



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

**Dipartimento Di Scienze Veterinarie**

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Scienze Veterinarie per la Salute Animale e la Sicurezza  
Alimentare**

CICLO: **XXVIII**

**TITOLO TESI: "Ruolo dei fattori di crescita quali regolatori dei  
segnali mitogenici intracellulari in cellule epiteliali mammarie  
non-tumorali e tumorali ottenute da differenti specie animali"**

TESI PRESENTATA DA: **Paolo Santino**

TUTOR: **Prof. Paolo Accornero**

COORDINATORE DEL DOTTORATO: **Prof. Mario Baratta**

ANNI ACCADEMICI: **2013-2016**

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA:  
**Fisiologia Veterinaria**

# Sommario

Abstract .....	4
Premessa .....	5
Introduzione.....	6
La ghiandola mammaria .....	7
Sviluppo della ghiandola mammaria.....	8
Fase di sviluppo embrionale .....	8
Fase di sviluppo puberale.....	9
Fase di sviluppo riproduttiva .....	10
Il Ciclo Cellulare.....	11
Breve premessa agli eventi intracellulari ed intranucleari .....	14
Le vie trasduzionali delle MAPK e di PI3K.....	15
Gli “immediate early genes” (IEGs) .....	19
I secondary response genes e i delayed early genes.....	23
La Ciclina D1 nella transizione G1-S.....	23
I microRNA controllano l’espressione degli IEGs .....	25
Obbiettivi del progetto.....	28
Materiali e metodi .....	30
Reagenti.....	31
Linee cellulari.....	31
Immunofluorescenza .....	32
Estrazione di RNA e real time PCR quantitativa .....	33
Analisi delle citodieresi cellulari attraverso time lapse in video microscopia.....	33
Analisi del ciclo cellulare.....	34
Western blot.....	34
Analisi dei microRNA .....	35
Analisi statistica .....	35
Tabella primers .....	36
Risultati del progetto .....	39
Caratterizzazione delle linee cellulari .....	40
Livelli di espressione basale di Egr-1, 2, 3, 4, c-Fos e c-Jun nelle linee cellulari epiteliali mammarie.....	41
Analisi delle cinetiche di espressione degli Immediate early genes (IEGs) in cellule epiteliali mammarie.....	43
Analisi della modulazione di Egr-1, 2, 3 .....	43
Analisi della modulazione di c-Fos e c-Jun .....	44
Analisi dell’espressione proteica di Egr-1 e c-Fos.....	46

Analisi dei fattori di crescita che modulano l'espressione genica degli Immediate early genes.....	47
Modulazione dell'espressione di Egr-1, 2, 3.....	47
Modulazione dell'espressione di c-Fos e c-Jun.....	48
Identificazione delle vie di trasduzione intracellulare che modulano l'espressione di Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun.....	50
Modulazione degli Egr in seguito all'inibizione delle vie di Erk 1/2 e di PI3K-Akt .....	50
Modulazione di c-Fos e c-Jun in seguito all'inibizione di Erk e di PI3K-Akt .....	52
Analisi dell'espressione proteica di Egr-1 .....	53
Analisi dell'espressione proteica di c-Fos.....	54
L'inibizione di Erk 1/2 mediata dalla Wortmannina .....	55
Regolazione della citocheratina 18 in seguito a stimolazione con terreno di proliferazione	57
Analisi dell'espressione genica dei geni a variazione lenta .....	58
Analisi dell'espressione genica dei microRNA implicati nella regolazione di Egr-1 e c-Fos	59
Discussione .....	61
Conclusioni .....	67
Bibliografia.....	69

# Abstract

Nella femmina adulta, durante il ciclo estrale, la ghiandola mammaria va incontro a round multipli di crescita, con aumentata proliferazione cellulare, e di involuzione, con aumentata apoptosi. L'aumento della proliferazione è guidato sia da ormoni (Estrogeni e Progesterone) che da fattori di crescita ad azione locale (fattore di crescita epidermico, fattore di crescita insulino simile, ecc.).

Tra i geni modulati durante la proliferazione cellulare, gli immediate early genes (IEGs) giocano un ruolo fondamentale. Gli IEGs infatti vengono rapidamente up regolati e poi down regolati all'interno della fase G0/G1 del ciclo cellulare, permettendo in questo modo la progressione alle fasi successive del ciclo.

Egr 1 (e le sue isoforme Egr 2, 3, 4), c-Fos e c-Jun sono degli immediate early genes che codificano per fattori di trascrizione che promuovono, in differenti tipi cellulari, e a seconda della lunghezza e della durata dello stimolo, differenti risposte quali mitogenesi, differenziamento, apoptosi o eventi anti apoptotici. In questa tesi ho studiato il meccanismo di modulazione dei membri della famiglia Egr, di c-Fos e di c-Jun in cellule epiteliali mammarie di differente origine (bovino, cane, gatto e topo).

Seguendo la stimolazione con il terreno di proliferazione, l'espressione genica degli Egr e di c-Fos ha mostrato un aumento, che ha raggiunto il picco tra i 45 e i 60 minuti ed è poi rapidamente tornato a valori basali. C-Jun invece ha mostrato un andamento simile solo su due delle quattro linee cellulari, raggiungendo comunque picchi di espressione più bassi.

Tra alcune citochine, particolarmente importanti per la morfogenesi della ghiandola mammaria, che sono state testate (EGF, IGF-1, insulina, estrogeni, progesterone), solo l'EGF ha up regolato i livelli degli Egr e di c-Fos a livelli simili a quelli osservati con il terreno di proliferazione. Per quanto riguarda c-Jun invece l'effetto dell'EGF è stato osservato solo sulle cellule BME-UV e sulle GH2.

Al fine di capire come l'espressione dei geni oggetto di studio è stata regolata dai fattori di trascrizione, sono state inibite le molecole, Erk1/2 e PI3K, che guidano due tra le maggiori vie di segnalazione intracellulari. L'inibizione del pathway di Erk 1/ 2 ha completamente abolito l' aumento di espressione degli Egr e di c-Fos, mediato dal terreno di proliferazione o dall'EGF, senza tuttavia modulare c-Jun. D'altro canto il pathway di PI3K ha giocato un ruolo minore sui livelli degli Egr e di c-Fos, con un forte effetto di inibizione solo sulle cellule GH2, che potrebbe essere dovuto ad una ridotta fosforilazione di Erk come conseguenza dell'inibizione di PI3K. Anche in questo caso c-Jun non è risultato essere modulato. Infine è stato mostrato come la somministrazione del terreno di proliferazione abbia aumentato l'espressione genica del marcatore citocheratina 18 ma solo nella linea cellulare murina (NMuMG).

Con questa tesi si è indagato per la prima volta come i fattori di trascrizione Egr 1 (e le isoforme 2, 3) c-Fos e c-Jun sono espressi nelle cellule epiteliali mammarie degli animali domestici e quali sono i fattori di crescita e le vie di segnalazione intracellulari che ne modulano l'espressione.

# Premessa

Molte specie di animali domestici (cane, cavallo, gatto..) sono utilizzate per lo studio della biologia dei tumori e lo sviluppo dei farmaci antitumorali. Sono diverse le motivazioni che rendono questi animali un modello, per poter sviluppare nuove conoscenze in campo oncobiologico, da applicare sia in ambito veterinario che umano. Infatti molte specie, in particolare il cane e il gatto, mostrano un'elevata similarità genetica con l'uomo (molto maggiore rispetto quella offerta dal modello murino) **(Hoffman e Birney, 2007)**. Tale evidenza è stata ulteriormente rafforzata dopo la mappatura dell'intero genoma del cane che ha dimostrato come **(Lindblad-toh et al., 2005) (Ostrander, E. A.; Giger, U.; Lindblad-Toh, K., 2006) (O'Brien e Murphy, 2003)** molti geni che promuovono lo sviluppo tumorale in questa specie, sono deregolati anche in diversi tumori umani **(Withrow, S. J.; Vail, D. M.; Rodney, P., 2007)**.

Un altro punto a favore dell'utilizzo degli animali domestici quali modelli per lo studio della patologia tumorale è sicuramente la loro aumentata aspettativa di vita. La maggiore longevità, unita ad una maggiore attenzione dei proprietari alla salute dei propri animali, aumenta infatti la possibilità di reperire soggetti, che hanno sviluppato in maniera naturale una patologia tumorale. D'altro canto gli stessi proprietari sono ora più disponibili a inserire i loro animali in trials clinici sperimentali nel caso in cui le cure tradizionali non diano risultati **(Paoloni e Khanna, 2008)**.

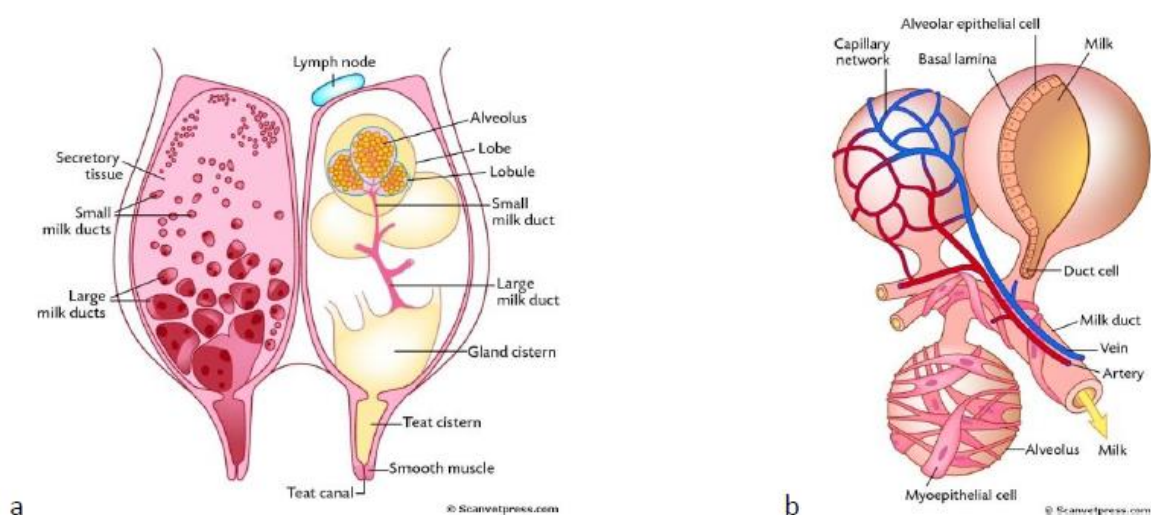
E' evidente quindi che approfondire in questi modelli animali, le conoscenze sul ruolo dei geni nella regolazione dei processi fisiologici e nello sviluppo delle patologie, ha il doppio vantaggio sia di una applicabilità in campo veterinario che di una possibile traslazonalità all'uomo.

# Introduzione

# La ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria ha una struttura tubulo-alveolare ed è composta da un epitelio di origine ectodermica e da uno stroma di origine mesenchimale. L'epitelio può essere grossolanamente suddiviso in due compartimenti:

- **Luminale:** le cellule di questo compartimento sono caratterizzate da una morfologia polarizzata poligonale e possono, una volta differenziate, sintetizzare e secernere le componenti del latte; la parte basale di queste cellule è connessa alle cellule del compartimento basale mentre la parte apicale è rivolta verso il lume dei dotti ghiandolari e, se presenti, degli alveoli. Le cellule del compartimento luminale esprimono le proteine citocheratina-18 (Krt 18), Epcam e Muc-1 ad alti livelli. Fanno parte della componente luminale le cellule che esprimono il recettore degli estrogeni (ER) e il recettore del progesterone (PR) **(Capuco et Al., 2012)**.
- **Basale:** è costituito da cellule mioepiteliali a funzione contrattile, che permettono il trasporto del latte dall'alveolo al sistema duttale, fino al capezzolo; Le cellule di questo compartimento esprimono alcuni marcatori caratteristici quali: citocheratina-14 (Krt 14), actina del muscolo liscio (SMA), P63. Appartengono alla componente basale anche le cellule staminali mammarie, cellule in grado di rigenerare sia la componente luminale che quella basale **(Martignani et al., 2010)**.



**Figura 1 (Sjaastad et Al., physiology of domestic animals, 2. Ed., 2010).** A: rappresentazione anatomica della ghiandola mammaria bovina; B: organizzazione tubulo-alveolare del lobulo mammario

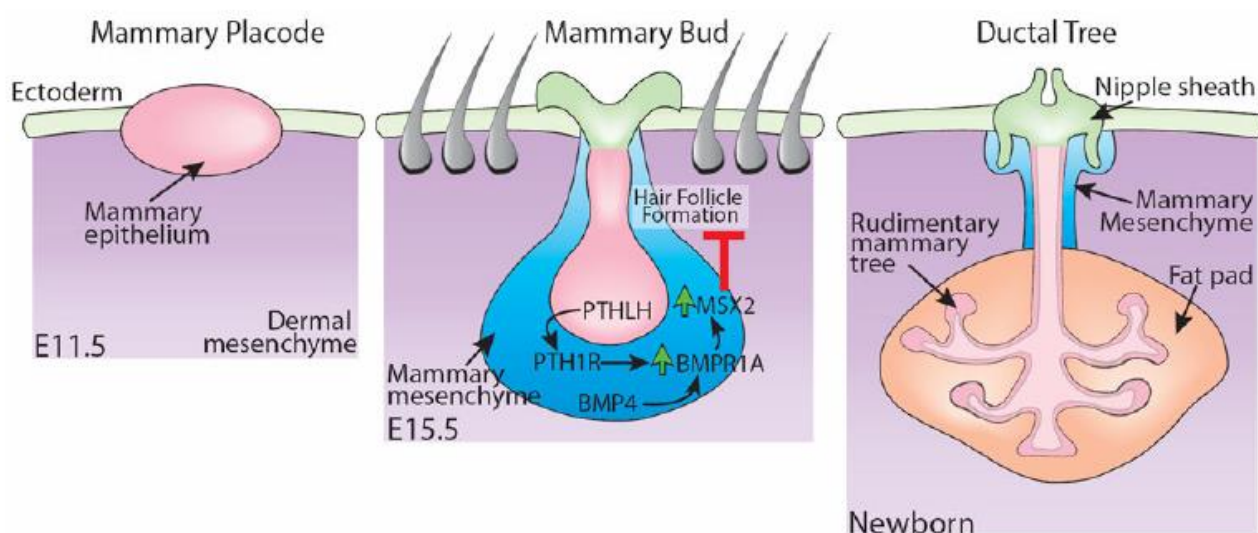
# Sviluppo della ghiandola mammaria

Durante lo sviluppo della ghiandola mammaria possiamo distinguere tre fasi principali: fase di sviluppo embrionale, fase di sviluppo puberale e fase di sviluppo riproduttiva.

## Fase di sviluppo embrionale

La struttura della ghiandola mammaria è costituita da un compartimento epiteliale e da un compartimento stromale. Nel modello murino lo sviluppo embrionale della ghiandola inizia al decimo giorno (E10), con la formazione, sulla superficie ventrale dell'embrione, di strisce di ectoderma multistratificato. A partire da questo multistrato ectodermico inizia la formazione della linea mammaria. Nel topo, la linea è organizzata in cinque paia di placche, costituite da cellule di origine ectodermica, che crescono in maniera asincrona (Macias e Hinck, 2012).

Durante questa fase il mesenchima mammario, situato sotto la linea mammaria, fornisce segnali che inducono le cellule ectodermali a differenziare in cellule mammarie della linea epiteliale (Cunha et al., 1995). L'epitelio in formazione, d'altro canto, stimola la maturazione del mesenchima, che a partire dal quattordicesimo giorno di sviluppo (E14) è costituito per lo più da fibroblasti (Sakakura et al., 1982). Una volta che la linea mammaria si è formata, i segnali provenienti dal mesenchima ne guidano l'orientamento dorso/ventrale. In particolare, a partire dal quattordicesimo giorno, le placche mammarie che costituiscono la linea, iniziano ad espandersi e da ogni placca si forma una sfera di cellule epiteliali, circondata da cellule del mesenchima, che inizia a invadere lo stroma sottostante (Fig. 2) (Cowin e Wysolmerski, 2010). Durante questo processo, la sfera di cellule rimane collegata con l'epidermide. Intorno al sedicesimo giorno di vita dell'embrione, le cellule epiteliali della sfera si estendono e raggiungono lo strato di grasso sottostante dove formano delle ramificazioni laterali. Le ramificazioni costituiscono un sistema duttale rudimentale che rimarrà quiescente fino alla pubertà.



**Figura 2** Rappresentazione schematico dello sviluppo della ghiandola mammaria in fase embrionale (Adattamento da Cowin and Wysolmerski 2010) Le cellule epiteliali iniziano ad invadere lo stroma sottostante E11.5. Raggiungono poi lo strato di grasso (E15.5) dove formano delle ramificazioni laterali che andranno a costituire un sistema duttale rudimentale.



Al momento della nascita la ghiandola mammaria è solo un rudimentale sistema di dotti le cui cellule epiteliali sono già in grado di produrre latte (per influenza degli ormoni di origine materna). A partire dalla nascita la ghiandola va incontro ad un periodo di crescita allometrica con il resto del corpo, che perdura sino all'inizio della pubertà **(Macias e Hinck, 2012)**.

## Fase di sviluppo puberale

Con la pubertà e l' inizio delle funzioni ovariche lo sviluppo del sistema di dotti, iniziato in fase embrionale, aumenta drasticamente. Le estremità dei dotti iniziano infatti ad allargarsi e formano delle strutture chiamate "terminal end buds" (TEBS), che contengono cellule altamente proliferanti. I dotti continuano a penetrare nel cuscinetto di grasso sottostante aumentando la complessità delle ramificazioni. Le cellule che formano le capsule esterne dei TEBS, differenziano in cellule basali che costituiranno lo strato più esterno del dotto **(Briskin e Duss, 2007)**.

Diversi studi hanno mostrato come questa fase di sviluppo sia guidata da ormoni secreti dalla ghiandola pituitaria come ad esempio l'ormone della crescita (GH) e da ormoni, come gli estrogeni, rilasciati dall'ovaio. Gli effetti del GH sulla ghiandola mammaria, non sono diretti ma mediati da fattori di crescita ad azione locale quali per esempio il fattore di crescita insulino simile di tipo I (IGF-I), la cui sintesi e rilascio viene stimolata a livello dello stroma **(Gallego et al., 2001)**. Gli estrogeni, ormoni di origine steroidea, contrariamente all'ormone della crescita, stimolano direttamente la crescita mammaria attraversando la membrana cellulare e, tramite recettori specifici, attivando la trascrizione genica **(Macias e Hinck, 2012)**. Gli estrogeni sono responsabili, in collaborazione con l'IGF-I, della grande crescita cui va incontro la ghiandola mammaria durante questo periodo di sviluppo e che genera una ghiandola mammaria funzionale **(Ruan e Kleinberg, 1999)**.

Dunque secondo il modello attuale, durante la pubertà, GH, IGF-I ed estrogeni agiscono in modo sincronizzato. Infatti l'ormone della crescita stimola il rilascio di IGF-I dal fegato che agisce insieme all'IGF-I prodotto nello stroma e nell'epitelio mammario, stimolando nei TEBS la formazione e la ramificazione dei dotti. Gli estrogeni d'altro canto agiscono andando a stimolare un'intensa proliferazione cellulare che risulta necessaria durante la morfogenesi dei dotti **(Macias e Hinck, 2012)**. Oltre ai fattori sopra citati, durante lo sviluppo puberale della ghiandola mammaria, intervengono molti altri fattori di crescita quali ad esempio i membri delle famiglie di EGF (fattore di crescita epidermico) e FGF (fattore di crescita dei fibroblasti) che agiscono attraverso i loro rispettivi recettori ad attività tirosin chinasi. Questi fattori di crescita influenzano in particolare la morfogenesi del sistema duttale **(Macias e Hinck, 2012)**.

## Fase di sviluppo riproduttiva

Sicuramente le maggiori modificazioni della ghiandola mammaria avvengono durante l'età adulta ed in particolare durante l'instaurarsi della gravidanza, quando dovranno formarsi le strutture alveolari necessarie per l'allattamento dei neonati. In questa fase sono richiesti infatti molti cambiamenti strutturali sia per quanto riguarda la maturazione della ghiandola mammaria che per ciò che concerne l'alveologenesi. Questi processi sono principalmente sotto il controllo di due fattori: il progesterone e la prolattina.

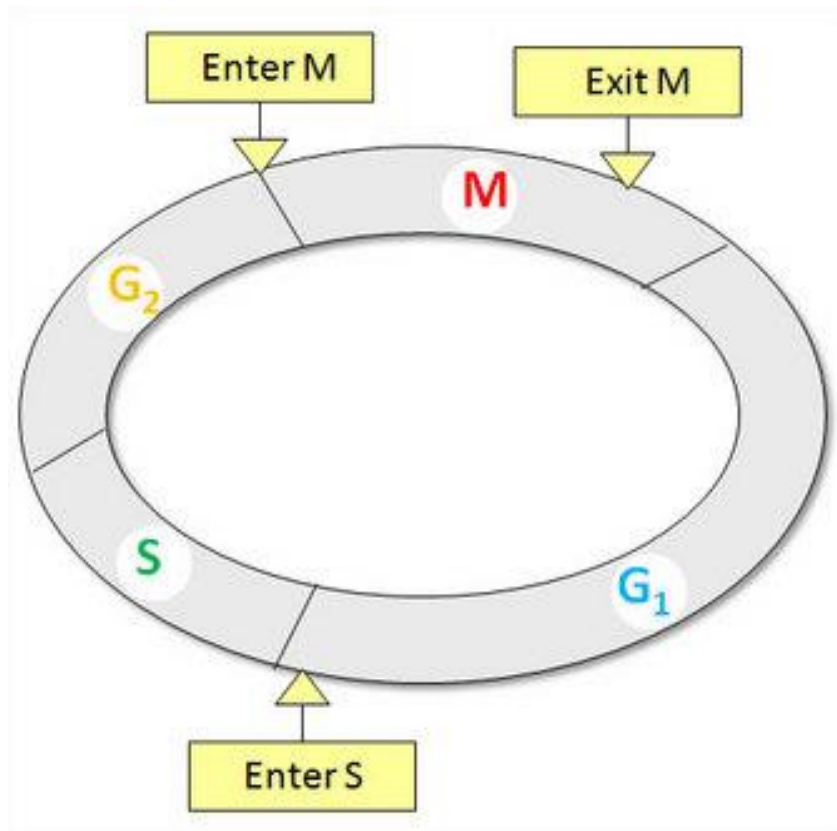
La prima trasformazione che avviene nella ghiandola, in questi casi, comporta un aumento di complessità nelle ramificazioni dei dotti, che a partire dai dotti principali, si estendono lateralmente a formare delle ramificazioni terziarie che invadono lo stroma "libero" circostante. Le cellule epiteliali inizieranno, proliferando, a formare gli alveoli e, una volta differenziate, a sintetizzare e secernere latte. Molti dei cambiamenti descritti si osservano, anche se in misura minore, durante il ciclo estrale (**Macias e Hinck, 2012**).

Una volta che i cuccioli sono stati svezzati, e quindi non vi è più richiesta di latte materno, inizia una fase di involuzione durante la quale le cellule epiteliali addette alla produzione di latte muoiono e vengono riassorbite, e l'intero albero duttale è riportato indietro all'architettura duttale semplice tipica dell'età adulta nella fase non gravidica. Il processo di involuzione ovviamente richiede un'intensa apoptosi e può essere diviso in una fase reversibile ed in una fase irreversibile.

Nel topo, la fase di involuzione reversibile inizia circa dodici ore dall'ultima assunzione di latte da parte dei cuccioli e viene interrotta se i cuccioli iniziano una nuova poppata. La fase irreversibile invece inizia dopo quarantotto ore dall'ultima poppata ed ovviamente una volta iniziata non può più essere arrestata (**D'Cruz et al., 2002**).

# Il Ciclo Cellulare

Come visto nei precedenti paragrafi, le varie fasi di sviluppo della ghiandola mammaria richiedono un' intensa proliferazione cellulare. Affinchè una cellula possa proliferare, deve attraversare le quattro fasi del ciclo cellulare (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M), che sono intervallate da tre punti di transizione G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-S, G<sub>2</sub>-M e M-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (**Bahler, 2005**).



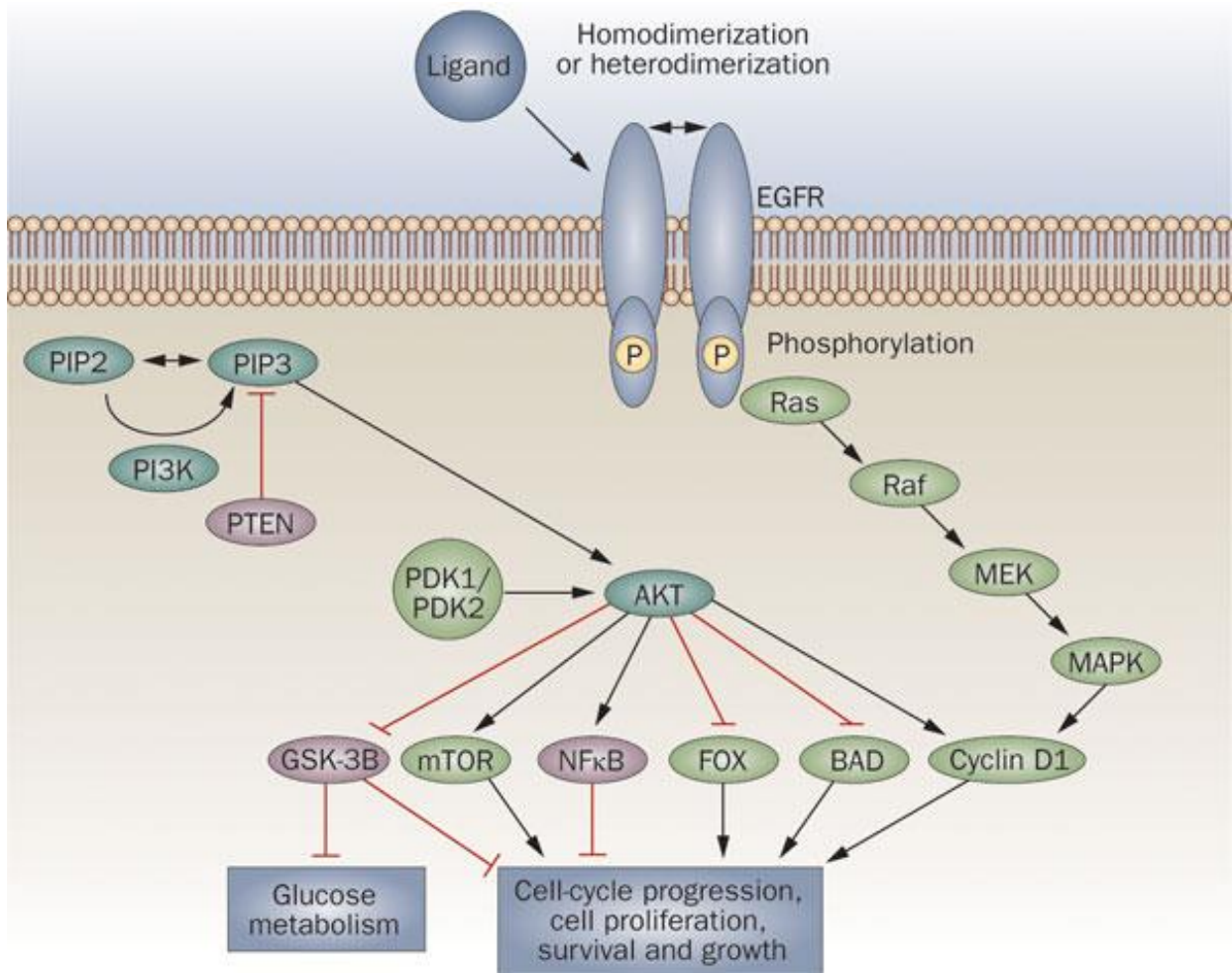
**Figura 3 Tang, Z. I. (2010) The Domino and Clock Models of Cell Cycle Regulation. Nature Education.** Il ciclo cellulare di una cellula eucariotica consiste di Quattro fasi: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M.

