



**Alma Mater Studiorum  
Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA  
in BIOCHIMICA  
XX ciclo**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/10

**Le tossine algali alterano proteine  
dell'adesione cellulare**

Presentata da Ronzitti Giuseppe

Coordinatore Dottorato

G. Lenaz

Relatore

G.Lenaz

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Le tossine algali

1.1.1 La yessotossina

1.1.2 Gli azaspiracidi

### 1.2 Le molecole di adesione

1.2.1 Il sistema E-caderina

*1.2.1.1 Il dominio intra-citoplasmatico*

*1.2.1.2 La  $\beta$ -catenina e la via regolatoria Wnt*

*1.2.1.3 p120 e la via regolatoria Src*

*1.2.1.4 Le GTPasi della famiglia Rho*

### 1.3 Yessotossina ed E-caderina

1.3.1 Effetti a medio termine su cellule in coltura [44]

1.3.2 Yessotossina e processi degradativi della E-caderina [45].

## 2. SCOPO DELLA TESI

## **3.MATERIALI E METODI**

### **3.1 Materiali**

### **3.2 Metodi**

3.2.1 Condizioni di mantenimento delle cellule in coltura e loro trattamento con yessotossina

3.2.2 Preparazione degli estratti cellulari

*3.2.2.1 Preparazione estratti base*

*3.2.2.2 Estrazione delle proteine dalla frazione insolubile in Triton X-100.*

*3.2.2.3 Ottenimento degli estratti nucleari*

*3.2.2.4 Procedura di immunoprecipitazione*

*3.2.2.5 Cross-linking di estratti citosolubili*

*3.2.2.6 Cross-linking di cellule in piastra*

3.2.3 Frazionamento delle proteine mediante SDS-PAGE

3.2.4 Frazionamento delle proteine mediante elettroforesi diagonale.

3.2.5 Immunoblotting

3.2.6 Calcolo dell'IR ECRA<sub>100</sub> e della risposta normalizzata.

3.2.7 Quantificazione dello stato di polimerizzazione della F-actina.

## **4. RISULTATI**

**4.1 Il trattamento a breve termine di cellule in coltura con yessotossina induce la frammentazione della E-caderina in assenza della redistribuzione di  $\beta$  e  $\gamma$ -catenine [50].**

**4.2 La yessotossina induce l'accumulo di dimeri di E-caderina alterati che non fanno parte delle strutture adesive [51].**

**4.3 Gli azaspiracidi alterano la E-caderina in**

**cellule epiteliali [53].**

## **5. DISCUSSIONE**

## **6. BIBLIOGRAFIA**

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Le tossine algali**

In questi ultimi anni si vanno sempre più sviluppando il commercio e le tecniche di allevamento in mare aperto dei prodotti ittici più svariati. La loro commercializzazione è regolata dalla normativa (Dlvo 530/92 e succ mod e integr.; Circ Min San n. 32 del 12/08/1993) che indica come debbano essere effettuati diversi controlli atti a stabilire la non pericolosità di tali prodotti per la salute umana. Tra gli agenti nocivi che possono contaminare i prodotti ittici troviamo le tossine di derivazione algale. Queste tossine, prodotte da alghe unicellulari, costituiscono la principale fonte nutritiva dei molluschi filtratori. Per le loro modalità di nutrizione tali molluschi filtrano volumi enormi di acqua marina. In tal modo essi accumulano facilmente quantità potenzialmente pericolose di tossine algali il cui livello nei mitili deve essere costantemente monitorato.

Oltre alla messa a punto di tecniche di analisi per l'individuazione della presenza di concentrazioni pericolose di dette sostanze, la ricerca in questo ambito è volta all'individuazione dei meccanismi di azione delle tossine. Conoscere il meccanismo d'azione di una molecola, infatti, da un lato consente di affrontare efficacemente i casi di intossicazione e dall'altro indica ai legislatori quali siano i limiti massimi di contaminazione



La yessotossina (YTX) è un etere policiclico a forma di scala (“ladder-shaped”) isolata in molluschi bivalvi e prodotta da dinoflagellati ampiamente diffusi lungo le coste di tutto il mondo, quali *Protoceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum* [1-3].

La somministrazione per iniezione intraperitoneale nel topo determina una risposta acuta di tipo neurotossico [4] a cui segue la morte del soggetto. La somministrazione di YTX per via orale, invece, non comporta alcun effetto acuto e non si risolve nella morte del topo, nemmeno a dosi di 2 mg/Kg, benché siano state riportate alcune alterazioni a livello tissutale. [4,5] Recentemente è stato dimostrato che la somministrazione orale di yessotossina determina nel topo la stabilizzazione della E-caderina presente nel colon[6].

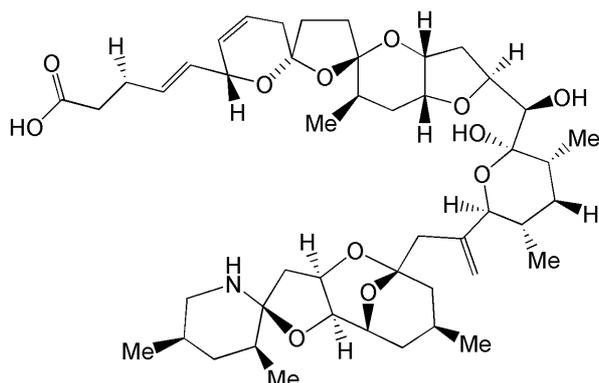
In sistemi cellulari, invece, la YTX ha mostrato avere effetti citotossici anche a basse concentrazioni ( $10^{-10}$ ÷ $10^{-9}$  M) [7].

Non molto si sa in effetti sui meccanismi molecolari coinvolti nella risposta alla YTX, tuttavia alcuni studi hanno mostrato la presenza di una risposta di tipo apoptotico. In questa risposta sarebbero in particolare coinvolti i canali del calcio [8], le fosfodiesterasi che agiscono sul cAMP [9], e le caspasi [7]. Inoltre altri dati sembrano indicare come la YTX abbia effetti di tipo cellula-specifici [10], nonché un ampio numero di tessuti sensibili [4,5].

Un quadro distinto riguardante il meccanismo cellulare di risposta

alla yessotossina emerge dal lavoro di questa tesi se integrato con i risultati di uno studio condotto nel nostro laboratorio, i cui risultati sono indicati nel paragrafo 1.3.2.

### 1.1.2 Gli azaspiracidi



Gli azaspiracidi sono tossine polieteree caratterizzate dalla presenza di un gruppo azaspiro, la cui famiglia conta almeno una decina di analoghi. Si tratta di tossine originariamente identificate in Irlanda, che sono state poi ritrovate in diversi paesi europei e che sembrano essere presenti anche nell'area mediterranea. Studi recenti hanno dimostrato che gli azaspiracidi sono prodotti da *Protoberidinium crassipes* [11]. La stima della tossicità deriva sia da alcuni episodi di intossicazione riportati in letteratura che direttamente da studi su animali [12-13]. Nel corso di questi studi gli azaspiracidi hanno mostrato essere tossici nel topo a concentrazioni pari a circa 0.2 mg/kg.

Dal punto di vista del meccanismo di azione non ci sono molte

informazioni in letteratura. La maggior parte delle informazioni sono state comunque ottenute su AZA-1, l'analogo che contamina più frequentemente i prodotti ittici. Sembra che a concentrazioni dell'ordine del  $10^{-7}$  M essi inducano modificazioni nei livelli di Ca citosolico [14,15,16], cAMP [15,16] e variazioni del pH intracitosolico [17]. Inoltre si sono riscontrate modificazioni della struttura citoscheletrica con depolimerizzazione della F-actina [15] e scomparsa degli pseudopodi in diversi tipi cellulari [18].

## **1.2 Le molecole di adesione**

I meccanismi che regolano i processi adesivi sono da lungo tempo studiati per il loro coinvolgimento in patologie importanti quali il cancro, nonché per la loro partecipazione nei fenomeni di motilità cellulare, riconoscimento e differenziamento.

La famiglia delle molecole di adesione conta un elevato numero di componenti distinti in due grandi famiglie: le molecole di adesione immunoglobulino simili e le caderine. La prima famiglia è coinvolta principalmente nei meccanismi della risposta immunitaria, mentre la seconda è coinvolta nell'adesione cellula-cellula che determina l'architettura dei tessuti solidi. Gli appartenenti a questa famiglia, pur mostrando una certa eterogeneità strutturale (Tab. 2), presentano alcuni

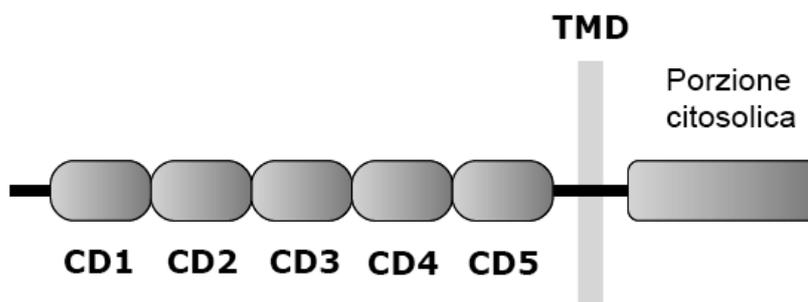
elementi comuni. In particolare sono tutte molecole transmembrana che presentano un dominio extra-cellulare, un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico [19]. Fra i tre domini, quello più conservato è sicuramente quello extra-cellulare il quale risulta essere organizzato in domini detti “caderinici” (CD) il cui numero varia nei diversi membri della famiglia delle caderine. (Tab. 2). I domini CD sono costituiti da circa 110 amminoacidi in una porzione della catena polipeptidica con struttura secondaria formata prevalentemente da foglietti  $\beta$  antiparalleli, che danno subdomini globulari leganti ciascuno uno ione  $\text{Ca}^{2+}$  che stabilizza la organizzazione tridimensionale della molecola [20] (si veda oltre).

Le caderine sono proteine estremamente conservate in specie anche filogeneticamente lontane, a conferma dell'importanza dei ruoli che esse rivestono negli organismi [19].

