

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA
XXIII CICLO

Coordinatore: Prof.ssa F. Stivala

Dott.ssa EVANGELIA SKARMOUTSOU

Notch1 e TGF- β 1 nell'espressione di FOXP3 in linee
cellulari umane di melanoma

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore e Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa F. Stivala

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

I. Introduzione	3
<i>a. Il melanoma</i>	3
<i>b. La via del segnale del Notch</i>	5
<i>c. Il fattore di crescita trasformante-β1(TGF-β1)</i>	9
<i>d. Il fattore di trascrizione FOXP3</i>	13
<i>e. Meccanismi di regolazione di FOXP3 e "cross-talk" delle vie di segnale</i>	15
II. Scopo del lavoro	20
III. Materiali e metodi	21
<i>a. Colture cellulari e trattamenti</i>	21
<i>b. Test di vitalità</i>	22
<i>c. Estrazione dell'RNA e RT-PCR</i>	23
<i>d. Western blotting</i>	24
<i>e. Immunoistochimica</i>	27
<i>f. Analisi statistica</i>	27
IV. Risultati	28
<i>a. Il trattamento con l'inibitore della γ-secretasi induce una inibizione dose-dipendente della crescita cellulare.</i>	28
<i>b. Le linee di melanoma A375 e A2058 esprimono il fattore di trascrizione FOXP3.</i>	29
<i>c. Il trattamento con TGF-β1 incrementa l'espressione genica e proteica del fattore FOXP3 nelle linee di melanoma A375 e A2058.</i>	31
<i>d. Le vie del segnale del Notch e del TGFβ1 agiscono sinergicamente nel modulare l'espressione genica e proteica del fattore FOXP3 nelle linee di melanoma A375 e A2058.</i>	33
V. Discussione	39
VI. Conclusioni	43
VII. Bibliografia	44

I. Introduzione

a. Il melanoma

Il melanoma rappresenta una neoplasia altamente aggressiva e resistente alle terapie convenzionali. Questo tumore origina dalla trasformazione di melanociti, che risiedono nello strato basale dell'epidermide. I melanociti originano dalle cellule della cresta neurale e sono principalmente distribuiti nella pelle, nelle leptomeningi del sistema nervoso centrale, nelle strie vascolari dell'orecchio e nel tratto uveale dell'occhio. I melanociti sono cellule altamente differenziate e specializzate nella sintesi della melanina, un pigmento che provvede a proteggere i cheratinociti dall'effetto dannoso delle radiazioni UV tramite la capacità di assorbire la luce all'interno di un ampio spettro di lunghezze d'onda. Una volta lasciata la cresta neurale, i melanociti si distribuiscono lungo lo strato basale dell'epidermide, dove ogni melanocita viene circondato da circa 30-50 cheratinociti. Tra i melanociti e i cheratinociti si instaura un contatto grazie alla presenza di processi dendritici melanocitici (Jimbow et al., 1993). La melanina prodotta nei melanosomi è trasferita ai cheratinociti attraverso questi stessi processi.

Sebbene non sia molto comune, il melanoma rappresenta la forma più letale e aggressiva tra i tumori cutanei. Il melanoma cutaneo presenta la maggiore incidenza e mortalità nelle popolazioni caucasiche e nel mondo si verificano circa 100.000 nuovi casi all'anno, corrispondenti all'1% di tutti i tumori maligni. Attualmente in Italia l'incidenza del tumore aumenta mediamente del 5-7% l'anno.

Le osservazioni cliniche a lungo termine e quelle istopatologiche sul melanoma cutaneo hanno permesso di definire cinque importanti stadi della progressione tumorale (Clark, 1991).

- i) Il nevo comune acquisito, la più precoce lesione melanocitica iperplastica.
- ii) Il nevo displastico con incrementata atipia strutturale, il candidato a precursore del melanoma cutaneo.
- iii) La fase di crescita radiale (RGP), primo stadio maligno senza capacità di rapida crescita e metastatica.
- iv) La fase di crescita verticale (VGP), caratterizzata da un'infiltrazione cellulare maligna a livello dermico e del sottocutaneo con un associato rischio di disseminazione sistemica.
- v) Il melanoma metastatico, il livello più avanzato di progressione tumorale.

Poiché il melanoma tende generalmente ad insorgere ad un'età relativamente precoce rispetto alla maggior parte degli altri tumori solidi, un numero limitato di eventi è probabilmente richiesto per la sua trasformazione maligna. Tra i fattori di rischio si annoverano la familiarità, l'alta densità di nevi, la loro atipia morfologica e la pelle chiara. Tuttavia, oltre a questi fattori genetici, vanno inclusi anche diversi fattori ambientali, quali l'esposizione alla luce solare, che possono aumentare il rischio di insorgenza del tumore. L'induzione della carcinogenesi ad opera delle radiazioni UV è dovuta probabilmente alla diretta interazione dei fotoni con il DNA o a meccanismi indiretti che generano molecole reattive (es. chinoni, ROS) in grado di danneggiare il DNA (Peak et al., 1987).

È noto che il melanoma è caratterizzato dalla presenza di alterazioni di diverse vie del segnale, quali NRas (Demunter et al, 2001), BRaf (Davies et al, 2002), PTEN/PI3K/Akt (Stahl et al, 2004), il segnale costitutivo del recettore dell'FGF (Becker et al., 1992), Wnt (Bittner et al., 2000; Weeraratna et al., 2002), e p16/ARF (Cannon-Albright et al., 1996). Tali alterazioni causerebbero la crescita incontrollata, la resistenza all'apoptosi e i comportamenti metastatici.

Oggi un considerevole sforzo si attua per lo sviluppo di terapie mirate ad inibire queste funzioni tumorigeniche, come pure per identificare nuove vie di segnale coinvolte nel melanoma.

b. La via del segnale del Notch

Nel 1917 Morgan descrisse una varietà di moscerini della frutta (*Drosophila melanogaster*) con delle tacche ai margini delle ali (Morgan, 1917). Questo fenotipo caratterizzato da ali con tacche (*notched*) risulta da una parziale perdita della funzione del gene Notch di *Drosophila*, clonato a metà degli anni 80 (Kidd et al., 1986). Il gene Notch codifica per un recettore transmembrana, parte di una cascata di segnale altamente conservata che regola le comunicazioni intercellulari e che è coinvolta in importanti funzioni negli organismi superiori, sia durante lo sviluppo che nell'omeostasi tissutale. Il primo omologo umano del gene Notch di *Drosophila* è stato identificato negli ultimi anni 80 (Reynolds et al., 1987). All'inizio degli anni 90, Ellisen et al. (1991) hanno identificato il gene con il clonaggio e il sequenziamento di una traslocazione cromosomica in un piccolo numero di cellule T linfoblastiche di campioni di pazienti con leucemia. Le cellule T di questi pazienti presentavano una traslocazione t(7;9)(q34;q34.3), che

induceva l'espressione del recettore NOTCH1, troncato a livello N terminale e indipendente da ligando. Questa scoperta rappresenta la prima associazione fra la cascata del Notch e il cancro nell'uomo. Nel 2004 si dimostrò che circa il 50% dei pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta a cellule T aveva mutazioni nel gene umano NOTCH1 (Weng et al., 2004). Quest'ultima scoperta aprì la strada a molti ricercatori per identificare un simile ruolo del Notch nei tumori solidi. Nel frattempo i biologi dello sviluppo hanno identificato quattro membri della famiglia Notch nei mammiferi (Notch1-4), le cui funzioni sono fondamentali per lo sviluppo embrionale e post-natale, come pure nello sviluppo di diverse forme tumorali.

Nei tessuti dei vertebrati e durante la tumorigenesi, l'inibizione della differenziazione, l'avvio ai processi proliferativi, la specificazione della linea a livello delle ramificazioni dello sviluppo e l'induzione della differenziazione rappresentano le funzioni più importanti del segnale Notch. Quindi, vi è un interesse sempre maggiore nel bloccare o attivare il segnale Notch in differenti contesti.

I mammiferi possiedono quattro recettori Notch (Notch1-4) che riconoscono cinque ligandi (Delta-like1, 3, e 4 e Jagged 1 e 2) (Bray, 2006). Appena sintetizzati i recettori Notch vengono proteoliticamente scissi da una proteasi furina-simile nell'apparato del Golgi durante il loro trasporto verso la superficie cellulare (sito S1). Questa scissione genera un recettore eterodimerico che consiste di una unità extracellulare (N^{EC}), la quale viene legata non covalentemente ad una seconda subunità contenente il dominio extracellulare di eterodimerizzazione e il dominio transmembrana, seguita da una regione citoplasmatica del recettore Notch (N^{TM}). La porzione extracellulare dei recettori

contiene tra i 29 e i 36 *repeats* EGF-simili coinvolti nel legame del ligando, seguiti da tre *repeats* LIN12 ricchi in cisteina che prevengono una attivazione indipendente da ligando, e da un tratto idrofobico di aminoacidi che mediano l'eterodimerizzazione fra N^{EC} e NTM. La coda citoplasmatica del recettore comprende elementi multipli che includono domini per segnali di localizzazione nucleare, come pure per interazioni proteina-proteina e transattivazione.

Come schematizzato in fig.1, la via del segnale Notch prende inizio con l'interazione ligando-recettore tra cellule adiacenti, che porta a due scissioni proteolitiche del recettore. La prima è mediata da metalloproteasi della famiglia ADAM, che scindono i recettori a 12-13 aminoacidi a monte della regione transmembrana (sito S2). Il dominio extracellulare rimosso viene endocitato dalla cellula che esprime il ligando, un processo che è dipendente da monoubiquitinazione della coda citoplasmatica dei ligandi ad opera di ligasi E3-ubiquitina. L'interazione con il ligando a livello del N^{EC} induce un cambiamento conformazionale del recettore per permettere la proteolisi a livello del sito S2. Dopo la rimozione del dominio extracellulare, avviene un secondo taglio nel dominio transmembrana (sito S3), mediato dalla γ -secretasi di un complesso multiproteico. Questa scissione libera il dominio intracellulare dei recettori Notch (NICD, *Notch intracellular domain*), che successivamente si porta al nucleo per eterodimerizzarsi col fattore di trascrizione CSL allo scopo di formare un complesso trascrizionale nucleare con breve emivita. Il fattore di trascrizione CSL è chiamato CBF-1 nell'uomo, soppressore di *hairless* nella *Drosophila*, Lag nel *Caenorhabditis elegans* e RBP-J nel topo. In seguito al legame col CSL, NICD recluta altri coattivatori, quali le proteine mastermind (MAML1-3), le quali a loro