All'interno dei punti di transizione sono presenti dei punti di controllo (checkpoints) in cui la cellula "valuta" se l'avanzamento attraverso il ciclo sta procedendo in maniera corretta. I checkpoints rivestono un ruolo molto importante, in quanto permettono l'arresto della proliferazione cellulare in caso di danni al DNA o problemi durante la replicazione (**Bertoli et al., 20013**).

La proteina p53, uno dei più importanti oncosoppressori esistenti (**Lane e Levine, 2010**), è sicuramente una molecola chiave dei checkpoint: entra in azione quando sono riscontrati degli errori nella duplicazione del DNA o più in generale quando la cellula è sottoposta a un qualche tipo di stress. In questi casi infatti, a seguito dell'aumentata espressione della proteina Arf, p53 viene liberata dai regolatori negativi MDM2 e MDM4 (**Brady e Attardi, 2010**). Una volta attiva, p53 può agire come fattore di trascrizione, inducendo l'espressione di geni che, in base al tipo di stress, possono bloccare temporaneamente il ciclo cellulare oppure indurre senescenza o apoptosi (**Bieging et al., 2014**) (**Kastan e Bartek, 2004**).

Il ciclo cellulare è anche caratterizzato dalla presenza di un importante punto di restrizione, presente tra la fase G1 e la fase S. Quando questo punto di restrizione viene superato, la cellula è in grado di attraversare il ciclo cellulare, indipendentemente dai segnali provenienti dall'ambiente extracellulare (**Bertoli et al., 2013**). Il superamento del punto di restrizione G1-S richiede una continua stimolazione della cellula con specifici fattori di crescita (**Zwang et al., 2011**). I fattori di crescita agiscono legando recettori transmembrana, presenti sulla superficie cellulare.

Uno dei recettori transmembrana più studiati è il recettore (EGFR) per il fattore di crescita epidermico (EGF). Il recettore EGFR fa parte, insieme ai recettori ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4, della famiglia dei recettori tirosina chinasi (**Yarden, 2001**). Tutti i recettori appartenenti a questa famiglia hanno una struttura costituita da un dominio extracellulare con elevata specificità di legame per il fattore di crescita, da un dominio transmembrana e da un dominio intracellulare ad attività tirosin-chinasica (**Olayioye et al., 2000**). Il dominio intracellulare è molto conservato tra i vari recettori appartenenti a questa famiglia (**Normanno et al., 2006**). Quando il ligando lega il recettore, quest'ultimo dimerizza con i recettori vicini, formando omo- (se dimerizza con lo stesso recettore) o etero- (se dimerizza con un recettore differente) dimeri e si attiva a livello dei domini intracellulari ad attività tirosina-chinasica (**Olayioye et al., 2000**). Una chinasi del dimero attiva l'altra mediante un meccanismo di transfosforilazione di tirosine vicine alla tasca della chinasi (**Huse e Kuriyan, 2002**). Una volta pienamente attive, le chinasi transfosforilano ulteriori residui tirosinici presenti sui domini intracellulari. I residui tirosinici fosforilati fungono da punto di legame per proteine contenenti domini SH2 (Src homology) o PTB (Phosphotyrosine-binding). Il reclutamento di queste proteine permette la loro attivazione, con conseguente avvio delle cascate trasduzionali intracellulari (**Normanno et al., 2006**) che portano infine alla risposta cellulare. Due delle vie trasduzionali più importanti attivate a valle dei recettori ErbB, sono quelle delle MAP chinasi (MAPK) e di PI3K (**Jorissen et al., 2003**) (**Soltoff e Cantley, 1996**).

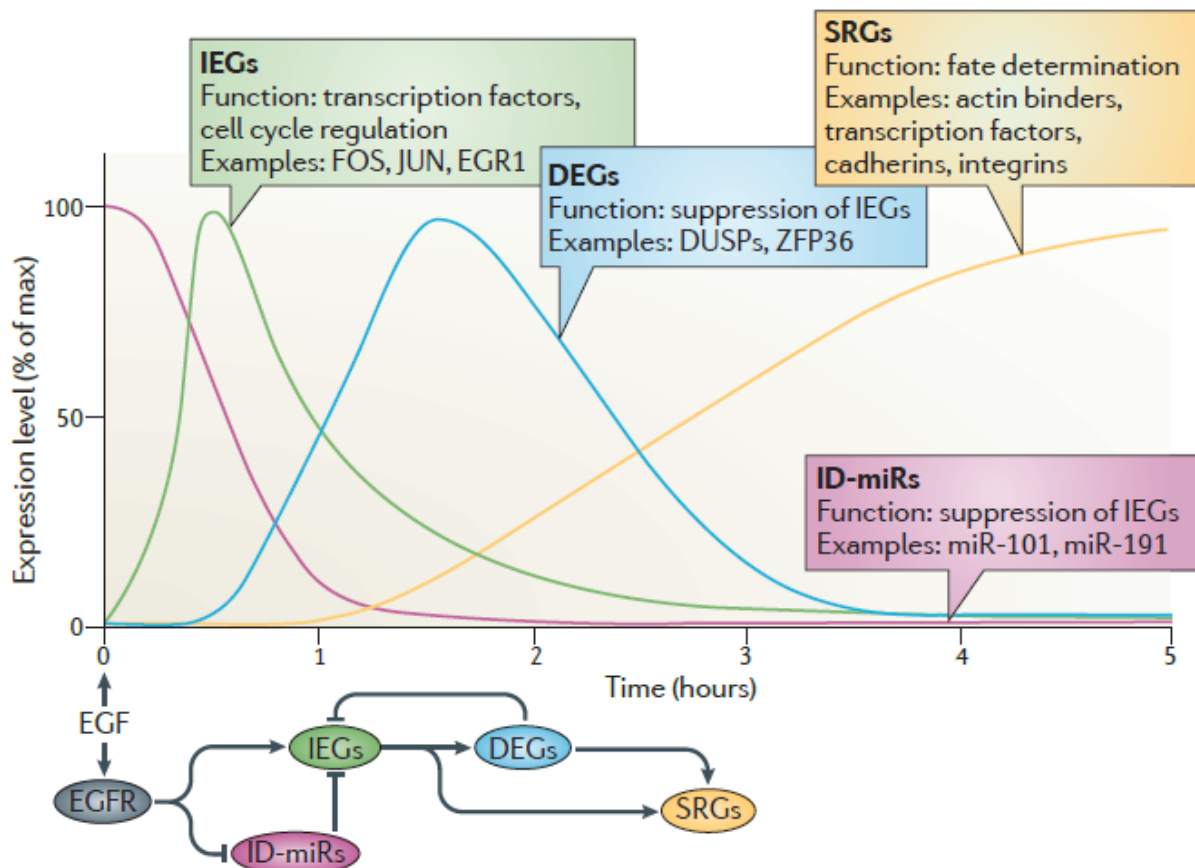


**Figura 4 (Okines et al., 2011)** Nell'immagine sono descritti gli eventi che si susseguono dopo il legame del ligando al recettore EGFR. Dopo che i recettori vicini dimerizzano e che vengono transfosforilate le tirosine sui domini intracellulari dei recettori, le cascate di segnalazione intracellulare sono attivate. Tra queste le più studiate sono le vie delle Map chinasi e di PI3K/Akt. Il messaggio "trasmesso" attraverso queste vie trasduzionali darà inizio alla risposta cellulare.

# Breve premessa agli eventi intracellulari ed intranucleari

Prima di iniziare a descrivere gli eventi che permettono ad un segnale, proveniente dall'ambiente extracellulare, di attraversare il citoplasma e giungere nel nucleo, vorrei fornire un breve quadro generale che possa permettere di seguire meglio i processi che tra poco descriverò.

Nella figura 5 è possibile osservare come, dopo l'interazione tra ligando e recettore specifico, e la conseguente attivazione delle cascate di segnalazione intracellulare, venga indotta la down regolazione degli Immediate delayed-microRNAs (ID-miRs), che controllano negativamente l'espressione degli Immediate Early Genes (IEGs). Come conseguenza di ciò, inizia ad aumentare l'espressione genica degli IEGs. I prodotti di espressione di questi ultimi regolano sia l'espressione genica dei Secondary Response Genes (SRGs), che hanno cinetiche di espressione più lente e sono implicati nella regolazione del ciclo cellulare, che l'espressione dei Delayed Early Genes (DEGs) i cui prodotti di espressione (come ad esempio le fosfatasi) regolano negativamente, mediante un processo a feedback negativo, l'espressione degli IEGs stessi.



**Figura 5 (Avraham e Yarden, 2011)** Uno stimolo proveniente dall'ambiente cellulare induce la rapida downregolazione degli ID-miR e ciò ha come conseguenza la rapida upregolazione degli IEGs da essi controllati. L'espressione degli IEGs stimola l'espressione degli SRGs (geni a cinetiche lente implicati nella divisione cellulare) e contemporaneamente l'espressione dei geni DEGs che mediante un feedback negativo "spengono" l'espressione degli IEGs stessi.

# Le vie trasduzionali delle MAPK e di PI3K

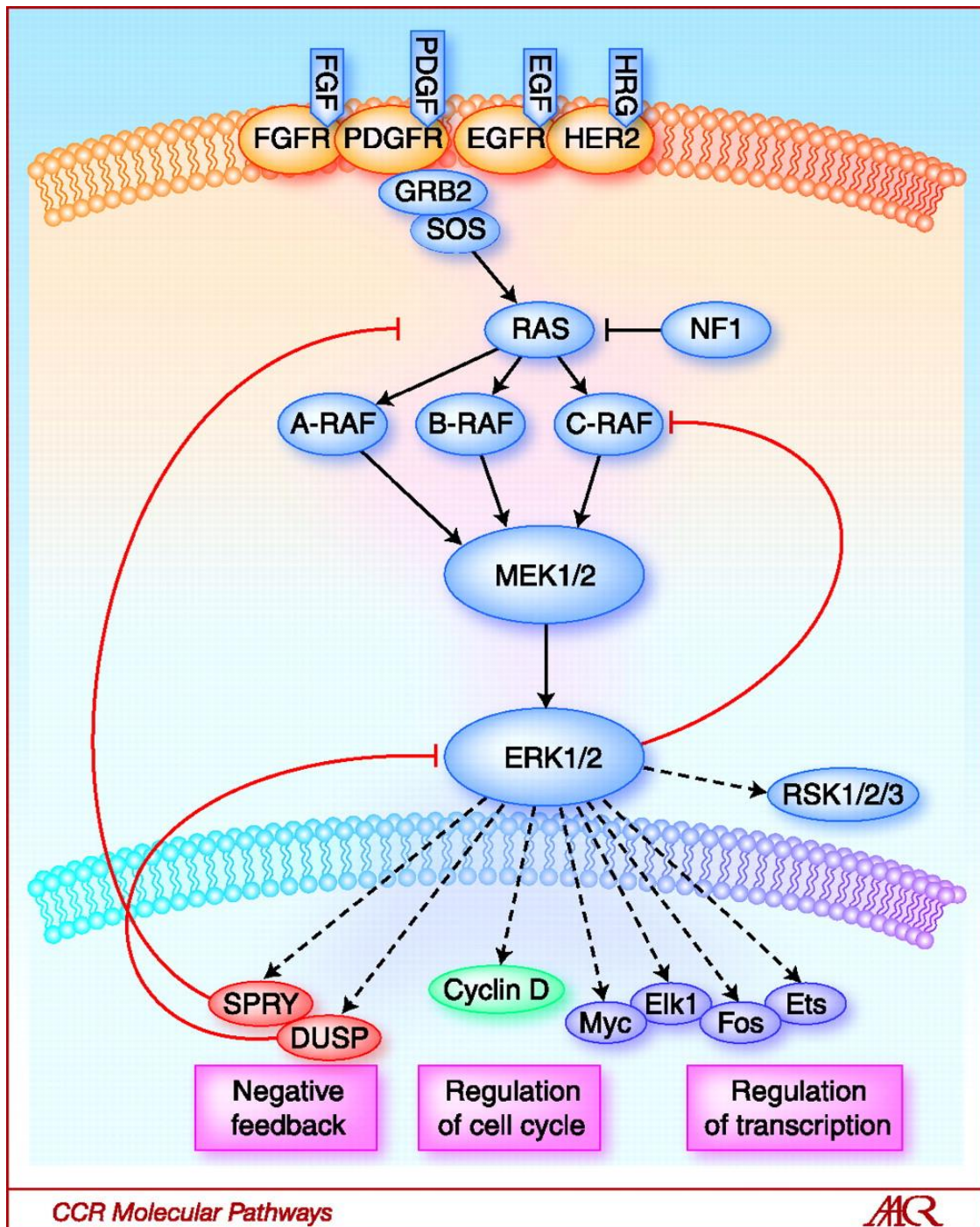
La famiglia delle Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK = Proteine Chinasi Attivate da Mitogeni) è costituita da proteine citoplasmatiche, ad attività serina/treonina-chinasica, che partecipano alla trasduzione del segnale dalla superficie cellulare fino all'interno della cellula (**Roskoski, 2012**). Queste proteine catalizzano la fosforilazione di diversi tipi di substrati quali ad esempio fattori di trascrizione, proteine chinasi, proteine fosfatasi ed elementi regolatori. E' possibile dividere il gruppo delle MAP chinasi in quattro sottofamiglie: Erk1/2, P38, JNK, ERK5 (**Katz et al., 2007**).

Il meccanismo di trasmissione del segnale, comune a tutte e quattro le famiglie, è costituito da tre elementi: MAP3K, MAP2K e MAPK (**Roskoski, 2012**). Una delle caratteristiche principali di questa via di segnalazione intracellulare è che al variare del tipo di stimolazione extracellulare, varia la risposta cellulare che viene indotta. Per esempio dalla letteratura sappiamo che, nelle cellule PC12, i due fattori di crescita FGF e NGF inducono lo sviluppo delle ramificazioni neuronali, attivando la via di Erk1/2, mentre EGF ed insulina benchè attivino Erk1/2 inducono proliferazione cellulare (**Marshall, 1995**). Sono differenti le cause che permettono questo differenziamento delle risposte cellulari:

differenti livelli di espressione dei recettori cellulari, differente reclutamento delle quattro sottofamiglie di MAP chinasi, presenza di differenti proteine adattatrici (**Murphy e Blenis, 2006**).

Durante il mio progetto di Dottorato ho posto particolare attenzione allo studio della sottofamiglia Erk1/2. Vediamo (Fig. 6) più nel dettaglio il funzionamento di questa via di segnalazione intracellulare:

Come descritto precedentemente, i domini intracellulari dei recettori tirosin-chinasici, dopo essere stati fosforilati, diventano dei punti di attracco per proteine contenenti un dominio SH2, quali ad esempio le proteine GRB2. GRB2 contiene nella sua struttura anche un secondo tipo di dominio: il dominio SH3. Il dominio SH3 permette l'interazione di GRB2 con la proteina Sos. Sos è in grado di indurre lo scambio del GDP con il GTP su una piccola proteina G chiamata Ras. In questo modo Ras passa dalla forma inattiva alla forma attiva e lega Raf (è una MAP3K), che induce la fosforilazione e quindi l'attivazione di Mek (MAP2K) (**Kyriakis et al., 1992**). Mek fosforila e attiva Erk (MAPK) che infine fosforila diversi tipi di bersagli molecolari (**Yoon e Seger, 2006**). Erk può anche migrare nel nucleo dove fosforila e attiva numerosi fattori di trascrizione tra cui la famiglia di AP-1 o Egr-1 (**Murphy e Blenis, 2006**).



**Figura 6 (Pratilis e Solit, 2010)** Nella figura è descritta la cascata di segnalazione della via di Erk 1/2. Le vie intracellulari, grazie ad una serie di fosforilazioni sequenziali, permettono ad un messaggio proveniente dall'ambiente extracellulare, di arrivare all'interno del nucleo dove viene attivata l'espressione genica di quei geni implicati nelle differenti risposte cellulari.

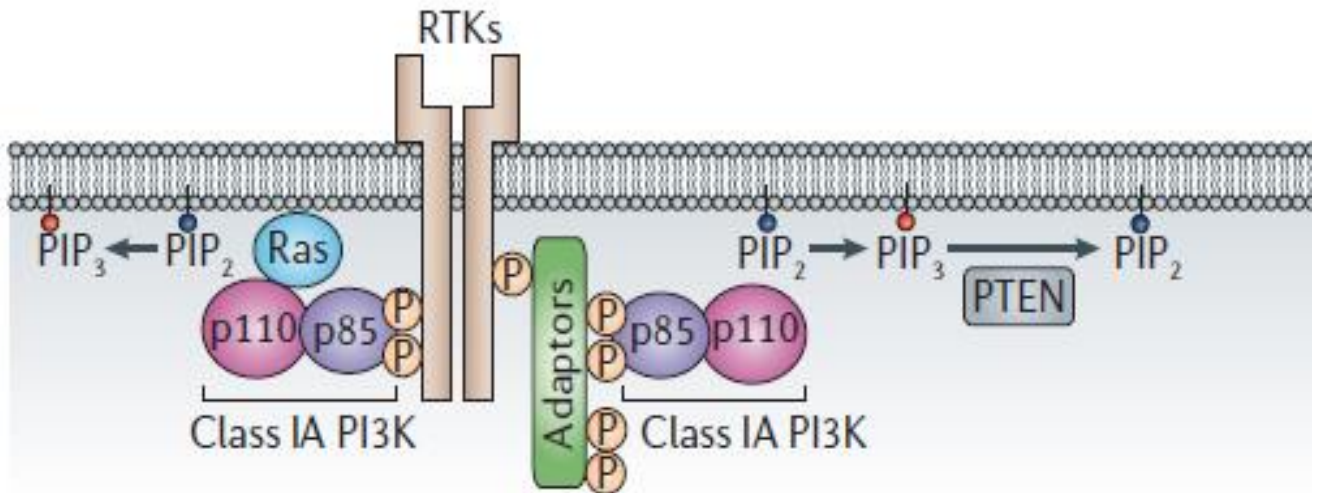


Un'altra importante via di segnalazione intracellulare è la via di PI3K-Akt. Le phosphatidylinositol 3-chinasi (PI3Ks) sono membri di un'unica famiglia, con elevato grado di conservazione del dominio chinasi, che fosforilano lipidi a livello del gruppo 3'-idrossile.

E' possibile raggruppare le PI3Ks in tre differenti classi, basandoci sulle omologie di sequenza e sulle preferenze a livello di substrato **(Engelman et al., 2006)**.

La I classe è sicuramente la meglio caratterizzata delle tre. Questa classe può essere ulteriormente suddivisa in due sottoclassi che si differenziano per il recettore al quale sono accoppiate. La classe IA è attivata dai recettori per i fattori di crescita ad attività tirosin-chinasica (RTKs) mentre della classe IB fanno parte le PI3Ks attivate da recettori accoppiati a proteine G **(Katso et al., 2001)**.

Per il mio progetto di Dottorato la classe IA di PI3K è risultata di particolare interesse. Il meccanismo di azione (Fig. 7) delle vie di trasduzione intracellulare di PI3K IA è piuttosto complesso e come detto viene attivato dall'interazione tra recettore, solitamente tirosin-chinasico, e ligando. Questo legame permette l'attivazione dei domini intracellulari dei recettori che, grazie all'attività chinasi, si autofosforilano a livello dei residui tirosinici e transfosforilano delle proteine adattatrici. PI3K viene portato a ridosso della membrana cellulare e si attiva mediante l'interazione con i residui tirosinici fosforilati. Per capire il processo di attivazione di PI3K IA è importante conoscere la sua struttura. PI3K IA è infatti un eterodimero formato da un dominio regolatore (p85) e da un dominio catalitico (p110) **(Engelman et al., 2006)**. La subunità p85 è molto importante nell'attivazione della via di PI3K, infatti essa media l'attivazione interagendo direttamente con i recettori tirosin chinasi fosforilati o con proteine adattatrici quali IRS1, tramite la subunità SH2 **(Songyang et al., 1993)**. L'interazione di p85, attiva da un lato la subunità catalitica p110, e dall'altro permette l'interazione, a livello della membrana citoplasmatica, di PI3K con il suo substrato: il fosfatidilinositolo-4,5 difosfato (PI-4,5-P2) **(Yu et al., 1998)**. PI3K fosforila PI-4,5-P2 formando fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato (PIP3) che, a sua volta, recluta e attiva, a livello della membrana, delle proteine di trasduzione. Tra queste troviamo proteine ad attività serina-treonina chinasi, quali ad esempio Akt, delle proteine adattatrici e delle proteine ad attività tirosin-chinasi. Akt è il principale bersaglio di PIP3 **(Franke et al, 1997)**. L'interazione tra Akt e PIP3 permette il reclutamento di Akt sulla membrana cellulare e la sua fosforilazione ad opera di mTOR e PDK1. A questo punto Akt risulta completamente attivato e può fosforilare diverse proteine bersaglio modulando diversi aspetti della biologia cellulare: sintesi proteica, l'entrata della cellula nel ciclo cellulare, sopravvivenza cellulare ecc.. **(Cantley, 2002)**.



**Figura 7 (riadattamento da Engelman et al., 2006)** La classe di PI3K IA è attivata da recettori ad attività tirosin chinasi. Alcuni recettori (quale per esempio il recettore per il fattore di crescita insulino-simile o IGF-I) utilizzano delle molecole adattatrici per reclutare PI3K mentre altri recettori riescono a reclutarlo direttamente.

Mediante le vie trasduzionali sopra descritte un segnale proveniente dall'ambiente extracellulare attraversa il citoplasma e arriva al nucleo, modulando la trascrizione genica.

Il processo di trascrizione non avviene in maniera omogenea tra tutti i geni coinvolti da un determinato stimolo. L'espressione genica si muove infatti a diverse velocità. Inizialmente vengono trascritti i geni che hanno le cinetiche più rapide (definiti per l'appunto "immediate early genes"). I prodotti dell'espressione di questi geni "rapidi" andranno poi a stimolare l'espressione di geni che hanno invece cinetiche di espressione piuttosto lente (definiti "secondary response genes").

# Gli “immediate early genes” (IEGs)

Gli immediate early genes (IEGs), codificano per enzimi citoplasmatici, proteine di secrezione e fattori di trascrizione, e sono coinvolti in differenti fasi della biologia della cellula **(Healy et al., 2013)**. E' importante sottolineare come gli IEGs non necessitano la sintesi di proteine de novo **(Herschman, 1991) (O'Donnell et al., 2012) (Booy et al., 2011)**.

La caratteristica principale degli IEGs, suggerita anche dal loro nome, è quella di avere delle cinetiche di espressione rapide e transienti. Dalla letteratura sappiamo infatti che, a seguito di uno stimolo mitogenico, raggiungono il picco di espressione tra i 30 e i 60 minuti e tornano a livello basale dopo circa 90 minuti **(Tullai et al., 2007)**.

I fattori alla base di questa rapidità di espressione sono diversi:

1. I promotori degli IEGs sono posizionati in siti cromatinici in cui la cromatina è più “lassa”. La cromatina è la forma in cui il DNA si trova nelle cellule ed è costituita da DNA avvolto intorno a proteine chiamate istoni. E' chiaro che più compatta è la struttura della cromatina e più difficile sarà per il macchinario della trascrizione raggiungere i siti promotori. Nei mammiferi la cromatina è arrangiata a formare dei domini denominati territori cromatinci (CTs). I promotori degli IEGs si trovano ai bordi di questi domini, in punti “strategici” nei quali la cromatina risulta più accessibile al macchinario della trascrizione **(Fraser e Bickmore W, 2007)**.
2. I promotori degli IEGs sono inoltre caratterizzati dalla presenza di isole CpG **(Ramirez et al., 2009)**. Le isole CpG riducono lo spazio occupato dal nucleosoma, rendendo, anche in questo caso, la cromatina più accessibile a componenti che legano il DNA, quale ad esempio la RNA polimerasi II (Pol II). A proposito della Pol II, alcuni studi hanno dimostrato come sui promotori degli IEGs sia presente una Pol II preassemblata, che in assenza di stimolo non è in grado di produrre rounds multipli di trascrizione. Quando giunge uno stimolo dall'ambiente extracellulare, si verifica l'attivazione di questa Pol II, che aumenta sensibilmente la propria attività, permettendo un rapido accumulo di mRNA degli IEGs **(Hargreaves et al., 2009)**.
3. I microRNA (piccole molecole di RNA non codificante) regolano l'espressione genica di geni bersaglio, legandosi agli mRNA bersaglio e indirizzandoli all'interno di corpuscoli cellulari denominati p-bodies. Dentro i p-bodies gli mRNAs possono rimanere “conservati” o andare incontro a degradazione **(Brenques et al., 2005)**. Quando giunge uno stimolo extracellulare, che comporta la riduzione degli immediate delayed microRNAs (ID-miRNAs), gli mRNA, ad essi legati, vengono rilasciati dai p-bodies e reclutati nei polisomi **(Bhattacharyya et al., 2006)**.
4. I polisomi sono complessi formati da diversi ribosomi che lavorano insieme. Tanto più numerosi sono i ribosomi associati ad un mRNA e tanto più rapida sarà la sua traduzione **(Piques et al., 2009)**.

Esistono circa un centinaio di immediate early genes. Nello sviluppo del mio progetto di ricerca ho in particolare focalizzato l'attenzione su sei IEGs: Egr-1 (incluse le sue isoforme 2, 3 4), c-Fos e c-Jun.

Mentre il primo (e le sue isoforme) funziona come monomero, gli altri due funzionano formando eterodimeri Fos-Jun oppure omodimeri Jun-Jun. Questi dimeri prendono il nome di complesso AP-1. Il complesso AP-1 si lega a sequenze specifiche sui siti promotori, andando ad agire da fattori di trascrizione.

Egr-1 è un fattore di trascrizione con una struttura a dita di zinco e un peso di circa 58 kDa. Ha una localizzazione nucleare e lega preferenzialmente sequenze, chiamate ERE, lunghe nove paia di basi e ricche in GC **(Thiel e Cibelli, 2002)**. Quando Egr-1 lega i siti promotori dei geni bersaglio, regola differenti funzioni della biologia della cellula quali proliferazione, differenziamento, apoptosi e carcinogenesi. Le differenti funzioni attivate variano a seconda del tipo cellulare, del contesto intracellulare e della durata dello stimolo **(Adamson e Mercola, 2002) (Seiler et al., 2012) (Sukhatme, 1990)**.