**Tabella 2.** Sottofamiglie delle caderine

Sottofamiglia	Caratteristiche strutturali	Sottofamiglia	Caratteristiche strutturali
Caderine classiche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio citoplasmatico altamente conservato che lega le catenine</li> <li>• Spesso trovate nelle giunzioni aderenti</li> </ul>	Caderine classiche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio citoplasmatico altamente conservato che lega le catenine</li> <li>• Spesso trovate nelle giunzioni aderenti</li> </ul>
Caderine simili a Fat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio extracellulare ampio con più di 34 CDs</li> <li>• Sottofamiglia eterogenea</li> </ul>	Caderine simili a Fat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio extracellulare ampio con più di 34 CDs</li> <li>• Sottofamiglia eterogenea</li> </ul>
Caderine trans-membrana (seven-pass)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio trans-membrana simile a quello di recettori legati a proteine G</li> </ul>	Caderine trans-membrana (seven-pass)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio trans-membrana simile a quello di recettori legati a proteine G</li> </ul>
Caderine simili a Dcad102F	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conservazione di sequenza nella maggior parte della proteina</li> <li>• Dominio LG</li> <li>• Dominio citoplasmatico ricco in Glu/Ser</li> </ul>	Caderine simili a Dcad102F	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conservazione di sequenza nella maggior parte della proteina</li> <li>• Dominio LG</li> <li>• Dominio citoplasmatico ricco in Glu/Ser</li> </ul>
Caderine con funzione protein-chinasica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio tirosin-chinasico</li> <li>• Ser/Thr chinasi putativa</li> </ul>	Caderine con funzione protein-chinasica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio tirosin-chinasico</li> <li>• Ser/Thr chinasi putativa</li> </ul>
Caderine desmosomali	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trovate solo nei vertebrati</li> <li>• Localizzate nei desmosomi Interagiscono con plakoglobina, desmoplakina e plakofilina</li> </ul>	Caderine desmosomali	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trovate solo nei vertebrati</li> <li>• Localizzate nei desmosomi Interagiscono con plakoglobina, desmoplakina e plakofilina</li> </ul>
Proto-caderine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trovate solo nei vertebrati</li> </ul>	Proto-caderine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trovate solo nei vertebrati</li> </ul>

Le caderine classiche costituiscono la sottofamiglia più studiata, con una struttura altamente conservata. Questa consta di una porzione extra-cellulare con cinque domini CD leganti il calcio, un breve tratto trans-membrana (TMD) e una porzione citosolica che prende contatto con il citoscheletro (Fig. 1)[19].



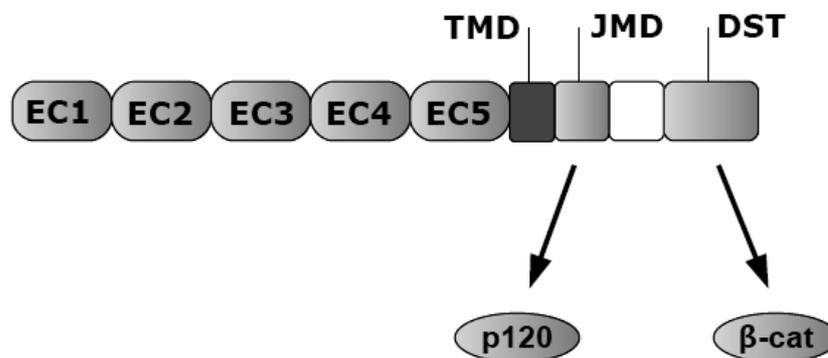
**Figura 1.** Struttura generale delle caderine classiche

Nell'uomo esistono almeno una decina di tipi di caderine classiche che si distinguono per l'espressione differenziale in diversi tessuti. La E-caderina, ad esempio, è espressa prevalentemente nell'epitelio, la N-caderina nel tessuto neuronale, la P-caderina nel tessuto placentale [21].

### 1.2.1 Il sistema E-caderina

La E-caderina (Epithelial cadherin), ovvero uvomorulina [22] o anche L-CAM [23], è un membro della sottofamiglia delle caderine classiche, espressa tipicamente nei tessuti epiteliali. Le sue caratteristiche essenziali, comuni a tutte le caderine classiche, sono

schematizzate in figura 2.



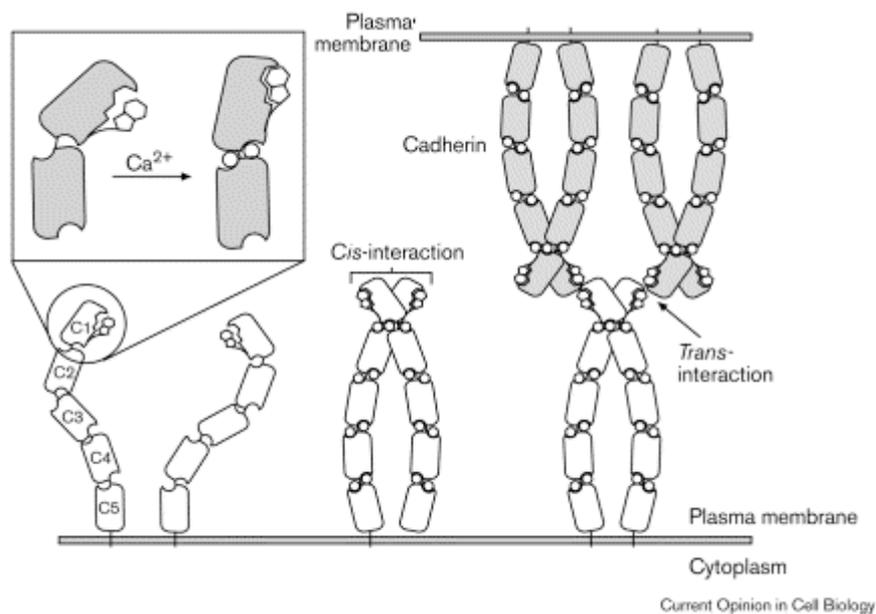
**Figura 2.** Struttura della E-caderina

Il legame con il calcio dei cinque domini CD (in questo caso indicati come EC) fa sì che la porzione extra-cellulare assuma una conformazione rigida (rod-like) e sia pertanto in grado di prendere contatto con un'altra molecola di E-caderina, vicina alla prima, sulla membrana plasmatica. Questo dimero di E-caderine affiancate, indicato in letteratura come "cis-dimero" (vedi fig. 3), è ritenuto la struttura base per la formazione di giunzioni aderenti fra due cellule [24].

Tali giunzioni si ipotizza comprendano molte molecole di E-caderina, complessate tra loro secondo un modello a "cerniera", che prevede la formazione di legami tra E-caderine appartenenti a cellule diverse, con la formazione di cosiddetti "trans-dimeri", e che quindi comporta l'assemblaggio di complessi sovramolecolari di elevate

dimensioni (Fig. 3) [25,26].

Benchè l'esistenza dei trans-dimeri non sia mai stata dimostrata in vivo la loro formazione in condizioni cell-free permette di ipotizzarne la presenza anche a livello delle giunzioni fra cellule [20].



**Figura 3.** Struttura dei dimeri di E-caderina

La formazione di complessi sovramolecolari, fenomeno che porta alla formazione della giunzione aderente fra due cellule, segue dinamiche non troppo chiare e sicuramente non intuitive. Il modello attualmente accettato prevede che l'adesione fra cellule sia fondata su un equilibrio fra due stati. Il primo di questi è detto di adesione debole (weak adhesion), e sembrerebbe fondarsi su trans-dimeri non organizzati in aggregati, mentre il secondo, di adesione forte (strong adhesion), sarebbe costituito da aggregati multimolecolari [25].

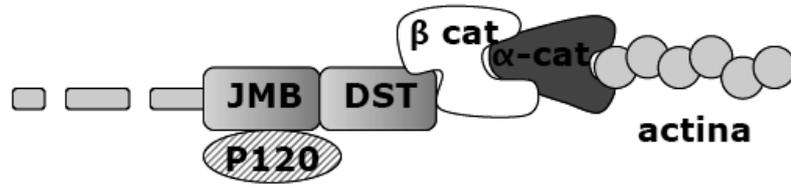
In realtà il processo sembra essere più complesso. La complessità emerge innanzitutto dalla presenza nella medesima cellula di tipi differenti di E-caderina. Inoltre non va dimenticato il ruolo della porzione citoplasmatica della E-caderina che sembra essere fondamentale.

### *1.2.1.1 Il dominio intra-citoplasmatico*

La porzione citoplasmatica della E-caderina viene suddivisa in due domini (Fig. 2): il dominio juxtamembranario (JMB) e il dominio distale di legame a  $\beta$ -catenina (DST). Entrambi i domini sono coinvolti in interazioni con proteine cellulari e la conseguente formazione di strutture sovramolecolari comprendenti la E-caderina [25].

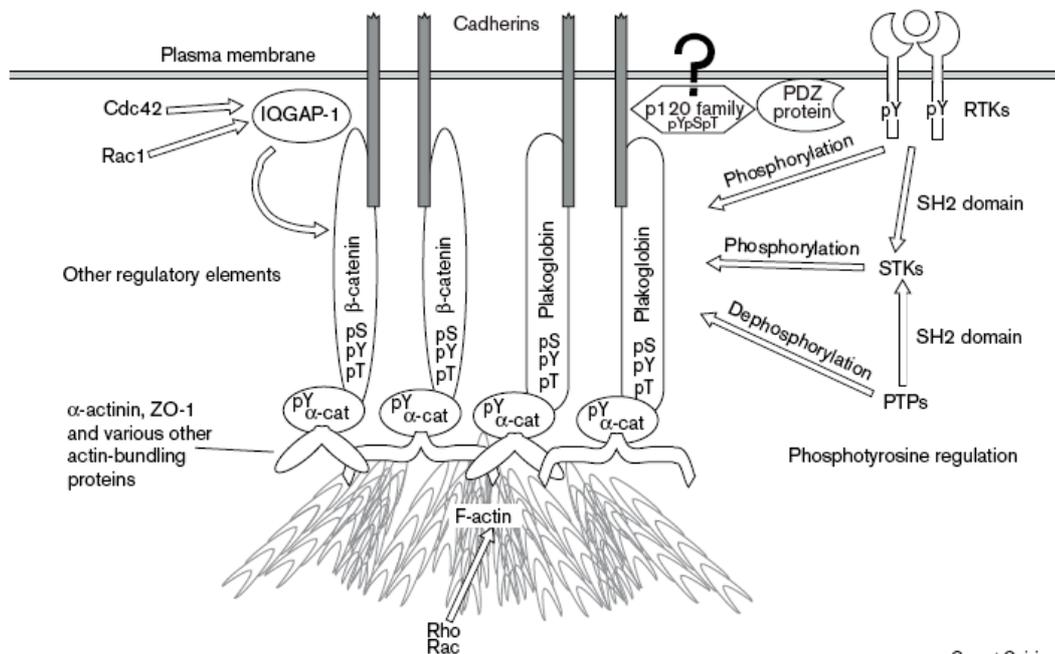
Il dominio DST prende contatto con una proteina definita  $\beta$ -catenina la quale lega a sua volta l' $\alpha$ -catenina [27]. Quest'ultima, insieme ad altre proteine (ZO-1,  $\alpha$ -actinina, vinculina), farebbe da punto di attacco del citoscheletro, associandosi con i filamenti di actina (Fig. 4) [28]. La  $\gamma$ -catenina, una proteina molto simile alla  $\beta$ -catenina, sembra dividerne il destino legandosi anch'essa al dominio DST e facendo da ponte tra l'E-caderina e il citoscheletro.

Il dominio JMB, invece, prende contatto con un'altra catenina detta p120 o  $\delta$ -catenina, la quale risulta essere un substrato della proteina cinasi Src (vedi par. 1.1.1.4) [29].



**Figura 4.** Struttura del dominio intracitoplasmatico

Si è a lungo discusso e si discute ancora su quali siano le funzioni del dominio citoplasmatico. Vi è comunque il consenso sulla importanza di tale dominio nella regolazione del sistema E-caderina, visto l'elevato numero di vie regolatorie che lo coinvolgono (Fig. 5) [25].