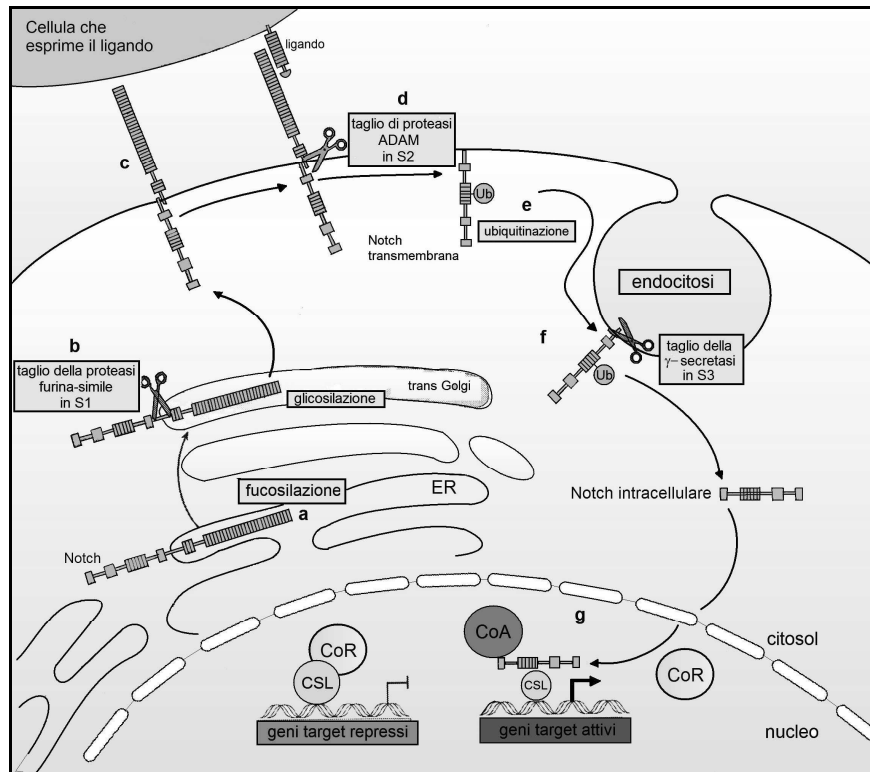


Fig.1 a: Il singolo peptide Notch (circa 300 kDa) viene sintetizzato e fucosilato nel reticolo endoplasmatico (ER) dalla fucosiltrasferasi FUT1. **b:** Questo processo facilita l'invio della proteina verso il trans-Golgi, dove viene tagliato da una proteasi furina-simile al sito S1 per generare l'eterodimero legato non covalentemente. Tale eterodimero è composto da una porzione intra- ed extracellulare. Successivamente l'eterodimero subisce delle glicosilazioni ad opera di numerose glicosiltrasferasi appartenenti alla famiglia *Fringe*. **c:** l'eterodimero si associa alla membrana plasmatica dove funziona da recettore. **d:** L'interazione col ligando induce il taglio proteolitico del recettore ad opera di proteasi ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) TACE (*tumour-necrosis-factor- α -converting enzyme*). **e:** La porzione intracellulare del frammento transmembrana viene monoubiquitinata. **f:** Seguono l'endocitosi del frammento transmembrana e il taglio ad opera della γ -secretasi endosomiale che rilascia del frammento intracellulare. **g:** il Notch intracellulare trasloca nel nucleo per associarsi con il repressore trascrizionale (CSL) per la regolazione dell'espressione genica. (CoA, coattivatori; CoR, corepressori).

volta reclutano il mediatore di trascrizione MED8 per l'induzione dell'espressione trascrizionale dei geni target a valle.

Alcuni geni target del Notch, inclusi i membri delle famiglie *enhancer-of-split* (Hes) e *Hairy-related* (Hrt o Hey), sono presenti in molti tessuti, mentre altri sembrano essere geni target tessuto-specifici. Recenti studi infatti rivelano l'esistenza di un grande numero di geni che possono essere direttamente regolati dal Notch (Krejci et al., 2009; Weng et al., 2006).

Inoltre la via del segnale del Notch può essere regolato a diversi livelli, inclusa l'espressione cellulo-specifica di ligandi e recettori, o tramite glicosilazione del dominio Notch extracellulare da parte della glicosiltrasferasi Fringe, la quale influenza l'affinità dei recettori Notch a certi ligandi (Haines e Irvine, 2003). Infine, il dominio PEST, situato all'estremità C-terminale del recettore, è responsabile della rapida degradazione mediata dall'ubiquitina, per assicurare una breve attività del Notch (Thompson et al., 2007).

c. Il fattore di crescita trasformante- β 1 (TGF- β 1)

Il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) regola alcuni processi cellulari fondamentali, quali la crescita, la migrazione, l'adesione, la formazione della matrice extracellulare e l'apoptosi. Il TGF- β è anche coinvolto nei processi immunitari e infiammatori agendo da potente fattore chemotattico, che riesce a reclutare monociti, neutrofilo e linfociti a concentrazioni femtomolari. TGF- β 1, - β 2 e - β 3 rappresentano le tre isoforme presenti nei mammiferi. Tra queste isoforme il TGF- β 1 è il più ampiamente espresso nel sistema immunitario. Come già detto, esso è una citochina pleiotropica con potente attività modulatoria

(Govinden e Bhoola, 2003). Topi privi di TGF- β 1 sviluppano una malattia infiammatoria autoimmunitaria multiorgano che li porta alla morte nel giro di alcune settimane dopo la nascita (Kulkarni et al., 1993). Poiché tale morte neonatale, come pure l'infiammazione, possono essere evitate con l'eliminazione della popolazione cellulare T matura, le cellule T giocherebbero un ruolo importante in questa forma infiammatoria severa (Bomireddy et al., 2004). Topi transgenici, le cui le cellule T sono incapaci di rispondere al TGF- β , sviluppano malattie autoimmunitarie, suggerendo così che il segnale del TGF- β è essenziale per l'omeostasi delle cellule T (Li et al., 2006).

Il TGF- β viene sintetizzato inizialmente in forma inattiva, il precursore pre-pro-TGF- β . La pro-proteina dimerica viene chiamata peptide associato alla latenza (*latency-associated peptide, LAP*). Il complesso LAP/TGF- β si lega alla proteina legante il TGF- β (LTBP) di circa 125-160 kDa. Quindi il complesso LTBP/LAP/TGF- β , una volta secreto, interagisce col collagene e altre proteine della matrice di tessuto (Taylor, 2009).

Le vie del segnale più importanti dei recettori TGF- β (TGF- β R) sono relativamente semplici (Massague, 1998). Dopo essersi legato al TGF- β , il recettore attiva i fattori di trascrizione Smad, composti da tre proteine simili: due Smad associati al recettore (Smad 2 e Smad3), e lo Smad4. Lo Smad2 o 3 viene direttamente fosforilato e attivato dal recettore, dimerizzandosi con lo Smad4 o TIF1 γ (He et al., 2006). Il complesso Smad attivo trasloca nel nucleo e, insieme ad altri cofattori nucleari regola la trascrizione dei geni target. Esistono comunque delle vie Smad-indipendenti (Derynck e Zhang, 2003). Attraverso meccanismi ancora poco noti, il TGF- β induce una rapida attivazione delle vie della chinasi regolata da segnale extracellulare Ras (Erk), della MAPK, TAK1-MKK4-JNK,

TAK1-MKK3/6-p38, Rho-Rac-cdc42 MAPK e PI3K-Akt. Quindi il TGF- β esercita i suoi effetti sulle funzioni cellulari tramite meccanismi diversi tra loro (fig. 2).

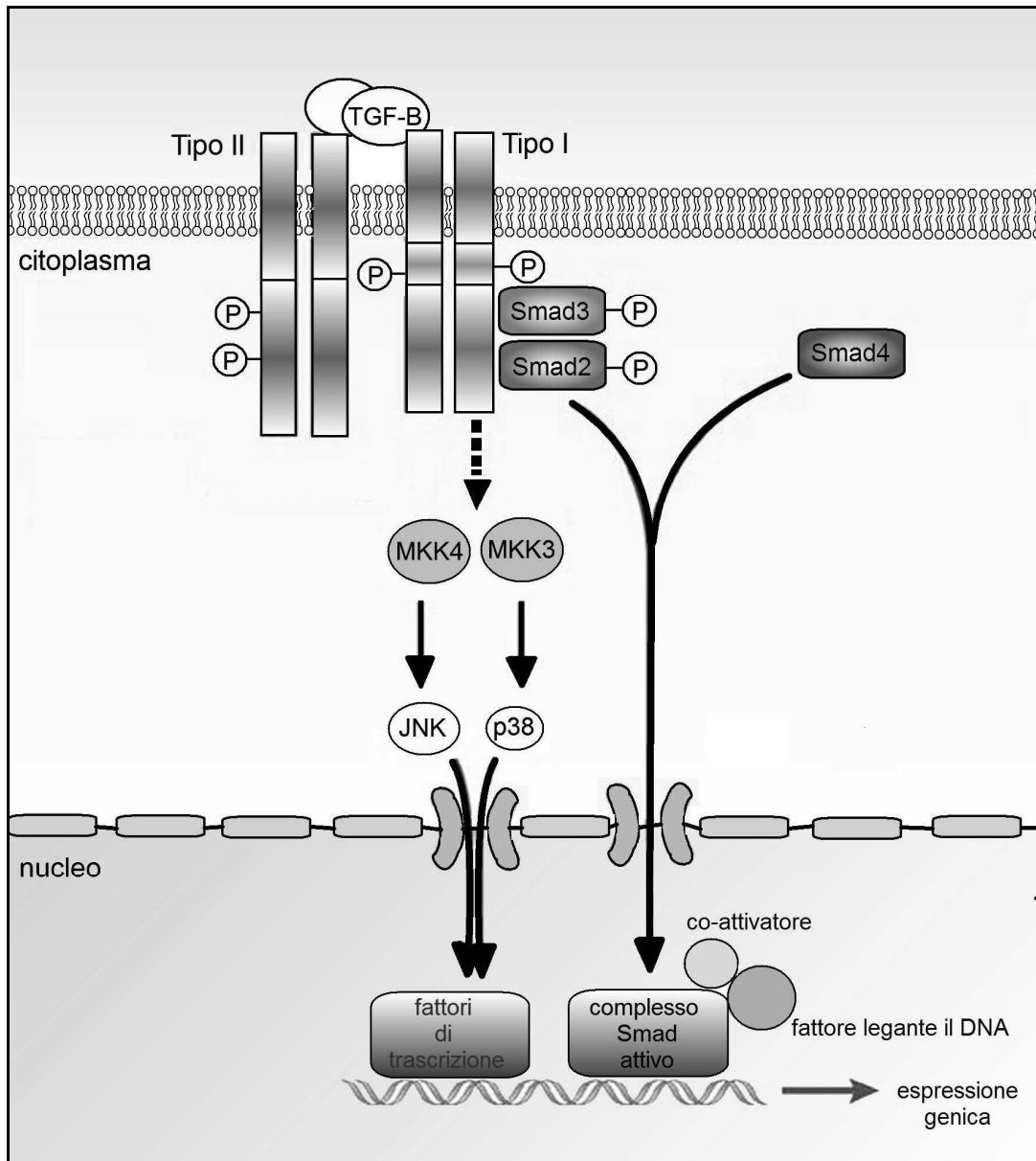


Fig. 2. Il TGF-β si lega alla chinasi recettore di tipo II reclutando così il recettore di tipo I, che si fosforila. Nella via di segnale dipendente dalle Smad, il recettore di tipo I attivato fosforila quindi lo smad2 e Smad3 associati al recettore, i quali a loro volta formano un complesso con lo Smad4 per traslocare infine nel nucleo. Quindi si forma nel nucleo complesso Smad attivato che, insieme ad altri coattivatori e fattori leganti il DNA cellulo-specifici, regolano l'espressione genica. Oltre alla via canonica dipendente dagli Smad, il TGF-β può attivare le vie della chinasi N-terminale JUN (JNK) e della proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK; p38). Esistono altri componenti Smad, qui non raffigurati, quali gli Smads1, 5 e 8 e gli Smad inibitori (I-Smad6 e 7).