La proteina Egr-1 ha una struttura (Fig. 8) modulare formata da tre domini: un dominio di legame al DNA che contiene tre motivi a dita di zinco, un dominio di attivazione lungo circa 278 amminoacidi **(Gashler et al., 1993)** e un terzo dominio che funge da sito di legame per due cofattori trascrizionali, Nab 1 e Nab 2, che agiscono bloccando l'attività biologica di Egr-1 **(Russo et al., 1995) (Thiel et al., 2000)**.

E' importante sottolineare come Egr-1 controlla l'espressione di Nab 1 e Nab 2 e quindi controlla la propria attività biologica attraverso un loop a feedback negativo **(Ehrenguber et al., 2000)**

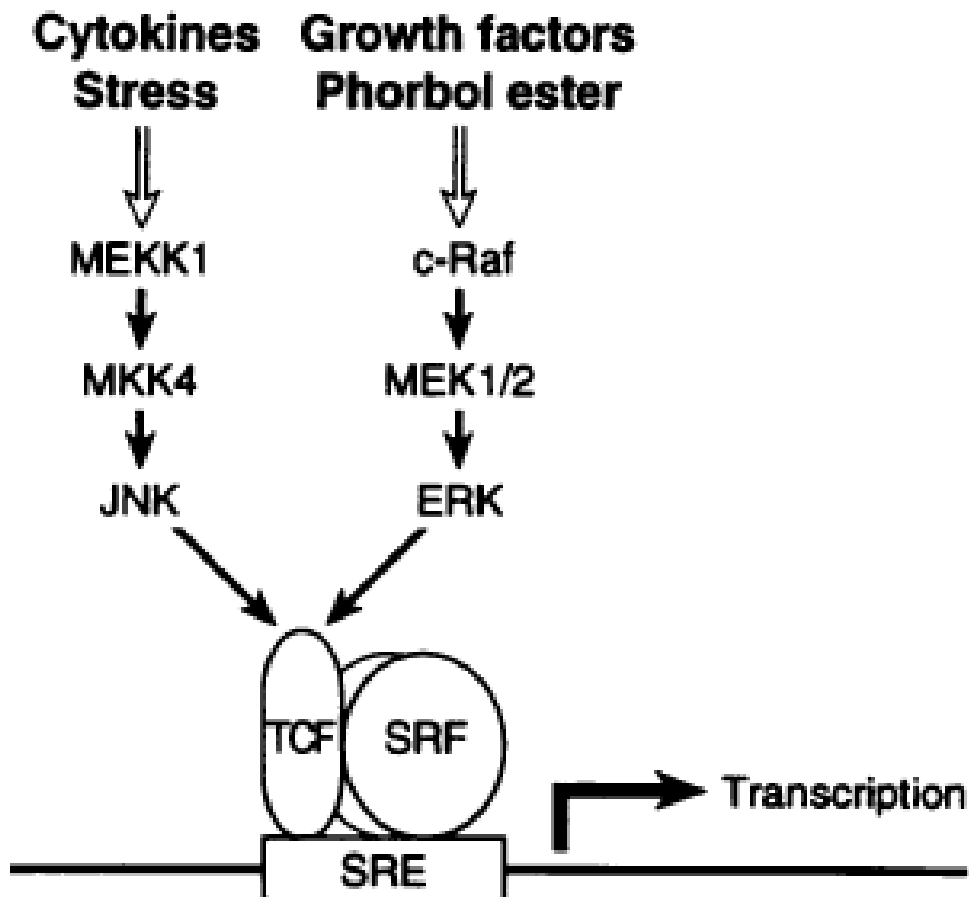


**Figura 8 (Thiel e Cibelli 2002)** Nella figura è mostrata la struttura modulare di Egr-1. All'estremità N-terminale è presente il dominio di attivazione. E' mostrato inoltre il dominio con i tre motivi a dita di zinco. Tra i due domini è presente anche il dominio di repressione al quale si legano Nab 1 e Nab 2.

Egr-1 è il membro più studiato di una famiglia che comprende, come detto, altre tre isoforme: Egr-2, Egr-3 e Egr-4. Tutte e quattro le proteine hanno un elevato grado di omologia per quanto riguarda il dominio a dita di zinco, mentre differiscono per quanto riguarda i rimanenti domini della struttura **(Bhattacharyya et al., 2013)**.

La trascrizione del gene di Egr-1 è direttamente attivata dalla via di Ekr1/2 (oltre che dalla via di Jnk). Infatti sul promotore a monte di Egr-1 sono presenti cinque elementi di risposta al siero (SREs) **(Thiel e Cibelli, G, 2002)**. Il funzionamento di questi elementi richiede la loro interazione (Fig. 9) con due fattori trascrizionali: i fattori di risposta al siero (SRFs) e il complesso ternario (che è costituito dai tre fattori Elk-1, Sap-1 e Sap-2). In particolare la fosforilazione di Elk-1 (ad opera di Jnk o Erk) potenzia l'interazione del complesso ternario con gli elementi SREs sul promotore di Egr-1. Allo stesso tempo

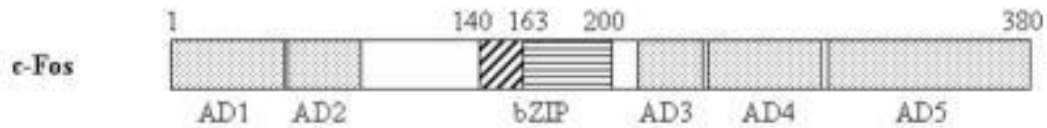
Elk-1 interagisce con i fattori SRFs fungendo da anello di congiunzione tra questi e i fattori SREs, attivando di fatto la trascrizione di Egr-1. Quindi Elk-1 gioca un ruolo fondamentale poiché agisce da anello di congiunzione tra il segnale, che mediante le vie di trasduzione intracellulari giunge dall'ambiente esterno, e l'attivazione della trascrizione di Egr-1 (Whitmarsh et al., 1995).



**Figura 9 (Whitmarsh et al. 1995)** La figura mostra l'interazione tra il complesso ternario (TCF), i fattori di risposta al siero (SRF) e gli elementi SRE sul sito promotore.

La famiglia di Fos comprende diverse isoforme (c-Fos, Fos B, Fra-1 e Fra-2) (Healy et al., 2013). La prima forma studiata di Fos è stata v-Fos, scoperta nel virus del sarcoma murino. L'analogo nella cellula prende il nome di c-Fos ed ha una struttura molto simile a v-Fos. Le due proteine differiscono solo per una sequenza di 48aa all'estremità C-terminale dovuta ad una fusione non in frame dentro v-Fos (van Straaten et al., 1983). L'assenza di questa sequenza comporta la mancanza su v-Fos di alcuni siti di fosforilazione e fa in modo che v-Fos risulti costitutivamente attivo (Monje et al., 2003). c-Fos è

codificato a partire da un gene di 4Kb trascritto a partire da un singolo promotore e che da origine ad un mRNA di 2,2 Kb. L'unico prodotto della traduzione di questo mRNA è rappresentato da una proteina di 380aa e dal peso di 55KDa (**Piechaczyk e Blanchard, 1994**).



**Figura 10 (riadattamento da Hivin et al., 2006)** La struttura di C-Fos è costituita da una sequenza di 380aache formano 5 domini di attivazione e un dominio bZip.

Jun è una famiglia di fattori di trascrizione costituita da diversi membri (c-Jun, Jun B e Jun D) anch'essi implicati in diverse fasi della biologia della cellula (proliferazione, apoptosi, oncogenesi) (**Chinenov e Kerppola, 2001**).

I diversi membri della famiglia Jun condividono un elevato livello di omologia di sequenza. Così come i membri della famiglia Fos anche quelli di Jun appartengono al gruppo bZIP di fattori di trascrizione leganti il DNA. Tali proteine sono caratterizzate dalla presenza di un dominio di legame al DNA localizzato immediatamente vicino ad un dominio definito "Leucine Zipper" ("cerniera di leucine"), posto sull'estremità C-terminale, che risulta fondamentale nel processo di dimerizzazione (**Mechta-Grigoriou et al., 2001**).

L'estremità C-terminale risulta molto conservata tra le varie isoforme della famiglia Jun. Al contrario il dominio di transattivazione, che si trova sull'estremità N-terminale, è poco conservato (**Mechta-Grigoriou et al., 2001**).

Sia i membri della famiglia Fos che i membri della famiglia Jun agiscono da fattore di trascrizione solo in forma dimerica. Mentre le proteine Jun possono formare sia omodimeri Jun-Jun che eterodimeri Jun-Fos, le proteine della famiglia Fos possono solo formare eterodimeri Fos-Jun.

Il dimero che origina da questa interazione è noto con il nome di complesso AP-1. I differenti dimeri AP-1 hanno tutti la stessa specificità di legame al DNA ma differiscono per ciò che riguarda l'efficienza di transattivazione (**Mechta-Grigoriou et al., 2001**). La differente efficienza di transattivazione dipende dalla variabilità tra i domini di transattivazione (all'estremità N-terminale) delle varie isoforme della famiglia di Jun. Per esempio c-Jun contiene un sito che normalmente viene fosforilato dalle chinasi JNKs sulle serine 63 e 73. Da questa fosforilazione scaturisce un'aumentata efficienza e stabilità del complesso AP-1 (**Smeal et al., 1991**). Le stesse serine non sono però presenti sull'estremità N-terminale di JunB (**Chiu et al., 1989**).

# I secondary response genes e i delayed early genes

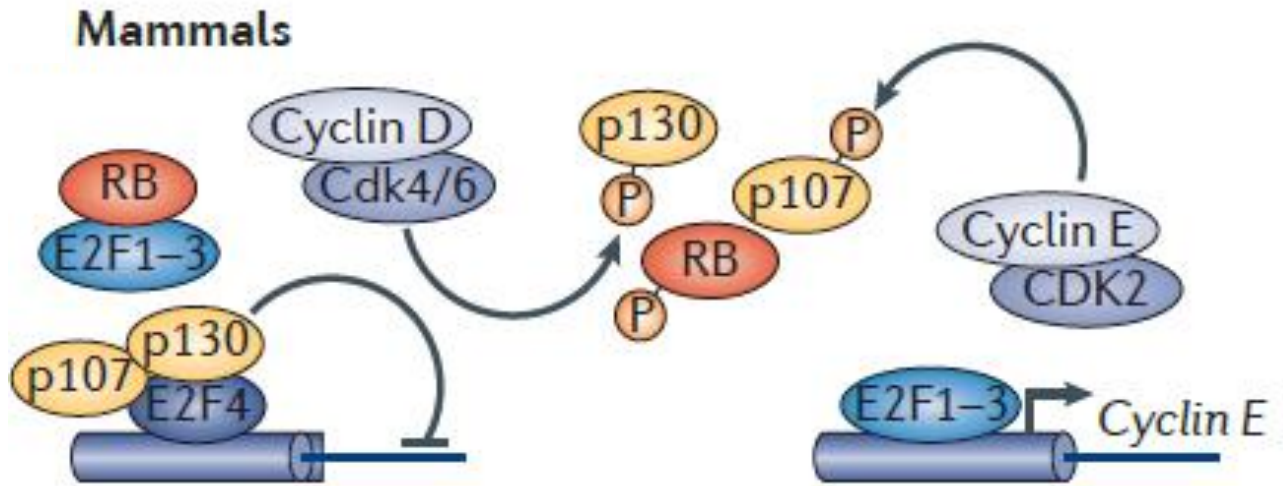
Una volta espressi gli Immediate Early Genes, questi regolano l'espressione sia dei "secondary response genes" (SRGs), che codificano per proteine direttamente implicate nell'attraversamento del ciclo cellulare, che dei "delayed early genes" (DEGs). Questi geni "bersaglio" sono caratterizzati da cinetiche di espressione molto più lente, rispetto quelle degli IEGs.

## La Ciclina D1 nella transizione G1-S

Tra i geni la cui espressione è controllata dagli IEGs, come detto, vi sono numerosi geni implicati nella proliferazione cellulare, come ad esempio quelli codificanti per le cicline. Le cicline mediano il passaggio da una fase del ciclo cellulare alla successiva, modulando l'attività di alcune chinasi ciclina dipendenti (CDKs) (**Bertoli et al., 2013**). In particolare durante il mio progetto di Dottorato, ho studiato l'attività della ciclina D1. Ma a che livello agisce la ciclina D1?

La transizione G1-S richiede l'espressione di diversi geni. L'espressione di questi geni è regolata dalla famiglia E2F di fattori di trascrizione. Le proteine appartenenti a questa famiglia possono attivare la trascrizione (E2F1, E2F2 e E2F3) o reprimerla (E2F4). All'inizio della fase G1, le proteine E2F attivatrici sono sotto il controllo dei loro inibitori p130 e p107 (appartenenti alla famiglia degli inibitori Rb) (**Helin, 1998**). E2F4 invece tiene legati p130 e p107 ai siti promotori dei geni che dovranno essere trascritti, bloccandone di fatto l'espressione (**Gaubatz et al., 2000**). Dopo che gli IEGs (espressi durante la fase G0/G1 del ciclo cellulare) hanno indotto l'espressione della ciclina D1, questa lega e attiva i complessi chinasi ciclina dipendenti 4 e 6. CDK 4 e 6 fosforilano p130 e p107 permettendo il rilascio di E2F1, E2F2, E2F3 e il distacco di E2F4 dai siti promotori. In questo modo può iniziare la trascrizione dei geni bersaglio. Tra i geni che vengono espressi vi è anche la ciclina E che attiva il complesso CDK2. CDK2 fosforila ulteriormente p130 e p107 potenziando, mediante un feedback positivo, il processo di trascrizione (**Skotheim et al., 2008**) (**Doncic et al., 2011**).

A questo punto inizia anche un processo a feedback negativo che interrompe la trascrizione. Infatti tra i geni trascritti a partire dalla stimolazione delle proteine E2F vi è anche la ciclina A, che potenzia ulteriormente l'attività di CDK2. In questo modo CDK2 "potenziato" fosforila anche le proteine E2F andandole di fatto a inibire (**Xu et al., 1994**) (**Dynlacht et al., 1994**) (**Krek et al., 1994**).



**Figura 11 (riadattamento da Bertoli et al 2013)** Nella figura è mostrato il meccanismo di azione della ciclina D1, che dopo il legame con cdk 4/6 induce la fosforilazione di p130 e p107 con conseguente liberazione di E2F 1,2,3 e distacco di E2F4 dal sito promotore. In questo modo può iniziare la trascrizione dei geni bersaglio.

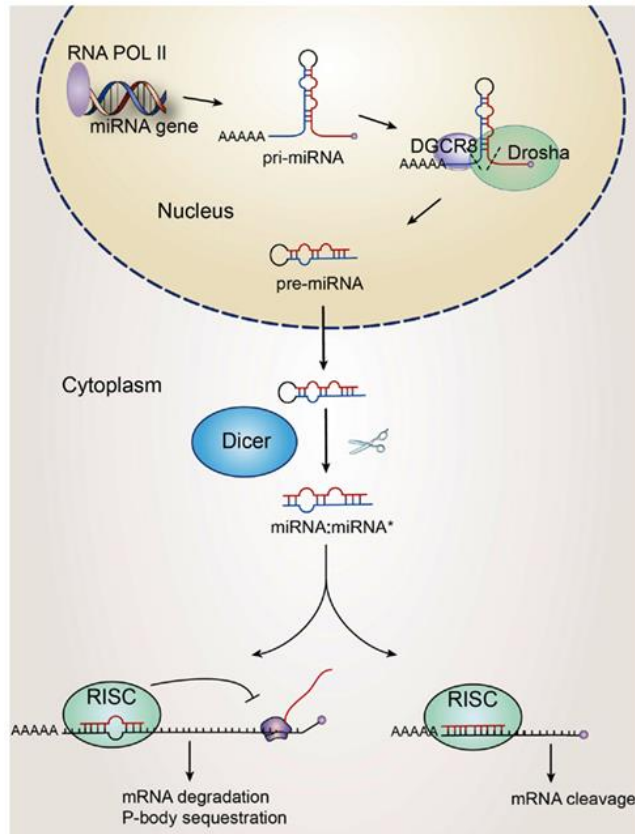


# I microRNA controllano l'espressione degli IEGs

I microRNA (miR) sono molecole di RNA lunghe 22 nucleotidi, a singolo filamento e non codificanti. Molti microRNA si trovano singolarmente nel genoma e sono posti sotto il controllo dei loro specifici promotori. Altri miR sono invece raggruppati e vengono coregolati insieme agli altri membri del gruppo. Il genoma dei vertebrati contiene circa 500 geni codificanti per i microRNA (**Ambros, 2004**).

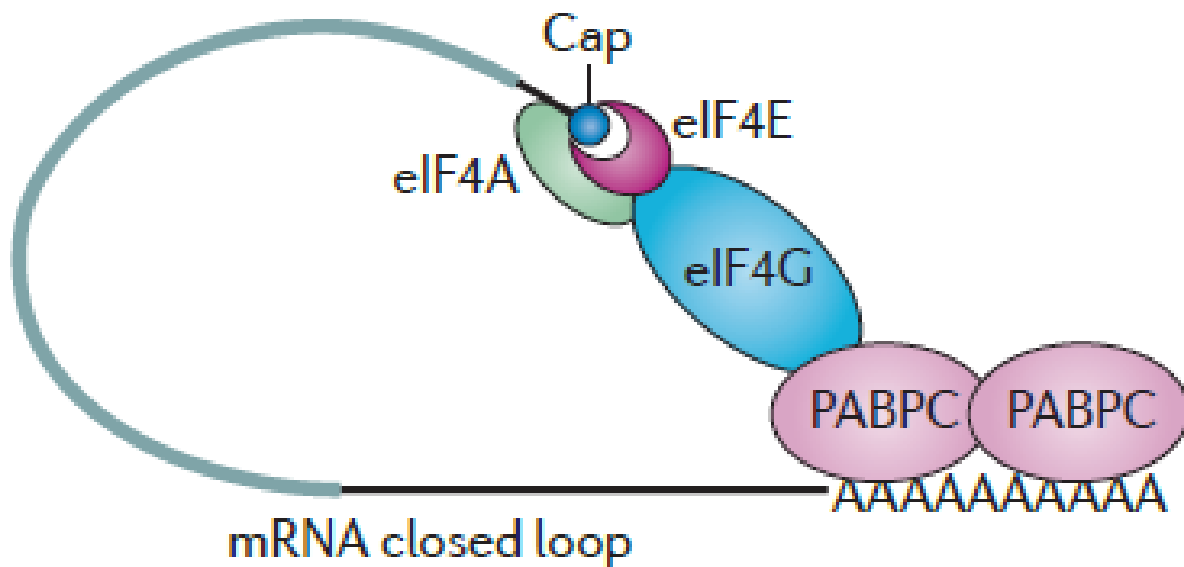
La biogenesi dei miR inizia con una RNA polimerasi II che trascrive una breve sequenza genomica, sintetizzando in questo modo dei microRNA primari (pri-miRNA) che hanno una lunghezza di circa 1000 paia di basi. I pri-miRNA sono costituiti da diversi miR in forma policistronica e sono ripiegati a formare una struttura contenente diverse anse. Le anse sono riconosciute da una RNasi III (DROSHA) che taglia i pri-miRNA formando dei pre-miRNA. I pre-miRNA sono poi trasportati nel citoplasma da una esportina 5. Nel citoplasma la proteina DICER taglia i pre-miRNA completandone la maturazione nella forma finale di 22 nucleotidi a doppio filamento.

I miR a doppio filamento vengono successivamente aperti da elicasi, a partire dall'estremità termodinamicamente più instabile ed il filamento che ha il 5' in questa estremità, diventerà il microRNA maturo (**Krol et al., 2010**).



**Figura 12 (Barca-Mayo e Lu 2012)** Nella figura è mostrato il complesso processo di biogenesi dei microRNA, che partendo da un microRNA primario porta infine alla sintesi di un microRNA maturo di 22 nucleotidi

I miR regolano l'espressione genica, dei bersagli, a livello post-trascrizionale (**Lee et al., 1993**). Esistono due differenti teorie su come avvenga questa regolazione. Secondo una prima teoria la regolazione dell'espressione genica avviene mediante il blocco della traduzione dell'mRNA bersaglio. Un altro filone di ricerca sostiene invece che la regolazione avvenga mediante la degradazione degli mRNA bersaglio (**Huntzinger e Izaurralde, 2011**). Studi recenti sembrano far propendere per quest'ultima ipotesi, infatti la quantità degli mRNA bersaglio e dei miR regolatori sono inversamente proporzionali (**Selbach et al. 2008**) (**Baek, et al., 2008**). Ma quale meccanismo c'è alla base di questa degradazione? Nell'mRNA maturo si distinguono due elementi fondamentali: un "cappuccio" all'estremità 5' e una coda di poly A all'estremità 3'. L'estremità 5' interagisce con un fattore denominato eIF4A mentre con la coda di poly A interagisce con una proteina chiamata PABPC. Questi due fattori inoltre interagiscono tra di loro permettendo la circolarizzazione dell'mRNA maturo. La circolarizzazione è molto importante sia perchè aumenta l'efficienza di traduzione sia perchè protegge l'mRNA dalla degradazione (**Derry et al., 2006**).



**Figura 13 (Huntzinger e Izaurralde, 2011)** Nella figura è riportato il processo di circolarizzazione del microRNA maturo

Il miR maturo interagisce con le proteine argonaute (AGO) formando il complesso miRISCs. Ogni miR ha una sequenza complementare all'mRNA bersaglio, e in questo modo il miR permette l'interazione tra complesso RISC e il bersaglio specifico. Dopo il legame con il complesso RISC, l'mRNA bersaglio è avviato verso un processo di "smontaggio": inizialmente interviene un complesso di deadenilasi costituito dalle proteine CAF1-CCR4-NOT, che eliminano la coda di poliadenilazione sull'estremità 3'; successivamente avviene un processo di decappucciamento ad opera della proteina DCP2 (Rehwinkel et al., 2005) (Behm-Ansmant et al., 2006). Gli mRNA così "mutilati" sono infine degradati dalla esonucleasi XRN1.

## **Obiettivi del progetto**

Nel corso del mio progetto di Dottorato, ho studiato sei geni: Egr-1 (e le sue isoforme 2, 3 e 4), c-Fos e c-Jun. Questi geni sono implicati in molti aspetti della biologia cellulare. Infatti regolano diverse risposte cellulari, che al variare dello stimolo proveniente dall'ambiente extracellulare, possono stimolare nella cellula proliferazione, differenziamento, senescenza o apoptosi.

Il meccanismo che regola l'espressione di questi geni segue varie tappe ed è molto articolato. Infatti quando giunge un segnale dall'ambiente extracellulare, sono attivati dei recettori sulla membrana della cellula, che avviano delle cascate di segnalazione intracellulari. Grazie a queste vie di trasduzione del segnale, un messaggio proveniente dall'ambiente esterno arriva all'interno del nucleo, dove viene attivata l'espressione di una vasta gamma di geni. I primi geni ad essere espressi sono chiamati "Immediate early genes" (IEGs). Il gruppo degli IEGs conta almeno 100 geni dei quali fanno parte anche i geni a centro dello studio del mio progetto di Dottorato. Questi geni codificano per dei fattori di trascrizione che hanno la funzione di stimolare l'espressione di geni, a cinetiche più lente, implicati nelle risposte cellulari. In questo processo di regolazione si inseriscono anche tutta una serie di altri elementi, quali ad esempio i microRNA, piccole molecole di RNA non codificante con la funzione di modulare l'espressione genica di geni bersaglio.

Tutti questi meccanismi citati, sono stati studiati sul modello umano, mentre esistono poche informazioni sul loro funzionamento negli animali domestici.

L'obiettivo del mio progetto di ricerca è stato quello di studiare, su linee cellulari provenienti da diverse specie animali (bovino, cane, gatto e topo), le cinetiche di espressione di Egr-1/2/3/4, c-Fos e c-Jun, le vie di trasduzione che ne controllano l'espressione e il ruolo di quei regolatori, quali ad esempio i microRNAs, implicati nella modulazione fine della loro espressione.

La comprensione di tali meccanismi sta alla base di possibili applicazioni in ambito veterinario e di una possibile traslationalità sul modello umano.

## **Materiali e metodi**

## Reagenti

Tutti I reagenti, a meno che non sia specificato, sono della Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita insulino simile di tipo I (IGF-I) sono della Immunotools (Friesoythe, Germany Friesoythe, Germany) e sono stati risospesi in acqua + 0,1% BSA; UO126, Wortmannina e phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) sono della LC Laboratories (Woburn, MA, USA) e sono stati risospesi in DMSO;

Il saggio (DC) per la valutazione dell'espressione proteica è stato condotto utilizzando materiale della Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Le membrane di nitrocellulosa "Hybond Enhanced Chemiluminescence (ECL)" sono della GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK); Il Clarity Western ECL per lo sviluppo delle lastre del western blot è della Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA); Le lastre CL-XPosure Film sono della Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

Gli anticorpi "rabbit" policlonali Anti-Egr-1 (1:1000; Sc-189), anti-Erk 1 (1:1000; Sc-94), anti-c-Fos (1:1000, Sc-52) e anti-IGF-IR alpha (1:1000; Sc-712) sono della Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Gli anticorpi "mouse" monoclonali anti- $\alpha$ -tubulina (1:5000) e anti-phospho-Erk 1/2 (1:5000; M 8159) sono della Sigma-Aldrich;

L'anticorpo "mouse" monoclonale anti-phospho-Akt (1:1000; #4051; ser-473), gli anticorpi "rabbit" policlonali anti-Akt (1:1000; #9272) e anti-EGFR (1:1000; #2232) sono della Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA); L'anticorpo "rabbit" policlonale anti-Keratin 14 (1:500; Poly19053) è della BioLegend (Dedham, MA, USA); L'anticorpo "mouse" monoclonale anti-Keratin 18 (1:200; RGE 53) è della Progen Biotechnik (Heidelberg, Germany).

## Linee cellulari

NMuMG, linea cellulare mammaria epiteliale di topo (ATCC numero CRL-1636), è stata gentilmente fornita da R. Montesano (University of Geneva Medical School, Switzerland) è stata coltivata in DMEM con il 10% di siero fetale bovino (FBS).

BME-UV, linea cellulare mammaria epiteliale di bovino, gentilmente fornita da I. Politis (Agricultural University of Athens, Athens, Greece; (Zavizion, B. et al. 1996) è stata coltivata in DMEM con aggiunto il 10% di siero fetale bovino (FBS).

Le GH2, sono cellule mammarie epiteliali di gatto ottenute da una ghiandola mammaria sana dopo mastectomia eseguita su un gatto con un tumore mammario (il tumore era presente nella ghiandola mammaria inguinale mentre le cellule mammarie sono state isolate dalla ghiandola mammaria toracica). Il consenso per la chirurgia è stato fornito dal proprietario dell'animale e approvato dalla commissione etica del Dipartimento di Scienze Veterinarie. Le cellule GH2 sono state isolate seguendo il seguente protocollo:

Il tessuto mammario fresco è stato dissezionato, triturato e trasferito in una falcon da 50 ml contenente un terreno di dissociazione composto da DMEM/F12 (in rapporto 1:1 v/v), 2% p/v di sieroalbumina

bovina (BSA, Fraction V), 300 U/ml collagenasi, 100 U/ml ialuronidasi, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina. Il tessuto è stato successivamente sottoposto ad agitazione a 37° per 3 ore. Mediante centrifugazione a 80 g per 30 secondi è stata ottenuta una frazione contenente aggregati di cellule epiteliali successivamente sottoposta a 3 lavaggi in DMEM/F12 fresco. Gli aggregati sono poi stati dissociati mediante incubazione in una soluzione contenente 0.5 mg/ml di tripsina e 0.2 mg/ml EDTA mantenendoli in costante agitazione meccanica per 4 minuti; successivamente la soluzione è stata lavata con una soluzione salina di Hank's (HBSS, STEMCELL Technologies) al 2% FBS. Le cellule sono state poi trattate per 3 minuti con 5 mg/ml dispasi e 100 µg/ml DNAsi e successivamente filtrate mediante "Cell Strainer" (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) da 40 µm per rimuovere gli aggregati cellulari.

