activity". *Cell.* **112**(2):169-80(2003)
- Stoyianni A., Goussia A., Pentheroudakis G., Siozopoulou V., Ioachim E., Krikelis D., Golfopoulos V., Cervantes A., Bobos M., Fotsis T., Bellou S., Fountzilias G., Malamou- Mitsi V., Pavlidis N.: "Immunohistochemical study of the epithelial-mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary: incidence, correlations and prognostic utility". *Anticancer Res*: 1273-81(2012)
- Strutz F., Zeisberg M., et al.: "Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation". *Kidney Int* **61**(5):1714-28(2002)
- Sun Y., Wei M., Ren SC., Chen R., Xu W.D., Wang F., Lu J., Shen J., Yu Y.W., Hou J.G., Xu CL., Huang JT., Sun YH.: "Histone

methyltransferase SETDB1 is required for prostate cancer cell proliferation, migration and invasion". *Asian J Androl.*; **16**(2):319-24(2014)

## **T**

Takeichi M., Hatta K., Nose A., Nagafuchi A.: "Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules". *Cell Differ Dev. Suppl.* **91**:4(1988)

Tam W.L. and Weinberg RA.: "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer". *Nat Med*: 1438-49(2013)

Tan E.J., Kahata K., Idås O., Thuault S., Heldin CH., Moustakas A.: " The high mobility group A2 protein epigenetically silences the Cdh1 gene during epithelial-to-mesenchymal transition". *Nucleic Acids Res*(2014)

Taneyhill L.A., Coles EG., Bronner-Fraser M.: "Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest". *Development*: 1481-90(2007)

Tanno B., Sesti F., Cesi V., Bossi G., Ferrari-Amorotti G., Bussolari R., Tirindelli D., Calabretta B ., Raschellà G.: "Expression of Slug is regulated by c-Myb and is required for invasion and bone marrow homing of cancer cells of different origin". *J Biol Chem.*: 29434-45 (2010)

Theveneau E. and Mayor R.: "Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration". *Dev. Biol.* **366**, 34–54(2012)

- Thiery J.P.: "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression". *Nat Rev Cancer* **2(6)**: 442-54(2002)
- Thiery J.P. and Sleeman J.P.: "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions". *Nat Rev Mol Cell Biol* **7(2)**: 131-42(2006)
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y. & Nieto M.A.: "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease". *Cell* **139**, 871–890(2009)
- Tlsty T.D, Coussens L.M.: "Tumor stroma and regulation of cancer development". *Annu. Rev. Pathol.* **1** 119–150(2006)
- Tomita K et al: "Cadherin switching in humane prostate cancer progression". *Cancer Res*, **60**, 3650-3654(2000)
- Tripathi R., Kota SK., Srinivas UK.: "4B/E3-ubiquitin ligase negatively regulates beta-catenin". *J Biosci.* **32(6)**:1133-8(2007)
- Trimboli A.J., Cantemir-Stone C.Z., Li F., Wallace JA., Merchant A., Creasap N., Thompson J.C., Caserta E., Wang H., Chong J., et al.: "Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours". *Nature* **461**, 1084–1091(2009)
- Tsang DP. and Cheng AS: "Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: role of the histone methyltransferase EZH2". *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **2** 61-27(2011)
- Turner BM.: "Histone acetylation and an epigenetic code". *Bioessays* **22**:836–845(2000)

**U**

Ulirsh J., Fan C., George K., Wu M.J., Coleman B., Perou C.M and Swift-Scanlan T.: “ Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer”. *Breast Cancer Res Tret*, **137**, 383-396(2013)

Unoki M., Kelly JD., Neal DE., Ponder BAJ, Nakamura Y. and Hamamoto R.: “UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer”. *British Journal of Cancer* **101**, 98-105(2009)

Unoki M., Nishidate T., Nakamura Y.: “ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain”. *Oncogene*. 7601-10(2004)

## **V**

Vandewalle C., Van Roy F., Berx G.: “The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease”. *Cell Mol Life Sci*. **66**(5):773-87(2009)

Vandewalle C., Comijn J., De Craene B., Vermassen P., Bruyneel E., Andersen H., Tulchinsky E., Van Roy F., Berx G.: “(SIP1/ZEB2) induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions”. *Nucleic Acids Res*; **33**:6566-6578(2005)

Vega S., Morales AV., Ocaña OH., Valdés F., Fabregat I., Nieto MA.: “Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death”. *Genes Dev*. **18**(10):1131-43(2004)

Vernon AE., LaBonne C.: “Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa”. *Development*. **133**(17):3359-70(2006)