d. Il fattore di trascrizione FOXP3

Le proteine *Forkhead* rappresentano una grande famiglia di fattori di trascrizione, diversi dal punto di vista funzionale (Kaufmann e Knochel, 1996). Il nome *forkhead* deriva dal prodotto genico *fork head* della *Drosophila melanogaster* (*fh*), richiesto per la formazione delle regioni embrionali terminali (Weigel et al., 1989). Successivamente a questa scoperta è stato identificato un nuovo gruppo di fattori di trascrizione epatici (la famiglia del fattore nucleare epatico 3, HNF3), i quali presentano domini di legame col DNA molto simili a quelli del prodotto genico *fh* (Lai et al., 1990). La scoperta di questo *motif forkhead* portò alla definizione di una nuova famiglia di fattori di trascrizione che sono presenti dal lievito all'uomo. I fattori di trascrizione *forkhead* sono comunemente associati con la regolazione dello sviluppo. Negli ultimi quindici anni sono stati identificati oltre cento membri della famiglia dei fattori di trascrizione *forkhead*. Il simbolo FOX (*forkhead box*) viene utilizzato per tutti i fattori *forkhead* dei vertebrati. Esistono 15 sottofamiglie (o classi) di proteine FOX, e in ognuna di questa, un gene viene identificato con un numero. I geni che codificano per i fattori nell'uomo vengono indicati con la sigla formata da tutte le lettere maiuscole (FOX), mentre nei topi solamente l'iniziale è resa maiuscola (Fox). Sia le proteine umane e di topo vengono invece indicate con tutte le lettere in formato maiuscolo (FOX). Il dominio *forkhead* che lega il DNA viene descritto come una *winged helix* per la sua caratteristica struttura a doppia ala, simile alla forma di una farfalla (Clark et al., 1993). Poiché la struttura di tale domini è invariata tra i diversi membri della famiglia, rimane ancora difficile spiegare come

l'effetto funzionale del legame di questi fattori col DNA possa indurre l'attivazione (transattivazione) o l'inibizione della trascrizione genica.

La proteina FOXP3 contiene 431 amminoacidi e il suo peso molecolare è 47,25 kD. Essa contiene quattro siti funzionali potenziali (i domini repressore, ZF (*zinc finger*), LZ (*leucine zipper*) e fork-head). Il dominio repressore è localizzato nella regione N-terminale ed è richiesto per reprimere l'attività trascrizionale mediata da NFAT (Bettelli et al., 2005). Il dominio LZ mutato conferisce una sia una dimerizzazione che una funzione soppressiva del FOXP3 nelle cellule T (Chae et al., 2006). Il dominio FKH, come già detto, riesce a legare il DNA (Ziegler, 2006).

Topi senza un'espressione funzionale di FOXP3 mancano completamente di Treg e sviluppano una severa autoimmunità. Anche nell'uomo vi è una forte associazione tra l'espressione di FOXP3 e il fenotipo Treg, sebbene tale relazione sia molto più complessa rispetto a quella dei topi (Ziegler, 2006). Nell'uomo FOXP3 sembra giocare un ruolo critico nell'attività delle Treg, in quanto mutazioni a livello del gene FOXP3 sono associate con lo sviluppo di disordini del sistema immunitario associati al cromosoma X, caratterizzati da fenomeni autoimmuni multisistemici (Bennet et al., 2001), in cui le Treg di questi pazienti presentano un'attività soppressiva grandemente ridotta (Bacchetta et al., 2006).

Fino a qualche anno fa, si credeva che l'espressione di FOXP3 fosse ristretta solamente alla linea cellulare T. Oggi, invece, è noto che tale fattore di trascrizione viene anche espresso dalle cellule tumorali (Ebert et al., 2008; Karanikas et al., 2008). Hinz et al. (2007) hanno dimostrato che il FOXP3 viene espresso in cellule di carcinoma pancreatico e che tali cellule inibiscono la

proliferazione delle cellule T CD4⁺CD25⁻, permettendo così l'evasione immunitaria delle cellule tumorali.

Bisogna infine ricordare che il FOXP3 espresso nelle cellule tumorali potrebbe essere differente dal trascritto espresso nelle Treg. In alcune linee cellulari tumorali, a differenza delle cellule T CD4⁺FOXP3⁺, è stata identificata una variante di mRNA di FOXP3 privo degli esoni 3 e 4 (Ebert et al., 2008).

L'espressione di FOXP3 nelle cellule tumorali potrebbe rappresentare un nuovo meccanismo con cui il cancro sopprime il sistema immunitario per evitare la sua distruzione. Non si sa ancora se l'espressione di FOXP3 influenzi l'immunità endogena tumore-specifica. Tuttavia, l'espressione di FOXP3 nelle cellule tumorali implicherebbe che la funzione delle cellule T potrebbe essere modulata non solo dal FOXP3 ma anche dal FOXP3 associato al tumore.

Il FOXP3 è stato studiato come target terapeutico ed è stato dimostrato che l'immunità contro il tumore può essere rafforzata da una vaccinazione che sopprime le cellule esponenti FOXP3 (Nair et al., 2007)

e. Meccanismi di regolazione del FOXP3 e "cross-talk" delle vie di segnale.

Il meccanismo attraverso il quale lo stesso FOXP3 viene regolato non è stato ancora chiarito. Tuttavia recenti studi indicano che alcune vie di segnale, quali la via degli STAT (*signal transducers and activators of transcription*), del TGF- β /Smad (*transforming growth factor- β /Smad*), del Notch, per nominarle solo alcune, sono strettamente correlate con la trascrizione di FOXP3 (Chen et al., 2003; Tone et al., 2008). La regione *promoter/enhancer* del FOXP3 contiene tre sequenze non codificanti e altamente conservate (CNS, *conserved non-coding*

sequence), dove possono legarsi diversi fattori di trascrizione. La sequenza CNS1 contiene due elementi consecutivi che legano i fattori di trascrizione Smad3 e NFAT. Ciò spiegherebbe il meccanismo con cui il TGF- β regola la trascrizione di Foxp3. Smad3 e NFAT agirebbero sinergicamente per l'acetilazione istonica della regione *enhancer* e per l'induzione della trascrizione di FOXP3 (Tone et al., 2008). L'espressione del FOXP3 mediata dal TGF- β può essere regolata da vari fattori. Il segnale IL-2/STAT5 rappresenta, ad esempio, un fattore essenziale per la generazione delle cellule Treg (Davidson et al., 2007). Lo STAT6 attivato dall'IL-4 può legarsi al promotore del FOXP3 (Takaki et al., 2008). Lo STAT1 sembra avere effetti differenti sull'espressione genica di FOXP3 mediata da TGF- β . IL-27 e IFN- γ , citochine attivanti lo STAT1, amplificano l'espressione di FOXP3 indotta da TGF- β (Ouaked et al., 2009).

Alcuni studi hanno dimostrato la partecipazione del segnale Notch nella trascrizione di FOXP3 (Anastasi et al, 2003; Vigouroux et al., 2003). Il blocco del segnale Notch tramite anticorpi anti-Jagged1 (uno dei ligandi Notch1) inibisce la funzione soppressoria delle Treg in vitro (Asano et al, 2008). Ancora, si è visto che il segnale Notch può modulare il promotore di FOXP3 attraverso meccanismi dipendenti da RBP-J (una delle proteine della famiglia CLS e importante mediatore della via del segnale del Notch) e da Hes1 (un repressore trascrizionale). Il complesso NICD RBP-J e Hes1 si legano rispettivamente a un sito altamente conservato localizzato nella regione promotrice e a *N-boxes* (sito di legame di Hes) vicino il sito di inizio trascrizionale del gene FOXP3. La dissezione del promotore di FOXP3 rivela il duplice effetto del sito di legame a RBP-J e N-boxes: il primo sito regola l'attività del promotore positivamente, laddove il secondo lo regola negativamente. Quindi il segnale del Notch

regolerebbe il promotore del FOXP3 in maniera bifasica: bassi livelli di Notch attiverrebbero il promotore attraverso il complesso NICD-RBP-J, mentre alti livelli reprimerebbero tale promotore attraverso Hes1 (Ou-Yang et al., 2008). In figura 3 vengono schematizzate le vie del NOTCH e del TGF- β nella regolazione della trascrizione di FOXP3.

Il segnale del Notch e del TGF convergono nella regolazione di diversi processi di sviluppo, inclusi quelli miogenici e di differenziamento endoteliale, pancreatico e neuronale. Sebbene si sia sempre ritenuto che i due sistemi agiscano in parallelo come vie indipendenti, Zavadil et al. (2001) in studio recente sulle variazioni trascrizionali nei cheratinociti umani esposti a TGF- β hanno identificato parecchi componenti della via del Notch, incluso il fattore di trascrizione Hes-1, un target diretto del segnale Notch. La rapida induzione dell'espressione di Hes-1 nei cheratinociti umani indotta dal TGF- β provverebbe una possibile interazione fra le due vie. Successivamente Blokzijl et al (2003) hanno dimostrato un sinergismo funzionale tra le vie del Notch e del TGF- β nella regolazione di Hes-1. In particolare, questi autori hanno suggerito che il TGF- β possa regolare la trascrizione dal promotore Hes-1 con un modalità dipendente da Notch, e che il dominio intracellulare del Notch (NICD) coopera sinergicamente con lo Smad3, un trasduttore intracellulare del TGF- β , allo scopo di indurre l'attivazione di promotori sintetici contenenti siti di legame multimerici per CSL e Smad3. Questi risultati indicano che i segnali del Notch e del TGF- β sono integrati da dirette interazioni proteina-proteina tra elementi intracellulari di trasduzione del segnale di entrambe le vie. La fig. 4 mostra l'integrazione funzionale delle due vie.

Infine le vie del segnale Notch e TGF- β convergono anche nella regolazione dell'espressione di FOXP3 (Samon et al., 2008). L'inibizione farmacologica del segnale Notch, effettuata tramite il trattamento con un inibitore della γ -secretasi (GSI) blocca l'espressione del FOXP3 indotta da TGF- β (Samon et al., 2008).

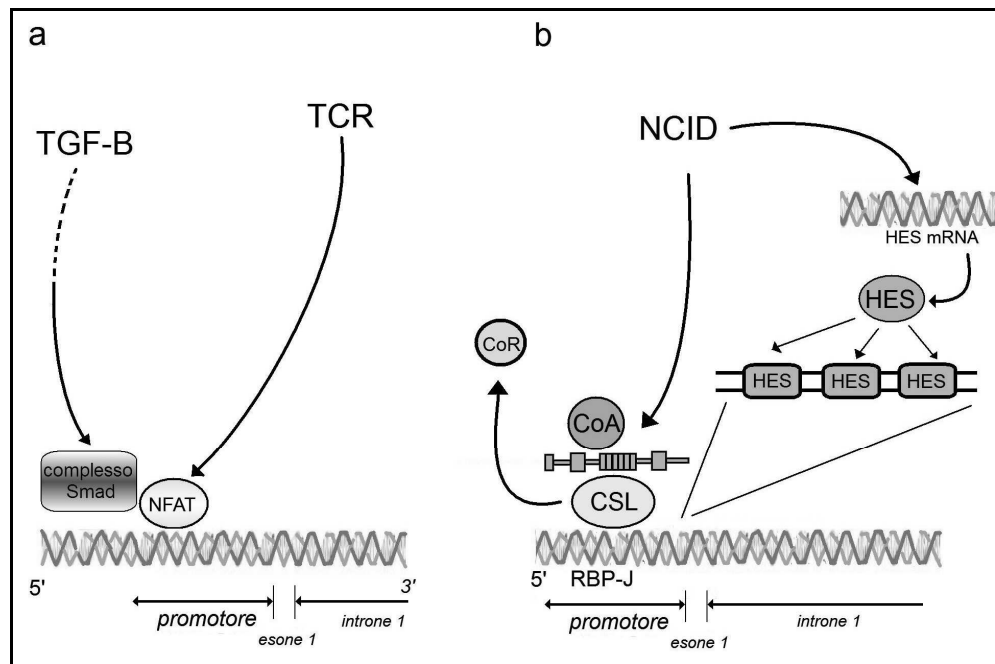


Fig 3. Raffigurazione schematica della via del TGF- β /Smad (a) e del Notch (b) nella regolazione della trascrizione di FOXP3. Smad3 e NFAT attivati rispettivamente dal TGF- β e dal TCR cooperano nell'acetilazione istonica della regione enhancer nell'induzione della trascrizione di FOXP3. Il Notch modula la regione promotrice di FOXP3 attraverso meccanismi RBP-J e Hes1 dipendenti. Basse concentrazioni di Notch attivano il promotore attraverso il complesso NICD-RBP-J, mentre alte concentrazioni della proteina reprimono il promotore attraverso Hes1.