Le cellule GH2 sono state poi coltivate, su piastre il cui fondo è stato rivestito di collagene, con terreno DMEM/F-12 arricchito con tossina colerica (100 ng/ml), insulina (10 µg/ml), idrocortisone (0.5 µg/ml), EGF (20 ng/ml) e 5 % di siero di cavallo.

Le cellule CF33, una linea cellulare di tumore mammario di cane, sono state ottenute da "American Type Culture Collection" (Manassas, VA, USA). Le CF33 sono state tenute in coltura con DMEM arricchito con il 10% di siero fetale bovino (FBS).

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in un incubatore a 37 °C al 5% di CO<sub>2</sub> e sistematicamente passate, quando confluenti, attraverso lavaggio con PBS seguito da tripsinizzazione.

## Immunofluorescenza

Le linee cellulari sono state fatte crescere su piastre da 6 cm e successivamente fissate, a temperatura ambiente per 30s, mediante l'aggiunta di una soluzione di acetone e metanolo (in proporzione 1:1), seguita da due lavaggi con una soluzione di tris buffer portato a temperatura ambiente. I siti di aspecificità sono stati bloccati mediante l'aggiunta di una soluzione contenente siero di capra al 10%, mantenuta sulle piastre per 60 minuti a temperatura ambiente. Dopo i 60 minuti sono stati effettuati 3 lavaggi con tris ( da 5 minuti ognuno). Successivamente le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 60 minuti con gli anticorpi primari anti cheratina 14 e anti cheratina 18 preparati come descritto nella sezione reagenti. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate tre volte per cinque minuti con una soluzione di tris e incubate con un anticorpo secondario hrp coniugato sempre per un'ora. Dopo l'incubazione è stato utilizzato 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, Sigma-Aldrich) al fine di evidenziare i nuclei delle cellule presenti nei campioni.



## Estrazione di RNA e real time PCR quantitativa

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule mammarie usando il kit Aurum™ Total RNA Mini (Bio-Rad Laboratories) seguendo le istruzioni del produttore. Per la rimozione del DNA genomico contaminante, l'RNA totale risultante è stato sottoposto ad incubazione con DNasi I. Un microgrammo di RNA totale è stato retroscritto con il kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories) usando una miscela di oligo(dT) e "random primers" seguendo le istruzioni del produttore. La real-time PCR è stata utilizzata per misurare la quantità dei geni di interesse in relazione alla quantità degli mRNA di HPRT-1 (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1) e GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). HPRT-1 e GAPDH sono stati utilizzati come normalizzatori rispetto la concentrazione del campione e l'efficienza di retroscrittura, in quanto la loro espressione è stabile, nelle linee cellulari utilizzate, nelle condizioni sperimentali studiate. Le efficienze per i vari geni sono state calcolate mediante curve di diluizione standard e utilizzate per effettuare la correzione rispetto il processo di amplificazione. La specificità di ogni amplificazione è stata confermata da un iniziale sequenziamento del prodotto di reazione e da una successiva verifica della curva di dissociazione consistente in un singolo picco. I cDNA diluiti ( 1:20, 30 ng per reazione) sono stati utilizzati per delle real-time PCR (CFX Connect real-time PCR system; Bio-Rad Laboratories) utilizzando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). I parametri utilizzati per le real-time PCR sono stati: ciclo 1, 95 C per 30 s; cycle 2, 95 C 10 s, 60 C 30 s per 40 cicli. Le analisi quantitative e la correzione per l'efficienza sono state calcolate con il software CFX Manager versione 3.1 (Bio-Rad Laboratories) usando il metodo D(DCT) da Livak and Schmittgen (2001) e comparati al campione controllo (CTRL=1). I primer sono stati utilizzati alla concentrazione finale di 250nM (MWG-Biotech; Ebersberg, Germania). I dettagli sui primer sono presenti nella tabella inserita in fondo al capitolo.

## Analisi delle citodieresi cellulari attraverso time lapse in video microscopia

Le cellule sono state piastrate e coltivate nel loro specifico terreno di crescita alla confluenza del 20-30% e successivamente lasciate in terreno di crescita (GM) oppure coltivate in un terreno deprivato di siero e fattori di crescita (ST) e fotografate per 24 h ad intervalli di 4 minuti ( 360 frame totali) con un microscopio Leica AF6000 LX (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipaggiato con una camera Leica DFC350FX digital. Tutte le cellule presenti all'interno di un campo di 10x sono state seguite dal tempo 0 sino alle 24 ore e il frame nel quale l'evento di citodieresi si è verificato è stato registrato. Infine il numero totale di divisioni verificatisi ogni ora è stato calcolato e diviso per il numero medio di cellule presenti all'interno di uno stesso intervallo temporale (numero di divisioni in un'ora/ numero di cellule).

## Analisi del ciclo cellulare

Per le analisi sul ciclo cellulare le cellule sono state piastrate su piastre da 6 cm e coltivate con il loro terreno specifico. Successivamente alcune piastre sono state ancora coltivate in terreno di proliferazione e altre invece in terreno di starving (deprivato dei principali fattori di crescita) per 16 h. Le cellule sono state poi tripsinizzate, lavate con PBS, fissate per 1 h in 50% di etanolo (in PBS), poi centrifugate, risospese in PBS e colorate con DAPI (1 g/ml concentrazione finale) per 2 h a 37 C°. I campioni sono stati analizzati in un citometro Attune Acoustic Focusing (Applied Biosystems) e la distribuzione delle cellule tra le fasi G0/G1 e G2/M del ciclo cellulare è stata calcolata usando il software Attune Cytometric (Applied Biosystems). Ogni esperimento è stato ripetuto per quattro volte in maniera indipendente.

## Western blot

Per le analisi di western blot, tutte le linee cellulari sono state piastrate in piastre 6-well e portate ad una confluenza di circa il 50%. Quando richiesto le cellule sono state tenute per 16 h in terreno deprivato dei principali fattori di crescita. Le citochine indicate sono state aggiunte per un'ora. UO126 (20  $\mu$ M) e Wortmannina (100  $\mu$ M) sono stati risospesi in dimethyl sulfoxide (DMSO) alla concentrazione di 1000x e aggiunti un'ora prima della lisi o del trattamento indicato. Nei campioni controllo è stata aggiunta una quantità equivalente di DMSO. Le cellule sono state lavate con PBS freddo, lisate e staccate mediante uno scraper mentre si trovavano in buffer di lisi (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X 100, 1 mM  $\beta$ -glycerolphosphate) con aggiunto un mix di inibitori proteici (1:100) e 1mM di ortovanadato di sodio. I lisati proteici (10mg) sono stati separati, mediante centrifugazione a 4 C° per 10 minuti a 12000g, dagli scarti cellulari dovuti alla lisi, quantificati mediante un kit DC Protein Assay e fatti correre su dei gel SDS-PAGE al 10% e trasferiti su membrane di nitrocellulosa Hybond-C Extra. Dopo il trasferimento delle proteine, le membrane sono state bloccate mediante incubazione a temperatura ambiente per 2 h con un buffer salino (TBS, 10mM Tris e 150 mM NaCl pH 7.4) contenente il 10% di BSA e successivamente incubate overnight a 4 C° con l'anticorpo primario appropriato. Le membrane sono state lavate sei volte (ad intervalli di 5 minuti) con TBS-Tween e successivamente incubate per 1 h a temperatura ambiente con un anticorpo secondario Hrp coniugato. Le membrane sono state nuovamente lavate per 6 volte con TBS-Tween ed incubate per 5 minuti a temperatura ambiente con un kit Clarity Western ECL Substrate. Le proteine sono state visualizzate esponendo brevemente la membrane ad una lastra autoradiografica CL-XPosure Film. Analisi densitometriche per citocheratina 18 e per i livelli di p-Erk 1/2 sono state condotti utilizzando il software ImageJ 1.50 (National Institutes of Health, USA) con tubulina totale ed Erk utilizzati come normalizzatori interni (rispettivamente per Krt18 e p-Erk).

## Analisi dei microRNA

Per quantificare l'espressione dei miR 29a-3p , miR 155, miR 183-5p e miR 191-5p sono stati retrotrascritti 100ng di RNA totale utilizzando il kit TaqMan miRNA Reverse Transcription e sottoposti a q-PCR usando il kit TaqMan miRNA Assay (Applied Biosystems) in accordo con il protocollo fornito dal produttore (miR ID: 29a-3p (478587), 155-5p (477927), 183-5p (002269), 191-5p (002299). Il miR 16 è stato utilizzato per normalizzare i risultati. Per la q-PCR sono stati utilizzati i seguenti parametri: ciclo 1, 95°C for 3 min; ciclo 2, 95°C per 15 s, 60°C per 30 s per 44 cicli. Ogni reazione è stata fatta in triplicato e nei campioni controllo senza template è stata utilizzato acqua al posto del cDNA.

## Analisi statistica

I dati sperimentali sono presentati come media  $\pm$  sem. Le differenze statistiche tra i vari trattamenti sono state calcolate con un test ANOVA usando Statgraphics package (STSC Inc., Rockville, MD, USA). Quando sono state riscontrate differenze significative, le medie statistiche sono state comparate da un student's t-test disaccoppiato. Per tutti i test, i livelli di significatività statistica sono stati settati a  $p < 0.05$ .

## Tabella primers

Gene	Specie	Accesion number	Primer Forward	Primer Reverse	amplicone
Egr-1	Bos t.	NM_001045875.1	AGCCCTACGAGCACCTGAC	GGTTTGGCTGGGGTAACTC	92
	Canis f.	XM_846145.3	ACCTGACCGCAGAGTCTTTT	GTGGTTTGGCTGGGGTAACT	82
	Felis c.	XM_003980809.3	Stesso di Canis f.	Stesso di Canis f.	82
	Mus m.	NM_007913.5	AACCCTATGAGCACCTGAC	CGTTTGGCTGGGATAACTC	92
Egr-2	Bos t.	XM_003585156.4	TTTTCCCAATGCCGAAGT	GCCTGCACTACAATGTTGA	245
	Canis f.	XM_536361.5	TCTTCCCAATGCCGAAGT	TGTTGATCATGCCATCTCCG	75
	Felis c.	XM_003993969.3	Stesso di Canis f.	Stesso di Canis f.	72
	Mus m.	NM_010118.3	CTCGTCGGTGACCATCTTCC	TTGATCATGCCATCTCCCGC	84
Egr-3	Bos t.	NM_001289818.1	CGCGCTCAACCTCTTTTCTG	TCCATCACATTCTCTGTAGCCA	75
	Canis f.	XM_543247.5	TGGCTACAGAGAATGTGATGGAC	CCCGAATAAGAGAGTTCCGGG	70
	Felis c.	XM_003984699.3	Stesso di Canis f.	Stesso di Canis f.	70
	Mus m.	NM_018781.3	ACAATCTGTACCCCGAGGAGA	TCACATTCTCTGTAGCCATCTGA	99
Egr-4	Bos t.	NM_001040497.1	CACCTTAGCGAGTTTTCCGG	GAGGCAGGAGTCGGTTAAGT	195
	Canis f.	XM_540228.5	ATCCAAGCAGTACCCGAACA	ATCCGGGGAGTAAAGGTCCG	183
	Felis c.	XM_006930186.2	Stesso di Canis f.	CCAGATCCGGGGAGTAAAGG	187
	Mus m.	NM_020596.2	CTTCTTCATCCAGGCGGTTT	CTTCTTCATCCAGGCGGTTT	192
c-Fos	Bos t.	NM_182786.2	AGGCGAATCCGAAGGGAAAAG	AGTTGGTCTGTCTCCGCTTG	98
	Canis f.	XM_547914.5	CCAAGCGGAGACAGACCAAC	TCCTTCAGCAGGTTGGCAAT	72
	Felis c.	NM_001009341.1	CCAAGCGGAGACAGATCAAC	Stesso di canis f.	72
	Mus m.	NM_010234.2	TGACAGATACACTCCAAGCGGA	CAAGGTCATCGGGGATCTTGCA	150
c-Jun	Bos t.	NM_001077827.1	CGGCGCAGCCGGTCTA	CGCCGTAGGAGGGTGC	81
	Canis f.	XM_005620245.2	CAAGTGCCGAAAAGGAAGC	CGAGTTCTGCGCTTTCAAGG	76
	Felis c.	XM_011284967.2	Stesso di canis f.	Stesso di canis f.	76
	Mus m.	NM_010591.2	GGAACAGGTGGCACAGCTTA	GCTGCGTTAGCATGAGTTGG	74
Krt-14	Bos t.	NM_001166575.1	TTGCAAAACCTGGAGATCGA	CACGCTGCTGATCAGCTCCT	129
	Canis f.	NM_001253741.1	GTGCAGAACCTGGAGATCGA	CACGTTGCCAATCAGGTCCT	129
	Felis c.	XM_003996860.3	Stesso di Canis f.	CACGTTGCCGATCAGGTCCT	129
	Mus m.	NM_016958.2	ATGCAGAACCTGGAGATCGA	CACACTGCCGATCATCTCCT	129
Krt-18	Bos t.	NM_001192095.1	AAGGGTCTACAAAACCAGATTG	CTGCGAGGTGACCACTGTGG	192
	Canis f.	XM_534794.5	AAGGGTCTACAAAACCAATCG	CTGTGTGGTGACCACTGTGG	192
	Felis c.	XM_003988746.2	AAGGGTCTACAAAACCAATTG	CTGGGAGGTGATCACTGTGG	192
	Mus m.	NM_010664.2	AAGGTCTGGAAGCCCAGATT	CTTGGTGGTGACAACTGTGG	191
IGF-IR	Bos t.	NM_001244612.1	AGCTGATGTGTACGTTTCTGAC	CTCATCCTTGACCACGCC	127
	Canis f.	XM_545828.5	GGACGCAGTATGCGGTTTAT	AGAGAGGGTGGGTTCCACTT	187

	Felis c.	XM_003986871.2	GACTAAAGCCTTGGACGCAGT	TGGAAGGAACTGAAGCATTGG	129
	Mus m.	NM_010513.2	CTTTCCGAGGATCGTCGCCT	CGGGCCCACAGATTTCTCC	247
Insulin R	Bos t.	XM_015464089.1	ACGCTAGGCCTTCGAGGAAA	CACGGCTGCTGTACATTC	62
	Canis f.	XM_005633222.1	GATCTAGCAGCCCCGAACTG	AGTGGTAAAGACCCCGTCCT	171
	Felis c.	XM_011288834.1	TCGGTTTCGAATTCCTCCTCT	GGAAGGCAGCTTCAACCCTTT	159
	Mus m.	NM_010568.3	TCAGCCAGTCTTCGAGAACG	AAGAAGGCGGACCACATGAT	87
EGFR	Bos t.	XM_002696890.4	CTTCGGCTGCCTGCTGGACTA	CCAGGTAATTCATGCCCTTTGC	104
	Canis f.	XM_014120756.1	GGACTATGTCCGCGAGCACAA	CCAGGTAGTTCATGCCCTTTGC	89
	Felis c.	XM_006929086.2	Stesso di Canis f.	CCAGGTAGTTCATGCCCTTCGC	89
	Mus m.	NM_207655.2	GGACTACGTCCGAGAACACAA	CCAGGTAGTTCATGCCCTTTGC	89
Erb-B2	Bos t.	NM_001303629.1	CTGAACTGGTGTGTGCAGATTG C	CATGGTTGGGACTCTTGACCA	177
	Canis f.	NM_001003217.2	CTGAACTGGTGTGTGCAGATTG	CATGGTTGGGACTCTTGACCA	109
	Felis c.	NM_001048163.1	Stesso di Bos t.	CGTGGTTGGGACTCTTGACCA	109
	Mus m.	NM_001003817.1	CTCAACTGGTGTGTTCAGATTGC	CGTGGTTGGGACTCTTGACTA	109
ERalfa	Bos t.	NM_001001443.1	AGGGAAGCTCCTATTTGCTCC	CGGTGGATGTGGTCCTTCTCT	234
	Canis f.	NM_001286958.1	AGGGAAGCTCTTCTTTGCTCC	CGGTGGATATGGTCCTTCTCT	234
	Felis c.	NM_001024231.1	Stesso di Bos t.	CGATGGATATGGTCCTTCTCT	234
	Mus m.	NM_007956.5	GGGGAAGCTCCTGTTTGCTCC	Stesso di Bos t.	234
ERbeta	Bos t.	NM_174051.3	GCTTCGTGGAGCTCAGCCTG	AGGATCATGGCCTTGACACAGA	262
	Canis f.	XM_005623489.2	GCTTTGTGGAGCTCAGCCTC	AGGACCATGGCCTTGACACAGA	262
	Felis c.	XM_006932907.2	GCTTTGTGGAGCTCAGCCTG	Stesso di Canis f.	262
	Mus m.	NM_207707.1	Stesso di Felis c.	AGAATCATGGCCTTCACACACA	316
PR	Bos t.	NM_001205356.1	GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG	CACCATCCCTGCCAATATCTT	227
	Canis f.	NM_001003074.1	GAGAGCTCATCAAAGCAATTGG	CACCATCCCTGCCAAGATCTT	227
	Felis c.	XM_011286504.1	Stesso di Bos t.	Stesso di Canis f.	227
	Mus m.	NM_008829.2	GCGAATTGATCAAGGCAATTGG	CACCATGCCCGCCAGGATCTT	227
P53	Bos t.	NM_174201.2	GAACAGCTTTGAGGTGCGTG	TGCCCTTCTTGCGAAGATT	81
	Canis f.	NM_001003210.1	GGCACCTATGGGTTCCGTTT	GGAGAGGGGAGTACGTCCAA	76
	Felis c.	NM_001009294.1	TGTAACAGTTCCTGCATGGGG	CAGCAGCTTCCCATTGGAGT	84
	Mus m.	NM_021897.3	GACTTCATAGATACCTGCCC	ATTGGACAGGACTCAAAGT	173
Ciclina D1	Bos t.	NM_001046273.2	GCCCTCGGTGTCTACTTCA	CTCGCAGACCTCCAGCATC	91
	Canis f.	NM_001005757.1	CGACGAACTGCTGCAAATGG	GATGAAGTCGTGTGGGGTCA	82
	Felis c.		GCCTCCAAGATGAAGGAGACC	Stesso del Bos T.	
	Mus m.	NM_007631.2	CATCAAGTGTGACCCGGACT	CAGGCTTGACTCCAGAAGGG	70
NAB 1	Bos t.	XM_010801794.2	AGCTCACAGCAGCCTGAAAA	TGTCATAGCCAGCTTGGGTG	70
	Canis f.	XM_545569.6	GTTACACAGCAGCCTGAAAAGG	ATGCTGCAGTCTCTCATAGCC	80

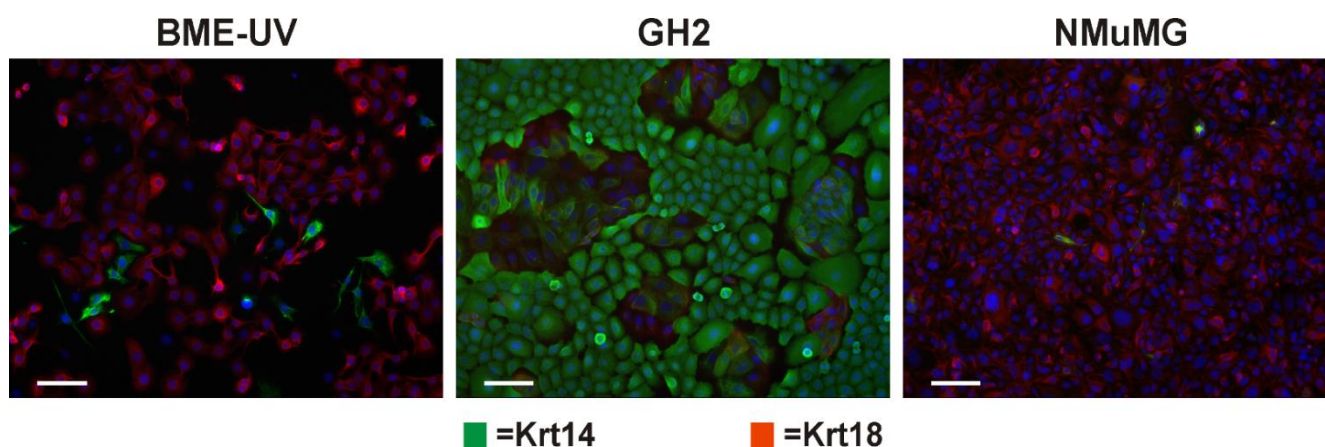
	Felis c.	XM_019838383.1	ACCCCATCATTTTGTGGTGA	CCCAAGACTCTCTGACTGGG	79
	Mus m.	XM_006495770.2	ATGGATTTCCCGACTTCCAGG	TTCAGCCTGCTGTGAACCGA	98
pTEN	Bos t.	NM_001319898.1	CCAATTCAGGACCCACACGA	TGTCACCACACACAGGCAAT	78
	Canis f.	NM_001003192.1	GTGGCGGAACTTGCAATCCT	AACTTGTCTTCCCGTCGTGT	94
	Felis c.	XM_019814227.1	Stesso di Canis F.	Stesso di Canis F.	94
	Mus m.	NM_008960.2	TCCTGCAGAAAGACTTGAAGGT	TGCTTTGAATCCAAAAACCTTACT	72
HPRT-1	Bos t.	NM_001034035.2	CACTGGGAAGACAATGCAGA	GGTCCTTTTCATCAGCAAGCT	92
	Canis f.	NM_001003357.2	CACTGGGAAAACAATGCAGA	ACAAAGTCAGGTTTATAGCCAAC A	123
	Felis c.	XM_006944016.2	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTCTTCACCAGCAAGCT	94
	Mus m.	NM_013556.2	TGACACTGGtAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	94
GAPDH	Bos t.	NM_001034034.2	ACTTATGACCACTGTCCACGC	GATATTCTGGGCAGCCCCTC	100
	Canis f.	NM_001003142.2	TGAACGGATTTGGCCGTATTGG	TGAAGGGGTCATTGATGGCG	90
	Felis c.	NM_001009307.1	Stesso di Canis f.	Stesso di Canis f.	93
	Mus m.	NM_001289726.1	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87

## **Risultati del progetto**

## Caratterizzazione delle linee cellulari

Le linee cellulari utilizzate per questa ricerca sono state colorate mediante immunofluorescenza, al fine di verificare la presenza dei marcatori caratteristici delle differenti popolazioni epiteliali mammarie. È stata effettuata una doppia marcatura per citocheratina 14 (Krt 14), marcatore caratteristico delle cellule epiteliali mammarie del sottotipo basale, e citocheratina 18 (Krt 18), marcatore specifico del sottotipo luminale. In un primo momento il saggio è stato condotto sulle linee cellulari di topo (NMuMG), bovino (BME-UV) e cane (CF33). Ciò ha permesso di osservare che le NMuMG sono un clone quasi esclusivamente positivo a Krt 18 con pochissime cellule positive a Krt14 (meno dell'1%); anche le BME-UV sono quasi tutte positive a Krt 18 con un limitato numero di cellule (meno del 10%) positive a Krt14 (Figura 14). Le CF33 risultano invece negative ad entrambi i marcatori (dato non mostrato).

Durante il terzo anno è stata isolata, a partire da una ghiandola mammaria sana, una linea cellulare primaria di gatto (vedi materiali e metodi). Tale linea cellulare è stata chiamata GH2. La caratterizzazione di questa linea ha evidenziato un'elevata positività a Krt 14 con la presenza di "isole" positive a Krt 18 (Fig. 14). Questi dati sono stati confermati mediante real-time PCR (Fig. 15).



**Figura 14** Immunofluorescenza di cellule epiteliali mammarie non tumorali per i marcatori citocheratinici. Le cellule BME-UV (bovino) e le NMuMG (topo) sono per lo più positive a Krt 18 mentre le GH2 (gatto) sono positive per Krt 14 con una piccola percentuale di cellule positive a Krt 18 che tende ad essere raggruppata in isolotti. Barre = 100  $\mu$ m **Fonte: Santino et al. General and Comparative Endocrinology, 2017**

Cell line	Cq (mean $\pm$ SEM)	
	Krt14	Krt18
BME-UV GM	23,9 $\pm$ 1,5	15,6 $\pm$ 1,3
BME-UV ST	22,4 $\pm$ 1,2	14,8 $\pm$ 1,1
CF33 GM	> 30,0	29,3 $\pm$ 1,6
CF33 ST	> 30,0	28,3 $\pm$ 1,7
GH2 GM	16,9 $\pm$ 0,9	21,8 $\pm$ 1,0
GH2 ST	17,4 $\pm$ 1,0	22,1 $\pm$ 1,1
NMuMG GM	29,0 $\pm$ 1,4	14,5 $\pm$ 0,9
NMuMG ST	28,8 $\pm$ 1,6	15,2 $\pm$ 0,8

**Figura 15** Valori dei Cq, ottenuti mediante Real-time PCR, dei marcatori Krt 14 e Krt18 sulle quattro linee cellulari oggetto dello studio. I valori di Cq sono stati calcolati sia sulle cellule in terreno di proliferazione (GM) che sulle cellule in terreno deprivato (ST) **Fonte: Santino et al.. General and Comparative Endocrinology, 2017**



## Livelli di espressione basale di Egr-1, 2, 3, 4, c-Fos e c-Jun nelle linee cellulari epiteliali mammarie

Per studiare il comportamento dei geni immediate early oggetto dello studio, abbiamo inizialmente analizzato il loro livello di espressione in due differenti condizioni: cellule coltivate con il loro specifico terreno di crescita e cellule coltivate per 16 ore, con terreno di coltura privato di qualsiasi supplemento (terreno di starving). I livelli di espressione sono stati valutati in maniera indiretta mediante la quantificazione dei valori di Cq (Figura 16). E' stato possibile osservare che, nonostante alcuni dei geni analizzati siano importanti per la proliferazione cellulare, i loro livelli di espressione non hanno evidenziato differenze significative tra le due differenti condizioni di trattamento.