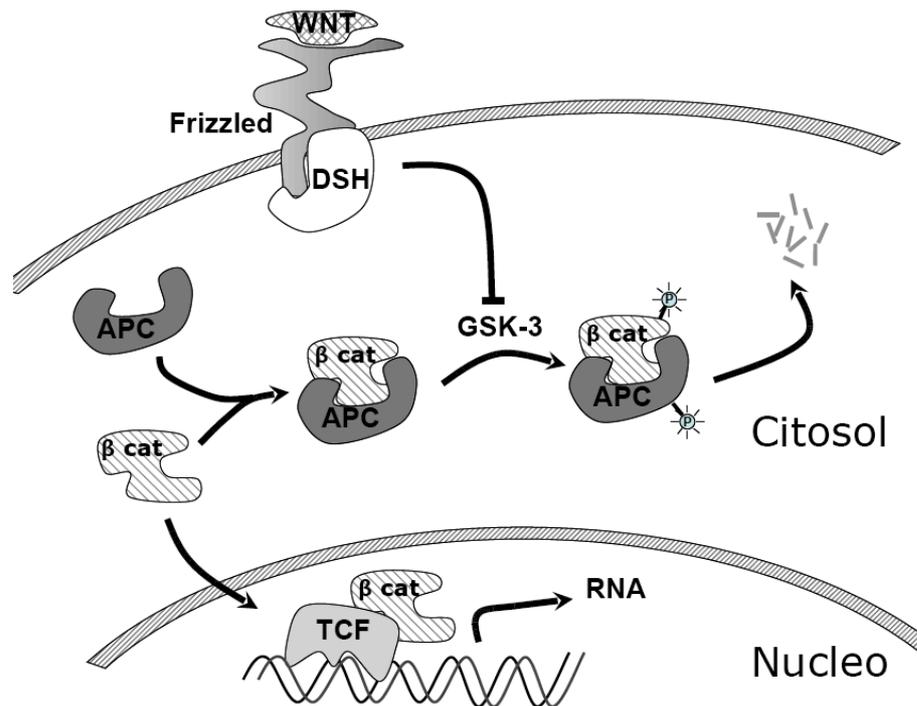
Current Opinion in Cell Biology

**Figura 5.** Modello dei sistemi di regolazione coinvolgenti la E-caderina

Per meglio comprendere la complessità dei vari meccanismi di regolazione è opportuno affrontarli singolarmente.

### *1.2.1.2 La $\beta$ -catenina e la via regolatoria Wnt*

Wnt è un fattore di crescita che svolge un ruolo fondamentale nella determinazione del destino cellulare nel corso dell'embriogenesi [30]. La via regolatoria che, a partire da Wnt, coinvolge la  $\beta$ -catenina è definita "canonica", tanto per il fatto di essere la prima identificata che per gli importanti meccanismi in cui essa è coinvolta. In particolare, per quanto riguarda lo sviluppo embrionale, tale via è coinvolta ad esempio nei processi di organogenesi, angiogenesi, sviluppo di cellule staminali [30]. Nell'adulto, invece, la segnalazione coinvolgente Wnt è implicata in processi fisiologici, come ad esempio il controllo della densità ossea [30], e in alcuni processi patologici, come talune neoplasie e il morbo di Alzheimer [30]. Da qui l'interesse per questa via regolatoria nonché per il suo effettore principale, cioè la  $\beta$ -catenina.



**Figura 6.** La via Wnt

In assenza di un segnale mitotico proveniente dall'esterno la  $\beta$ -catenina viene sequestrata in un complesso formato da diverse subunità proteiche comprendente le proteine APC (Adenomatous Polyposis Coli), glicogeno sintasi cinasi  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), fosfoprotein-fosfatasi 2A (PP-2A) e l'axina [31]. Quando questo complesso è assemblato, la GSK- $3\beta$  catalizza la fosforilazione della  $\beta$ -catenina [32]. In seguito alla fosforilazione multipla, le molecole di  $\beta$ -catenina vengono distrutte, ed è appunto la reazione di fosforilazione che avrebbe il ruolo di indirizzarle all'eliminazione [32]. Questo meccanismo, in sinergia con il legame della  $\beta$ -catenina all'E-caderina, causa la presenza di bassi livelli di  $\beta$ -catenina

libera a livello citosolico.

Quando il ligando Wnt lega il proprio recettore denominato frizzled (Fz) viene attivata, secondo un meccanismo non ancora del tutto chiaro, una proteina intracellulare chiamata dishevelled (Dsh), la quale viene reclutata sulla membrana destabilizzando il complesso APC, GSK-3 $\beta$ , axina, che, pertanto, non risulta essere più in grado di fosforilare la  $\beta$ -catenina [32]. In conseguenza della diminuita fosforilazione della  $\beta$ -catenina aumenta la quantità citosolica della proteina, che si trasferisce nel nucleo legandosi ai fattori di trascrizione Lef-1 (Lymphocyte Enhancer Factor) e TCF (T-cell Factor) [30]. In seguito alla formazione di queste interazioni viene regolata l'espressione genica di geni coinvolti ad esempio nella migrazione cellulare [33-35]. Anche la  $\gamma$ -catenina si ritiene segua lo stesso destino, ma potrebbe avere capacità transattivanti diverse [36].

### *1.2.1.3 p120 e la via regolatoria Src*

Src è una tirosin-chinasi che ha dato il nome ad una famiglia di proteine ad azione chinasi di estrema rilevanza [37], visto il ruolo nella normale funzionalità cellulare ovvero nei processi di oncogenesi [37]. In particolare un aumento della attività tirosin-chinasi è stato riscontrato in diversi tipi di tumori [37].

I substrati di Src sono molteplici, e fra questi troviamo p120 [38], una catenina che si lega al dominio juxtamembranario dell'E-caderina. Per quanto il ruolo di p120 nell'adesione cellula-cellula non sia del tutto chiaro sembra che essa agisca da modulatore [37].

Per ciò che riguarda il ruolo di Src si ritiene che essa sia in grado di fosforilare p120 solo quando essa è legata alla E-caderina. La fosforilazione di p120 causa la sua dissociazione dal citoscheletro e il suo rilascio nel citosol [39]. L'aumento del pool citosolico di p120 correla con il distacco della E-caderina dal citoscheletro (vedi Par. 1.2.1.4), quindi l'attivazione di Src causerebbe il distacco della E-caderina dal citoscheletro, con conseguente diminuzione dei complessi multimolecolari su cui si basa l'adesione cellula-cellula. Poichè una delle vie di attivazione di Src coinvolge le integrine, responsabili dell'adesione fra cellula e matrice extra-cellulare, si pensa che la fosforilazione di p120, mediata da Src, rappresenti il meccanismo molecolare della comunicazione fra i due sistemi di adesione (cellula-matrice e cellula-cellula), e sia coinvolto nel controllo di processi quali, ad esempio, la migrazione cellulare [39]. A questo va aggiunto che anche la  $\beta$ -catenina e la  $\gamma$ -catenina possono fungere da substrato di Src [40]: la loro fosforilazione determinerebbe il distacco delle catenine dalla E-caderina, e, conseguentemente verrebbe determinato il distacco della E-caderina dal citoscheletro e la perdita dell'adesione cellula-cellula. Come

conseguenza di questa perdita le cellule potrebbero essere in grado di migrare in un altro distretto dell'organismo [41]. Quando tale processo coinvolge cellule trasformate si può assistere alla formazione di metastasi.

#### *1.2.1.4 Le GTPasi della famiglia Rho*

Una interessante caratteristica dei cluster formati dalle caderine consiste nella possibilità di rimodellamento, cioè nella capacità che hanno le giunzioni di cambiare forma e posizione sulla superficie cellulare [41]. Tale processo sembra essere fondamentale per i fenomeni di migrazione cellulare, tanto fisiologici che patologici, come ad esempio nel corso della metastatizzazione [41].

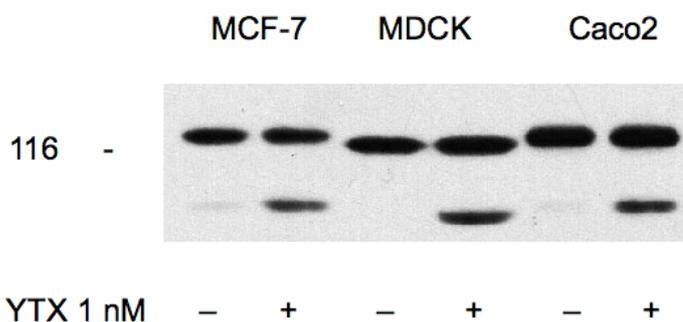
Le GTPasi della famiglia Rho sembrano partecipare alla regolazione del rimodellamento delle strutture adesive [41]. Il meccanismo di funzionamento è analogo a quello delle proteine G trimeriche, e prevede la possibilità per tali molecole di esistere in due forme, una legante GDP, inattiva, e una legante GTP, in grado di associarsi a specifici effettori, svolgendo la propria funzione [41]. Uno degli effettori meglio conosciuti di questa via di segnalazione, coinvolto nel sistema E-caderina, è IQGAP1. Esso, interagendo con la  $\beta$ -catenina legata alla E-caderina [42,43], ne causa il distacco dell' $\alpha$ -catenina e quindi la rottura dei collegamenti E-caderina-citoscheletro [43].

Rac1 e Cdc42 sono due Rho GTPasi, le quali in forma attivata sono in grado di inibire il legame di IQGAP1 alla  $\beta$ -catenina [42,43], favorendo così il legame della E-caderina al citoscheletro. In sostanza perciò l'attivazione delle Rho GTPasi causa il passaggio dallo stato di "weak adhesion" allo stato di "strong adhesion".

Le Rho GTPasi inoltre sono in grado di modulare il sistema E-caderina anche agendo su p120. Bisogna precisare che tale catenina è presente in due distinti pool, uno citosolico e uno membranario. Sembra che p120 citosolica sia in grado di agire sulla via delle Rho GTPasi inattivando la GTPasi RhoA e attivando le GTPasi Rac1 e Cdc42. L'entità del pool citosolico di p120 è strettamente correlata all'entità del pool membranario, cioè alla quantità di p120 legata alla E-caderina (fenomeno che sembra essere strettamente correlato al clustering). Pertanto un aumento del pool citosolico ( $\downarrow$  pool membranario  $\Rightarrow$   $\downarrow$ clustering) causerebbe un'attivazione di Rac1 e Cdc42, con conseguente distacco di IQGAP1 dalla  $\beta$ -catenina e quindi legame della E-caderina al citoscheletro. Si avrebbe perciò una sorta di loop in grado di mantenere i livelli globali di cluster più o meno costanti, consentendo tuttavia il rimodellamento delle strutture già esistenti.