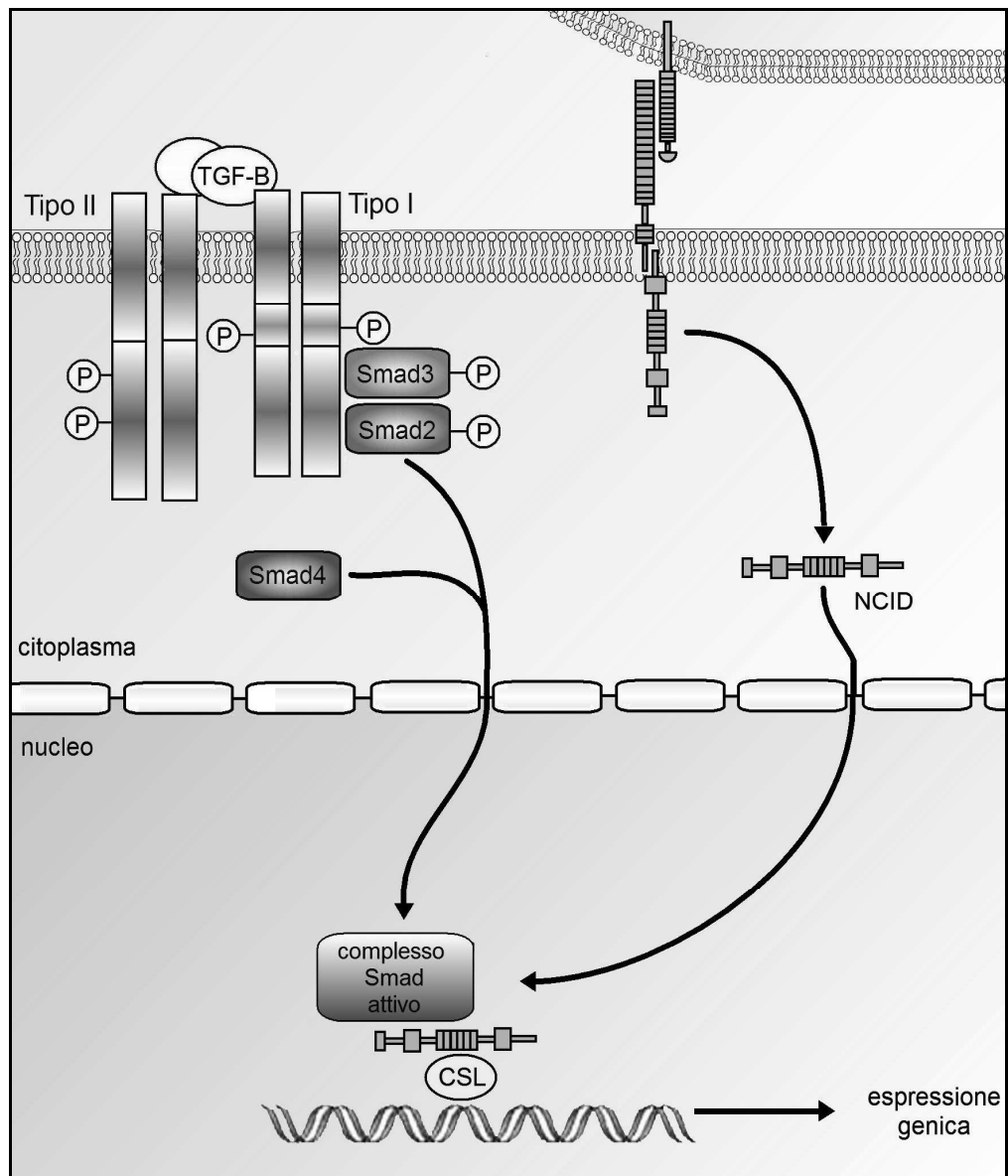


Fig. 4 Meccanismo di integrazione dei segnali Notch e TGF- β tramite l'interazione diretta tra lo Smad3 e NCID. Sebbene la figura mostri che il trasporto verso il nucleo del complesso Smad3-Smad4 e NCID sono avvenute indipendentemente, è possibile che la loro interazione possa avvenire anche nel citoplasma.

II. Scopo del lavoro

Poiché il ruolo e il meccanismo molecolare del fattore di trascrizione FOXP3 nei tumori sono ancora sconosciuti, lo scopo del presente studio è stato quello di esaminare l'espressione del trascritto e della proteina matura di FOXP3 nelle linee cellulari di melanoma A375 e A2058.

Come precedentemente accennato, diversi studi hanno dimostrato un *cross-talk* fra le vie del segnale Notch e il TGF- β . Gli Smads, i mediatori intracellulari del segnale del TGF β , riescono a legarsi anche a domini sia del Notch1 che del Notch4. Inoltre lo Smad3 può formare un complesso con CSL e NCID al fine di attivare sinergicamente la trascrizione del gene target Hes1 (Blokzijl et al.003). Poiché, sia la via del TGF- β che quella del Notch sono coinvolte nella regolazione della trascrizione del gene FOXP3, abbiamo condotto questo studio per determinare se il *crossstalk* delle due vie di segnale rappresenta un evento fondamentale anche per l'induzione di FOXP3 nelle linee cellulari di melanoma A375 e A2058. Gli esperimenti condotti in questo studio si sono avvalsi del trattamento con inibitore della γ -secretasi (GSI) allo scopo di inibire la via del segnale Notch.

III. Materiali e metodi

a. Colture cellulari e trattamenti

La linea cellulare dei melanociti è stata ottenuta dalla ditta Lonza (Svizzera). La linea A375, ottenuta dalla *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA), è caratterizzata da cellule con morfologia epiteliale e derivate dal derma di un melanoma maligno. La linea A2058, ottenuta dalla *European Collection of Cell Culture* (ECACC; Salisbury, UK), è composta da cellule derivate da un linfonodo di melanoma metastatico e presentano una morfologia epiteliale ed aspetto fusiforme. Queste ultime esprimono i recettori per il *Nerve Growth Factor* (NGF) e laminina. *In vivo* sono in grado di formare tumori e metastasi.

I melanociti normali sono stati coltivati in MB-M4 (Lonza, Svizzera) con l'aggiunta dei seguenti supplementi: PMA (forbolo-12-miristato13 acetato), *Bovine Pituitary Extract*, idrocortisone, rh-*Fibroblast Growth Factor*-B, cloruro di calcio, insulina, gentamicina solfato, amfotericina-B, FBS. Le linee di melanoma A375 e A2058 sono state fatte crescere rispettivamente in DMEM e RPMI-1640, contenenti L-glutamina e 10% di siero fetale bovino, penicillina (100 unità/ml) e streptomina (0,1 mg/ml). Le cellule sono state incubate in atmosfera umida a 37°C in anidride carbonica al 5%. Il tempo di duplicazione delle linee del melanoma è di circa 24-36 ore. Tutti i suddetti prodotti sono stati acquistati dalla ditta Invitrogen (Carlsbad, USA). Le cellule ($2,6 \times 10^6$) sono state piastrate nel medium completo e, dopo 24 ore di adesione, sono state trattate con l'inibitore della γ -secretasi XII (565773, Calbiochem, Germania) disciolto in DMSO a diverse concentrazioni (5, 10 e 25 μ M) e rinnovato nelle culture ogni giorno a

causa della sua breve bioattività dalla preparazione della soluzione. La γ -secretasi (fig.5) utilizzata in questo studio è un dipeptide aldeidico cellulo-permeabile (Z-Ile-Leu-CHO).

Alcuni esperimenti hanno previsto la stimolazione delle linee con 5 ng/ml di rhTGF β 1 (Gibco, Langley, USA), disciolto in acqua.

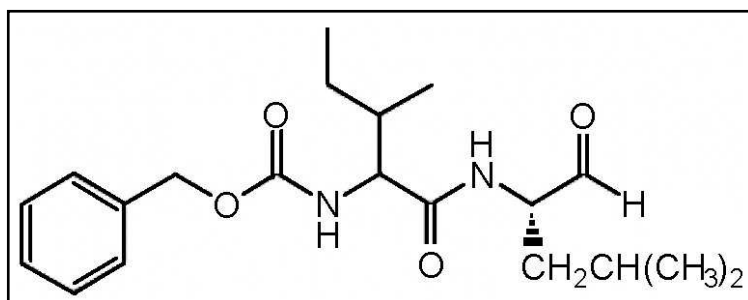


Fig. 5 Formula di struttura dell'inibitore della γ -secretasi utilizzata nel presente studio.

b. Test di vitalità

L'inibizione della crescita cellulare e la vitalità delle linee di melanoma sono state valutate seguendo le curve di crescita con il test di esclusione con il trypan blue. Le cellule sono state poste in piastre *multiwell* da 12 pozzetti ad una concentrazione di $2,5 \times 10^4$ cellule in 500 μ l dei rispettivi terreni. Dopo 24 ore, ogni linea cellulare è stata trattata con GSI a diverse concentrazioni (5, 10 e 25 μ M) per ciascuna linea cellulare. I controlli sono stati eseguiti solamente col cambio di terreno. Quindi, ogni 24 ore e per successivi 4 giorni, le cellule sono state staccate con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, USA) (tripsina/terreno 1:1) e contate mediante test di esclusione del trypan blu in camera citometrica di Bürker.

c. Estrazione dell'RNA e RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto da un pellet di 3×10^6 cellule in coltura, ottenuto tramite centrifugazione a 800 g per 10 min, con il sistema di purificazione dell'RNA totale *Micro-to-Midi* (Invitrogen, Carlsbad, USA) secondo le istruzioni della ditta. Il pellet di RNA è stato risospeso in 30 μ l di H₂O DEPC (dietilpirocarbonato). La determinazione della concentrazione dell'RNA è stata eseguita con il NanoDrop® (Thermo Scientific, Wilmington, USA). La lettura, preceduta dall'autoazzeramento con acqua sterile DEPC, è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 260 nm (λ di assorbimento per le basi eterocicliche degli acidi nucleici) e di 280 nm (λ di assorbimento per gli aminoacidi aromatici delle proteine). La concentrazione dell'RNA è stata espressa in μ g/ml. La qualità dell'estrazione è stata verificata dal rapporto A260/A280, considerando ottimali i rapporti tra 1.7 e 2.0 e dopo corsa elettroforetica al 1% di gel di agarosio in tampone TAE (tampone tris acetato EDTA modificato; Millipore, Billerica, USA) 1x. Per la sintesi del cDNA, sono stati utilizzati 2,2 μ g di RNA totale (estratto come descritto in precedenza) di ciascun campione.