	Cq (media $\pm$ deviazione standard)					
	Egr-1	Egr-2	Egr-3	Egr-4	c-Fos	c-Jun
<b>BME-UV GM</b>	23,1 $\pm$ 1,4	29,6 $\pm$ 1,7	34,5 $\pm$ 1,2	36,4 $\pm$ 1,3	23,6 $\pm$ 0,6	23,7 $\pm$ 1,8
<b>BME-UV ST</b>	23,6 $\pm$ 1,2	29,4 $\pm$ 1,5	31,2 $\pm$ 2,0	35,8 $\pm$ 1,4	24,5 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 0,8
<b>CF33 GM</b>	26,5 $\pm$ 0,7	29,8 $\pm$ 1,4	31,8 $\pm$ 1,4	33,0 $\pm$ 1,6	29,2 $\pm$ 0,4	21,7 $\pm$ 0,7
<b>CF33 ST</b>	25,4 $\pm$ 1,2	28,5 $\pm$ 1,3	32,3 $\pm$ 1,3	32,0 $\pm$ 1,7	28,9 $\pm$ 0,4	21,8 $\pm$ 0,4
<b>GH2 GM</b>	24,6 $\pm$ 1,2	28,0 $\pm$ 1,6	27,2 $\pm$ 0,9	30,7 $\pm$ 1,4	27,6 $\pm$ 2,6	26,2 $\pm$ 2,3
<b>GH2 ST</b>	24,8 $\pm$ 1,1	27,5 $\pm$ 1,9	27,6 $\pm$ 1,0	30,9 $\pm$ 1,3	26,5 $\pm$ 0,5	25 $\pm$ 1,0
<b>NMuMG GM</b>	25,4 $\pm$ 0,8	32,0 $\pm$ 0,9	31,7 $\pm$ 0,9	36,8 $\pm$ 1,8	29,4 $\pm$ 1	24,2 $\pm$ 1,2
<b>NMuMG ST</b>	24,0 $\pm$ 0,9	30,2 $\pm$ 1,0	29,8 $\pm$ 1,2	36,2 $\pm$ 1,3	28,33 $\pm$ 0,8	23,4 $\pm$ 1,6

**Figura 16** Livelli di Cq di Egr-1, Egr-2, Egr-3, Egr-4, c-Fos e c-Jun in cellule epiteliali mammarie coltivate nel loro specifico terreno di proliferazione (GM) o in terreno di starving (ST) per 16 h. Ogni numero rappresenta la media  $\pm$  errore standard di quattro replicati sperimentali.

Per capire questi risultati, abbiamo acquisiti, mediante microscopia, dei video in time lapse che hanno permesso di quantificare gli eventi di citodieresi avvenuti simultaneamente (ogni ora, ogni cento cellule). Le cellule coltivate con terreno di proliferazione hanno mostrato le seguenti percentuali di eventi: 3,2 $\pm$ 0,8% (NMuMG), 3,6 $\pm$ 1,3% (CF33), 4,4 $\pm$ 1,2% (BME-UV) e 5,8 $\pm$ 0,8% (GH2). Le cellule coltivate in terreno di starving (trascorse circa 14-18 ore dopo la rimozione del terreno di crescita) hanno mostrato le seguenti percentuali di eventi: 1,4 $\pm$ 0,5% (NMuMG), 1,9 $\pm$ 0,5% (CF33), 2,4 $\pm$ 0,9% (BME-UV) e 3,4 $\pm$ 1,0% (GH2) (Figura 17 A).

Questi dati indicano che la percentuale di eventi di citodieresi nelle cellule coltivate in terreno di starving è stata pari circa alla metà di quella in terreno di proliferazione ma mostrano anche che in entrambe le condizioni sperimentali, la percentuale di cellule presenti esattamente nella stessa fase del ciclo cellulare è stata molto bassa. In entrambe le condizioni le cellule "desincronizzate" sono state superiori al 94%. Questa situazione non può pertanto essere utilizzata per studiare il comportamento dei geni oggetto del progetto di ricerca, in quanto la desincronizzazione maschera la variazione di espressione genica, che è estremamente rapida, e genera un fortissimo "rumore di fondo". Pertanto, per aumentare la percentuale di cellule sincronizzate nella stessa fase del ciclo cellulare, si è deciso di coltivare le

cellule con il terreno di starving per circa 16 h prima di ogni esperimento. Mediante analisi citofluorimetriche è stato possibile apprezzare come in tutte le linee cellulari mammarie così coltivate, ad eccezione delle BME-UV, la percentuale di cellule sincronizzate nella fase G0/G1 del ciclo cellulare sia aumentata (Figura 17 B).

A)

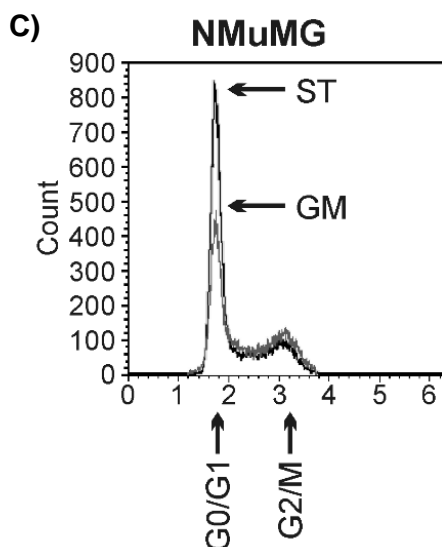
Cytodieresis events/h (%)			
BME-UV GM	4,4 ± 1,2	GH2 GM	5,8 ± 0,8
BME-UV ST	2,4 ± 0,9	GH2 ST	3,4 ± 1,0
CF33 GM	3,6 ± 1,3	NMuMG GM	3,2 ± 0,8
CF33 ST	1,9 ± 0,5	NMuMG ST	1,4 ± 0,5

B)

	% G0/G1	% G2/M
BME-UV GM	61,4±6,0	12,3±3,7
BME-UV ST	49,5±9,0	9,9±1,4
CF33 GM	50,2±4,5	20,0±3,2
CF33 ST	64,9±4,7	14,2±3,1
GH2 GM	32,6±4,2	26,7±5,4
GH2 ST	46,3±6,8	20,5±7,2
NMuMG GM	42,0±3,6	17,7±1,9
NMuMG ST	57,8±5,6	15,8±2,0

**Figura 17 A** media ± errore standard del numero di eventi di citodieresi che si verificano ogni ora ogni 100 cellule in linee cellulari epiteliali mammarie coltivate in terreno di proliferazione o con terreno di starving (da 14 h a 18 h dal momento in cui le cellule vengono messe in terreno di starving). Sono stati acquisiti mediante microscopia dei video in time lapse di campi multipli (n=4) e sono state contate le citodieresi che si sono verificate ogni ora e sono poi state divise per il numero di cellule nel campo. **B** Media ± errore standard della percentuale di cellule in G0/ G1 e G2/ M in cellule mammarie coltivate con terreno di proliferazione (GM) o in condizioni di starving (ST) per 16 h (n=4)

**C** Grafico esemplificativo di ciclo cellulare analizzato tramite FACS in cellule NMuMG (50.000 eventi) nel quale è mostrato la variazione in G0/G1 quando le cellule sono coltivate per 16 h in terreno di starving. **Fonte: Santino et al. General and Comparative Endocrinology, 2017**

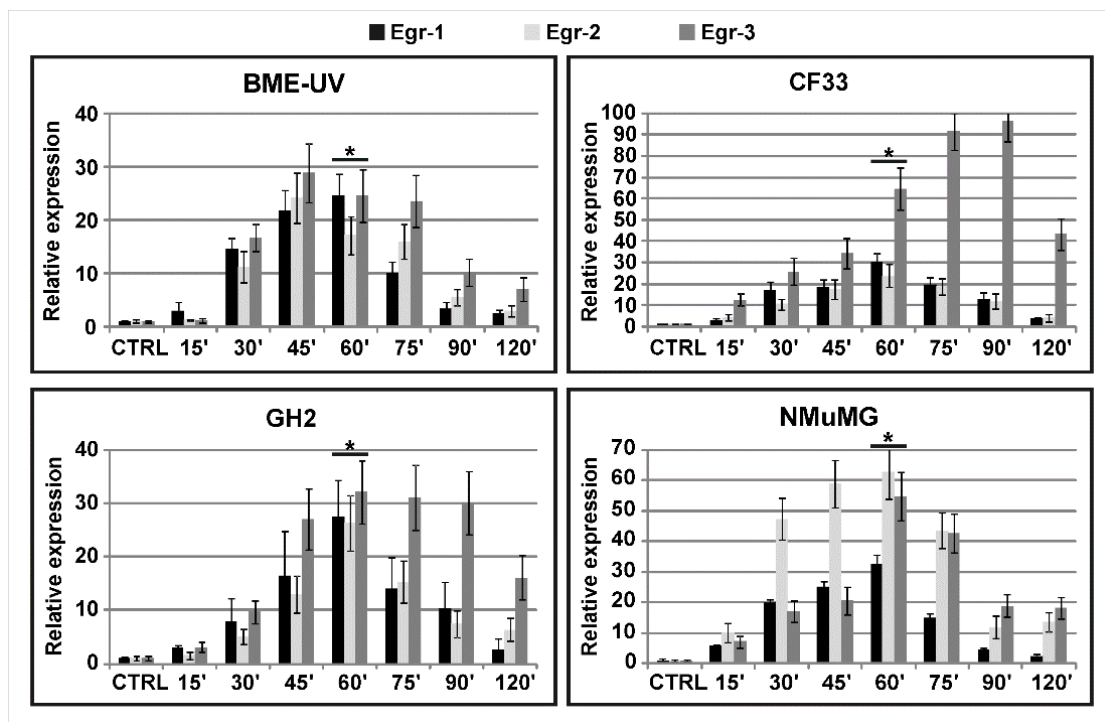


# **Analisi delle cinetiche di espressione degli Immediate early genes (IEGs) in cellule epiteliali mammarie**

Le cellule, sincronizzate nella fase G0/G1 del ciclo cellulare mediante coltura in terreno privo di fattori di crescita per 16 h, sono state stimolate con il terreno di proliferazione specifico (vedi materiali e metodi). L'RNA totale è stato poi estratto a tempistiche crescenti (da 15' fino a 120') dall'inizio del trattamento e, dopo retrotrascrizione, si è proceduto con l'analisi della variazione di espressione genica di Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun mediante real-time PCR. Egr-4 non è stato rappresentato in quanto i valori di espressione sono rimasti costantemente a Cq elevati, difficilmente quantificabili (>30 Cq). Le cellule starvate (CTRL) sono state utilizzate come riferimento con valore impostato a 1. La normalizzazione dei differenti geni è stata fatta utilizzando come geni di riferimento HPRT-1 e GAPDH. Nel calcolo di espressione è stata anche utilizzata l'efficienza di amplificazione, precedentemente calcolata per tutti i geni per i quali il livello di Cq basale fosse sufficientemente basso.

## **Analisi della modulazione di Egr-1, 2, 3**

In tutte le linee cellulari utilizzate, l'espressione genica di Egr-1 e 2 ha raggiunto il picco di espressione tra i 45 e i 60 minuti dopo l'aggiunta del terreno di proliferazione, ed è tornata quasi a valori basali dopo 120 minuti (figura 18). Egr-3 ha mostrato una cinetica di espressione leggermente ritardata, sia in aumento che in diminuzione. In particolare nelle CF33 l'espressione di Egr-3 ha raggiunto il picco tra i 75 e i 90 minuti dopo la somministrazione dello stimolo (figura 18). Egr-4 ha mostrato un andamento simile (dato non mostrato) ma con livelli di espressione nettamente più bassi. Per questo motivo Egr-4 è stato escluso da ulteriori analisi.

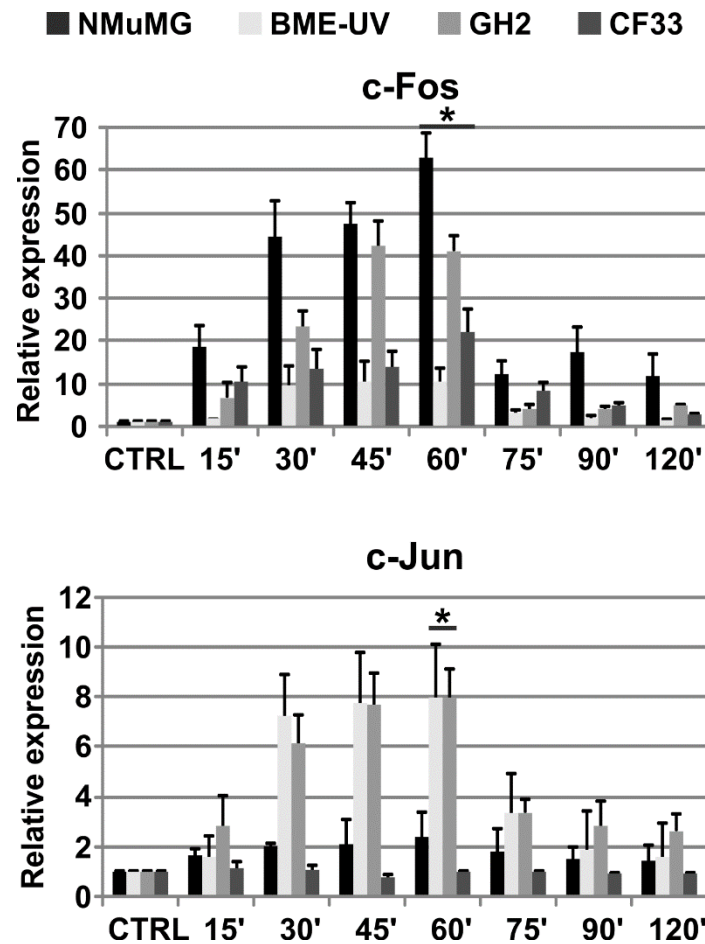


**Figura 18** Time course della variazione nell'espressione genica di Egr-1 (nero), Egr-2 (grigio chiaro) e Egr-3 (grigio scuro) in linee cellulari epiteliali mammarie in seguito a stimolazione con terreno di proliferazione. Le cellule sono state sincronizzate mediante coltura con terreno di starving per 16 h e poi trattate con il loro specifico terreno di proliferazione. L' RNA è stato estratto agli intervalli di tempo segnati e l'espressione genica degli Egr è stata misurata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GAPDH. L'espressione degli Egr al tempo zero è stata impostata a 1(CTRL). Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media di quattro replicati sperimentali \* $P < 0,001$  contro CTRL. **Fonte:** Santino et Al. *General and Comparative Endocrinology*, 2017

## Analisi della modulazione di c-Fos e c-Jun

L'espressione genica di c-Fos, dopo la somministrazione dello stimolo (terreno di proliferazione), ha avuto un andamento simile a quello descritto per Egr-1 e -2, raggiungendo, in tutte le linee cellulari, il picco di espressione tra i 45 e i 60 minuti (Fig. 19).

c-Jun non ha mostrato variazione di espressione, statisticamente significativa, nelle cellule di cane (CF33) e di topo (NMuMG). Nelle BME-UV (bovino) e nelle GH2 (gatto) c-Jun ha avuto un andamento, simile a quello descritto precedentemente per Egr-1, 2 e c-Fos, raggiungendo però picchi di espressione più bassi (Fig. 19).



**Figura 19** Time course della variazione nell'espressione genica di c-Fos e c-Jun in linee cellulari epiteliali mammarie in seguito a stimolazione con terreno di proliferazione.

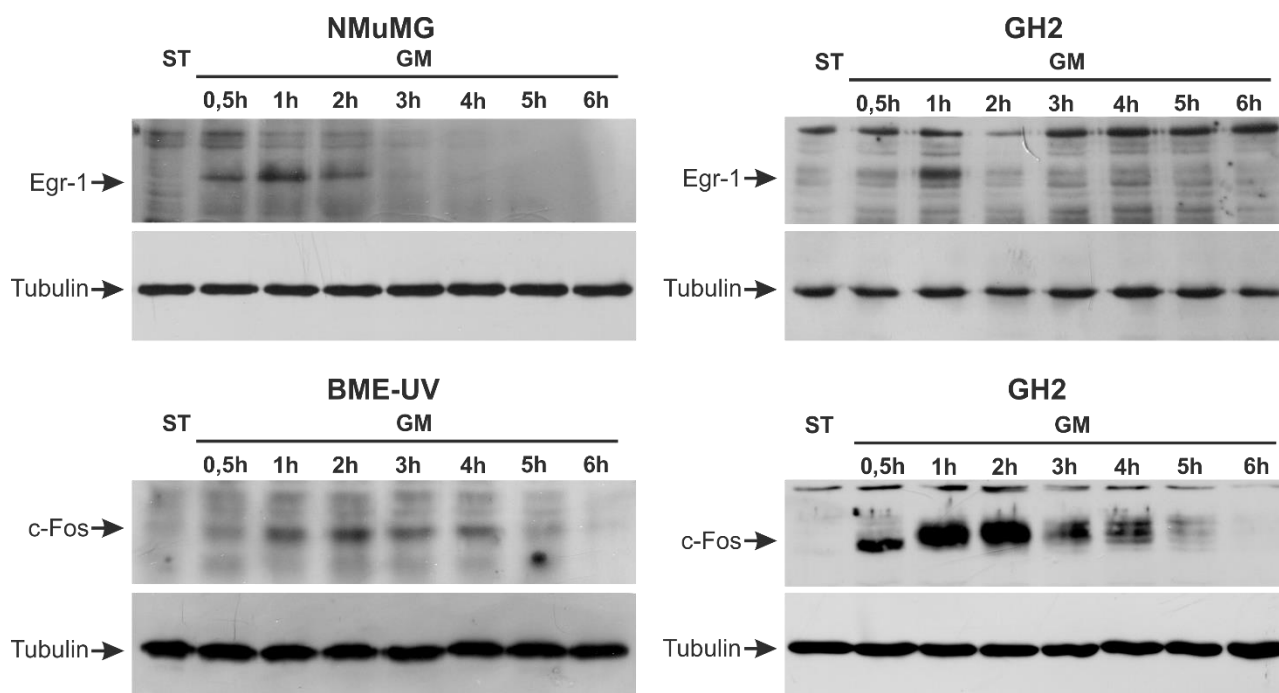
Le cellule sono state sincronizzate in terreno di starving per 16 h e poi trattate con il loro specifico terreno di proliferazione. L'RNA è stato estratto agli intervalli di tempo indicati e l'espressione genica di c-Fos e c-Jun è stata misurata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GAPDH. L'espressione di c-Fos e c-Jun al tempo zero (CTRL) è stata impostata a 1. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media dei quattro replicati sperimentali \* $P < 0,001$  contro CTRL.

## Analisi dell'espressione proteica di Egr-1 e c-Fos

Su tre delle linee cellulari utilizzate (NMuMG, BME-UV e GH2) e solo per due dei geni oggetto del progetto di Dottorato (Egr-1 e c-Fos) è stato possibile analizzare la variazione dell'espressione proteica mediante dei saggi di Western Blot (Figura 20). L'esperimento è stato condotto con modalità analoghe a quelle descritte in precedenza, con l'unica differenza che lo stimolo è stato somministrato per un tempo maggiore (da 30 minuti a 6 ore). Questo approccio ha permesso di osservare come, sia nelle NMuMG che nelle GH2, l'espressione proteica di Egr-1 abbia un andamento simile a quello osservato per l'espressione genica. Infatti l'espressione proteica è aumentata, rispetto al controllo, a 30 minuti dalla somministrazione dello stimolo, raggiungendo il picco dopo un'ora di stimolazione e decrescendo dopo due ore.

Nelle GH2 è stato possibile analizzare anche l'espressione proteica di c-Fos che ha evidenziato una tempistica più "dilatata" nel tempo, rispetto quanto osservato in mRNA, raggiungendo il picco di espressione dopo due ore dalla stimolazione e iniziando a tornare a valori basali dopo circa quattro ore.

Per quanto riguarda le BME-UV è stato possibile effettuare il saggio di Western Blot solo per c-Fos. Anche in questo caso c-Fos ha mostrato un andamento simile a quanto visto per l'espressione genica. Non è stato possibile analizzare l'espressione proteica di Egr-1 sulla linea cellulare bovina (BME-UV) e sulla linea cellulare di cane (CF33) e l'espressione proteica di c-Fos sulla linea cellulare di topo (NMuMG) e su quella di cane (CF33) in quanto gli anticorpi testati non hanno cross-reagito con queste specie (sono stati testati quattro differenti anticorpi).



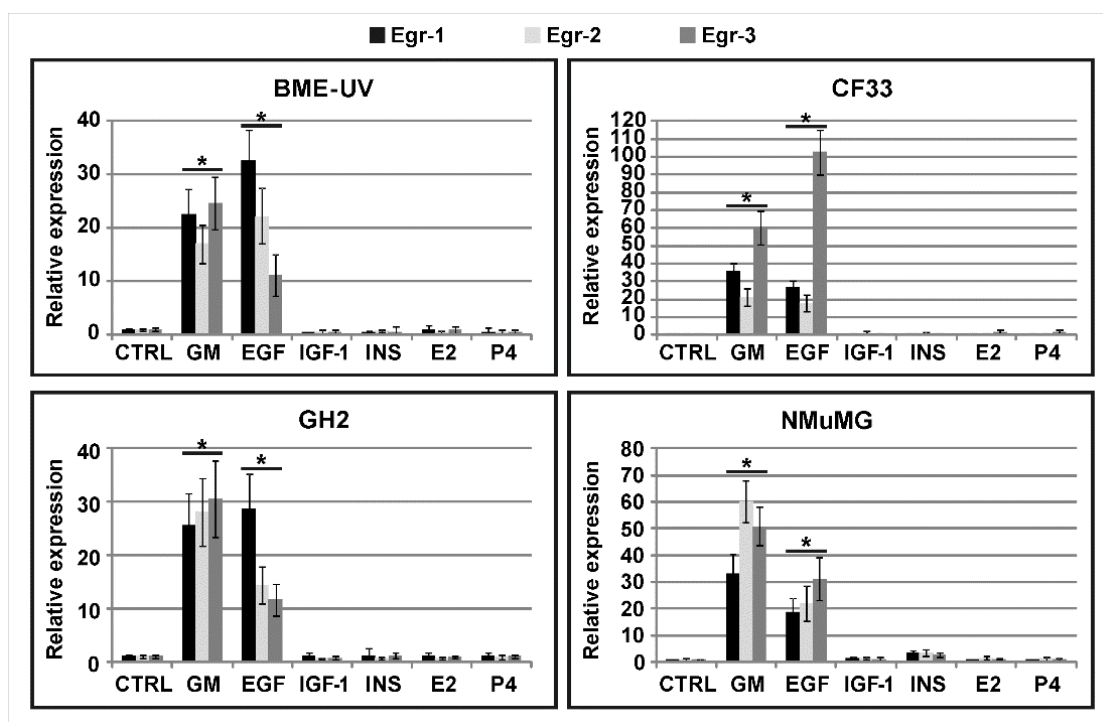
**Figura 20** Analisi dell'espressione proteica (mediante western blot) di Egr-1 e del normalizzatore tubulina nelle cellule NMuMG e GH2. Analisi dell'espressione proteica (mediante western blot) di c-Fos e del normalizzatore tubulina nelle cellule BME-UV e GH2. Le cellule sono state sincronizzate in terreno di starving per 16 h e poi trattate con il loro specifico terreno di proliferazione e l'espressione proteica è stata valutata a diversi intervalli temporali (30'- 6 h)

# Analisi dei fattori di crescita che modulano l'espressione genica degli Immediate early genes

Il progetto è proseguito studiando l'effetto di diverse citochine, implicate nello sviluppo della ghiandola mammaria, sulla modulazione dei geni studiati. Nel dettaglio, dopo 16 h di coltura in terreno di starving, le cellule sono state stimolate per un' ora con differenti fattori di crescita (EGF, IGF-1, insulina, 17 $\beta$ -estradiolo, progesterone). Dopo lo stimolo è stata analizzata, mediante real-time PCR, la variazione di espressione genica di Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun.

## Modulazione dell'espressione di Egr-1, 2, 3

Tra i differenti fattori di crescita testati, esclusivamente l' EGF è stato in grado di aumentare i livelli di espressione dei tre Egr, in maniera simile al terreno di proliferazione (GM). Nella linea cellulare di topo (NMuMG) anche l'insulina ha promosso un aumento, seppur minimo, dell'espressione dei tre geni (Fig. 21).



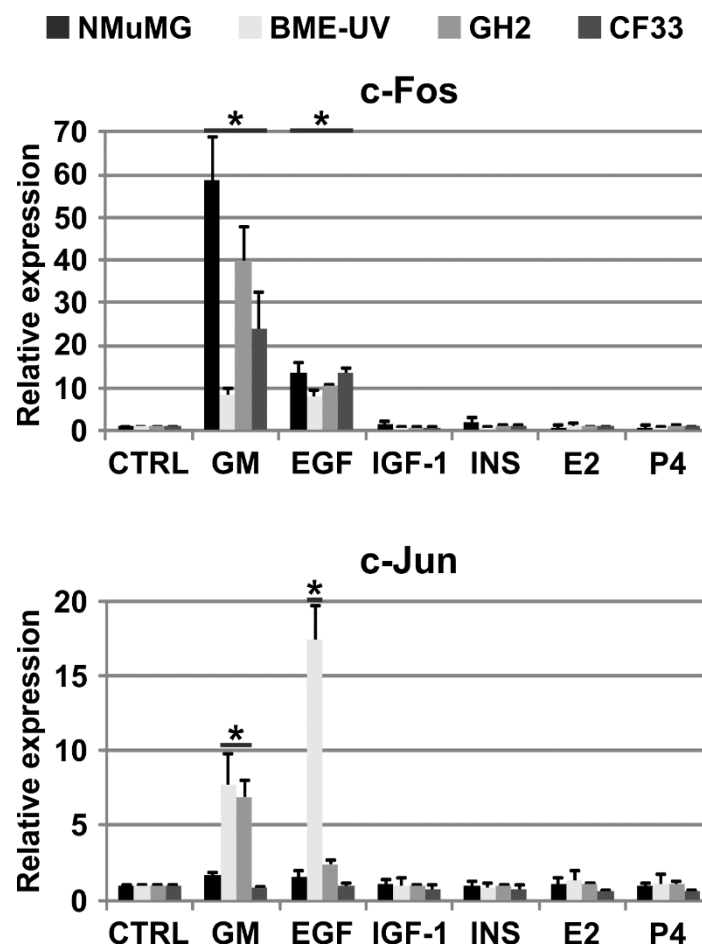
**Figura 21** Modulazione di Egr-1 (nero), Egr-2 (grigio chiaro) e Egr-3 (grigio scuro) in linee cellulari epiteliali mammarie trattate con differenti fattori di crescita o ormoni. Le cellule sono state coltivate con terreno di starving per 16 h e poi trattate con i fattori di crescita/ormoni/terreno di proliferazione indicati (EGF 20 ng/ml; IGF-1 10 ng/ml; Insulina 10 $\mu$ g/ml,  $\beta$ -estradiolo 20 nM, 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone 1  $\mu$ M). L'RNA è stato estratto dopo un'ora di trattamento. La variazione nell'espressione genica degli Egr è stata quantificata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GAPDH. Il campione in terreno di starving non trattato (CTRL) è stato impostato a 1. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media dei quattro replicati sperimentali. \* $P < 0,001$  contro CTRL. **Fonte: Santino et Al. General and Comparative Endocrinology, 2017**

## Modulazione dell'espressione di c-Fos e c-Jun

Per quanto riguarda c-Fos, i dati osservati hanno rispecchiato quelli appena descritti per gli Egr (Fig. 22).

C-Jun non ha invece mostrato alcuna variazione, neanche in caso di stimolazione con EGF, sulle linee cellulari di cane (CF33) e di topo (NMuMG). Nelle cellule di gatto (GH2), c-Jun ha mostrato un leggero aumento dei livelli di espressione in seguito a stimolazione con terreno di crescita (Fig. 22).