### **1.3 Yessotossina ed E-caderina**

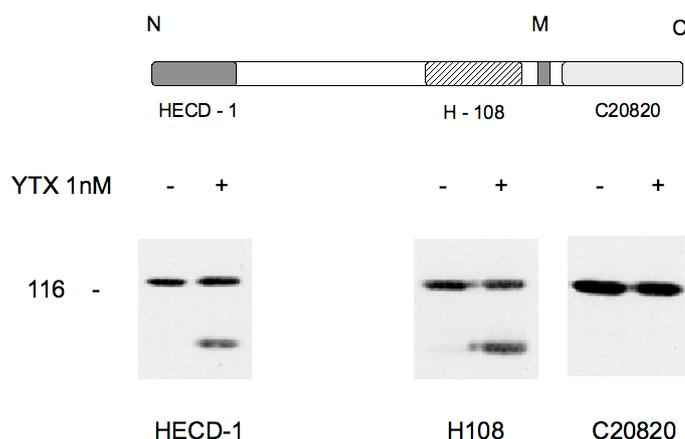
Nell'ambito di studi condotti nel nostro laboratorio sulle basi molecolari delle risposte indotte da YTX in sistemi cellulari, è emerso come il trattamento di cellule MCF-7 con yessotossina causi l'accumulo di un frammento del peso molecolare di 100 Kda. Tale frammento, riconoscibile da un anticorpo anti E-caderina, è stato definito ECRA<sub>100</sub> (E-Cadherin Related Antigen) [44]. Questo risultato è stato osservato anche in altre linee epiteliali normali e trasformate, in particolare in MDCK (cellule di rene canino), e Caco<sub>2</sub> (cellule di carcinoma del colon umane), come mostrato in figura 7.



**Figura 7:** Effetto della yessotossina su tre linee cellulari. Cellule del tipo descritto sopra sono state trattate con veicolo (-) oppure con 1 nM YTX (+) per 24 ore a 37°C. Al termine le cellule sono state utilizzate per l'ottenimento di estratti citosolubili separati in SDS-PAGE e sottoposti ad immunoblotting con l'anticorpo anti-E-caderina H-108. La mobilità elettroforetica della  $\beta$ -galattosidasi (116 Kda) usata come marker è indicata sulla sinistra.

Per definire quale fosse la porzione della molecola mancante in ECRA<sub>100</sub> sono stati impiegati tre diversi anticorpi, in grado di riconoscere epitopi posti in posizioni diverse della molecola di E-caderina, come

schematizzato nella figura 8.



**Figura 8:** Organizzazione generale della E-caderina e posizione degli epitopi riconosciuti dai diversi anticorpi (Pannello A). Le sigle indicate si riferiscono a prodotti reperibili sul mercato (si veda in proposito la sezione materiali e metodi). Pannello B: autoradiografia ottenuta da cellule MCF-7 di controllo (-) e trattate con YTX (+) i cui estratti cellulari sono stati separati in SDS-PAGE e sottoposti ad immunoblotting con l'anticorpo indicato.

I tre anticorpi sono in grado di riconoscere epitopi diversi, e sono stati scelti in quanto localizzati in rilevanti domini della molecola. In particolare, i due anticorpi competenti nel legame con la porzione extracellulare dell'E-caderina riconoscono e legano sia la E-caderina intera che ECRA<sub>100</sub>. L'anticorpo il cui epitopo comprende la porzione citoplasmatica della E-caderina, invece, lega soltanto la proteina intatta, indicando che ECRA<sub>100</sub> manca proprio della porzione citoplasmatica, e rappresenta quindi un frammento di E-caderina, costituito dalla sua porzione extracellulare [44].

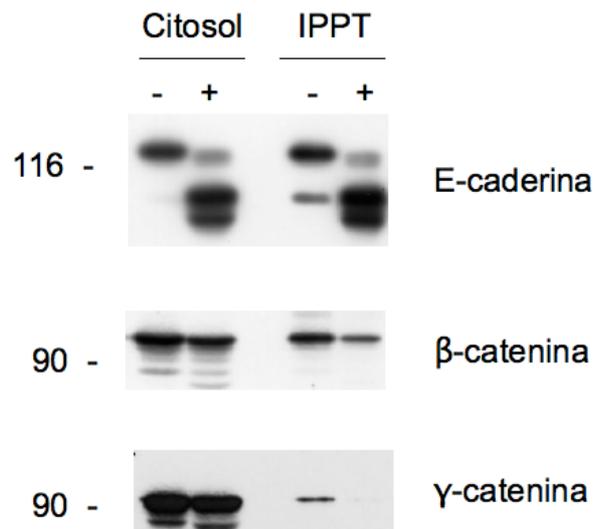
### 1.3.1 Effetti a medio termine su cellule in coltura [44]

Per quanto detto è chiaro come la E-caderina perda la porzione intracellulare che è quella deputata al legame con le catenine. Siamo andati a valutare su cellule in coltura se in seguito alla distruzione della porzione citosolica della E-caderina si determinasse una diminuzione della quantità di catenine ad essa legate.

Come già descritto nel paragrafo 1.2.1.2, il legame con la E-caderina contribuisce a mantenere bassi i livelli citosolici delle catenine. Qualora si determinasse una diminuzione della capacità legante della E-caderina il livello citosolico delle catenine aumenterebbe. Un tale fenomeno è stato spesso correlato in letteratura alla proliferazione cellulare ed alla tumorigenesi.

Per questo motivo sono stati analizzati i livelli di catenine associati alla E-caderina in cellule MCF-7 dopo un trattamento di quattro giorni con YTX. Il trattamento prolungato per 4 giorni con YTX di cellule MCF-7 determina effettivamente una diminuzione della quantità di  $\beta$  e  $\gamma$ -catenina co-immunoprecipitate con la E-caderina come mostrato in figura.

Tale effetto sembra essere dovuto primariamente al collasso dei livelli di E-caderina presenti nel sistema e all'accumulo di grosse quantità di ECRA<sub>100</sub> che, mancando della porzione citosolica, non è verosimilmente in grado di legare le catenine.



**Figura 9.** Effetto del trattamento prolungato con YTX sui livelli di catenine totali ed associate alla E-caderina. Cellule MCF-7 sono state trattate con veicolo (-) o con YTX 1 nM (+) per 4 giorni a 37°C. Al termine le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili sottoposti ad SDS-PAGE e immunoblotting con gli opportuni anticorpi.

### 1.3.2 Yessotossina e processi degradativi della E-caderina [45].

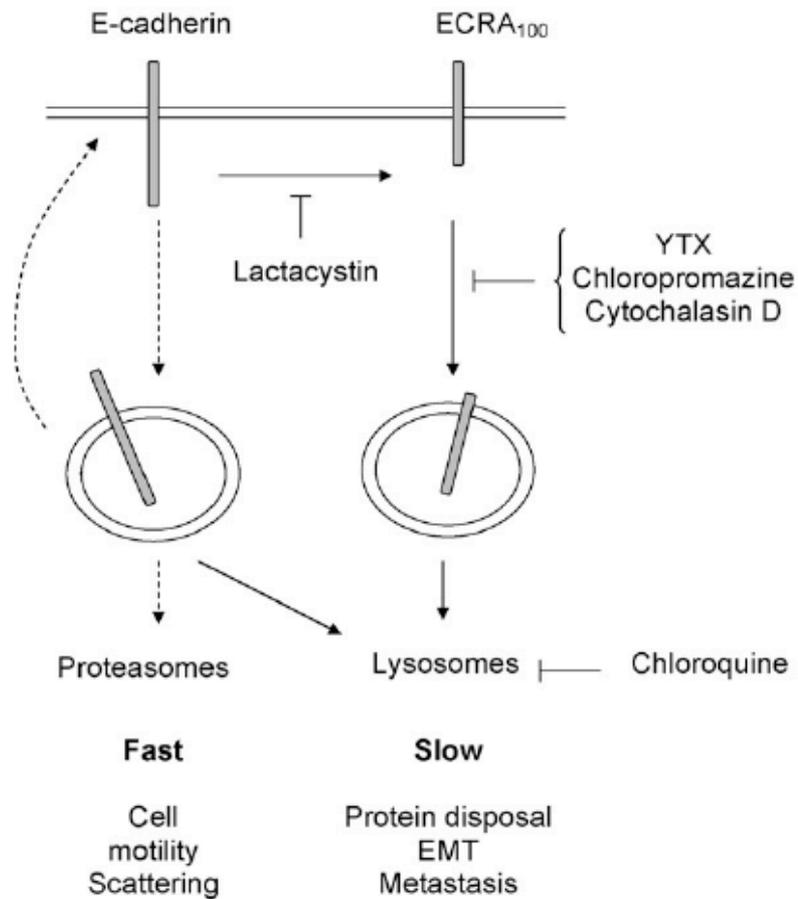
Per quanto detto il trattamento di cellule MCF-7 con YTX determina la comparsa di un frammento di E-caderina di circa 100 Kda. La degradazione proteolitica delle proteine di membrana in generale e della E-caderina in particolare è un processo piuttosto complesso che si realizza in diversi stadi e la cui descrizione non rappresenta lo scopo di questo lavoro. Tuttavia è bene sapere che esistono diversi inibitori specifici per ciascuno stadio dei processi di eliminazione di una proteina. L'approccio seguito nel nostro laboratorio è stato quello di utilizzare in

cellule MCF-7 gli inibitori descritti in tabella 3 allo scopo di ottenere informazioni sul destino cellulare di ECRA<sub>100</sub>.

Inibitore	Funzione cellulare	Effetto sull' E-caderina
Lactacistina	Inibitore del proteasoma	inibizione dell'effetto della YTX
Clorochina	inibitore dell'attività lisosomiale	accumulo di ECRA <sub>100</sub>
Clorpromazina	inibitore dell'endocitosi mediata da clatrina	accumulo di ECRA <sub>100</sub>
Nistatina	inibitore dell'endocitosi mediata da caveole	nessun effetto
Nocodazolo	inibitore dei microtubuli	nessun effetto
Citocalasina D	inibitore della polimerizzazione dell'actina	accumulo di ECRA <sub>100</sub>

**Tabella 3.** Effetti di diversi inibitori delle vie di degradazione e internalizzazione della E-caderina sull'accumulo di ECRA<sub>100</sub>.

Come si vede un solo inibitore è in grado di impedire l'accumulo di ECRA<sub>100</sub> determinato dalla YTX, la lactacistina. Come descritto si tratta di un inibitore del proteasoma. Inoltre, sia gli inibitori dell'endocitosi che quelli della degradazione lisosomiale, determinano l'accumulo di ECRA<sub>100</sub>. Anche la distruzione del citoscheletro di actina porta all'accumulo del frammento. Sulla base di questi dati è stato possibile costruire il quadro interpretativo schematizzato in figura:



**Figura 10.** Vie degradative della E-caderina ed effetto dei diversi inibitori [45].

Il turnover della E-caderina può seguire due differenti percorsi. Il primo, rapido, prevede l'internalizzazione diretta della E-caderina ed è coinvolto in tutti quei fenomeni che richiedono una veloce redistribuzione della E-caderina sulla membrana cellulare. Il secondo invece, più lento, prevede un primo passaggio di proteolisi mediato dal proteasoma, a cui è dovuta la formazione di ECRA<sub>100</sub>. Questo passaggio è inibito dalla lactacistina e ciò spiega perchè il trattamento con tale inibitore impedisce l'accumulo di

ECRA<sub>100</sub>. Dopo la formazione del frammento proteolitico, esso viene endocitato e veicolato ai lisosomi per la completa degradazione. Secondo quanto emerge dal lavoro citato, la YTX agisce proprio a questo livello, impedendo che ECRA<sub>100</sub>, venendo endocitato, venga avviato alla successiva eliminazione. L'incapacità del sistema di eliminare ECRA<sub>100</sub> tramite la normale via degradativa determinerebbe, secondo gli autori, l'accumulo del frammento riscontrato nei nostri sistemi sperimentali.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Per quanto detto, individuare i meccanismi d'azione di una tossina presente in un alimento è fondamentale allo scopo di evitare potenziali rischi per la salute umana.