La reazione della trascrittasi inversa e l'amplificazione PCR sono state eseguite con reattore termico Eppendorf AG22331 (Eppendorf, Germania). L'RNA totale (2,2 μ g) è stato portato alla temperatura di 65°C per 5 minuti e quindi raffreddato in ghiaccio. Successivamente è stata aggiunta una miscela di 20 μ l contenente 0,15 μ g di random primers (Invitrogen, Carlsbad, USA), tampone di trascrizione, RNasi OUT (40 unità/ μ l; Invitrogen, Carlsbad, USA), dNTP (10mM di ognuno) e trascrittasi inversa M-MLV (200 unità; Invitrogen, Carlsbad, USA).

L'incubazione è stata eseguita a 37°C per 50 minuti. La reazione è stata inattivata a 70°C per 15 minuti.

L'amplificazione è stata eseguita con 2 µl di cDNA in un volume totale di 50 µl contenente un mix di 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 20 µM di primer specifici e 5 U/µl di Taq DNA polimerasi (Invitrogen, Carlsbad, USA). I seguenti primers sono stati usati (5'>3):

FOXP3 *sense*: CACAACATGCGACCCCCTTTCACC

FOXP3 *antisense*: AGGTTGTGGCGGATGGCGTTCTTC

GAPDH *sense*: ACGTGATGCAGAACCACCTACTG

GAPDH *antisense* ACGACGGCTGCAAAAAGTGGCG

Per l'amplificazione ogni ciclo è stato eseguito alla temperatura di 93°C , 64°C e 72°C per 60 secondi ciascuno. La reazione è stata arrestata dopo 35 cicli. La normalizzazione è stata eseguita tramite amplificazione RT-PCR della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (GAPDH). Per la quantificazione l'intensità dei pixel di ogni banda dei gel è stata determinata usando il programma ImageJ (NIH Image, Bethesda, USA) e normalizzata alla quantità della GAPDH.

d. Western blotting

Estrazione e dosaggio delle proteine. Per l'analisi dell'espressione proteica di NOTCH1 (NICD) e FOXP3 sono stati usati estratti proteici totali dalle linee cellulari di melanoma (2,6x10⁶ cellule/piastra, diametro 100mm). Dopo i trattamenti e le opportune stimolazioni, come descritto in precedenza, le cellule sono state lavate con PBS freddo e le proteine totali citoplasmatiche e nucleari

sono state estratte con *lysis buffer* RIPA (150 mM cloruro di sodio, 1,0% Triton X-100, 0,5% deossicolato di sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) in aggiunta dell'inibitore delle proteasi e fosfatasi. Dopo 30 minuti in ghiaccio, il lisato è stato centrifugato (13.000 rpm per 20 minuti, a 4°C) ed il surnatante, contenente le proteine estratte, è stato raccolto e conservato a -80°C. La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio Bradford, utilizzando il kit Quick Start Bradford (BioRad, Hercules, USA).

Elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS. Per lo studio dell'espressione delle proteine è stata eseguita un'elettroforesi su gel di acrilamide composto da un *resolving gel*, per la risoluzione dei campioni e uno *stacking gel* per l'effetto di impaccamento dei campioni stessi. Di ciascun campione sono stati caricati 50 µg di proteine totali diluite 1:1 (v/v) in *Laemmli Sample Buffer* [62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 25% (v/v) glicerolo, 0,01% (p/v) blu di bromofenolo] in condizioni riducenti e portate ad ebollizione per 10 minuti prima del caricamento. L'acrilamide/N,N'-metilenbisacrilamide, il sodiododecilsolfato (SDS), la glicina, l'ammonio persolfato, l'N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina (TEMED), il TBS (20mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5), il polioxi-etilen-sorbitanomonolaurato (TWEEN 20), il *Laemmli Sample Buffer* e l'agarosio sono stati forniti dalla BioRad (Hercules, USA). L'elettroforesi è stata condotta su Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell 7.3×8.3 cm (BioRad; Hercules, USA) utilizzando gli spaziatori da 1.5 mm, un tampone di corsa 25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8,3, 0.1% SDS, sottoponendolo ad un campo elettrico costante di 90 Volt per 2 ore circa, utilizzando un alimentatore POWER-PAC 3000 (BioRad, Hercules, US). Terminata l'elettroforesi, le proteine separate su gel di poliacrilamide sono state trasferite su nitrocellulosa (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose

Membrane 0.45 μm , BioRad, Hercules, USA) utilizzando un tampone 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% MetOH (v/v), pH 8.3. Il blotting è stato eseguito con la Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad; Hercules, USA) sottoponendolo ad una intensità di corrente costante a 300 mA per 2 ore a freddo utilizzando l'alimentatore POWER-EPS-600 (Amersham Pharmacia Biotech, Svezia). Terminato il trasferimento, il filtro di nitrocellulosa è stato lavato con T-TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20) per 15 minuti totali con 3 cambi. E' stato poi eseguito il bloccaggio dei siti di legame aspecifici con una incubazione di 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione 5% latte in polvere (p/v) in T-TBS. Successivamente il filtro è stato incubato *overnight* a 4°C con i seguenti anticorpi monoclonali: anti-Notch1-NICD (diluito 1/1000, eBioscience, San Diego, USA) e anti-FOXP3 (diluito 1/1000, eBioscience, San Diego, USA). Come controllo di caricamento è stato usato il GAPDH (diluito 1/2000, Calbiochem, Germania). Dopo lavaggio con T-TBS, le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (coniugato con perossidasi di rafano HRP 1/2000, Calbiochem, Germania). Dopo un ulteriore lavaggio in T-TBS le membrane sono state trattate con un agente che emette chemiluminescenza (ECL detection system, BioRad, Hercules, USA). Infine, la rivelazione delle bande d' interesse è stata ottenuta mediante autoradiografia, impressionando e poi sviluppando una pellicola fotografica messa a contatto con il filtro trattato. Tutti gli anticorpi sono stati incubati in soluzione T-TBS al 0,5% di latte in polvere.

e. Immunoistochimica

Per l'indagine immunoistochimica, 1×10^5 cellule delle linee A375 e A2058 sono state piastrate su un vetrino. Dopo 24 ore di incubazione sono state trattate con 5 ng/mL di rhTGF β 1 per 72 ore. Al termine dei trattamenti le cellule sono state lavate con PBS e fissate con paraformaldeide al 4%, pH 7,4 per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono state permeabilizzate per 4 minuti con una soluzione allo 0,5% di TritonX-100. Dopo lavaggio in PBS, le cellule sono state trattate con 1% BSA per bloccare i siti aspecifici di legame. Successivamente le cellule sono state incubate con anticorpo primario anti-FOXP3 (diluizione 1:100; eBiosciences, San Diego, USA) per 2 ore a temperatura ambiente. Quindi, dopo lavaggio in PBS si è passati al rilevamento dell'anticorpo primario tramite complesso streptavidina-biotina-perossidasi (ImmunoCruz Staining System; SantaCruz Biotechnology Inc, USA), secondo le istruzioni della ditta. Infine le cellule sono state controcolorate con ematossilina di Mayer per 30 secondi e quindi disidratate e montate. I controlli negativi sono stati eseguiti con la sostituzione dell'anticorpo primario con siero non immune (fornito dallo stesso kit di rilevamento) e con solo tampone.

f. Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm errore standard della media. Il confronto tra le medie è stato eseguito col test *t* di Student per campioni indipendenti. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per un livello di $p < 0.05$.

IV. Risultati

a. Il trattamento con l'inibitore della γ -secretasi induce una inibizione dose-dipendente della crescita cellulare.

L'effetto dell'inibitore della γ -secretasi sulla proliferazione cellulare è stata valutata tramite analisi della curva di crescita delle cellule di controllo (non trattate) e delle cellule trattate con GSI alle concentrazioni di 5, 10 e 25 μ M per 24, 48 e 72 ore. Le cellule di ogni linea non trattate mostravano una crescita lineare nel tempo, mentre nelle cellule trattate si evidenziava un'inibizione della crescita da farmaco dose-dipendente. Sia nelle A375 che nelle A2058, dopo 24h di trattamento era già evidente un'inibizione dose-dipendente della crescita. Alla concentrazione maggiore (25 μ M) del farmaco si riscontrava una mortalità cellulare più elevata, indice della citotossicità immediata indotta dal farmaco. L'inibizione della crescita raggiungeva il massimo a 72h con esposizione alla dose di 25 μ M di GSI (fig. 6).

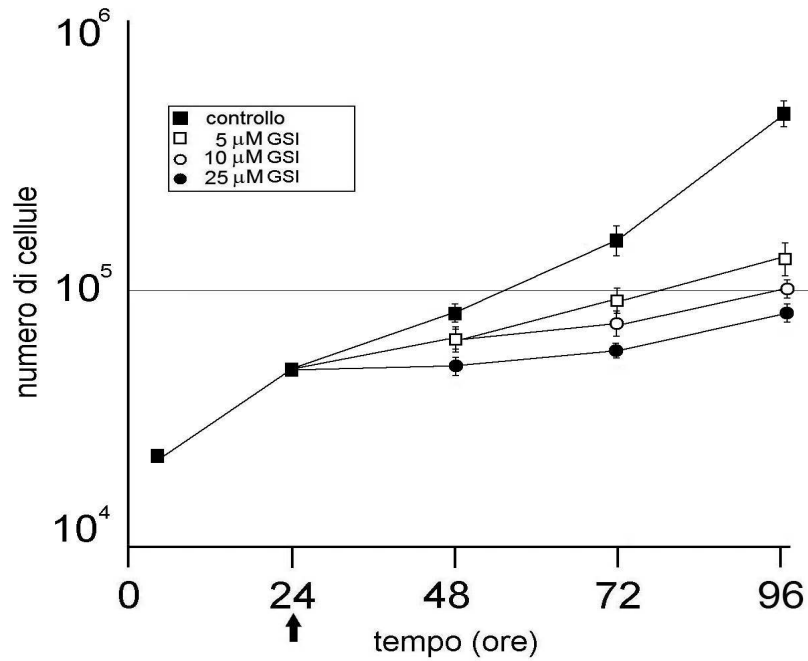


Fig. 6 Curve di crescita delle cellule in coltura trattate con GSI a diverse concentrazioni. La freccia indica l'inizio del trattamento.

b. Le linee di melanoma A375 e A2058 esprimono il fattore di trascrizione FOXP3.

I risultati della RT-PCR nelle linee cellulari di melanoma A375 e A2058 hanno mostrato la presenza di mRNA di FOXP3. Il trascritto era maggiormente espresso nella linea A2058 rispetto alla linea A375. I melanociti, usati come controllo, non mostravano alcuna espressione di mRNA di FOXP3. Come marker di normalizzazione, è stato usato il trascritto della gliceraldeide-6-fosfato deidrogenasi (GAPDH) (fig. 7a).

La presenza della proteina matura di FOXP3 è stata confermata nelle linee cellulari tumorali tramite l'utilizzo del western blotting (fig. 7b) e

dell'immunocitochimica (fig. 7c). Il western blotting mostrava una maggiore espressione della proteina nelle cellule della A2058 rispetto alla linea A375.