Infine nelle cellule di bovino (BME-UV) c-Jun ha mostrato una netta upregolazione nel caso in cui lo stimolo fosse rappresentato da EGF, e una upregolazione leggermente inferiore in terreno di crescita (Fig. 22).



**Figura 22** Modulazione di c-Fos e c-Jun in linee cellulari epiteliali mammarie trattate con differenti fattori di crescita o ormoni. Le cellule sono state coltivate in terreno di starving per 16 h e poi trattate per 1 h con i fattori di crescita/ormoni/terreno di proliferazione indicati (EGF 20 ng/ml; IGF-1 10 ng/ml; Insulina 10µg/ml, β-estradiolo 20 nM, 17α-idrossiprogesterone 1 µM). L'RNA è stato estratto dopo un'ora di trattamento. La variazione di espressione genica di c-Fos e c-Jun è stata quantificata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GAPDH. Il campione in terreno di starving non trattato (CTRL) è stato impostato a 1. Ogni punto rappresenta la media ± l'errore standard della media dei quattro replicati sperimentali. \*P<0,001 contro CTRL

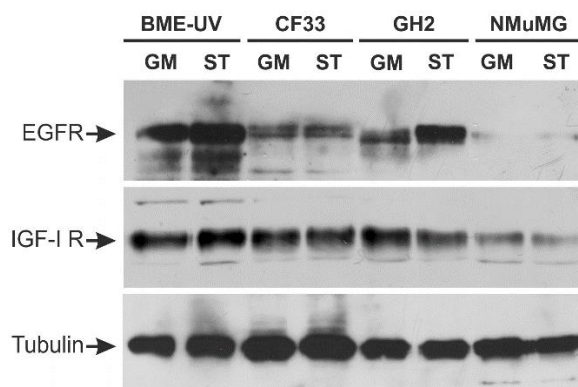


Sono state testate anche altre citochine, scelte tra quelle che hanno un limitato effetto sullo sviluppo della ghiandola mammaria (FGF $\beta$ , PDGF $\alpha\alpha$ , VEGF, TNF $\alpha$ ), senza però evidenziare nessun effetto sull'espressione genica dei cinque geni analizzati (dato non mostrato).

È stata infine valutata la presenza, tramite real time PCR, dei recettori per le citochine analizzate (recettori per EGF, Insulina, IGF-1, Estrogeni e Progesterone). Tutte le linee cellulari hanno evidenziato livelli di Cq bassi per i recettori EGFR e Erb-B2, attivati da EGF sia come omo- (EGFR/EGFR) che etero- (EGFR/Erb-B2) dimeri. Anche i livelli di Cq dei recettori per l' IGF-1 (attivati da IGF-1 e Insulina alle elevate concentrazioni utilizzate in coltura) sono risultati sufficientemente bassi da prevederne la presenza in quantità elevata.

Per quanto riguarda i recettori per Insulina, estrogeni e progesterone, questi hanno evidenziato livelli di Cq molto elevati (circa 30 o superiori) compatibili con livelli di espressione estremamente bassi o nulli (Fig. 23). L'espressione proteica dei recettori per l'EGF e per l'IGF1 è stata quindi confermata tramite western-blot in tutte le linee cellulari (Fig. 23).

	Cq (mean $\pm$ SEM)							
	BME-UV		CF33		GH2		NMuMG	
	GM	ST	GM	ST	GM	ST	GM	ST
<b>EGFR</b>	21,4 $\pm$ 1,4	20,5 $\pm$ 1,5	25,0 $\pm$ 1,2	24,0 $\pm$ 1,4	25,4 $\pm$ 1,2	25,1 $\pm$ 1,3	22,8 $\pm$ 0,9	22,1 $\pm$ 1,2
<b>Erb-B2</b>	24,3 $\pm$ 1,2	22,7 $\pm$ 1,0	23,3 $\pm$ 1,0	22,7 $\pm$ 1,2	27,6 $\pm$ 1,1	27,0 $\pm$ 1,0	22,2 $\pm$ 1,2	22,0 $\pm$ 0,9
<b>Insulin R</b>	> 30	> 30	27,2 $\pm$ 0,9	26,9 $\pm$ 1,1	28,9 $\pm$ 1,2	28,4 $\pm$ 0,7	27,3 $\pm$ 1,2	26,3 $\pm$ 1,3
<b>IGF-IR</b>	24,5 $\pm$ 1,8	24,1 $\pm$ 1,9	24,2 $\pm$ 0,7	24,6 $\pm$ 0,8	25,2 $\pm$ 1,1	24,4 $\pm$ 1,0	26,7 $\pm$ 0,9	27,3 $\pm$ 0,8
<b>ER <math>\alpha</math></b>	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30	> 30
<b>ER <math>\beta</math></b>	> 30	28,9 $\pm$ 1,2	> 30	> 30	> 30	> 30	28,8 $\pm$ 1,3	28,8 $\pm$ 1,4
<b>PR</b>	> 30	> 30	> 30	> 30	28,9 $\pm$ 1,5	28,0 $\pm$ 1,4	> 30	> 30



**Figura 23** La tabella mostra i livelli dei Cq di EGFR, Erb-B2, Insulin R, IGF-1R, ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  e PR in cellule epiteliali coltivate nel loro specifico terreno di proliferazione (GM) o in condizioni di starving (ST) per 16 h. Ogni numero rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media dei quattro replicati sperimentali. EGFR e IGF-1R sono stati analizzati mediante western blot in cellule coltivate in terreno di proliferazione (GM) oppure in condizioni di starving (ST) per 16h. La tubulina è stata utilizzata come controllo interno

Fonte: Santino et Al. *General and Comparative Endocrinology*, 2017.

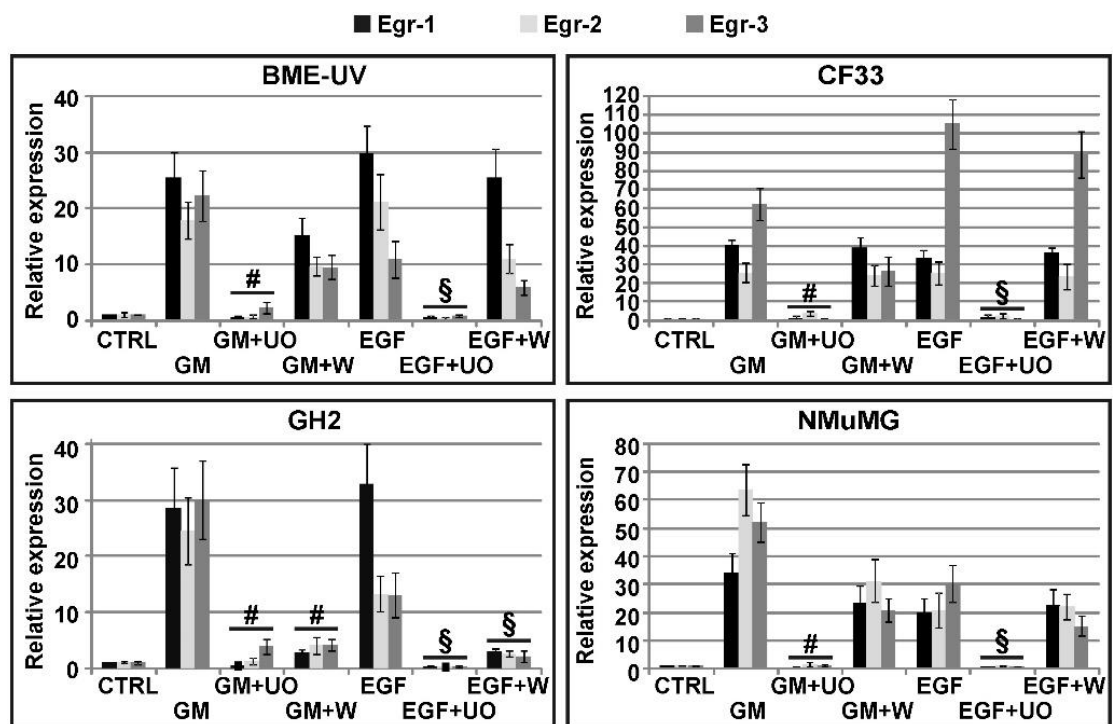
# **Identificazione delle vie di trasduzione intracellulare che modulano l'espressione di Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun**

E' stato studiato il ruolo di due tra le maggiori vie trasduzionali intracellulari, Erk 1/2 e PI3K-Akt, per capire se e quale ruolo potessero svolgere nella modulazione dei geni oggetto del nostro studio. A tal fine le cellule sono state sincronizzate nel ciclo cellulare, tramite coltura in terreno di starving per 16 h, poi pretrattate per 1h con UO 126 (inibitore specifico di Erk 1/2; 20 $\mu$ M) o con Wortmannina (inibitore di PI3K-Akt; 100 nM) e successivamente stimulate per un'ulteriore ora con terreno di proliferazione o EGF (10 ng/ml) al fine di aumentare l'espressione genica dei geni bersaglio, sempre in presenza degli inibitori. Nelle cellule così trattate è stato quantificato l'mRNA di Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun e l'espressione proteica di Egr-1 (NMuMG e GH2) e c-Fos (BME-UV e GH2).

## **Modulazione degli Egr in seguito all'inibizione delle vie di Erk 1/2 e di PI3K-Akt**

L'inibizione della via di trasduzione di Erk 1/2 ha bloccato l'aumento di espressione genica degli Egr a valle dello stimolo del terreno di proliferazione (GM) o dell'EGF in tutte le linee cellulari (Fig. 24).

Inibendo la via di trasduzione a valle di PI3K non si sono osservati effetti significativi sugli Egr nelle cellule di bovino (BME-UV) e in quelle di cane (CF33). Un effetto dell'inibizione di PI3K-Akt sugli Egr, anche se moderato, è stato osservato nelle cellule di topo NMuMG trattate con il terreno di proliferazione (GM vs GM+W). Infine è stato osservato un maggiore effetto inibitorio della wortmannina sull'espressione degli Egr nelle cellule GH2 (GM vs GM+W e EGF vs EGF+W) (Fig. 24).

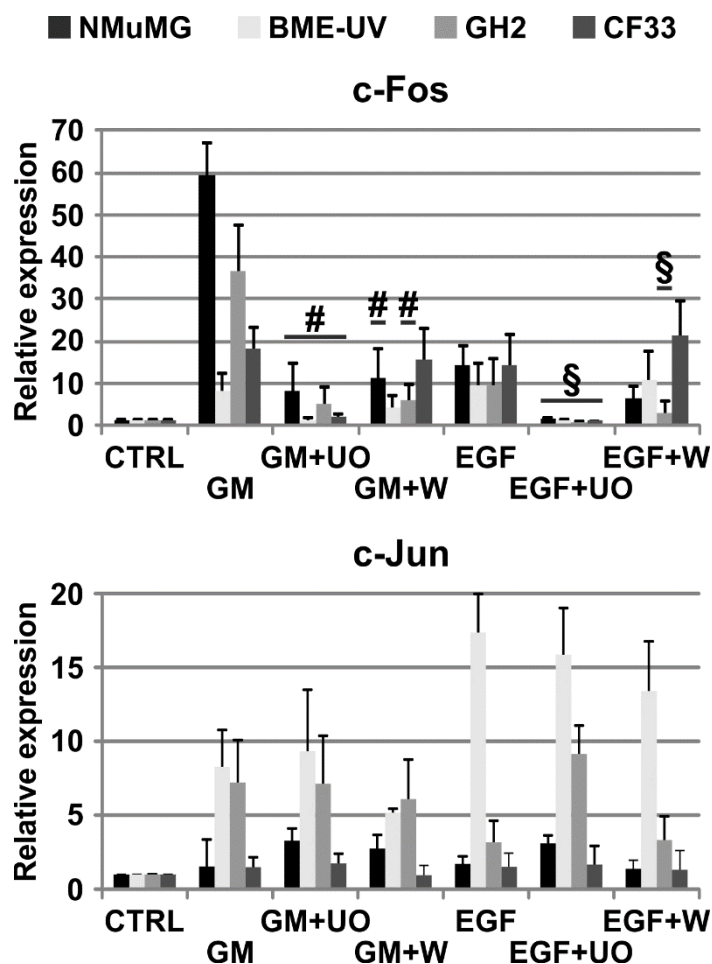


**Figura 24:** Variazione di espressione genica di Egr-1 (nero), Egr-2 (grigio chiaro) e Egr-3 (grigio scuro) in cellule trattate con terreno di proliferazione o EGF in presenza di un inibitore per Erk 1/2 o PI3K. Le cellule sono state coltivate in terreno di starving per 16 h poi pretrattate per 1 h con UO126 (20µM) o wortmannina (100nM) e dopo un'ora è stato aggiunto, sempre in presenza dell'inibitore, terreno di proliferazione (GM) o EGF (10ng/ml). L'RNA è stato estratto dopo un'ora di trattamento. L'espressione degli Egr è stata misurata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GADPH. Il campione controllo in terreno di starving non trattato (CTRL) è stato impostato a 1. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media dei quattro replicati sperimentali. #P<0,001 contro GM. §P<0,001 contro EGF. *Fonte: Santino et Al. General and Comparative Endocrinology, 2017*

## Modulazione di c-Fos e c-Jun in seguito all'inibizione di Erk e di PI3K-Akt

Per quanto riguarda c-Fos, nelle medesime condizioni sperimentali descritte sopra, l'inibizione della via di Erk 1/2 con UO126 ha inibito l'espressione in tutte e quattro le linee cellulari, indipendentemente dallo stimolo utilizzato (GM o EGF). L'inibizione della via di PI3K-Akt (mediata da Wortmannina) non ha influenzato l'espressione di c-Fos nelle BME-UV e nelle CF33, mentre nelle GH2 e nelle NMuMG ne ha ridotto l'incremento di espressione sia a valle di GM (GH2 e NMuMG) che di EGF (GH2) (Figura 25).

c-Jun non ha subito invece variazione significativa nell'espressione genica in nessuna delle quattro linee cellulari utilizzate e in nessuna delle condizioni sperimentali (Figura 25).

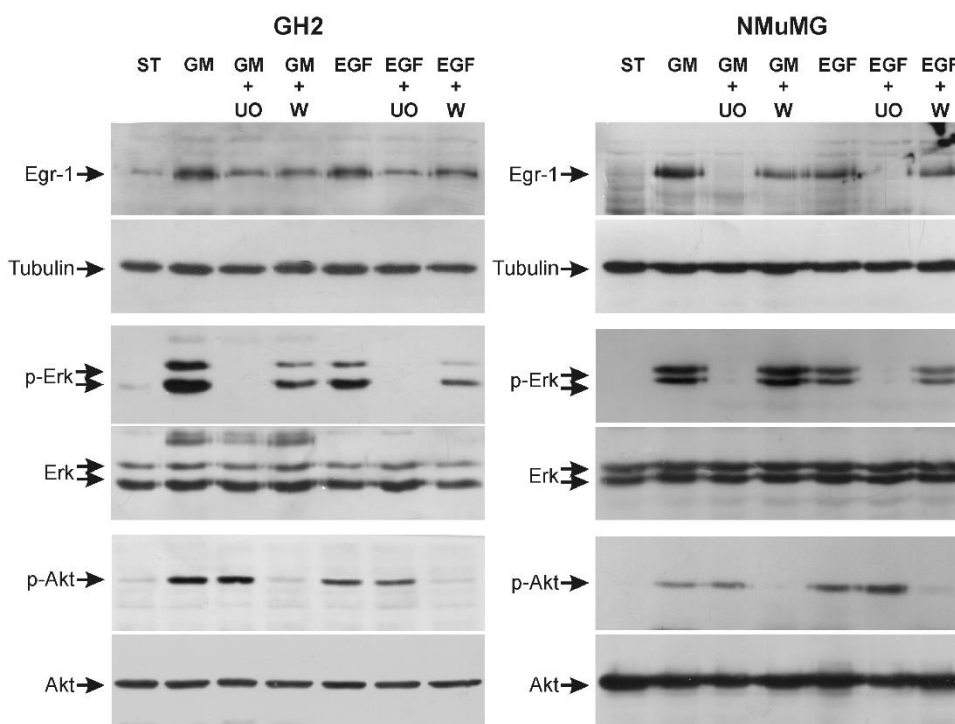


**Figura 25**

Variazione di espressione genica di c-Fos e c-Jun in cellule trattate con terreno di proliferazione o EGF in presenza di un inibitore per Erk 1/2 o PI3K. Le cellule sono state coltivate in terreno di starving per 16 h poi pretrattate per 1 h con UO126 (20µM) o wortmannina (100nM) e dopo un'ora è stato aggiunto, sempre in presenza dell'inibitore, terreno di proliferazione (GM) oppure EGF (10ng/ml). L'RNA è stato estratto dopo un'ora di trattamento. L'espressione di c-Fos e c-Jun è stata misurata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GADPH. Il campione controllo in terreno di starving non trattato (CTRL) è stato settato a 1. Ogni punto rappresenta la media ± l'errore standard della media di quattro replicati sperimentali. #P<0,001 contro GM. §P<0,001 contro EGF

## Analisi dell'espressione proteica di Egr-1

Nelle NMuMG e nelle GH2 è stato possibile analizzare i livelli di espressione proteica di Egr-1 mediante western blot. I dati ottenuti sono stati del tutto in linea con i dati ottenuti dalla quantificazione dell'mRNA. Al fine di confermare che UO126 e Wortmannina abbiano inibito i loro bersagli specifici, sono stati anche analizzati i livelli di fosforilazione di Erk 1/2 e di Akt. Ciò ha permesso di osservare come nelle GH2 vi fosse una sensibile riduzione dei livelli di p-Erk in seguito al trattamento con Wortmannina (Figura 26).



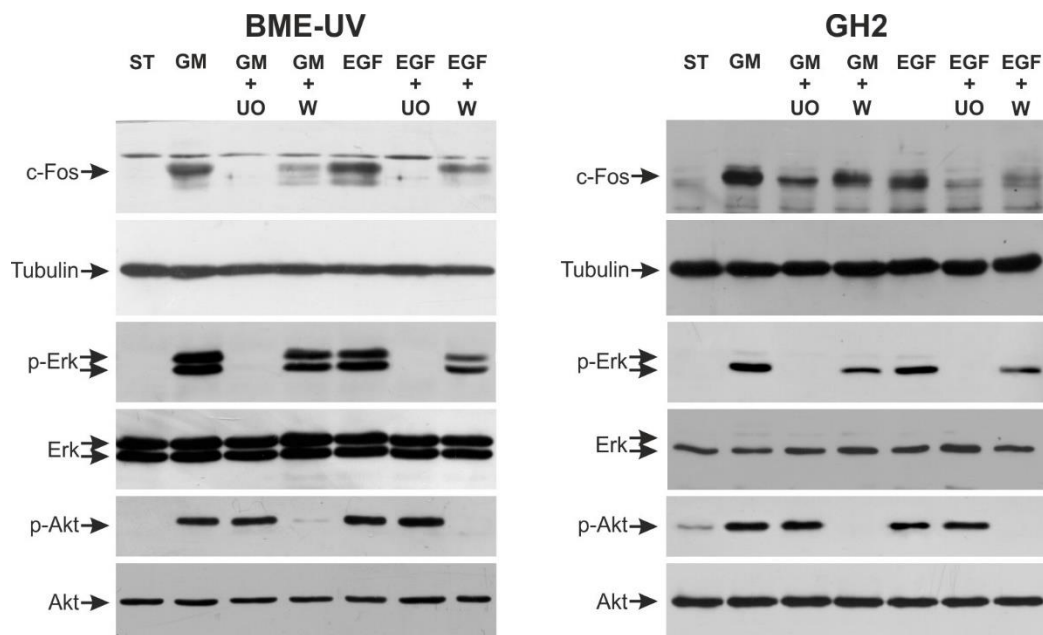
**Figura 26**

Analisi dell'espressione proteica (mediante western blot) di Egr-1 e del normalizzatore tubulina nelle cellule NMuMG e GH2 trattate con terreno di proliferazione o EGF in presenza di un inibitore per Erk 1/2 o PI3K. Le cellule sono state coltivate in terreno di starving per 16 h poi pretrattate per 1 h con UO126 (20 $\mu$ M) o wortmannina (100nM) e dopo un'ora è stato aggiunto sempre in presenza dell'inibitore terreno di proliferazione (GM) o EGF (10ng/ml). Phospho-Erk 1/2 e phospho-Akt sono stati usati come controlli interni per valutare l'efficacia degli inibitori (in questo caso le proteine sono state estratte 10 minuti dopo il trattamento con GM o EGF). Erk 1/2 totale e Akt totale sono i controlli interni rispettivamente per phospho-Erk 1/2 e phospho-Akt **Fonte: Santino et Al. General and Comparative Endocrinology, 2017**

## Analisi dell'espressione proteica di c-Fos

Nelle BME-UV e nelle GH2 è stato possibile analizzare, nelle medesime condizioni sperimentali, l'espressione proteica di c-Fos. Anche in questo caso i dati ottenuti riflettono quelli osservati per l'espressione dell'mRNA per quanto riguarda l'inibizione della via di Erk 1/2 (mediata da UO126).

L'inibizione della via di PI3K mediata dalla Wortmannina sembra avere sulle BMEUV e sulle GH2 un effetto sull'espressione di c-Fos ( GM vs GM+W e EGF vs EGF+W) che sembra essere associato (come descritto precedentemente per Egr-1 sulle cellule GH2) ad un effetto su p-Erk.



**Figura 27** Analisi dell'espressione proteica (mediante western blot) di c-Fos e del normalizzatore tubulina nelle cellule BME-UV e GH2 trattate con terreno di proliferazione o EGF in presenza di un inibitore per Erk 1/2 o PI3K. Le cellule sono state coltivate in terreno di starving per 16 h poi pretrattate per 1 h con UO126 (20 $\mu$ M) o wortmannina (100nM) e dopo un'ora è stato aggiunto sempre in presenza dell'inibitore terreno di proliferazione (GM) o EGF (10ng/ml). Phospho-Erk 1/2 e phospho-Akt sono stati usati come controlli interni per valutare l'efficacia degli inibitori (in questo caso le proteine sono state estratte 10 minuti dopo il trattamento con GM o EGF). Erk 1/2 totale e Akt totale sono i controlli interni rispettivamente per phospho-Erk 1/2 e phospho-Akt

## L'inibizione di Erk 1/2 mediata dalla Wortmannina

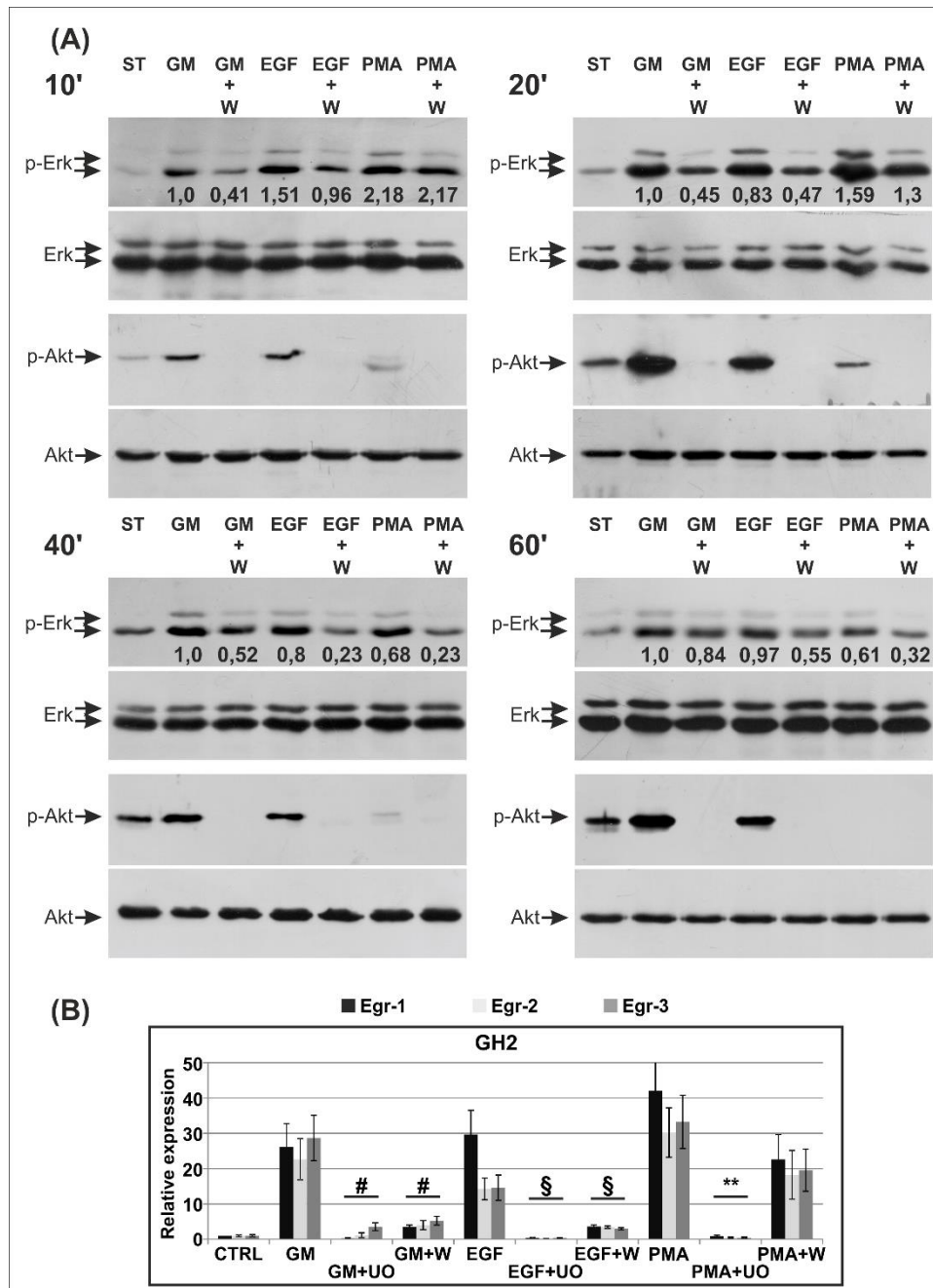
Per chiarire se l'inibizione mediata dalla Wortmannina, sull'espressione degli Egr nelle GH2 potesse dipendere da un effetto di inibizione crociato sulla via di Erk 1/2 piuttosto che da un'inibizione diretta della via trasduzionale di Akt, ho analizzato, mediante western blot, il time course di p-Erk 1/2 e p-Akt in seguito all'aggiunta di terreno di crescita, EGF o phorbol 12-myristate 13-acetato (PMA, un analogo del diacil-glicerolo, un forte attivatore della proteina chinasi C). Il PMA è stato inserito in questo saggio poiché è un forte attivatore della via di Erk 1/2 e dell'espressione di Egr-1 con attività di modulazione differenti sulla fosforilazione di Akt (**Han e Meier, 2009**) (**Liu et al., 2006**) (**Moelling et al., 2002**). L'analisi tramite western blot ha messo in evidenza come nelle GH2 la wortmannina abbia avuto un forte effetto di inibizione sull'attivazione di Erk 1/2 a 10 e 20 minuti dopo stimolazione con GM o EGF, ma non con PMA (Figura 28 a; 10' e 20'). A 40 e 60 minuti dalla stimolazione i livelli di p-Erk si sono ridotti notevolmente. A queste tempistiche l'inibizione mediata dalla Wortmannina ha ridotto ulteriormente i livelli di p-Erk 1/2 a valle di tutti i fattori (Figura 28 a).