La yessotossina potrebbe rappresentare un rischio a causa della sua capacità di determinare l'accumulo di un frammento della E-caderina incapace di legare le catenine.

La yessotossina è presente nei mitili allevati nei mari italiani ormai da molti anni. Nuove tossine tuttavia iniziano a diffondersi. Una di esse, gli azaspiracidi, presenta una provata pericolosità.

Lo scopo di questa tesi è, dunque, da un lato quello di approfondire i meccanismi di azione della yessotossina e, dall'altro, quello di cominciare ad affrontare lo studio delle modalità con cui gli azaspiracidi inducono effetti tossici nell'uomo.

## 3.MATERIALI E METODI

### 3.1 Materiali

La yessotossina è stata fornita dal gruppo del Prof. Ernesto Fattorusso del Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". La yessotossina è stata disciolta in etanolo assoluto e conservata a -20°C, in contenitori di vetro.

L'azaspiracido di tipo 1 è stato cortesemente fornito dal Dr. Philipp Hess del Marine Institute di Galway in Irlanda.

Gli anticorpi primari impiegati in questa indagine sono descritti dalla seguente tabella:

Antigene	Ditta fornitrice	Codice	Epitopo
E-caderina	Alexis	HECD-1	N-terminale
E-caderina	Zymed	13-1700	N-terminale
E-caderina	Santa Cruz	H-108	Extracellulare prossimo alla membrana
E-caderina	Transduction Laboratories	C20820	C-terminale
$\beta$ -catenina	Transduction Laboratories	C19220	C-terminale
$\gamma$ -catenina	Transduction Laboratories	C26220	C-terminale
p120	Transduction Laboratories	P17920	C-terminale
$\alpha$ -catenina	Transduction Laboratories	C21620	C-terminale

**Tabella 4.** Anticorpi utilizzati nell'immunoblotting

Gli anticorpi secondari "anti-mouse IgG" e "anti-rabbit IgG" coniugati con perossidasi di rafano, e i reagenti ECL, sono stati acquistati dalla

Amersham Biosciences.

I marker di peso molecolare per elettroforesi in gel di poliacrilammide, tanto quelli standard (Standard Blu) che quelli per elevati pesi molecolari (Crosslinked Phosphorylase), sono stati acquistati dalla SIGMA.

La membrana di nitrocellulosa Protran BA83 è stata acquistata dalla Schleicher&Schuell.

La proteina G coniugata a Sepharose® (Protein G-sepharose 4B Fast-Flow) è stata acquistata dalla Amersham Biosciences.

I cross-linker DSS e DTSP sono della Pierce

Il colorante fluorescente Oregon Green Phalloidine è stato ottenuto dalla Molecula Probes (Invitrogen).

Tutti gli altri reattivi salvo quando diversamente specificato sono almeno di grado analitico.

## **3.2 Metodi**

### **3.2.1 Condizioni di mantenimento delle cellule in coltura e loro trattamento con yessotossina**

La sperimentazione è stata condotta su cellule MCF-7, ottenute da un essudato pleurale di carcinoma mammario umano [46] e acquisite dalla European Collection of Animal Cell Cultures, su cellule

Caco-2 ottenute da un adenocarcinoma al colon umano e acquisite dalla American Type Culture Collection e su fibroblasti normali di topo ottenuti da espianti di pelle di topi normali neonati, messi in coltura come precedentemente descritto [47]. Le cellule sono state mantenute in coltura in capsule Petri del diametro di 90 mm, ad una temperatura di 37°C, in presenza di anidride carbonica al 5%, in un mezzo di coltura composto da Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenente siero bovino fetale al 10% e amminoacidi non essenziali all'1%.

Per eseguire gli esperimenti, due serie di Petri contenenti cellule in crescita logaritmica, sono state addizionate rispettivamente con tossine e altre sostanze alla concentrazione finale indicata (trattato, +), oppure con un egual volume di etanolo puro (controllo, -). Dopo il tempo di incubazione indicato a 37°C, si è proceduto alla preparazione e analisi degli estratti, come descritto di seguito.

### 3.2.2 Preparazione degli estratti cellulari

Le procedure sono state condotte interamente a 4°C

#### 3.2.2.1 *Preparazione estratti base*

Le cellule di ogni Petri sono state lavate con tampone fosfato 20 mM, pH 7,4 e NaCl 0,15 M (PBS), addizionate con 4ml/Petri di tampone

fosfato 20mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M ed EDTA 1,5 mM (PBS-EDTA), staccate, recuperate mediante centrifugazione per 8 min a 800xg, lavate in 4 ml di PBS, recuperate e disperse in tampone di lisi composto da PBS contenente Triton X-100 all'1% (v/v), fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,1 mg/ml, EDTA 1mM (TX). Il lisato cellulare è stato poi centrifugato per 30 min a 16000xg. Al termine della centrifugazione, viene ottenuta una porzione liquida definita estratto citosolubile (C) e un sedimento. L'estratto citosolubile così ottenuto è stato usato in parte per determinare il contenuto in proteine mediante il metodo dell'acido bicinconinico [40], e un'aliquota restante è stata addizionata con un uguale volume di un tampone composto da SDS al 4% (w/v),  $\beta$ -mercaptoetanololo al 10% (v/v) e glicerolo al 40% (v/v) (Laemmli 2x), per essere successivamente sottoposta a frazionamento mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide, secondo la procedura di Laemmli [48].

### *3.2.2.2 Estrazione delle proteine dalla frazione insolubile in Triton X-100.*

Il sedimento ottenuto precedentemente in seguito a centrifugazione 16000xg per 30 min, è stato ridissolto in 0,4÷0,9 ml di Laemmli 2x ,oppure in 0,2÷0,5 ml di un tampone composto da Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 a 25 °C, SDS al 4% (w/v) ,centrifugato a 25 °C per un'ora a 105000 x

g e il sovranatante di questa centrifugazione costituiva la frazione definita “precipitato” (P)

### *3.2.2.3 Ottenimento degli estratti nucleari*

Le cellule in petri vengono lavate due volte con PBS, staccate meccanicamente, recuperate mediante centrifugazione per 8 min a 800 x g e risospese in un tampone costituito da Tris 20 mM (pH 7.4 a 25°C) ed EDTA 1.5 mM (TE), incubazione per 20'. Al termine le cellule sono lisate meccanicamente tramite dounce e il lisato è sottoposto a centrifugazione per 10 min a 1000 x g. Il precipitato di questa seconda centrifugazione viene risospeso direttamente nel tampone da SDS-PAGE per ottenere gli estratti totali, oppure in NaCl 0.75 M per portare in soluzione le proteine associate alla cromatina mediante ponti salini. Entrambi gli estratti sono centrifugati per 30' a 16000 x g e il sovrinatante costituisce il campione per le successive analisi.

### *3.2.2.4 Procedura di immunoprecipitazione*

L'estratto citosolubile è stato sottoposto a pretrattamento con una adeguata quantità di Proteina G Sepharose®, per un ora in agitazione su agitatore orbitale. L'estratto citosolubile così trattato è stato addizionato con 4 µg anticorpo/800 µg proteina totale. Anche in questo caso

l'incubazione è avvenuta per un'ora in agitazione su agitatore orbitale. Al termine dell'incubazione è stata aggiunta una quantità di Proteina G-Sepharose® (30÷80 µl a seconda della quantità di proteina), e si è incubato nuovamente per un'ora in agitazione.

La proteina G-Sepharose® è stata a questo punto lavata per due volte tramite dispersione in 0,2 ml PBS, stratificazione su un cuscino di saccarosio al 10% in PBS (0,5 ml) e recuperata mediante centrifugazione per 4 min a 16000Xg. Il materiale immunoprecipitato è stato quindi staccato con l'aggiunta di 100 µl di tampone Laemmli 2x/800 µg di proteina citosolubile sottoposta a immunoprecipitazione.

### 3.2.2.5 *Cross-linking di estratti citosolubili*

Gli estratti citosolubili, ottenuti come descritto precedentemente, vengono addizionati con il cross-linker alla concentrazione adeguata e incubati in agitazione per 90'. Al termine la reazione viene bloccata aggiungendo lisina alla concentrazione finale di 0,04 M e incubando per 30' in agitazione.

Cross-linker	Concentrazione
Glutaraldeide	0,0125 %
DSS	1 mM
DTSP	1 mM

**Tabella 5.** Concentrazione dei cross-linker utilizzati

### *3.2.2.6 Cross-linking di cellule in piastra*

Le cellule di ogni Petri sono state lavate con PBS, sono state quindi incubate per 90 min a 4°C con 4 ml di PBS contenente glutaraldeide 0,0125% (w/v) mantenendo i campioni in lieve agitazione. La reazione di cross-linking è stata bloccata con aggiunta di 50 µl/Petri di lisina 3M e incubazione per 30 min a 4°C in lieve agitazione.

Le cellule sono state a questo punto addizionate con 4 ml di PBS e staccate meccanicamente con scraper. La sospensione cellulare è stata centrifugata per 8 min a 800 x g e le cellule sono poi state risospese in un adeguato volume di tampone di lisi costituito da PBS contenente Triton X-100 all'1% (v/v), fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,1 mg/ml. Il lisato cellulare è stato poi centrifugato per 30 min a 16000xg. Al termine della centrifugazione è stato ottenuto un estratto citosolubile ed un precipitato che sono stati processati secondo le procedure già descritte.

### *3.2.3 Frazionamento delle proteine mediante SDS-PAGE*

Campioni contenenti la stessa quantità di proteine sono stati separati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) usando un gel di separazione contenente poliacrilammide al 10% oppure al 5% e un gel di stacking contenente poliacrilammide al

3%.

### *3.2.4 Frazionamento delle proteine mediante elettroforesi diagonale.*

Le proteine che hanno subito il trattamento con il cross-linker reversibile e che sono state denaturate mediante un tampone da SDS-PAGE privo di  $\beta$ -mercaptoetanololo, vengono separate in una prima dimensione che è costituita da una normale SDS-PAGE al 5% di acrilammide. In seguito la corsia nella quale il campione ha corso viene excisa completamente dal gel ridotta mediante incubazione per 30' a temperatura ambiente con Laemmli 2x e caricata ortogonalmente su un secondo gel al 5% di acrilammide nel quale avviene la separazione dei componenti degli oligomeri dopo la rottura dei ponti disolfuro del crosslinker.

### *3.2.5 Immunoblotting*

Alla fine della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite mediante l'applicazione di campo elettrico, su una membrana di nitrocellulosa (Protran BA83).