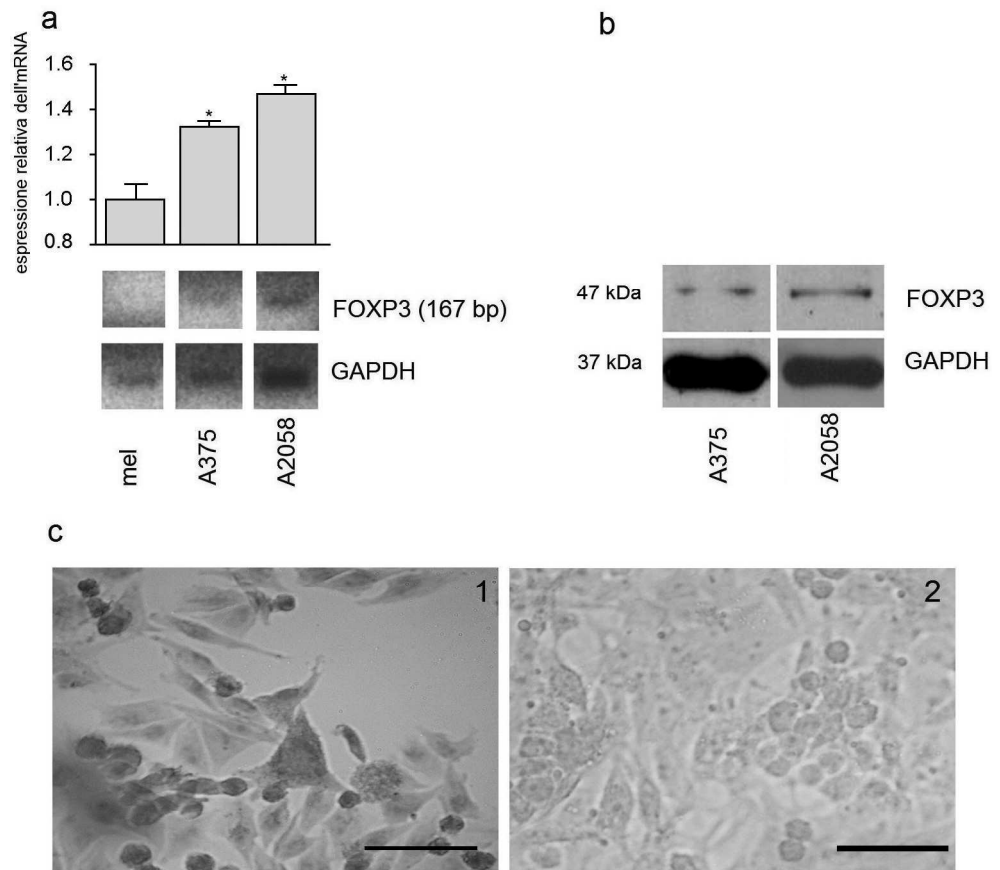


Fig. 7 a: Analisi semiquantitativa tramite RT-PCR dell'espressione dell'mRNA di FOXP3 nelle linee di melanociti (mel) e nelle linee tumorali. L'espressione è stata quantificata rispetto a quella dei melanociti. L'asterisco indica un livello di significatività $p < 0,05$. **b:** Analisi tramite western blotting dell'espressione proteica di FOXP3. **c:** Immunocitochimica delle cellule A375 per il FOXP3 (**1**; barra: 50 μ m). Una reazione di controllo negativo è rappresentata in **c2** (barra: 75 μ m).

L'immunomarcatura per il FOXP3 era prevalentemente localizzata a livello citoplasmatico. La linea A2058 mostrava una simile immunocolorazione.

c. Il trattamento con TGF- β 1 incrementa l'espressione genica e proteica del fattore FOXP3 nelle linee di melanoma A375 e A2058.

Per valutare l'influenza del TGF- β 1 sul livello dell'espressione genica di FOXP3, le linee cellulari sono state trattate con rh-TGF- β 1 a una concentrazione di 5ng/ml per 48 ore. Il trattamento delle cellule tumorali con tale citochina induceva l'espressione di una maggiore quantità di mRNA di FOXP3 rispetto alle cellule non trattate. Tale incremento è stato maggiormente osservato nella linea A375 (fig. 8a). La figura 8b mostra i risultati del western blotting sull'espressione della proteina FOXP3 nelle due linee cellulari tumorali, dopo stimolazione con TGF- β 1 per 48 ore. L'immunocitochimica per il FOXP3 mostrava l'espressione del fattore di trascrizione localizzata principalmente a livello citoplasmatico (fig. 8c).

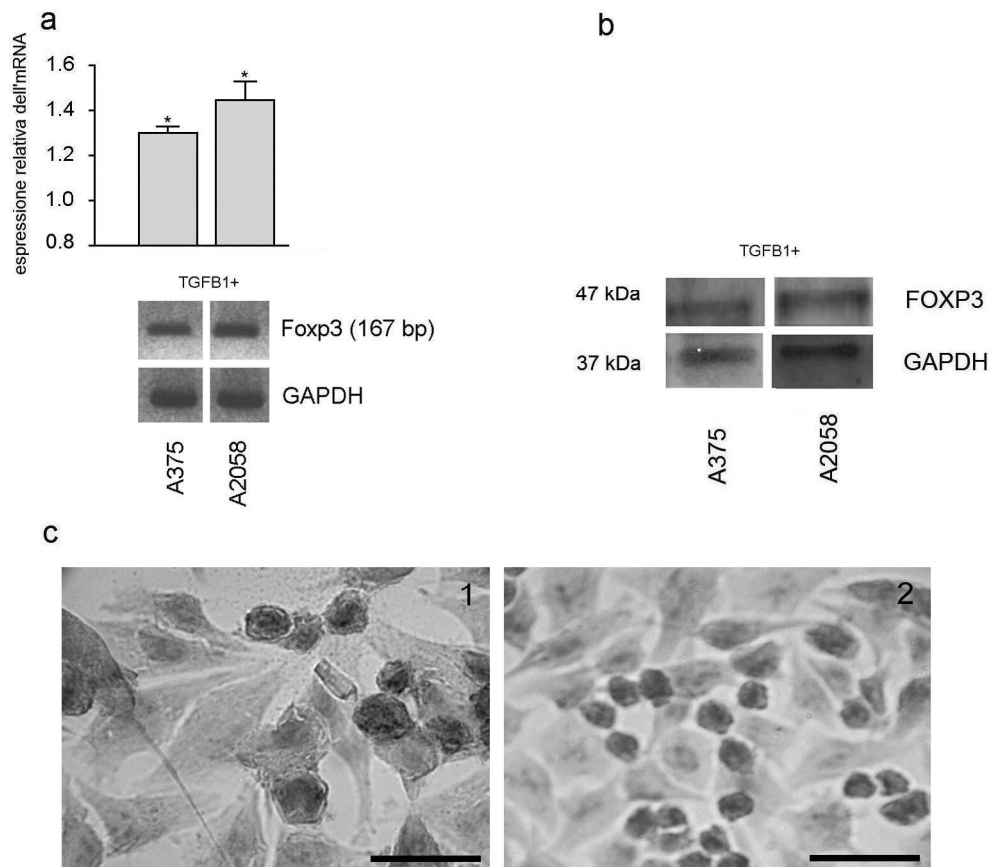


Fig. 8. a: Analisi semiquantitativa tramite RT-PCR dell'espressione dell'mRNA di FOXP3 nelle linee tumorali stimolate con TGF-β1. La quantificazione dell'espressione è relativa a quella delle cellule non stimolate L'asterisco indica un livello di significatività $p < 0,05$. **b:** Analisi tramite western blotting dell'espressione proteica di FOXP3. **c:** Immunolocalizzazione di FOXP3 nelle cellule A375 (1; barra: 25 μm) e A2058 (2; barra: 60 μm) stimolate con TGF-β1.

d. Le vie del segnale del Notch e del TGFβ1 cooperano nel modulare l'espressione genica e proteica del fattore FOXP3 nelle linee di melanoma A375 e A2058.

Il trattamento di entrambe le linee cellulari tumorali con l'inibitore della secretasi (GSI) alla concentrazione, per 24 e 48 ore, non alterava il livello dell'espressione genica di FOXP3 e quindi il farmaco non presentava alcun effetto. Il GAPDH è stato utilizzato come marker di normalizzazione (fig. 9).

Tuttavia, in seguito al trattamento delle due linee di melanoma con GSI per 72 ore alla concentrazione di 25μM, l'espressione dell'mRNA di Foxp3 subiva un forte decremento rispetto alle linee di controllo. Tale decremento si presentava più significativo nella linea A2058. Dopo trattamento con GSI e in presenza di 5 ng/ml di rh-TGFβ1, si notava una parziale ripresa dell'espressione di FOXP3, che rimaneva comunque a livelli inferiori rispetto a quelli di controllo. Tale ripresa risultava più marcata nella linea A2058 (figura 10).

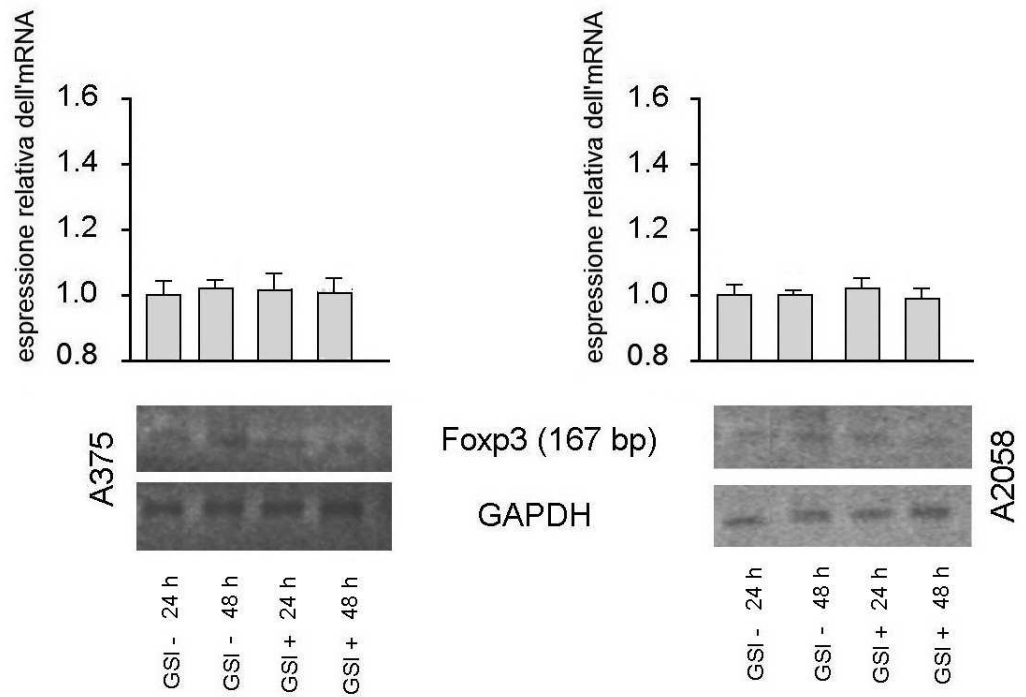


Fig. 9 Analisi semiquantitativa tramite RT-PCR dell'espressione dell'mRNA di FOXP3 nelle linee tumorali trattate con GSI (25 μ M), per 24 e 48 ore. Il trattamento con GSI non altera il livello dell'espressione genica di FOXP3 e quindi il farmaco non presenta alcun effetto. La quantificazione dell'espressione è relativa a quella delle cellule non stimulate.