I livelli di p-Akt sono aumentati in seguito al trattamento con GM o EGF mentre il trattamento con PMA, nelle GH2, li ha ridotti a livelli inferiori a quelli delle cellule starvate (ST) (Figura 28 a).

L'analisi di Egr-1, -2 e -3 dopo stimolazione con PMA, ha evidenziato come la wortmannina abbassi molto poco i livelli di espressione di questi geni (Figura 28, b; PMA+W).

Questi dati suggeriscono che nelle GH2, l'inibizione non specifica della fosforilazione di Erk 1/2 (e non quella di Akt) mediata dalla wortmannina, sia il fattore che riduce l'espressione degli Egr a valle del terreno di crescita e dell'EGF.

Tale dato giustifica anche la leggera diminuzione dell'espressione di c-Fos osservata nelle BME-UV e nelle GH2, quando lo stimolo mediante terreno di proliferazione o EGF è stato somministrato insieme a Wortmannina.



**Figura 28**

Analisi sull'espressione genica e proteica di Egr-1, -2 e -3 in cellule GH2 trattate con terreno di proliferazione (GM), EGF o PMA in presenza di un inibitore per Erk 1/2 o PI3K. **A:** Analisi tramite western blot del time course di phospho-Erk 1/2 (con quantificazione densitometrica relativa ai livelli di Erk) e phospho-Akt in cellule GH2 trattate con terreno di proliferazione (GM), EGF o PMA (10ng/ml) in assenza o presenza di Wortmannina (100nM). Erk 1/2 totale e Akt totale sono i controlli interni rispettivamente per phospho-Erk 1/2 e phospho-Akt.

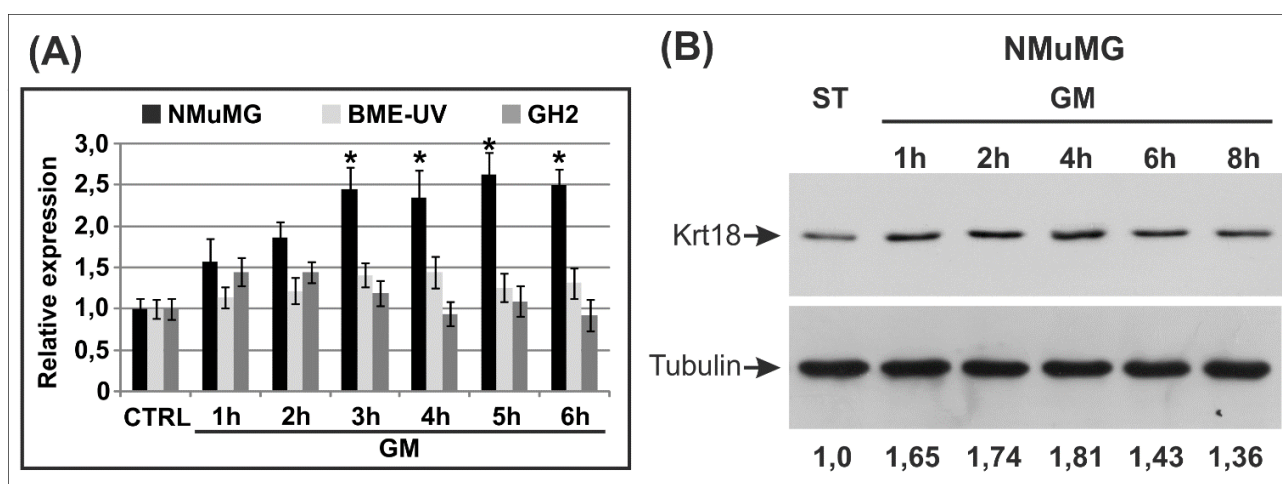
**B:** Le cellule sono coltivate per 16 h in terreno di starving, poi pretrattate per 1 h con UO126 (20  $\mu$ M) o wortmannina (100 nM) e poi stimulate, sempre in presenza degli inibitori, con terreno di crescita (GM), EGF (20ng/ml) o PMA (10ng/ml). Un'ora dopo il trattamento l'RNA viene estratto, l'espressione genica di Egr-1, -2 e -3 misurata mediante real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GAPDH. Il campione coltivato in terreno di starving e non trattato (CTRL) è stato impostato a 1. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media di quattro replicati sperimentali. # $P < 0,001$  versus GM. § $P < 0,001$  versus EGF. \*\* $P < 0,001$  versus PMA.

Fonte: Santino et Al. *General and Comparative Endocrinology*, 2017



## Regolazione della citocheratina 18 in seguito a stimolazione con terreno di proliferazione

Recenti studi hanno mostrato come Egr-1 si leghi al promotore della citocheratina 18 e ne regoli l'espressione (Zhang et al., 2014). La citocheratina 18 (Krt18) nelle cellule mammarie è un marcatore del sottotipo luminale. Partendo dal fatto che il trattamento delle cellule con il terreno di proliferazione aumenta l'espressione di Egr-1, è stato testato se tale stimolo fosse anche in grado di modulare l'espressione di Krt18 nelle cellule mammarie che posseggono questo marcatore (BME-UV, GH2 e NMuMG). Anche in questo caso, le cellule sono state in un primo momento coltivate in terreno di starving e successivamente allo stimolo con terreno di proliferazione, l'mRNA di Krt18 è stato quantificato. In queste condizioni sperimentali solamente le NMuMG hanno risposto aumentando l'espressione di Krt18 in seguito allo stimolo con il terreno di crescita. Questo dato è stato confermato a livello proteico mediante analisi di Western blot. La citocheratina 14, che è espressa ad alti livelli solo nelle GH2, non ha mostrato nessuna variazione in risposta allo stimolo con terreno di crescita (dato non mostrato).



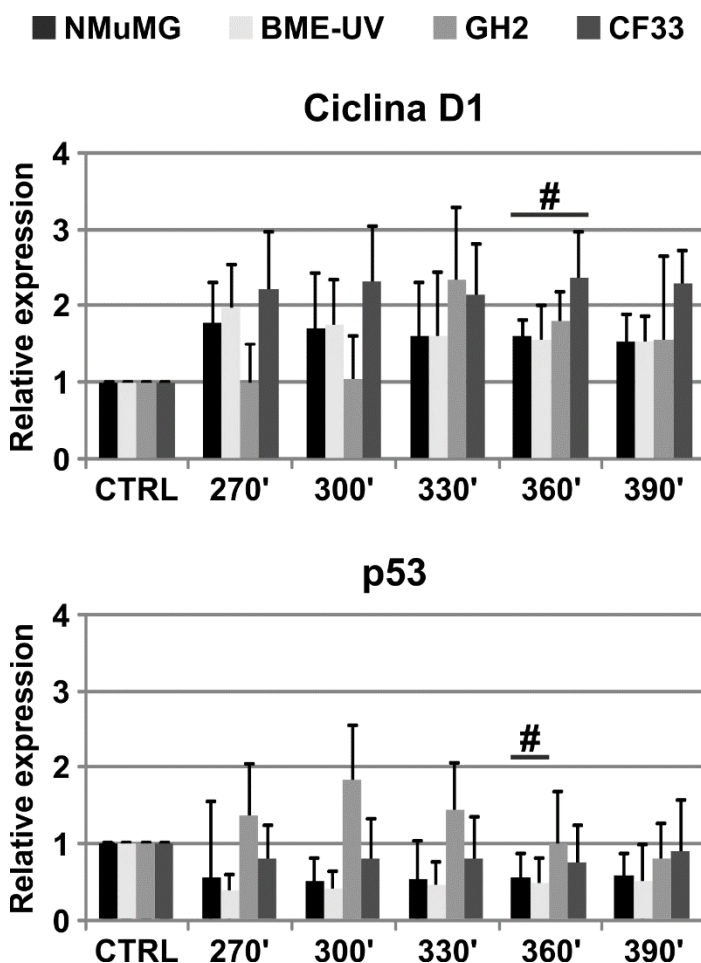
**Figura 29**

Espressione genica e proteica della citocheratina 18 in seguito a trattamento con terreno di crescita (GM). **(A)**: Le cellule sono state coltivate in terreno di starving per 16 h e poi trattate con il loro rispettivo terreno di crescita. L'RNA è stato estratto agli intervalli di tempo indicati e la variazione nell'espressione genica della citocheratina 18 è stata misurata tramite real-time PCR e normalizzata con HPRT-1 e GADPH. \* $P < 0,05$  versus CTRL. **(B)**: Cellule NMuMG coltivate in terreno di starving per 16 h e trattate con terreno di crescita. Le proteine totali sono state estratte agli intervalli di tempo indicati e visualizzate tramite western blot. La tubulina è stata usata come controllo interno per l'analisi densitometrica indicata in basso. **Fonte: Santino et Al. General and Comparative Endocrinology, 2017.**

## Analisi dell'espressione genica dei geni a variazione lenta

Come discusso nell'introduzione, i prodotti di espressione degli Immediate Early Genes regolano l'espressione genica di molti geni (ciclina D1, p53, pTEN, NAB1 e 2...), con cinetiche di espressione lente, implicati in varie fasi della biologia della cellula.

Al fine di analizzare la variazione di espressione di questi geni, è stato utilizzato un approccio sperimentale simile a quello adottato per quantificare l'espressione dei geni a variazione rapida, ma basato su intervalli temporali più lunghi (270-390 minuti). In questo modo in tutte le quattro linee cellulari è stato possibile osservare come NAB1 e pTEN non varino (dato non mostrato). L'espressione della ciclina D1 è risultata aumentare nei campioni trattati rispetto al controllo (T=0) e ha raggiunto un picco di espressione statisticamente significativo, in tutte le linee cellulari oggetto di studio, sei ore dopo la somministrazione dello stimolo. L'espressione genica di p53 è invece diminuita in tutte le linee cellulari, dopo la somministrazione dello stimolo. Questa tendenza, la cui unica eccezione è rappresentata dalle cellule GH2 (nelle quali si è osservato un aumento nell'espressione di p53 tra i 270 e i 330 minuti dopo la stimolazione con terreno completo, un ritorno a livello basale dopo 360 minuti e un inizio di riduzione a partire da 390 minuti dopo la stimolazione) risulta essere significativa intorno alle sei ore dopo la somministrazione dello stimolo mitogenico.



**Figura 30**

Time course della variazione nell'espressione genica di Ciclina D1 e p53 in linee cellulari epiteliali mammarie in seguito a stimolazione con terreno di proliferazione. Le cellule sono state sincronizzate mediante coltura con terreno di starving per 16 h e poi trattate con il loro specifico terreno di proliferazione. L'RNA è stato estratto agli intervalli di tempo indicati e l'espressione genica di ciclina D1 e di p53 è stata misurata mediante real-time PCR e normalizzata su HPRT-1 e GAPDH. L'espressione genica al punto zero è stata settata al valore 1. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media di quattro replicati sperimentali- #P<0,001 contro CTRL.

# **Analisi dell'espressione genica dei microRNA implicati nella regolazione di Egr-1 e c-Fos**

Come discusso nell'introduzione, i microRNA (miR) regolano l'espressione genica di geni bersaglio. Dunque si è deciso di analizzare l'espressione di alcuni miR, che controllano l'espressione di Egr-1 e c-Fos, per studiare se al variare dell'espressione dei due IEGs si accompagni anche una variazione nell'espressione dei miR che li controllano.

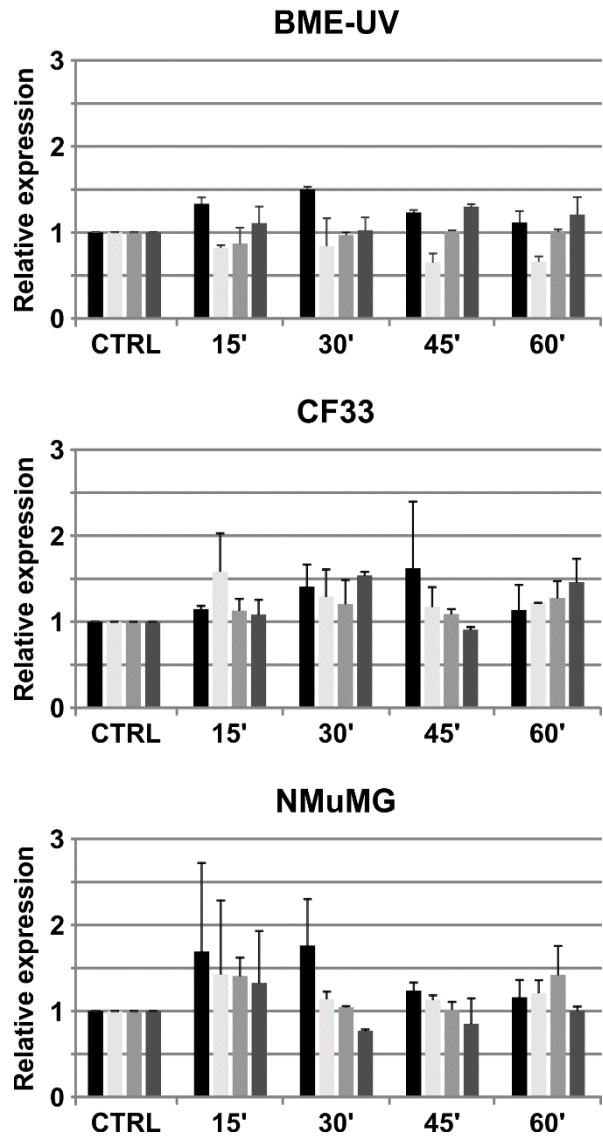
Per questo esperimento si è deciso di utilizzare i campioni sui quali in precedenza era stata verificata la variazione di espressione degli immediate Early Genes a tempistiche crescenti dopo la somministrazione di uno stimolo mitogenico (terreno di proliferazione specifico di ogni linea). In particolare sono state prese in considerazione solo le tempistiche dai 15 fino ai 60 minuti dopo la somministrazione dello stimolo in quanto, come mostrato in precedenza, rappresentano l'intervallo di tempo in cui Egr-1 e c-Fos mostrano le maggiori variazioni nei livelli di espressione. Sono stati inizialmente testati diversi miR (124, 101, 199a-3p, 212-5p...). Tra questi alla fine i migliori candidati da analizzare sono sembrati essere il miR 155 e il miR 29a tra quelli che controllano l'espressione di c-Fos e il miR 183-5p e il miR 191-5p tra i microRNA che controllano l'espressione di Egr-1.

E' stato possibile condurre l'esperimento solo sulle linee cellulari di bovino, cane e topo in quanto le sonde non sono risultate specifiche per il gatto.

Questo approccio ha permesso di osservare che nelle BME-UV (bovino) il mir 29a (c-Fos), 183 e 191 (Egr-1) non hanno avuto un andamento che possa essere messo in correlazione con gli IEGs da essi regolati (Fig. 31). Per quanto riguarda invece il miR 155 (c-Fos) (Fig. 31), è sembrato avere un andamento che ricalca quello osservato in precedenza per c-Fos. Infatti la sua espressione ha iniziato a decrescere dopo 15 minuti dalla somministrazione dello stimolo arrivando al valore più basso di espressione 45 minuti dopo la stimolazione. Tale andamento non ha comunque mostrato una significatività di tipo statistico.

Per quanto riguarda invece le CF33 (cane) e le NMuMG (topo), nessuno dei quattro miR analizzati è sembrato avere un andamento che possa essere ricondotto a quello dei rispettivi geni controllati (Fig. 31).

■ miR-29a    ■ miR-155    ■ miR-183    ■ miR-191



**Figura 31**

Time course della variazione di espressione dei miR29a, miR155, miR183 e miR191 in linee cellulari epiteliali mammarie di topo (NMuMG), cane (CF33) e bovino (BME-UV) in seguito a stimolazione con terreno di proliferazione. Le cellule sono state sincronizzate mediante coltura con terreno di starving per 16 h e poi trattate con il loro specifico terreno di proliferazione. Il miR16 è stato utilizzato, come normalizzatore. L'espressione dei miR29a, miR155, miR183 e miR191 al punto zero è stata impostata al valore 1. Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  l'errore standard della media di quattro replicati sperimentali.

## **Discussione**

Il mio progetto di Dottorato è stato incentrato sullo studio, in linee cellulari mammarie provenienti da diverse specie animali, di una specifica classe di geni denominati Immediate early genes (IEGs). Lo studio in particolare ha riguardato cinque IEGs: Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun.

Egr-1 è stato identificato cercando geni la cui espressione aumentava in seguito all'aggiunta di siero alle cellule **(Sukhatme et al., 1987)**. Alla scoperta di Egr-1 è poi seguita, non molto tempo dopo, l'identificazione di alcune sue isoforme (Egr-2, 3, 4) **(Chavrier et al., 1988) (Muller et al., 1991) (Patwardhan et al., 1991)**. Gli Egr sono descritti come fattori di trascrizione, con una struttura a dita di zinco, implicati nella regolazione della trascrizione genica.

Fos è stato scoperto nel virus del sarcoma murino, da cui il nome di v-Fos. Un analogo di v-Fos è stato successivamente scoperto anche in uomo e in diverse altre specie animali, ed ha preso il nome di c-Fos **(Van Straaten et al., 1983)**.

c-Jun, appartiene, così come c-Fos, al gruppo bZIP di fattori di trascrizione leganti il DNA **(Mechta-Grigoriou et al., 2001)**. Mentre gli elementi della famiglia Egr agiscono da fattori di trascrizione in forma monomeric, c-Fos e c-Jun (e altri membri appartenenti alle loro famiglie, che non ho esaminato in questo lavoro) diventano attivi funzionalmente esclusivamente quando formano un complesso binario chiamato AP-1.

Questi geni svolgono molti ruoli nella fisiologia della cellula, infatti oltre a modulare l'espressione di geni implicati nella progressione del ciclo cellulare, in alcuni tipi cellulari e sotto specifiche condizioni di stimolazione, gli IEGs promuovono anche differenziamento, motilità cellulare e apoptosi **(Oliveira et al., 2015) (Seiler et al., 2012) (Tao et al., 2015) (Tourtellotte et al., 1999) (Zwang et al., 2011)**.

In questa tesi ho descritto il comportamento biologico di Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun in tre linee cellulari epiteliali mammarie non tumorali, isolate da differenti specie (bovino, topo, gatto), e in una linea cellulare mammaria tumorale isolata da cane **(Saito et al., 2014) (Baron et al., 2006) (Baron et al., 2015)**.

In un primo momento i livelli di espressione dei cinque geni sono stati analizzati sotto due condizioni di trattamento: cellule coltivate in terreno di proliferazione (GM) e cellule coltivate con un terreno deprivato dei principali fattori di crescita, chiamato "terreno di starving" (ST). Questo approccio ha permesso di osservare, per i geni oggetto dello studio, livelli di espressione simili nelle due condizioni di trattamento (Fig. 16). Questo dato è stato piuttosto inaspettato in quanto, come detto, gli Immediate Early Genes sono strettamente collegati a specifici momenti del ciclo cellulare. Pertanto si è deciso di contare il numero di eventi di citodieresi avvenuti ogni ora (come indicatore diretto delle cellule che si trovano nella stessa fase del ciclo cellulare). In questo modo è stato possibile osservare come, per esempio nella linea cellulare GH2, il numero massimo di eventi di citodieresi nelle cellule trattate con il GM è circa del 5% ogni ora e leggermente diminuito nelle cellule coltivate in terreno di starving (3% circa). In tutte le restanti linee cellulari si è osservato un comportamento simile. Questo esperimento ha evidenziato come nelle linee cellulari studiate, solo una piccola frazione di cellule si trova esattamente nella medesima fase del ciclo cellulare in uno stesso intervallo di tempo (ogni ora). Considerando che gli IEGs sono modulati in intervalli di tempo molto brevi (meno di un'ora), avere più del 95% delle cellule

“desincronizzate”, spiega perchè i livelli di espressione dei cinque geni analizzati siano risultati simili tra le cellule in terreno di proliferazione e quelle in terreno di starving.

In considerazione di quanto appena descritto, la sincronizzazione (della durata di 16 h) mediante coltura con terreno di starving è stata un pre-requisito fondamentale dei mie esperimenti, che ha permesso l'analisi della modulazione di Egr 1, 2, 3, c-Fos e c-Jun dopo l'aggiunta di uno stimolo mitogenico. Il pre-trattamento con il terreno di starving infatti, ha aumentato la percentuale di cellule sincronizzate nella fase G0/G1 del ciclo cellulare (Fig.17 b). Solo le cellule BMEUV hanno mostrato una risposta differente a questo pretrattamento, probabilmente dovuta al fatto che lo starving di 16h ha provocato in queste cellule una intensa morte cellulare (circa il 20-30% di cellule che, in analisi citofluorimetrica, sono visibili come un eventi sub G0).

Dopo la sincronizzazione e la successiva stimolazione delle cellule con il terreno di proliferazione, la modulazione di Egr 1, 2 e di c-Fos ha avuto un andamento simile su tutte e quattro le linee cellulari, raggiungendo il picco di espressione tra i 45 e i 60 minuti dopo la somministrazione dello stimolo e tornando a valori simili a quelli basali dopo circa 120 minuti. Dato che il pre-trattamento delle cellule con il terreno di starving potrebbe non sincronizzare tutte le cellule, è stato ipotizzato che l' aumento nell'espressione genica descritto, raggiunga livelli molto più elevati di quelli che sono stati osservati. I livelli di espressione di Egr-3 sono stati mantenuti alti per circa 75-90 minuti prima di diminuire rapidamente. Questo differente meccanismo di modulazione non era mai stato descritto fino ad ora. Per quanto riguarda invece c-Jun, nonostante svolga il ruolo di fattore di trascrizione formando il complesso AP-1 con c-Fos e le sue isoforme, ha una cinetica diversa da quella descritta per gli Egr e c-Fos. C-Jun infatti non mostra variazioni di espressione genica su due delle linee cellulari utilizzate (NMuMG, CF33). Nelle cellule di bovino (BME-UV) e gatto (GH2) l'espressione di c-Jun, dopo lo stimolo, ha invece un andamento simile a quello descritto per gli Egr e per c-Fos, raggiungendo però dei livelli di espressione nettamente più bassi.

Ad eccezione della linea cellulare CF33 (cane), che è stata ottenuta da un tessuto mammario di origine tumorale, tutte le altre linee cellulari utilizzate provengono da ghiandole mammarie sane. È possibile dividere l'epitelio mammario in due compartimenti cellulari:

- il compartimento luminale che costituisce il lume dei dotti mammari ed è formato da cellule positive al marcatore citocheratina 18 (Krt 18)
- il compartimento basale che costituisce il lato più esterno dei dotti, a contatto con la membrana basale, ed è costituito da cellule che esprimono citocheratina 14 (Krt 14).

Le cellule mammarie che sono state utilizzate per questo progetto di Dottorato, esprimono in maniera differenziale i marcatori di entrambi i compartimenti (Fig 14 e 15). Le NMuMG (linea murina) sono quasi tutte positive a Krt18; le GH2 mostrano positività per Krt14 con una piccola percentuale di cellule positive a Krt18, distribuite in isolotti; le BME-UV bovine sono principalmente positive a Krt18. Le CF33 sono invece caratterizzate dall'assenza di entrambi i marcatori, dunque hanno un'origine stromale oppure hanno perso i marcatori cheratinici durante il processo di selezione. Fatta eccezione per il

comportamento di c-Jun che, come visto nelle BME-UV e nelle GH2, sembra in qualche modo rispondere alla somministrazione dello stimolo mitogenico, i risultati ottenuti mostrano che l'andamento degli Egr e di c-Fos è simile in tutte le linee cellulari che sono state esaminate, facendo supporre che l'origine cellulare (basale o luminale) e lo stato tumorale non sembrano modificare la modulazione di questi fattori di trascrizione.

L'osservazione che solo l'EGF è in grado di promuovere l'aumento di espressione genica degli Egr, di c-Fos (su tutte e quattro le linee cellulari) e di c-Jun (solo in una delle linee cellulari analizzate) in modo simile a quanto visto con il terreno di proliferazione è molto interessante. Sarebbe stato plausibile infatti aspettarsi che anche altri fattori di crescita e/o ormoni specifici della ghiandola mammaria (IGF-1, estrogeni, progesterone..) potessero essere in grado di modulare l'espressione dei geni presi in esame. Questo risultato è stato probabilmente una conseguenza della selezione operata durante il processo di immortalizzazione, durante il quale la maggior parte dei sottotipi cellulari presenti nella ghiandola mammaria è scomparsa. Per esempio, l'espressione dei recettori per gli estrogeni e il progesterone è limitata ad una piccola percentuale di cellule terminalmente differenziate che difficilmente riescono a rimanere in coltura.

Per questo motivo ho analizzato, nelle linee cellulari utilizzate, la presenza dei recettori per le citochine prese in esame. In questo modo ho potuto verificare come sulle quattro linee cellulari fossero presenti i recettori EGFR e Erb-B2 (attivati da EGF) e IGF-1R (attivato da IGF-1 e insulina). I recettori per estrogeni, progesterone e insulina non sono invece risultati espressi o erano espressi a bassi livelli..

EGF è un potente promotore della crescita cellulare nella ghiandola mammaria. Il recettore (EGFR) di EGF e il suo ruolo biologico sono già stati descritti da molto tempo (**Fowler et al., 1995**). Tra i ligandi di EGFR, finora conosciuti, solo l'anfiregulina ha un ruolo fondamentale durante lo sviluppo puberale della ghiandola mammaria (**Ciarloni et al., 2007**). E' molto interessante notare come questo ruolo dell'anfiregulina dipenda dalla presenza dei recettori EGFR sulla superficie delle cellule del compartimento stromale e non su quelle del compartimento epiteliale della ghiandola mammaria (**Wiesen et al., 1999**). I dati ottenuti, come detto, hanno mostrato che in tutte le linee cellulari utilizzate, EGF è stato il solo fattore di crescita in grado di aumentare la trascrizione degli Egr, di c-Fos ed in parte di c-Jun. Quindi è possibile ipotizzare che vi sia anche un ruolo biologico di EGF nelle cellule epiteliali mammarie e che questo sia mediato anche dagli Immediate Early Genes. Per esempio la proliferazione delle cellule murine NMuMG dipende dal recettore EGFR (**Accornero et al., 2012**), quindi in queste cellule la modulazione degli IEGs potrebbe guidare la proliferazione.

Un altro possibile ruolo per gli Immediate Early Genes potrebbe essere quello di modulare l'espressione di alcuni marcatori della differenziazione quali ad esempio citocheratina 14 e 18. Un recente lavoro ha messo in correlazione i livelli di espressione Egr-1 e di Krt 18 (**Zhang et al., 2014**). La modulazione di Krt 18 è regolata grazie ad un sito di legame per Egr-1 posto all'interno del promotore. Tra le linee cellulari esaminate, solo le NMuMG hanno mostrato un aumento di espressione di Krt 18 in seguito all'aggiunta di terreno di proliferazione. Riteniamo improbabile che l'espressione basale di questa cheratina possa essere mantenuta dagli IEGs ed in particolare dagli Egr per due motivi:



1. nelle BME-UV e nelle GH2, i livelli di Krt18 non sono modulati dall'aggiunta del terreno di proliferazione, anche se quest'ultimo è un grande modulatore di Egr-1.
2. Le cellule tumorali mammarie di origine umana responsive agli estrogeni MCF-7, T47D and ZR-75D hanno alti livelli basali di Krt 18 ma livelli basali di Egr-1 più bassi rispetto le cellule che abbiamo testato.