Le proteine adsorbite alla membrana sono state visualizzate mediante colorazione con Ponceau S. I siti di legame aspecifici presenti sulla membrana sono stati poi bloccati mediante un trattamento di un'ora a temperatura ambiente con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 a 25°C, NaCl 0,15 M

(tampone TBS), contenente  $\text{CaCl}_2$  1 mM e latte magro in polvere al 3%. La membrana è stata quindi incubata per 1 ora a temperatura ambiente con TBS contenente  $\text{CaCl}_2$  1 mM, latte magro in polvere all'1%, e l'anticorpo primario alle seguenti concentrazioni:

Anticorpo	Concentrazione ( $\mu\text{g/ml}$ )
HECD-1	2
13-1700	2
H-108	2
C20820	0,1
C19220	0,25
C26220	0,25
P17920	0,25
C21620	0,25

**Tabella 6.** Concentrazioni dei primari utilizzati in immunoblotting

Quando l'analisi è stata condotta per rilevare componenti diversi dalla E-caderina la procedura di bloccaggio e l'incubazione con l'anticorpo primario, è stata condotta in assenza di  $\text{CaCl}_2$  e il tampone conteneva Tween 20 0,05% (v/v). I passaggi successivi erano identici per tutti gli antigeni rilevati. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario, la membrana è stata lavata per cinque volte con TBS contenente Tween 20 allo 0,05% (v/v) (TBS-Tween) e successivamente è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano, diluito 1:3000 in TBS-Tween contenente latte magro in polvere all'1%. La membrana è stata quindi sottoposta ad altri

cinque lavaggi con TBS-Tween e gli antigeni sulla membrana sono stati infine visualizzati mediante chemiluminescenza (sistema ECL o ECL plus) e autoradiografia.

I risultati mostrati nelle figure sono quelli ottenuti in uno dei tre o più esperimenti identici da noi condotti.

### *3.2.6 Calcolo dell'IR ECRA<sub>100</sub> e della risposta normalizzata.*

L'IR ECRA<sub>100</sub> o intensità relativa di ECRA<sub>100</sub> è calcolata come il rapporto tra la densità ottica della banda relativa ad ECRA<sub>100</sub> e la densità ottica della banda della E-caderina. Quando la IR ECRA<sub>100</sub> è espressa come percentuale, il calcolo viene fatto rapportando il valore ottenuto di IR ECRA<sub>100</sub> al valore massimo ottenuto nell'esperimento.

La risposta normalizzata invece rappresenta il rapporto tra la IR ECRA<sub>100</sub> del campione trattato con la tossina e la IR ECRA<sub>100</sub> del campione di controllo.

### *3.2.7 Quantificazione dello stato di polimerizzazione della F-actina.*

Il metodo qui presentato deriva dal metodo di Cunningham [49] con alcune piccole modifiche. Le cellule sono state lavate due volte con PBS,

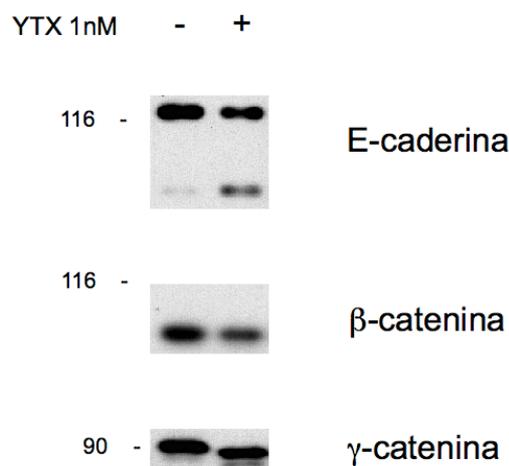
staccate meccanicamente dalle petri e recuperate mediante centrifugazione per 10 min a 800 x g. Il sedimento cellulare è risospeso in PBS contenente 0.5% Triton X-100 e 100 nM Oregon Green Phalloidine. Incubazione 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente e al buio. Le cellule sono in seguito centrifugate per 60 min a 20000 x g . Il pellet ottenuto da questa seconda centrifugazione viene risospeso in 300 µl di MeOH ed incubato per 40 ore a -20°C e al buio. Il contenuto in Oregon Green Phalloidine per ciascun campione è stato determinato mediante una separazione HPLC su colonna Prodigy (250 x 4,6 mm Phenomenex) usando 65% di metanolo e 20 mM di potassio acetato come eluente. 20 µl di ciascun campione sono iniettati in colonna, in coda alla quale è stato posto un rivelatore di fluorescenza sul quale era impostata come lunghezza d'onda di eccitazione 492 nm e come emissione 517 nm.

## 4. RISULTATI

### **4.1 Il trattamento a breve termine di cellule in coltura con yessotossina induce la frammentazione della E-caderina in assenza della redistribuzione di $\beta$ e $\gamma$ -catenine [50].**

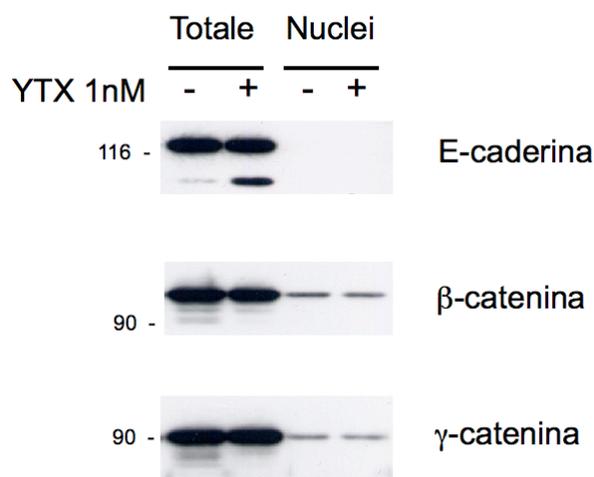
Come già detto le catenine  $\beta$  e  $\gamma$  sono coinvolte in una via di trasduzione del segnale il cui funzionamento è legato ai loro livelli citosolici (vedi par. 1.2.1.2). Il trattamento con la yessotossina determina l'accumulo di un frammento di E-caderina che, essendo privo della porzione citosolica non dovrebbe essere in grado di legare le catenine . Da dati pubblicati risulta chiaro come il trattamento a lungo termine con YTX determini un crollo dei livelli di E-caderina intera presenti nel sistema cui consegue una diminuzione dei livelli di catenine ad essa associate. Ci siamo chiesti se questo tipo di effetto avvenisse anche per tempi più brevi, pari a circa un giorno, in modo da simulare un normale episodio di esposizione alla tossina in seguito al consumo di molluschi contaminati. In un primo esperimento siamo andati a valutare mediante immunoprecipitazione il

quantitativo di catenine associate alla E-caderina.



**Figura 11.** Effetto del trattamento per un giorno con YTX sui livelli di catenine associate alla E-caderina. Cellule MCF-7 sono state trattate con 1 nM YTX o con veicolo per 24h. Al termine dell'incubazione le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili sui quali è stata eseguita la procedura di immunoprecipitazione utilizzando l'anticorpo anti E-caderina HECD-1, come descritto nella sezione materiali e metodi.

L'immunoprecipitazione mediante anticorpo anti E-caderina mostra come il trattamento con YTX alla concentrazione di 1 nM per 24 ore non induca alcuna variazione dei livelli di catenine ad essa associate. A parità di E-caderina integra immunoprecipitata, non si osserva alcuna diminuzione della quantità di  $\beta$  e  $\gamma$ -catenine co-immunoprecipitate. A questo punto siamo andati a valutare, se nonostante i livelli di catenine associate alla E-caderina fossero costanti, il trattamento con YTX determinasse ugualmente una modifica dei livelli nucleari delle due catenine.



**Figura 12.** Effetto del trattamento per un giorno con YTX sui livelli di catenine associate al nucleo. Cellule MCF-7 sono state trattate con 1 nM YTX o con veicolo per 24h. Al termine dell'incubazione le cellule sono state processate per ottenere estratti totali e nucleari mediante estrazione in ambiente ipertonico.

L'estrazione dei nuclei, recuperati a basso campo centrifugo mediante un mezzo fortemente ipertonico, consente di recuperare le proteine legate al nucleo mediante ponti salini, come lo sono, ad esempio, molti fattori di trascrizione. L'utilizzo di questa procedura su cellule trattate con YTX per 24h permette di ottenere estratti utilizzabili per valutare il contenuto di antigeni nucleari. Dai risultati si vede come negli estratti totali si possa osservare l'accumulo di ECRA<sub>100</sub> e l'assenza di variazioni nei livelli di catenine presenti. Negli estratti salini non è presente la E-caderina, che dai dati in letteratura non risulta associata al materiale nucleare, ma si riscontra la presenza di bassi livelli di  $\beta$  e  $\gamma$ -catenine. Come risulta da figura 12, i livelli delle due catenine non risultano significativamente

influenzati dal trattamento con YTX.

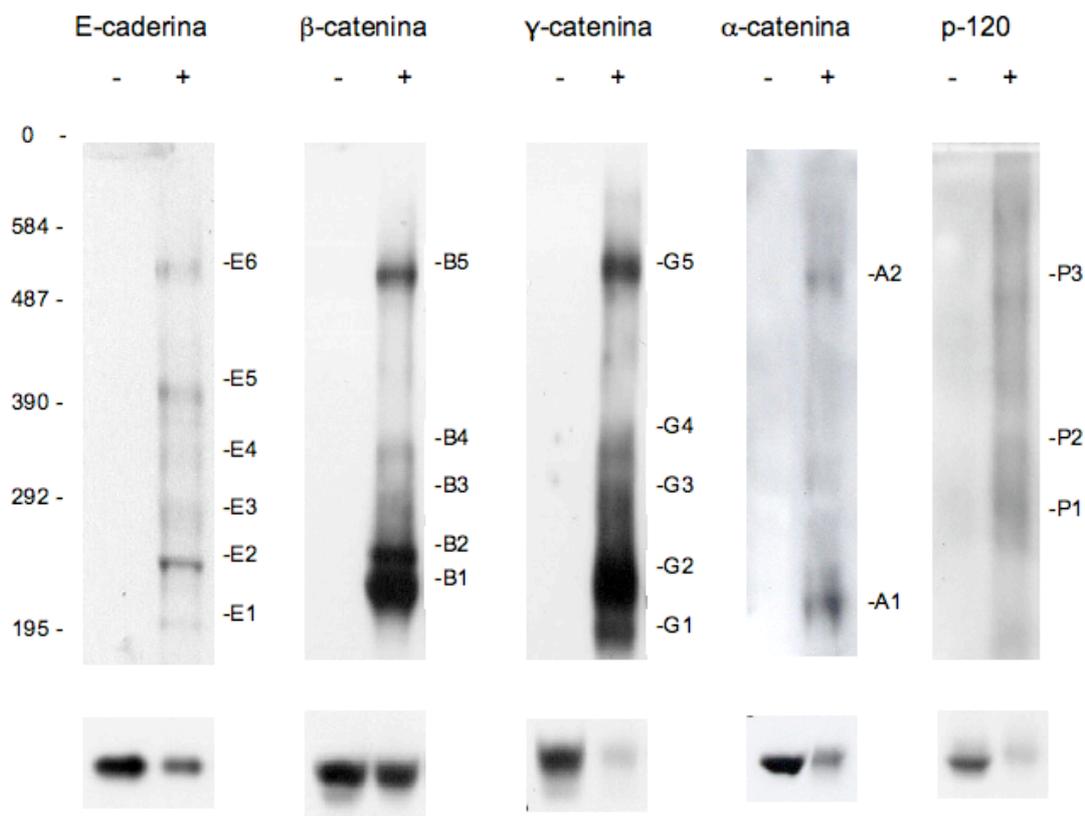
## **4.2 La yessotossina induce l'accumulo di dimeri di E-caderina alterati che non fanno parte delle strutture adesive [51].**

All'interno della cellula la E-caderina fa parte di complessi multiproteici che mediano l'adesione cellulare, già descritti nel paragrafo 1.2.1. Allo scopo di definire quali fossero le modifiche indotte dalla YTX sulla struttura quaternaria della E-caderina e delle proteine ad essa associate, siamo andati a valutare lo stato dei complessi proteici stabilizzati mediante cross-linking.