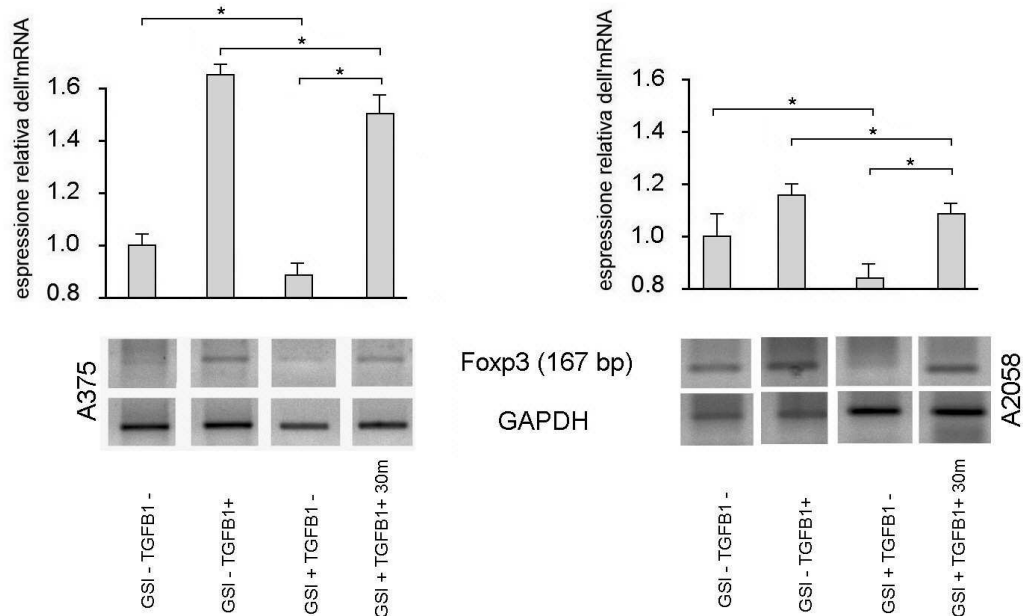


Fig. 10. Analisi semiquantitativa tramite RT-PCR dell'espressione dell'mRNA di FOXP3 nelle linee tumorali trattate con GSI per 72 ore alla concentrazione di 25 μ M. L'mRNA di FOXP3 mostra un forte decremento rispetto alle linee di controllo. Tale decremento si presenta più significativo nella linea A2058. Dopo trattamento con GSI e in presenza di 5 ng/ml di rh-TGF β 1, l'espressione di FOXP3 mostra incremento, più marcato nella linea A2058. L'asterisco indica un livello di significatività $p < 0,05$.

L'espressione proteica di FOXP3 nelle linee del melanoma trattate con o senza GSI per 72 ore è stata valutata mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici per il FOXP3. L'analisi tramite western blot ha dato risultati simili a quelli dell'espressione genica. Il trattamento con il solo inibitore della secretasi induceva un decremento dell'espressione proteica di FOXP3, che risultava più pronunciata nella linea cellulare A2058. L'aggiunta di TGF- β 1 al trattamento con GSI induceva una parziale ripresa dell'espressione proteica del fattore di trascrizione che non raggiungeva comunque i livelli presenti nelle

cellule con sola stimolazione con TGF- β 1. Il GAPDH è stato utilizzato come marker di normalizzazione (fig. 11).

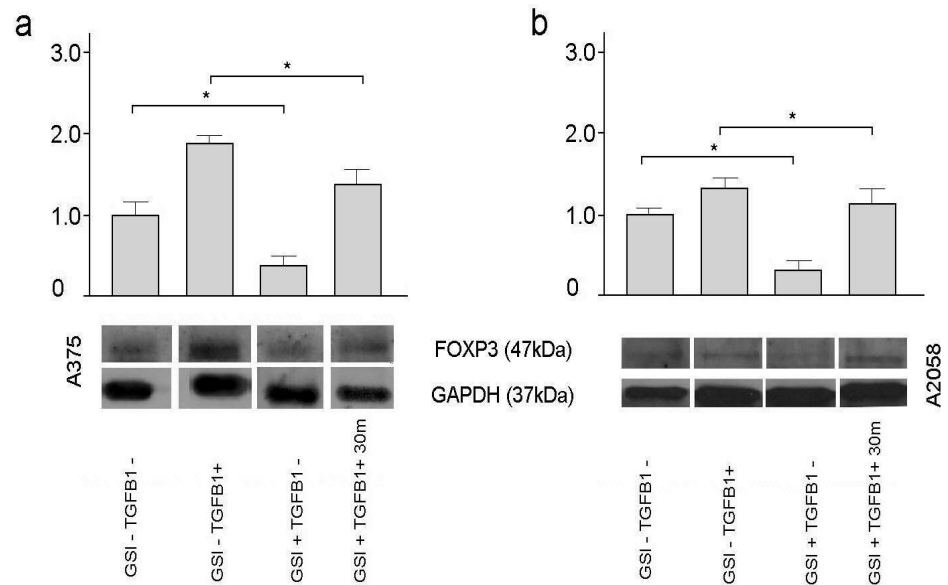


Fig. 11. Analisi dell'espressione proteica di FOXP3 mediante western blotting. Il trattamento con GSI a 72 ore e alla concentrazione di 25 μ M riduce sensibilmente l'espressione del fattore di trascrizione. L'aggiunta del TGF- β 1 al trattamento induce una parziale ripresa della sintesi proteica. IL GAPDH è stato utilizzato come marker di normalizzazione. L'asterisco indica un livello di significatività $p < 0,05$.

Per definire se i trattamenti con GSI fossero responsabili della riduzione dell'attivazione del Notch1, l'espressione del NICD è stata verificata con il western blotting utilizzando anticorpi specifici. Le cellule tumorali trattate con GSI alla concentrazione di 25 μ M per 72 ore mostravano una ridotta espressione proteica del NICD. Mentre in presenza di 5 ng/ml di TGF- β 1 ricombinante, l'espressione del NICD subiva un modesto incremento (fig.12).

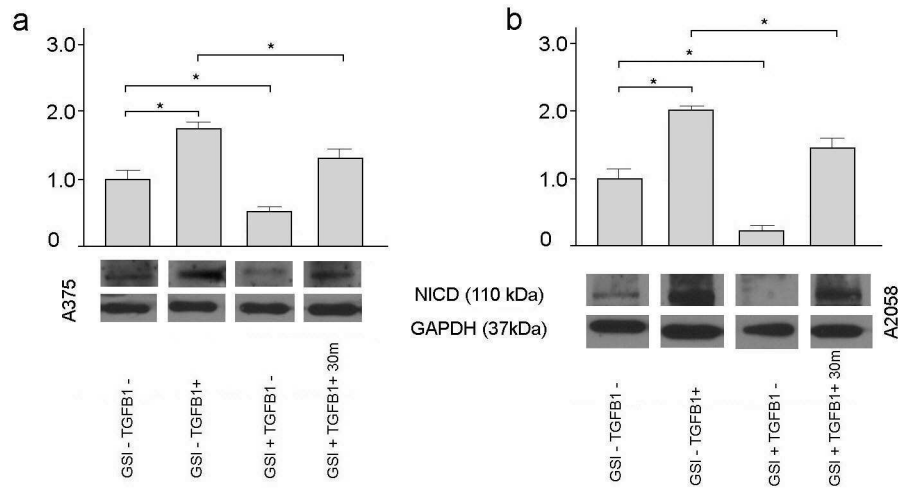


Fig. 12. Western blotting dell'espressione proteica del dominio intracellulare del Notch (NICD) nelle linee cellulari A375 e A2058. Il trattamento delle cellule tumorali con GSI, alla concentrazione di 25 μ M e per 72 ore, induce una ridotta espressione proteica del NICD. L'aggiunta al trattamento col GSI di 5 ng/ml di TGF- β 1, induce una parziale ripresa dell'espressione del NICD. GAPDH è stato utilizzato come marker di normalizzazione. L'asterisco indica un livello di significatività $p < 0,05$.

V. Discussione

Il presente studio dimostra che il fattore di trascrizione FOXP3 viene espresso nelle linee cellulari di melanoma A2058 e A375. Questa osservazione è particolarmente interessante perché dimostra che l'espressione del fattore di trascrizione FOXP3 non è ristretta solamente alle cellule T regolatorie (Treg). Questi risultati concordano con quelli di altri autori, i quali hanno dimostrato la presenza di FOXP3 anche in diverse linee cellulari tumorali (Karanikas et al. 2008; Hinz et al., 2007; Ebert et al., 2008).

L'espressione di FOXP3 è anche presente in cellule epiteliali non cancerose. Chen et al. (2008), studiando topi Rag2^{-/-}, privi di linfociti T, hanno dimostrato la presenza del trascritto e della proteina di FOXP3 in cellule epiteliali di mammella, polmone e prostata. Tessuti di intestino, fegato, rene e cuore non mostravano la presenza del trascritto o della proteina.

Anche nell'uomo è stata riportata la presenza del trascritto e della proteina di FOXP3 in cellule normali e cancerose; l'espressione di FOXP3 nell'uomo mostra due situazioni opposte nelle cellule normali e cancerose. Infatti l'espressione di FOXP3 può essere ristretta alle sole cellule tumorali. Hinz et al., (2007) hanno osservato che l'espressione di FOXP3 era presente nelle cellule di carcinoma pancreatico, ma non nelle cellule normali dei dotti pancreatici. Come già accennato, anche cellule di melanoma umano, a differenze dei melanociti, presentano FOXP3 (Ebert et al., 2008).

Una situazione opposta si ritrova nelle cellule normali dell'epitelio mammario e prostatico, in cui il fattore di trascrizione viene espresso nelle due isoforme, come nelle Treg. A differenza di quanto accade nelle cellule normali, le

corrispettive cancerose mostrano una *downregolazione* della proteina (Zuo et al., 2007). Questi ultimi autori hanno notato che molte linee cellulari, tra quelle esaminate, esprimevano un trascritto con delezioni degli esoni 3, 4 e/o 8. Inoltre in alcuni tumori, si riscontrava una delezione completa del locus FOXP3. Wang et al. (2009), indagando sull'epitelio prostatico umano, hanno osservato che l'espressione di FOXP3 era presente in tutte le cellule epiteliali osservate dei tessuti normali, mentre lo era solamente nel 30% dei tessuti cancerosi, il cui DNA di FOXP3 aveva mutazioni o delezioni.

La differenza che esiste nell'espressione di FOXP3 tra le cellule normali e cancerose di mammella e prostata, suggerisce la presenza di una relazione fra la *downregolazione* di FOXP3 e lo sviluppo del cancro (Wang et al., 2009).

Il FOXP3 risulta quindi essere un gene soppressore tumorale nella mammella e nella prostata. Il FOXP3 *wild-type* delle cellule normali, a differenza di quello mutato delle cellule cancerose, riesce a legare e quindi a reprimere HER-2 e SKP2, due oncogeni coinvolti nella carcinogenesi mammaria (Zuo et al., 2007), come pure il c-MYC, oncogene coinvolto nella carcinogenesi prostatica (Wang et al., 2009).