Vetter G., Le Behec A., Muller J., Muller A., Moes M., Yatskou M., Al Tanoury Z., Pouch O., Vallar L., Friederich E.: “ Time-resolved

analysis of transcriptional events during SNAI1- triggered epithelial to mesenchymal transition". *Biochemical and Biophysical Research Communications*(2009)

Vicovac L. and Aplin J. D.: "Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation". *Acta Anat* (Basel) **156**(3): 202-16(1996)

Villarejo A., Cortes-Cabrera A., Molina-Ortiz P., Portillo F. and Cano A.: "Differential Role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and Epithelial to Mesenchymal Transition". *The Journal of Biological Chemistry*, **289**:930-941(2014)

Viñas-Castells R., Beltran M., Valls G., Gómez I., García JM., Montserrat-Sentís B., Baulida J., Bonilla F., de Herreros AG., Díaz VM.: "The hypoxia-controlled FBXL14 ubiquitin ligase targets SNAIL1 for proteasome degradation". *J Biol Chem.***285**(6):3794-805(2010)

Visse R. and Nagase H.: "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry". *Circ Res* **92**(8):827-39(2003)

## **W**

Wang G., Allis CD., Chi P.: "Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications". *Trends Mol Med.*; **13**:363–372(2007)

Wang Y., Leung FC.: "An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers". *Bioinformatics.*; **20**:1170–1177(2004)

Wang Y. and Shang Y.: “Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis”. *Experimental Cell Research*, **319** 160-169(2013)

Wheelock MJ, Johnson KR.: “Cadherins as modulators of cellular phenotype”. *Annu Rev Cell Dev Biol*; **19**:207-235(2003)

Whiteland H., Spencer-Harty S., Thomas DH., Davies C., Morgan C ., Kynaston H., Bose P., Fenn N., Lewis PD., Bodger O., Jenkins S ., Doak SH.: “Putative prognostic epithelial-to-mesenchymal transition biomarkers for aggressive prostate cancer”. *Exp Mol Pathol* :**95**(2):220-6(2013)

Wu Cy., Tsai Y.P., Wu M.Z., Teng S.C. and Wu K.J.: “Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition”. *Cell vol 28*, 9(2012)

## X

Xiang Y., Zhu Z., Han G., Ye X., Xu B., Peng Z., Ma Y., Yu Y., Lin H., Chen A.P., Chen C.D., “JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104** 19226–19231(2007)

## Y

Yang J., Mani SA., Donaher JL., Ramaswamy S., Itzykson RA., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg RA.: “Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis”. *Cell*. **117**(7):927-39(2004)

Yang MH. and Wu KJ.: “TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF1): implications in metastasis and development”. *Cell Cycle*.**7**(14):2090-6(2008)

Yaqinuddin A., Quresh S., Qazi R. and Abbas F.: “Down-regulation of DNMT3b in PC3 effects locus-specific DNA methylation, and represses cellular growth and migration”. *Cancer Cell International*, **8**:13 1-9(2008)

Yilmaz M. and Christofori G.: “EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion”. *Cancer Metastasis Rev* **28**(1-2): 15-33(2009)

You A., Tong J.K., Grozinger CM., et al: “CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex”. *Proc. Natl. Acad. Sci* **98**,1454-1458(2001)

Yu J., Rhodes DR., Tomlins SA., Cao X., Chen G., Mehra R., Wang X., Ghosh D., Shah RB., Varambally S., Pienta KJ., Chinnaiyan AM.: “A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome”. *Cancer Res* **67**(22):10657-63(2007)

## **Z**

Zheng H. & Kang Y.: “Multilayer control of the EMT master regulators”. *Oncogene*.128(2013)

Zhou L., Zhao X., Han Y., Lu Y., Shang Y., Liu C., Li T., Jin Z., Fan D., Wu K.: “Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis”. *FASEB J.* **27**(12):4929-39(2013)



...Grazie a tutte le persone che, durante questo mio dottorato, mi hanno aiutato, guidato ed insegnato molto; tra questi un ringraziamento particolare va al professor Ian Marc Bonapace, che mi ha permesso di lavorare e studiare presso il suo Laboratorio di Patologia, e a Christian Pistore, che mi ha sopportato in questi anni di Dottorato e in questi ultimi mesi di stesura tesi, insegnandomi inoltre, che la Biologia non è solo analisi, ma soprattutto Ricerca.

Un grazie enorme al mio compagno Stefano, che mi è stato sempre accanto e sempre lo sarà, a mio fratello Francesco che riesce sempre a darmi una mano, facendomi semplicemente capire che il doppio spazio nella tesi si sostituisce senza problemi, con un click, e ai miei genitori che non hanno mai smesso di credere in me.