Esperimenti preliminari sono stati realizzati con lo scopo di determinare quali fossero i complessi stabilizzabili in cellule MCF-7 mediante cross-linking con glutaraldeide.

In figura 13 sono individuabili nella autoradiografia dei complessi separati mediante SDS-PAGE, tra questi: 6 complessi sono immunoreattivi verso un anticorpo anti-E-caderina, 5 complessi sono immunoreattivi verso un anticorpo anti- $\beta$ -catenina, 5 complessi sono immunoreattivi verso un anticorpo anti- $\gamma$ -catenina, 2 complessi sono immunoreattivi verso un anticorpo anti- $\alpha$ -catenina e 3 complessi sono

immunoreattivi verso un anticorpo anti-p120.



**Figura 13.** Oligomeri contenenti E-caderina e catenine stabilizzati mediante cross-linking con glutaraldeide in condizioni cell-free. Gli estratti citosolubili ottenuti da cellule MCF-7 sono stati sottoposti (+) o no (-) a cross-linking con glutaraldeide. Gli estratti sono separati mediante SDS-PAGE e identificati per immunoblot mediante l'anticorpo rivolto verso l'antigene indicato. La mobilità elettroforetica degli oligomeri di fosforilasi B stabilizzati mediante cross-linking è indicata sulla sinistra della autoradiografia anti-E-caderina. Le bande individuate dagli anticorpi sono marcate sulla destra di ciascuna autoradiografia. I risultati ottenuti per la proteina monomerica sono separati dal risultato degli oligomeri poiché lo sviluppo della intera membrana porterebbe ad una sovraesposizione nella porzione contenente il monomero.

Il peso molecolare dei complessi è stato determinato tramite la taratura del nostro sistema di separazione elettroforetica. I complessi sono stati poi divisi in 6 gruppi sulla base della fascia di peso molecolare come

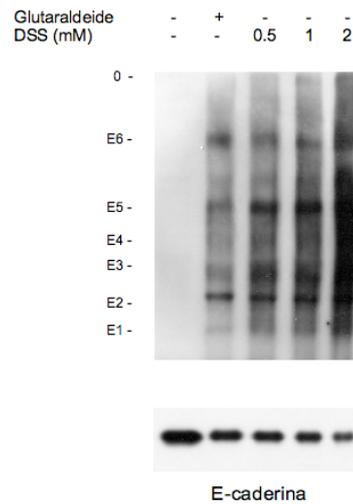
mostrato in tabella 7

PM apparente (kDa)	Componente immunoreattivo				
	E-caderina	$\beta$ -catenina	$\gamma$ -catenina	$\alpha$ -catenina	p120
520-540	E6	B5	G5	A2	P3
400	E5				
295-310	E4	B4	G4		P2
250-275	E3	B3	G3		P1
215-235	E2	B2	G2	A1	
195-225	E1	B1	G1		

**Tabella 7.** Pesì molecolari apparenti dei complessi E-caderina-catenine. Gli estratti citosolubili ottenuti da MCF-7 sono stati sottoposti a cross-linking e analizzati tramite SDS-PAGE ed immunoblotting utilizzando gli anticorpi verso gli antigeni indicati in tabella. Gli oligomeri identificati dagli anticorpi sono stati raggruppati in accordo al peso molecolare apparente.

Per comprendere se la stabilizzazione degli oligomeri isolati fosse un artefatto dovuto alle specifiche condizioni e al tipo di cross-linker utilizzato, abbiamo effettuato la stabilizzazione dei complessi con un altro reattivo, il disuccinimidylsuberate (DSS).

Il trattamento con DSS determina la stabilizzazione di oligomeri pressochè indistinguibili da quelli stabilizzati con la glutaraldeide. In particolare si osserva la stabilizzazione dei sei complessi (E1-E6) già individuati nel trattamento con glutaraldeide. Inoltre dosi crescenti di DSS determinano la stabilizzazione di livelli crescenti dei complessi, a conferma del fatto che la loro formazione è dovuta alla loro effettiva presenza nella cellula e non ad un qualche artefatto che si forma in seguito all'utilizzo di uno specifico cross-linker.

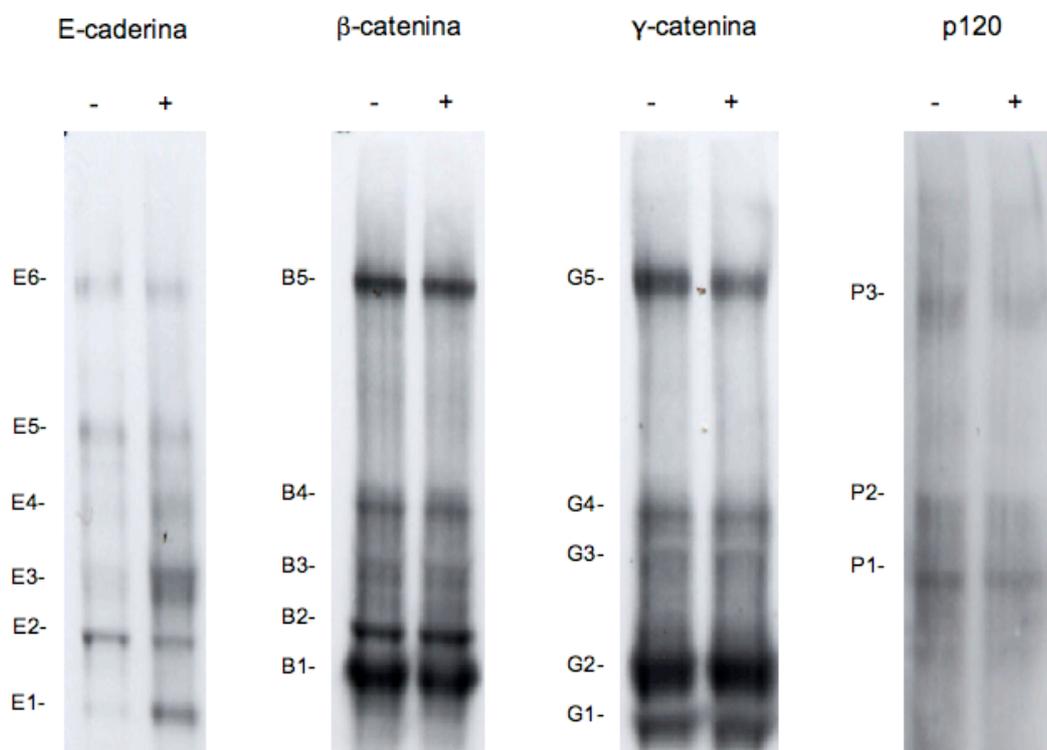


**Figura 14.** Stabilizzazione dei complessi tramite cross-linking con DSS. Gli estratti citosolubili ottenuti da MCF-7 sono stabilizzati per trattamento con le concentrazioni indicate di DSS oppure con glutaraldeide. Alla fine dell'incubazione i campioni sono sottoposti a SDS-PAGE e successivo immunoblot tramite un anticorpo anti E-caderina. I risultati ottenuti per la proteina monomerica sono separati dal risultato degli oligomeri per poich  una esposizione singola porterebbe a una elevata esposizione del monomero.

Poich  il quadro dei complessi presenti nelle MCF-7 sembrava abbastanza chiaro siamo andati a valutare quali fossero gli effetti del trattamento con la YTX sul livello di questi complessi.

Il trattamento con la yessotossina, come si vede in figura 15, non determina alcuna variazione significativa nel livello degli oligomeri contenenti le catenine  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ . Al contrario, per quanto riguarda la E-caderina, si osserva l'aumento della densit  ottica di due bande la cui mobilit  elettroforetica corrisponde agli oligomeri E1 ed E3. Questi dati presi insieme a quelli emersi dalla coimmunoprecipitazione dei complessi non stabilizzati (dati non mostrati), sembrano indicare come non vi siano

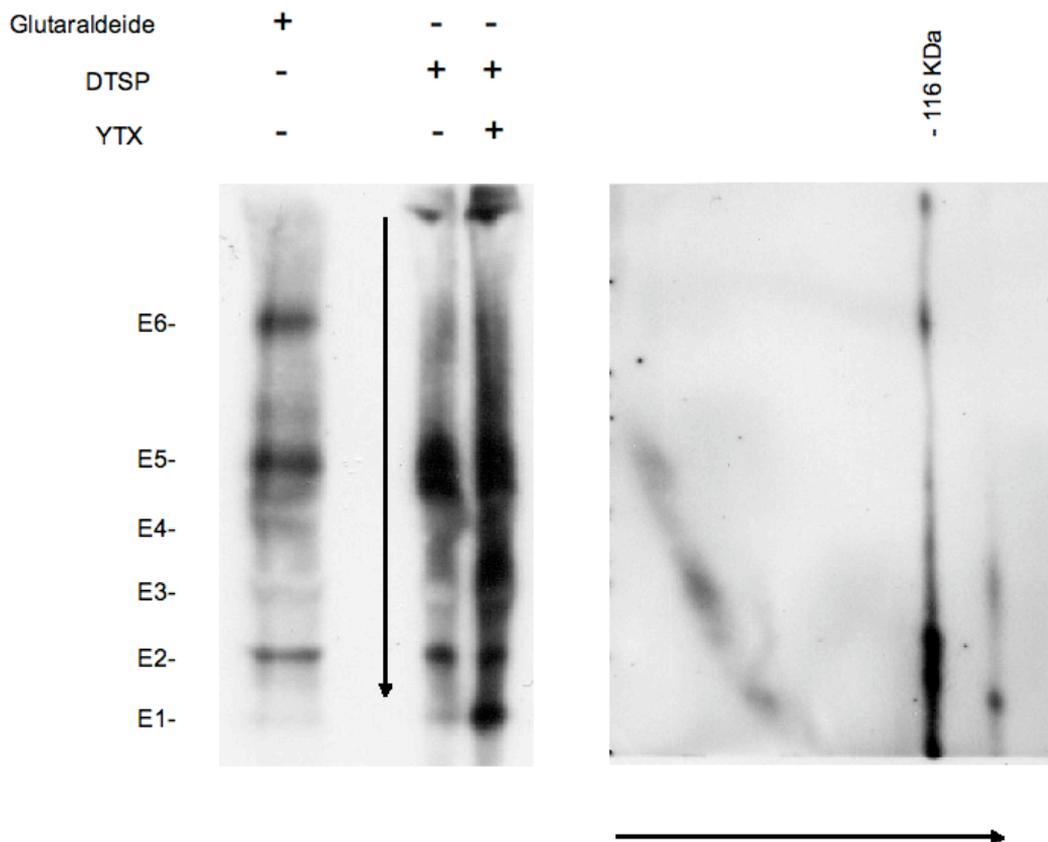
evidenti variazioni nei complessi E-caderina-catenine presenti nella cellula.