Quindi nei modelli descritti in questo lavoro, la modulazione degli Egr che segue la stimolazione con EGF e con il terreno di proliferazione, molto probabilmente promuove uno stimolo proliferativo, antiapoptotico e di migrazione cellulare (**Baron et al., 2006**) (**Yu et al., 2009**).

Nelle fasi più avanzate del progetto di Dottorato ho analizzato quali vie di segnalazione intracellulari sono coinvolte nella modulazione dell'espressione dei geni oggetto di studio. I dati ottenuti mostrano chiaramente che Erk 1/2 è la principale via trasduzionale implicata nell'espressione sia degli Egr che di c-Fos. Infatti in tutte le linee cellulari utilizzate, l'inibizione della via di Erk 1/2 con UO126, (oppure con selumetinib, dati non mostrati) ha impedito la modulazione dei livelli degli Egr e di c-Fos. Questi risultati sono in linea con la letteratura (**Murphy et al., 2002**) (**O'Donnell et al., 2012**) (**Tarcic et al., 2012**) e ne estendono la valenza anche a linee cellulari mammarie di diversa origine. C-Jun invece non è regolato da tale via.

L'inibizione della via di PI3K ha determinato invece una forte riduzione nell'espressione degli Egr nella sola linea cellulare di gatto (GH2), e una moderata diminuzione di c-Fos nelle GH2 (GM vs GM+W e EGF vs EGF+W) e nelle NMuMG (GM vs GM+W). Una possibile spiegazione di questo dato si può trovare nel fatto che la Wortmannina, utilizzata per inibire PI3K, abbia indotto un'inibizione anche nella via di Erk 1/2. Questo effetto, osservato in western blot, potrebbe essere dovuto, solo nelle GH2, ad un' aspecificità della Wortmannina (solo in questa linea cellulare) oppure più probabilmente ad un "cross-talk" tra la via di Akt e la via di Erk 1/2.

Per verificare quanto detto, ho stimolato le GH2 con terreno di proliferazione (GM), EGF o PMA, in presenza di Wortmannina, ed esaminato i livelli di p-Erk e p-Akt a diversi intervalli temporali. In particolare si è deciso di utilizzare il PMA in quanto è un forte attivatore della via di Erk 1/2 che agisce però con un meccanismo differente rispetto GM o EGF. PMA infatti è un poliestere che mima il diacilglicerolo (DAG) attivando la protein chinasi C. In questo modo è avviata una cascata di segnalazione intracellulare che attiva anche la via di Erk 1/2 (**Bauer et al., 2005**).

Questo approccio ha messo in evidenza come la Wortmannina induca una forte riduzione dei livelli di p-Erk a valle di uno stimolo con GM o EGF, mentre questo effetto è molto ridotto nel caso in cui lo stimolo somministrato sia il PMA. Questa mancanza di inibizione da parte della Wortmannina in presenza di PMA (in particolare a 10 e 20 minuti dallo stimolo) è abbinata ad una minima riduzione nei livelli di espressione degli Egr nei campioni trattati con PMA+ Wortmannina. Questo dato, insieme all'evidenza che nelle GH2 il trattamento con PMA riduce i livelli di p-Akt, ci fornisce la conferma che gli Egr sono regolati in modo Erk-dipendente ma non Akt-dipendente. Ciò mi ha fatto inoltre ipotizzare che anche la diminuzione di c-Fos osservata nelle GH2, ed in minor misura nelle NMuMG, in presenza di wortmannina sia dovuta ad un meccanismo di cross-talk analogo.

Altri autori hanno osservato che, nelle cellule ematopoietiche, l'attivazione di Erk richiede un segnale generato da PI3K (**Sutor et al., 1999**). Con i miei esperimenti ho mostrato, per la prima volta nelle cellule mammarie, che la via di PI3K non è isolata dalla cascata di segnalazione di Erk, a valle dello stimolo con GM o EGF, estendendo così le osservazioni precedenti a tipi cellulari e stimoli differenti.

Come già discusso, gli IEGs, agendo da fattori di trascrizione, regolano l'espressione genica di geni bersaglio coinvolti nella proliferazione cellulare. Questi geni bersaglio sono tutti caratterizzati da cinetiche di espressione molto più lente rispetto quelle degli Immediate Early Genes. Durante l'ultima fase del mio progetto di Dottorato ho analizzato le cinetiche di espressione di alcuni di questi geni "tardivi". In particolare ho esaminato la modulazione della Ciclina D1, p53, NAB1 e pTEN, che sono bersagli di Egr 1, c-Fos e c-Jun. L'analisi dell'espressione genica di questi geni, ha evidenziato dopo somministrazione dello stimolo, un aumento di espressione della ciclina D1 ed una diminuzione di p53. Quanto appena detto è stato riscontrato in tutte e quattro le linee cellulari utilizzate. Questi dati sono perfettamente allineati con il ruolo biologico dei due geni. La ciclina D1 è infatti un mediatore molto importante nel passaggio tra la fase G1 e la fase S del ciclo cellulare. Al contrario p53 gioca un ruolo fondamentale per arrestare il ciclo cellulare a seguito dell'insorgenza di problemi e pertanto la sua downregolazione, dopo la somministrazione di uno stimolo mitogenico permette la corretta progressione della cellula attraverso le quattro fasi del ciclo cellulare. NAB1 e pTEN non hanno invece mostrato variazioni statisticamente significative nei campioni stimolati rispetto al campione controllo.

Dalla letteratura sappiamo che la modulazione degli IEGs dipende da una rapida downregolazione, che segue la somministrazione di stimoli mitogenici, di specifici microRNAs (**Avraham et al., 2010**). Gli ultimi mesi del mio percorso di Dottorato, sono stati spesi ad identificare e testare specifici miRNA, implicati nel controllo dell'espressione genica di Egr-1 e c-Fos. Da un iniziale pool di diversi microRNA ho deciso di focalizzare l'attenzione in particolare su quattro di essi: miR 29a, miR 155, miR 183 e miR 191. I risultati ottenuti sono solamente dei risultati preliminari e da intendersi come un possibile sviluppo futuro di questo filone di ricerca. Ad ogni modo da queste analisi è stato possibile osservare come, dei quattro microRNA analizzati, solamente il miR 155 ed il miR 183, e solo nel modello bovino, sembrano avere una cinetica di espressione con un andamento in qualche modo riconducibile a quella di Egr-1 e c-Fos pur senza significatività statistica.

# Conclusioni

Con questo studio ho potuto valutare il meccanismo di modulazione dei fattori di trascrizione Egr-1, 2, 3, c-Fos e c-Jun, appartenenti al gruppo degli Immediate Early Genes, in linee cellulari epiteliali mammarie provenienti da diverse specie.

Ho osservato come Egr-1, 2 e c-Fos abbiano raggiunto il picco di espressione tra i 45 e i 60 minuti dopo la somministrazione dello stimolo. Egr-3 ha invece avuto una cinetica di espressione più dilatata nel tempo, fino a 90 minuti dallo stimolo. c-Jun non ha mostrato variazione nell'espressione genica in due delle quattro linee. Nelle GH2 e nelle BME-UV, l'andamento di c-Jun è stato simile a quello osservato per Egr-1, 2, c-Fos anche se con picchi di espressione inferiori.

Ho osservato inoltre che, tra i diversi fattori di crescita e ormoni testati, esclusivamente l'EGF ha aumentato l'espressione degli Egr e di c-Fos. Per quanto riguarda c-Jun un risultato analogo è stato osservato solo su due delle linee cellulari studiate.

In questo lavoro ho inoltre identificato Erk 1/2 come la principale via di trasduzione implicata nella regolazione degli Egr e di c-Fos, mentre non sono riuscito ad identificare una via di trasduzione in grado di regolare c-Jun.

Ho osservato nelle NMuMG, ma non nelle altre linee cellulari, un aumento del marcatore Krt18 a seguito di stimolazione con terreno di crescita.

I dati ottenuti hanno anche mostrato una diretta correlazione tra la variazione di espressione dei geni a variazione rapida, oggetto di studio, e la modulazione di alcuni geni bersaglio, a variazione lenta, direttamente implicati nel controllo della proliferazione cellulare.

Infine l'analisi di alcuni microRNA, coinvolti nella regolazione dell'espressione genica dei miei geni di interesse, non ha prodotto risultati statisticamente significativi.

## **Bibliografia**

- Accornero, P.; Miretti, S.; Bersani, F.; Quaglino, E.; Martignani, E.; Baratta, M.; (2012). Met receptor acts uniquely for survival and morphogenesis of EGFR-dependent normal mammary epithelial and cancer cells. *PLoS One.*, 7(9):e44982.
- Adamson, E. D.; Mercola, D.; (2002). Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumour Biol.*, 23(2):93-102.
- Ambros, V.; (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature.*, 431(7006):350-5.
- Avraham, R.; Sas-Chen, A.; Manor, O.; Steinfeld, I.; Shalgi, R.; Tarcic, G.; Bossel, N.; Zeisel, A.; Amit, I.; Zwang, Y.; Enerly, E.; Russnes, H. G.; Biagioni, F.; Mottolese, M.; Strano, S.; Blandino, G.; Børresen-Dale, A. L.; Pilpel, Y.; Yakhini, Z.; Segal, E.; Yarden, Y.; (2010). EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. *Sci Signal.*, 3(124):ra43.
- Avraham, R.; Yarden, Y.; (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 12(2):104-17.
- Baek, D.; Villén, J.; Shin, C.; Camargo, F. D.; Gygi, S. P.; Bartel, D. P.; (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature.*, 455(7209):64-71.
- Bahler, J.; (2005). Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet.*, 39:69-94.
- Barca-Mayo, O.; Lu, Q. R.; (2012). Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front Neurosci.*, 6: 13.
- Baron, V.; Adamson, E. D.; Calogero, A.; Ragona, G.; Mercola, D.; (2006). The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther.*, 13(2):115-24.
- Bauer, I.; Hohl, M.; Al-Sarraj, A.; Vinson, C.; Thiel, G.; (2005). Transcriptional activation of the Egr-1 gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate and extracellular signal-regulated protein kinase. *Arch Biochem Biophys.*, 438(1):36-52.
- Behm-Ansmant, I.; Rehwinkel, J.; Doerks, T.; Stark, A.; Bork, P.; Izaurralde, E.; (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.*, 20(14):1885-98.
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14(8):518-28.
- Bhattacharyya, S. N.; Habermacher, R.; Martine, U.; Closs, E. I.; Filipowicz, W.; (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 71:513-21.
- Bhattacharyya, S.; Fang, F.; Tourtellotte, W.; Varga, J.; (2013). Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol.*, 229(2):286-97.
- Biegging, K.; Mello, S.; Attardi, L. D.; (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14(5): 359–370.
- Booy, E. P.; Henson, E. S.; Gibson, S. B.; (2011). Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene.*, 30(20):2367-78.
- brady, C. A.; Attardi, L. D.; (2010). p53 at a glance. *J Cell Sci.*, 123(15): 2527–2532.

- Bregues, M.; Teixeira, D.; Parker, R.;. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. , 310(5747):486-9.
- Brisken, C.; Duss, S.;. (2007). Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem Cell Rev*, 3(2):147-56.
- Cantley, L. C.;. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*., 296: 1655-1657.
- Capuco, A. V.; Choudary, R. K.; Daniels, K. M.; Li, R. W.; Evock-Clover, C. M.;. (2012). Bovine mammary stem cells: cell biology meets production agriculture. *Animal*., 6:382-393.
- Chavrier, P.; Zerial, M.; Lemaire, P.; Almendral , J.; Bravo , R.; Charnay, P.;. (1988). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *EMBO J*., 7(1):29-35.
- Chinenov , Y.; Kerppola , T. K.;. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*. , 20(19):2438-52.
- Chiu, R.; Angel, P.; Karin , M.;. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell*. , 59(6):979-86.
- Ciarloni, L.; Mallepell, S.; Brisken, C.;. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. , 104(13):5455-60.
- Cowin, P.; Wysolmerski, J.;. (2010). Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*., 2(6):a003251.
- Cunha, G. R.; Young, P.; Christov, K.; Guzman, R.; Nandi, S.; Talamantes, F.; Thordarson, G.;. (1995). Mammary phenotypic expression induced in epidermal cells by embryonic mammary mesenchyme. *Acta Anat.*, 152(3):195-204.
- D'Cruz, C. M.; Moody, S. E.; Master, S. R.; Hartman, J. L.; Keiper, E. A.; Imielinski, M. B.; Cox, J. D.; Wang, J. Y.; Ha, S. I.; Keister, B. A.; Et Al.;. (2002). Persistent parity-induced changes in growth factors, TGF-beta3, and differentiation in the rodent mammary gland. *Mol Endocrinol*., 16(9):2034-51.
- Derry, M. C.; Yanagiya, A.; Martineau, Y.; Sonenberg, N.;. (2006). Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. , 71:537-43.
- Doncic, A.; Falleur-Fettig, M.; Skotheim, J. M.;. (2011). Distinct interactions select and maintain a specific cell fate. *Mol Cell*. , 43(4):528-39.
- Dynlacht , B. D.; Flores, O.; Lees, J. A.; Harlow, E.;. (1994). Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev*. , 8(15):1772-86.
- Ehrengruber, M. U.; Muhlebach , S. G.; Söhrman , S.; Leutenegger, C. M.; Lester, H. A.; Davidson , N.;. (2000). Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus. *Gene*., 258(1-2):63-9.
- Engelman, J. A.; Luo, J.; Cantley, L. C.;. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*., 7(8):606-19.
- Fowler, K. J.; Walker, F.; Alexander, W.; Hibbs, M. L.; Nice, E. C.; Bohmer, R. M.; Mann, G. B.; Thumwood, C.; Maglitto, R.; Danks, J. A.; et al.;. (1995). A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A*., 92(5):1465-9.
- Franke, T. F.; Kaplan, D. R.; Cantley, L. C.; Toker, A.;. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*., 275(5300):665-8.

- Fraser, P.; Bickmore W.; (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature.*, 447(7143):413-7.
- Gallego, M. I.; Binart, N.; Robinson, G. W.; Okagaki, R.; Coschigano, K. T.; Perry, J.; Kopchick, J. J.; Oka, T.; Kelly, P. A.; Hennighausen, L.; (2001). Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol.*, 229:163-175.
- Gashler, A. L.; Swaminathan, S.; Sukhatme, V. P.; (1993). A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol.* , 13(8):4556-71.
- Gaubatz , S.; Lindeman, G. J.; Ishida , S.; Jakoi, L.; Nevins , J. R.; Livingston, D. M.; Rempel , R. E.; (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell.* , 6(3):729-35.
- Han, S.; Meier, K. E.; (2009). Integrated modulation of phorbol ester-induced Raf activation in EL4 lymphoma cells. *Cell Signal.* , 21(5):793-800.
- Hargreaves , D. C.; Horng, T.; Medzhitov, R.; (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell.*, 138(1):129-45.
- Healy, S.; Khan, P.; Davies, J. R.; (2013). Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacol Ther.* , 137(1):64-77.
- Helin, K.; (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev.* , 8(1):28-35.
- Herschman , H. R.; (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem.*, 60:281-319.
- Hivin, P.; Arpin-André, C.; Clerc, I.; Barbeau, B.; Mesnard, J. M.; (2006). A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency. *Nucleic Acids Res.*, 34(9):2761-72.
- Hoffman, M M; Birney, E.; (2007). Estimating the neutral rate of nucleotide substitution using introns. *Mol. Biol. Evol.*, 24, 522-531.
- Huntzinger, E., & Izaurralde , E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* , 12(2):99-110.
- Huse, M.; Kuriyan, J.; (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.*, 109(3):275-82.
- Jorissen, R. N.; Walker, F.; Pouliot, N.; Garret, T. P.; Ward, C. W.; Burgess, A. W.; (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*, 284(1):31-53.
- Kastan, MB.; bartek, J.; (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432:316-323.
- Katso, R.; Okkenhaug, K.; Ahmadi, K.; White, S.; Timms, J.; Waterfield, M. D.; (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 17:615-75.
- Katz, M.; Amit, I.; Yarden, Y.; (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta.*, 1773(8):1161-76.
- Klippel, A.; Kavanaugh, W. M.; Pot, D.; Williams, L. T.; (1997). A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol.*, 17(1):338-44.



- Krek, W.; Ewen, M. E.; Shirodkar, S.; Arany, Z.; Kaelin, W. G.; Livingston, D. M.; (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell.* , 78(1):161-72.
- Krol, J.; Loedige, I.; Filipowicz, W.; (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* , 11(9):597-610.
- Kyriakis, J. M.; App, H.; Zhang, X. F.; Banerjee, P.; Brautigan, D. L.; Rapp, U. R.; Avruch, J.; (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385):417-21.
- Lane, D.; Levine, A.; (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2(12).
- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V.; (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.*, 75(5):843-54.
- Lindblad-toh, K et al. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of domestic dog. *Nature*, 438, 803-819.
- Liu, H.; Qiu, Y.; Xiao, L.; Dong, F.; (2006). Involvement of protein kinase Cepsilon in the negative regulation of Akt activation stimulated by granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol.*, 176(4):2407-13.
- Macias, H.; Hinck, L.; (2012). Mammary Gland Development. *Dev Biol.*, 1(4): 533–557.
- Marshall, C. J.; (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.*, 80(2):179-85.
- Martignani, E.; Eirew, P.; Eaves, C. J.; Accornero, P.; Baratta, M.; (2010). Human milk protein production in xenografts of genetically engineered bovine mammary epithelial stem cells. *Plos.One*, 5:e13372.
- Mechta-Grigoriou, F.; Gerald, D.; Yaniv, M.; (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene.* , 20(19):2378-89.
- Moelling, K.; Schad, K.; Bosse, M.; Zimmermann, S.; Schwenecker, M.; (2002). Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem.* , 277(34):31099-106.
- Monje, P.; Marinissen, M. J.; Gutkind, J. S.; (2003). Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol.*, 23(19):7030-43.
- Muller, H. J.; Skerka, C.; Bialonski, A.; Zipfel, P. F.; (1991). Clone pAT 133 identifies a gene that encodes another human member of a class of growth factor-induced genes with almost identical zinc-finger domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88(22):10079-83.
- Murphy, L. O.; Blenis, J.; (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.*, 31(5):268-75.
- Murphy, L. O.; Smith, S.; Chen, R. H.; Fingar, D. C.; Blenis, J.; (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol.* , 4(8):556-64.
- Normanno, N.; De Luca, A.; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M. R.; Carotenuto, A.; De Feo, G.; Caponigro, F.; Salomon, D. S.; (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1):2-16.
- O'Brien, S. J.; Murphy, W.; (2003). Genomics. A dog's breakfast? *Science*, 301, 1854-1855.

- O'Donnell , A.; Odrowaz , Z.; Sharrocks , A. D.;. (2012). Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? *Biochem Soc Trans.* , 40(1):58-66.
- Okines, A.; Cunningham, D.; Chau, I.;. (2011). Targeting the human EGFR family in esophagogastric cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 492-503.
- Olayioye, M. A.; Neve, R. M.; Lane, H. A.; Hynes, N. E.;. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19(13):3159-67.
- Oliveira Fernandes, M.; Tourtellotte , W. G.;. (2015). Egr3-dependent muscle spindle stretch receptor intrafusal muscle fiber differentiation and fusimotor innervation homeostasis. *J Neurosci.* , 35(14):5566-78.
- Ostrander, E. A.; Giger, U.; Lindblad-Toh, K.;. (2006). The dog and its genome. *Cold Spring Harbor Monograph Series* 44, 84.
- Paoloni, M.; Khanna, C.;. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev cancer*, 8(2):147-56.
- Patwardhan , S.; Gashler, A.; Siegel , M. G.; Chang , L. C.; Joseph, L. J.; Shows, T. B.; Le Beau , M. M.; Sukhatme , V. P.;. (1991). EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene.* , 6(6):917-28.
- Piechaczyk, M.; Blanchard, J. M.;. (1994). c-fos proto-oncogene regulation and function. *Oncology Hematology.*, 17: 93-131 .
- Piques , M.; Schulze, W. X.; Höhne, M.; Usadel, B.; Gibon, Y.; Rohwer , J.; Stitt , M.;. (2009). Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in Arabidopsis. *Mol Syst Biol.*, 5:314.
- Pratilas, C. A.; Solit , D. B.;. (2010). Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res.* , 16(13):3329-34.
- Ramirez-Carrozzi, V. R.; Braas, D.; Bhatt, D. M.; Cheng, C. S.; Hong, C.; Doty, K. R.; Black, J. C.; Hoffman, A.; Carey, M.; Smale, S. T.;. (2009). A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell.*, 138(1):114-28.
- Rehwinkel, J.; Behm-Ansmant, I.; Gatfield, D.; Izaurralde, E.;. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA.* , 11(11):1640-7.
- Roskoski, R.;. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* , 66(2):105-43.
- Ruan, W.; Kleinberg, D. L.;. (1999). Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology*, 140(11):5075-81.
- Russo, M. W.; Sevetson , B. R.; Milbrandt, J.;. (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(15):6873-7.
- Saito, T.; Tamura, D.; Asano, R.;. (2014). Usefulness of selective COX-2 inhibitors as therapeutic agents against canine mammary tumors. *Oncol Rep.*, 31(4):1637-44.
- Sakakura, T.; Sakagami, Y.; Nishizuka, Y.;. (1982). Dual origin of mesenchymal tissues participating in mouse mammary gland embryogenesis. *Dev Biol.*, 91(1):202-7.
- Santino, P.; Martignani, E.; Miretti, S.; Baratta, M.; Accornero, P.;. (2017). Mechanisms of modulation of the Egr gene family in mammary epithelial cells of different species. *General and Comparative Endocrinology*, 247: 87–96.

- Seiler , M. P.; Mathew , R.; Liszewski , M. K.; Spooner, C. J.; Barr, K.; Meng, F.; Singh, H.; Bendelac, A.;. (2012). Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol.* , 13(3):264-71.
- Selbach , M.; Schwanhäusser , B.; Thierfelder , N.; Fang , Z.; Khanin, R.; Rajewsky , N.;. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.*, 455(7209):58-63.
- Sjaastad, O.V.; Hove, K.; Sand, O.;. (2010). Physiology of domestic animals. *Physiology of domestic animals.*
- Skotheim, J. M.; Di Talia , S.; Siggia, E. D.; Cross, F. R.;. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature.*, 454(7202):291-6.
- Smeal , T.; Binetruy, B.; Mercola, D. A.; Birrer , M.; Karin, M.;. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature.*, 354(6353):494-6.
- Soltoff, S. P.; Cantley, L. C.;. (1996). p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem.*, 271(1):563-7.
- Songyang, Z.; Shoelson, S. E.; Chaudhuri, M.; Gish, G.; Pawson, T.; Haser, W. G.; King, F.; Roberts, T.; Ratnofsky, S.; Lechleider, R. J.; et Al.;. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.*, 72(5):767-78.
- Sukhatme , V. P.; Kartha, S.; Toback, F. G.; Taub, R.; Hoover , R. G.; Tsai-Morris, C. H.;. (1987). A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* , 1(4):343-55.
- Sukhatme , V. P.;. (1990). Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol.* , 1(6):859-66.
- Sutor , S. L.; Vroman, B. T.; Armstrong, E. A.; Abraham, R. T.; Karnitz , L. M.;. (1999). A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf. *J Biol Chem.* , 274(11):7002-10.
- Tang, Z.I.;. (2010). The Domino and Clock Models of Cell Cycle Regulation. *Nature Education*, 3(9):56.
- Tao, X.; Liu, J.; Chen, L.; Zhou, Y.; Tang, K.;. (2015). EGR1 induces tenogenic differentiation of tendon stem cells and promotes rabbit rotator cuff repair. *Cell Physiol Biochem.* , 35(2):699-709.
- Tarcic, G.; Avraham, R.; Pines, G.; Amit, I.; Shay, T.; Lu, Y.; Zwang, Y.; Katz, M.; Ben-Chetrit , N.; Jacob-Hirsch, J.; Virgilio, L.; Rechavi, G.; Mavrothalassitis, G.; Mills, G. B.; Domany, E.; Yarden, Y.;. (2012). EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *FASEB J.* , 26(4):1582-92.
- Thiel, G.; Kaufmann, K.; Magin, A.; Lietz, M.; Bach, K.; Cramer, M.;. (2000). The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta.* , 1493(3):289-301.
- Thiel, G.; Cibelli, G.;. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol.* , 193(3):287-92.
- Tourtellotte, W. G.; Nagarajan , R.; Auyeung, A.; Mueller, C.; Milbrandt , J.;. (1999). Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in Egr4-deficient mice. *Development.* , 126(22):5061-71.

- Tullai, J. W.; Schaffer, M. E.; Mullenbrock, S.; Sholder, G.; Kasif, S.; Cooper, G. M.; (2007). Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J Biol Chem.*, 282(33):23981-95.
- van Straaten, F.; Müller, R.; Curran, T.; Van Beveren, C.; Verma, I. M.; (1983). Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 80(11):3183-7.
- Whitmarsh, A. J.; Shore, P.; Sharrocks, A. D.; Davis, R. J.; (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science.*, 269(5222):403-7.
- Wiesen, J. F.; Young, P.; Werb, Z.; Cunha, G. R.; (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development.*, 126(2):335-44.
- Withrow, S. J.; Vail, D. M.; Rodney, P.; (2007). Withrow and MacEwen's Small Animal . *Clinical oncology*, 846.
- Xu, M.; Sheppard, K. A.; Peng, C. Y.; Yee, A. S.; Piwnica-Worms, H.; (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol.*, 14(12):8420-31.
- Yarden, Y.; (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 4:S3-8.
- Yoon, S.; Seger, R.; (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.*, 24(1):21-44.
- Yu, J.; Zhang, S. S.; Saito, K.; Williams, S.; Arimura, Y.; Ma, Y.; Ke, Y.; Baron, V.; Mercola, D.; Feng, G. S.; Adamson, E.; Mustelin, T.; (2009). PTEN regulation by Akt-EGR1-ARF-PTEN axis. *EMBO J.*, 28(1):21-33.
- Yu, J.; Zhang, Y.; McIlroy, J.; Rordorf-Nikolic, T.; Orr, G. A.; Backer, J. M.; (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110 $\alpha$  catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol.*, 18(3):1379-87.
- Zhang, H.; Chen, X.; Wang, J.; Guang, W.; Han, W.; Zhang, H.; Tan, X.; Gu, Y.; (2014). EGR1 decreases the malignancy of human non-small cell lung carcinoma by regulating KRT18 expression. *Sci Rep.*, 4:5416.
- Zwang, Y.; Sas-Chen, A.; Drier, Y.; Shay, T.; Avraham, R.; Lauriola, M.; Shema, E.; Lidor-Nili, E.; Jacob-Hirsh, J.; Amariglio, N.; Lu, Y.; Mills, G. B.; Rechavi, G.; Oren, M.; Domany, E.; Yarden, Y.; (2011). Two phases of mitogenic signaling unveil roles for p53 and EGR1 in elimination of inconsistent growth signals. *Mol Cell*, 42(4):524-35.