La presenza di un'elevata espressione di FOXP3 nelle cellule di melanoma permetterebbe al tumore di resistere agli attacchi del sistema immunitario, mimando così l'attività caratteristica delle cellule T regolatorie. Come suggerito da Ebert et al. (2008), le cellule di melanoma esprimenti il FOXP3 potrebbero sopprimere la proliferazione linfocitaria T, mostrandosi più potenti delle Treg. Sebbene il FOXP3 espresso da linee di carcinoma pancreatico sia capace di sopprimere la proliferazione linfocitaria T, come dimostrato da esperimenti di

RNA interference (Hinz et al., 2007), ulteriori studi sono necessari per confermare tale ruolo del FOXP3 nelle cellule di melanoma.

I risultati da noi ottenuti mediante l'indagine immunocitochimica per il FOXP3 mostrano una localizzazione di questa proteina prevalentemente a livello citoplasmatico. Questi dati concordano con quelli di altri autori che hanno evidenziato l'espressione citoplasmatica in altri tipi di cellule tumorali (Hinz et al., 2007; Ladoire et al., 2010). Risulta comunque difficile interpretare il significato della localizzazione citoplasmatica del FOXP3 nelle cellule tumorali di melanoma. La presenza di una mutazione o delezione dei segnali di localizzazione nucleare potrebbe essere responsabile di tale inconsueta localizzazione citoplasmatica di FOXP3. Wang et al. (2009) hanno infatti osservato che tre delle quattro forme mutate di FOXP3 si localizzavano nel citoplasma di cellule di carcinoma pancreatico umano.

I meccanismi che regolano l'espressione di FOXP3 nelle cellule tumorali rimangono ampiamente inesplorati. Nel nostro studio abbiamo osservato che il trattamento delle linee cellulari tumorali con TGF- β 1 induceva un incremento dell'espressione del trascritto e della proteina di FOXP3. Questa osservazione suggerirebbe la presenza di un coinvolgimento delle Smad.

Questo studio dimostra, per la prima volta nelle linee umane di melanoma, che il trattamento in vitro con l'inibitore della γ -secretasi XII (GSI), come atteso, inibisce l'espressione del NICD, parte attiva del Notch, e parallelamente l'espressione di FOXP3. Con l'aggiunta di TGF- β 1 nelle nostre linee, l'espressione

del FOXP3 viene parzialmente ripristinata, suggerendo un possibile *cross-talk* fra i due pathway.

Nel nostro laboratorio sono stati ottenuti dei risultati preliminari su biopsie di melanoma umano che confermerebbero i dati ottenuti *in vitro*.

Studi recenti suggeriscono che l'attivazione della via del Notch è importante per preservare le cellule staminali melanocitiche e potrebbe giocare un ruolo nella progressione del melanoma, estendendo così la lista delle possibili vie di segnale coinvolte nello sviluppo del melanoma. Studi di *microarray* sull'espressione genica di melanociti normali e di melanoma umani rivelano un'*up*-regolazione dei recettori Notch, dei suoi ligandi e dei geni target. Il Notch2 e l'mRNA di Hey1 vengono espressi nelle cellule di melanoma in misura maggiore rispetto ai nevi e ai melanociti normali (Hoek et al., 2004). Massi et. (2006) hanno dimostrato che l'espressione di Notch1 e Notch2, come pure i loro ligandi, erano *up*-regolati in lesioni melanocitiche maligne. Questi risultati suggeriscono che l'attivazione del segnale Notch possa essere coinvolta nella crescita tumorale del melanoma e nella sua progressione, come supportato da Pinnix et al. (2009), i quali hanno dimostrato che un'alterazione del segnale del Notch gioca un ruolo specifico nella trasformazione del fenotipo normale dei melanociti umani in tumore.

L'inibizione del segnale del Notch può rappresentare in fine un valido trattamento contro il cancro. Sono disponibili diverse strategie farmacologiche, sia a livello sperimentale che clinico, che permettono di bloccare il segnale in diversi punti del pathway (Nickoloff et al., 2003). Tra queste strategie, quella che utilizza l'inibitore della gamma secretasi sembrerebbe la più promettente (van Es et al., 2005).

VI. Conclusioni

L'espressione e la funzione del fattore di trascrizione FOXP3 non possono essere più considerate esclusive di sottopopolazioni cellulari T. Quindi il FOXP3 potrebbe essere considerato un fattore multifunzionale dai molteplici ruoli biologici che vanno al di là della già nota attività immunosoppressiva. Queste considerazioni suggeriscono la possibilità di rafforzare l'immunogenicità dei tumori, ad esempio, per mezzo del *knocking down* dell'espressione di FOXP3 usando la tecnica dell'RNA *interference* o, alternativamente, per mezzo di vaccinazioni. Le possibili strategie terapeutiche che mirerebbero a colpire le cellule esprimenti il FOXP3, potrebbero tuttavia avere seri effetti collaterali autoimmunitari, in quanto verrebbero colpite anche le Treg. Tuttavia, molte linee cellulari esprimono una caratteristica isoforma priva degli esoni 3 e 4, che non si ritrova nelle Treg (Ebert et al., 2008). Quindi, una vaccinazione contro l'isoforma $\Delta 3,4$ di FOXP3 eliminerebbe le possibili complicazioni autoimmunitarie.

È indubbio che strategie terapeutiche più efficaci contro il melanoma sono richieste, poiché il melanoma rappresenta un tumore notoriamente chemioresistente. La manipolazione farmacologica della via del segnale di Notch potrebbe quindi ulteriormente rappresentare una possibile strategia per l'inibizione della progressione del melanoma. A tal scopo gli inibitori della γ -secretasi rappresentano degli ottimi candidati nella scelta di approcci terapeutici mirati a inibire la tumorigenesi e l'angiogenesi *in vivo*.

VII. Bibliografia

Anastasi E, Campese AF, Bellavia D, Bulotta A, Balestri A, Pascucci M, et al. Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* 2003;171:4504-11.

Asano N, Watanabe T, Kitani A, Fuss IJ, Strober W. Notch1 signaling and regulatory T cell function. *J Immunol* 2008;180:2796-804.

Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006;116:1713–22.

Becker D, Lee PL, Rodeck U, Herlyn M. Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation. *Oncogene* 1992; 7:2303-13.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.

Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5138-43.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536-40.

Blokzijl A, Dahlqvist C, Reissmann E, Falk A, Moliner A, Lendahl U, et al. Cross-talk between the Notch and TGF-beta signalling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol* 2003;163:723-8.

Bommireddy R, Engle SJ, Ormsby I, Boivin GP, Babcock GF, Doetschman T. Elimination of both CD4+ and CD8+ T cells but not B cells eliminates inflammation and prolongs the survival of TGFbeta1-deficient mice. *Cell Immunol* 2004;232: 96-104.

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:678-89.

Cannon-Albright LA, Kamb A, Skolnick M. A review of inherited predisposition to melanoma. *Semin Oncol* 1996;23:667-72.

Chae WJ, Henegariu O, Lee SK, Bothwell AL. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 20;103:9631-6. The mutant leucine-zipper domain impairs both dimerization and suppressive function of Foxp3 in T cells.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003;198:1875-86.

Chen GY, Chen C, Wang L, Chang X, Zheng P, Liu Y. Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. J Immunol 2008;180:5163-6.

Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. Br J Cancer, 1991; 64:631-44.

Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA recognition motif resembles histone H5. Nature 1993; 364: 412-20.

Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. J Immunol 2007; 178:4022-6.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 2002; 417:949-54.

Demunter A, Ahmadian MR, Libbrecht L, Stas M, Baens M, Scheffzek K et al. A novel N-ras mutation in malignant melanoma is associated with excellent prognosis. Cancer Res 2001;61:4916-22.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature 2003;425: 577-584.

Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N, Gedye C, Moss D, Ng SP, MacGregor D, Davis ID, Cebon J, Chen W. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. Cancer Res 2008;68:3001-9.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 1991; 66: 649-61.

Haines N, Irvine K. Glycosylation regulates Notch signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 786-97.

He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. Cell 2006; 125: 929-41.

Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, Grützmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Klöppel G, Kabelitz D, Kalthoff H. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 2007; 67:8344-50.

Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004;64:5270-82.

Jimbow K, Quevedo W Jr, Fitzpatrick T, et al. *Biology of melanocytes*. In: *Dermatology in General Medicine* 4a ed. New York. McGraw Hill, p261, 1993.

Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barda AK, Gourgoulis KI, Germenis AE. Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med* 2008; 22:6:19.

Kaufmann E, Knochel W. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* 1996;57:3-20.

Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol*, 1986; 6: 3094-108.

Krejci A, Bernard F, Housden BE, Collins S, Bray SJ. Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic. *Sci Signal* 2009; 2: ra1.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC et al. Transforming growth factor b1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:770-4.

Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 257-65.

Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Re´be´ C, Chalmin F, Vincent J et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2010. DOI 10.1007/s10549-010-0831-1; (in stampa).

Lai E, Prezioso VR, Smith E, Litvin O, Costa RH Darnell JE. HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* 1990; 4: 1427-16.

Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-b controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006; 25: 455-71.

Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-91.

Massi D, Tarantini F, Franchi A, Paglierani M, Di Serio C, Pellerito S et al. Evidence for differential expression of Notch receptors and their ligands in

melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol* 2006;19: 246-54.

Morgan TH. The theory of the gene. *Am Nat* 1917; 51: 513-44.

Nair S, Boczkowski D, Fassnacht M, Pisetsky D, Gilboa E. Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. *Cancer Res* 2007;67:371-80.

Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003;22:6598-608.

Ouaked N, Mantel PY, Bassin C, Burgler S, Siegmund K, Akdis CA et al. Regulation of the foxp3 gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27-induced STAT1. *J Immunol.* 2009;182:1041-9.

Ou-Yang HF, Zhang HW, Wu CG, Zhang P, Zhang J, Li JC et al. Notch signaling regulates the FOXP3 promoter through RBP-J- and Hes1-dependent mechanisms. *Mol Cell Biochem* 2008;320: 109-14.

Peak MJ, Peak JG, Carnes BA. Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far and near ultraviolet radiations: action spectrum and mechanism. *Photochem Photobiol* 1987; 45:381-7.

Pinnix CC, Lee JT, Liu ZJ, McDaid R, Balint K, Beverly LJ et al. Active Notch1 confers a transformed phenotype to primary human melanocytes. *Cancer Res* 2009;69:5312-20.

Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. Analysis of DNA surrounding the breakpoints of chromosomal translocations involving the beta T cell receptor gene in human lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1987; 50:107-7.

Samon JB, Champhekar A, Minter LM, Telfer JC, Miele L, Fauq A et al. Notch1 and TGFbeta1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood* 2008; 112:1813-21.

Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 2004; 64:7002-10.

Takaki H, Ichiyama K, Koga K, Chinen T, Takaesu, G Sugiyama et al. STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 2008;283: 14955-62.

Taylor AW. Society for Leukocyte Biology Review of the activation of TGF-b in immunity. *J Leukocyte Biol* 2009;85: 29-33.

Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med* 2007; 204: 1825-35.

Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 2008; 9:194-202.

van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 2005;435:959-63.

Vigouroux S, Yvon E, Wagner HJ, Biagi E, Dotti G, Sili U et al. Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol* 2003;77:10872-80.

Wang L, Liu R, Li W, Chen C, Katoh H, Chen GY et al. (2009). Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell* 2009;16:336-46.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002;1:279-88.

Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E. & Jackle, H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989; 57:645-58.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; 306: 269-71.

Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 2006; 20: 2096-109.

Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:6686-91.

Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-26.

Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, et al. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell* 2007;129:1275-86.