**Figura 15.** Effetto della YTX sulle strutture degli oligomeri contenenti la E-caderina e le catenine stabilizzati con cross-linking con glutaraldeide in condizioni cell-free. Cellule MCF-7 sono incubate con veicolo (-) oppure con YTX 1 nM (+) per 24 h a 37°C, prima di essere utilizzate per la preparazione di estratti citosolubili stabilizzati in seguito mediante cross-linking con glutaraldeide. Gli estratti sono poi separati in SDS-PAGE e sottoposti ad immunoblotting con l'anticorpo riportato sopra ciascuna radiografia. Le bande individuate per ciascun anticorpo sono marcate a lato.

I dati mostrati, unitamente al fatto che solo il livello dei complessi di basso peso molecolare veniva modificato dal trattamento con la YTX ci hanno portato a ipotizzare che i complessi E1 ed E3 potessero contenere ECRA<sub>100</sub>. Per dimostrare questa ipotesi abbiamo utilizzato la tecnica dell'elettroforesi diagonale e un cross-linker reversibile, il DTSP.

Gli estratti citosolubili ottenuti da cellule MCF-7 sono stati perciò sottoposti a cross-linking con glutaraldeide o con DTSP e poi analizzati in SDS PAGE in condizioni non riducenti oppure in elettroforesi diagonale.



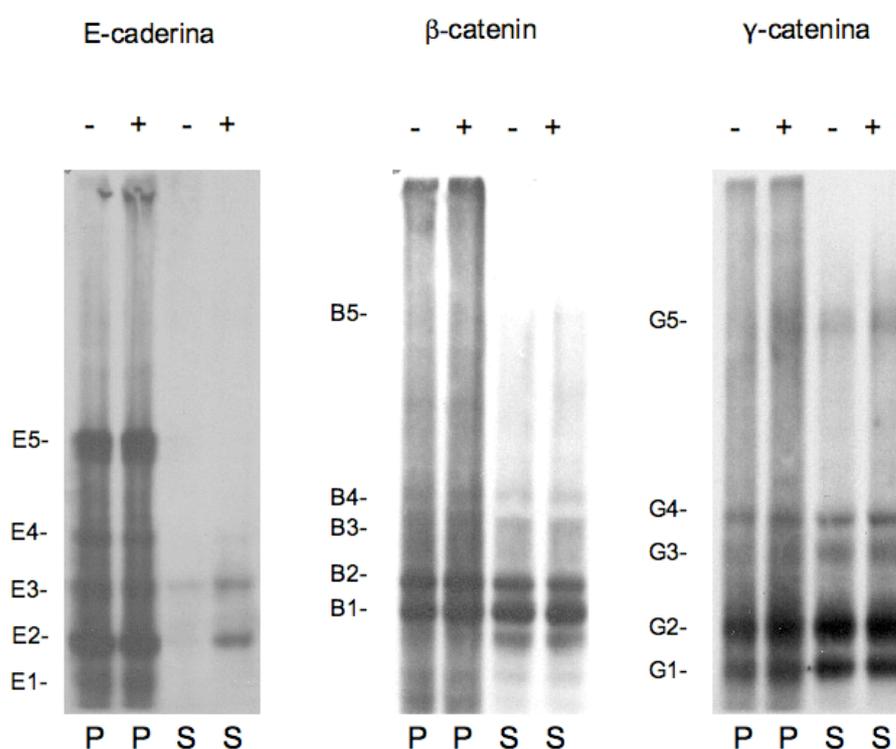
**Figura 16.** Analisi degli oligomeri contenenti E-caderina stabilizzati con cross-linking reversibile e analizzati in elettroforesi diagonale. Le condizioni sperimentali sono le medesime di quelle descritte nella legenda di figura 2 ma il cross-linking è effettuato con glutaraldeide o DTSP come indicato. Pannello di sinistra: le proteine estratte dalle cellule che hanno subito i trattamenti indicati sono frazionate in SDS-PAGE in condizioni non riducenti e sono sottoposte a immunoblot utilizzando l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1. Autoradiografia di destra: una porzione del gel contenente le proteine stabilizzate con DTSP e separate in SDS-PAGE in condizioni non denaturanti è stata tagliata, sottoposta a trattamento con agenti riducenti e caricata ortogonalmente su un secondo gel da SDS-PAGE. L'autoradiografia ottenuta mediante immunoblot con HECD-1 mostra la posizione dei monomeri costituenti gli oligomeri stabilizzati.

Il trattamento con DTSP porta alla stabilizzazione di oligomeri con mobilità elettroforetiche molto simili a quelli ottenuti per stabilizzazione con glutaraldeide. Tuttavia come già riportato in letteratura [52] l'elettroforesi in condizioni non riducenti porta a bande molto meno definite ciò comporta un quadro difficilmente interpretabile. Tuttavia quando si vanno ad analizzare i costituenti degli oligomeri mediante elettroforesi diagonale è facile individuare due bande all'altezza di circa 100 kDa riconosciute dall'anticorpo anti E-caderina e in corrispondenza delle bande E1 ed E3 degli oligomeri. Questo ci consente di concludere che queste due bande il cui livello è aumentato dal trattamento con YTX contengono ECRA<sub>100</sub>.

A questo punto volevamo valutare se la nostra metodica di indagine fornisse risultati che fossero riproducibili anche in cellule intere. Per questo motivo la procedura di stabilizzazione mediante crosslinking è stata ripetuta su cellule MCF-7 intere prima che da esse si procedesse all'estrazione delle proteine.

Anche nel caso in cui la stabilizzazione venga effettuata su cellule intere sono identificabili un buon numero di bande corrispondenti ad altrettanti oligomeri. In particolare si possono osservare 5 bande riconosciute dall'anticorpo anti-E-caderina, 5 bande riconosciute dall'anticorpo anti- $\beta$ -catenina e 5 bande riconosciute dall'anticorpo anti- $\gamma$ -catenina.

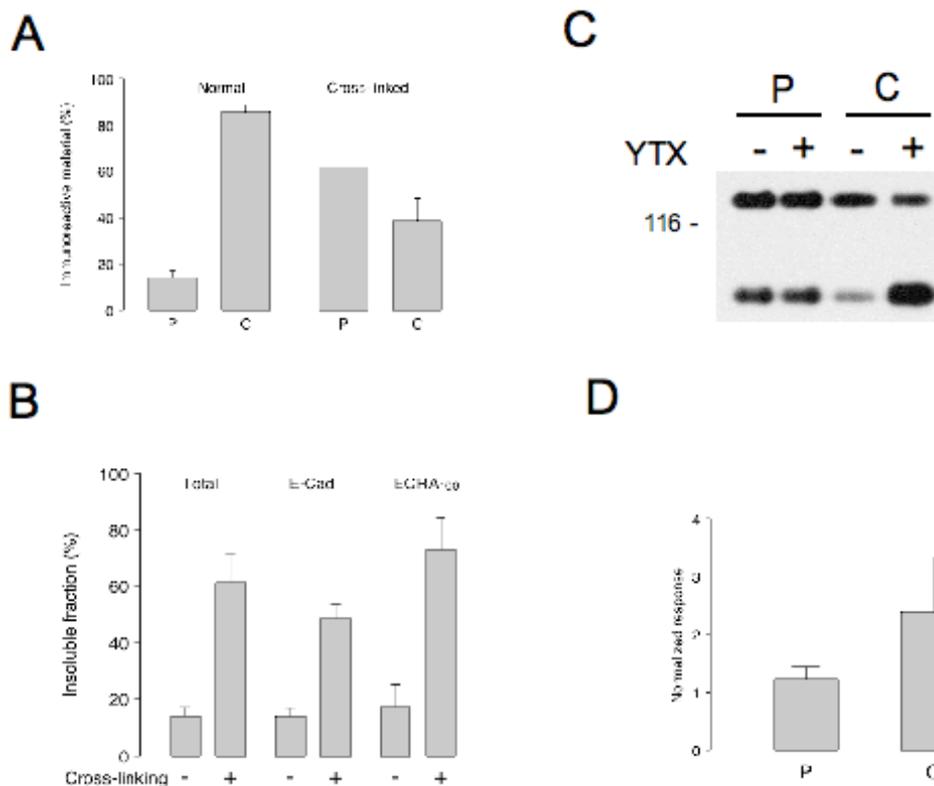
L'individuazione di bande riconosciute da anticorpi anti p120 ed  $\alpha$ -catenina non è stata possibile a causa della difficoltà nel trovare anticorpi idonei alla loro identificazione. Gli oligomeri contenenti le catenine sono presenti in quantità facilmente osservabili sia nella frazione solubile che in quella insolubile in Triton X-100. Al contrario gli oligomeri della E-caderina sono presenti in grande quantità nella frazione insolubile mentre sono difficilmente individuabili nella frazione solubile.



**Figura 17.** Effetto della yessotossina sugli oligomeri contenenti E-caderina e catenine stabilizzati mediante cross-linking su cellule intere. Cellule MCF-7 sono incubate con veicolo (-) oppure 1 nM YTX (+) per 24 h a 37° C, prima di essere sottoposte al cross-linking con glutaraldeide. Le cellule in seguito sono utilizzate per ottenere estratti citosolubili (S) ed estratti da materiale insolubile in Triton X-100 (P). Il materiale è stato poi sottoposto ad SDS-PAGE ed immunoblotting con gli anticorpi verso le proteine indicate. La posizione delle individuate è riportata sulla sinistra di ciascuna autoradiografia.

Il trattamento con YTX non induce alcuna modifica evidente nel livello degli oligomeri contenenti le catenine  $\beta$  e  $\gamma$ . per ciò che riguarda invece la E-caderina, in seguito al trattamento con la tossina si osserva un aumento della quantità degli oligomeri di basso peso molecolare nella frazione solubile in Triton X-100 in particolare per i due complessi E2 ed E3.

Visto questo particolare comportamento degli oligomeri della E-caderina, siamo andati a valutare la distribuzione della E-caderina e di ECRA<sub>100</sub> nelle due frazioni solubile ed insolubile in Triton X-100.



**Figura 18.** Effetto della yessotossina sulla distribuzione della E-caderina e di ECRA<sub>100</sub> nelle frazioni solubile e insolubile in Triton X-100. **Pannello A.** effetto del crosslinking sulla distribuzione della E-caderina in cellule MCF-7. Cellule in coltura sono sottoposte o meno al trattamento con

glutaraldeide e in seguito sono utilizzate per ottenere estratti citosolubili (C) ed estratti da materiale insolubile in Triton X-100 (P). Il materiale è in seguito sottoposto a SDS-PAGE e immunoblotting per la misurazione dei componenti immunoreattivi verso l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.D. di tre esperimenti separati. **Pannello B.** effetto del crosslinking sull'abbondanza relativa della E-caderina e di ECRA<sub>100</sub> nella frazione insolubile in Triton X-100 da cellule MCF-7. Le condizioni sperimentali sono le stesse del pannello A. Il materiale insolubile in Triton X-100 è sottoposto a SDS-PAGE e immunoblotting per la misurazione della immunoreattività totale dell'anticorpo HECD-1, della E-caderina e di ECRA<sub>100</sub>. **Pannello C.** Immunoblot di E-caderina ed ECRA<sub>100</sub> nelle frazioni solubile e insolubile in Triton X-100 da cellule MCF-7 trattate con YTX e sottoposte a crosslinking. Le cellule sono incubate con veicolo (-) o con 1 nM YTX (+) per 24 h a 37° C prima di essere sottoposte a crosslinking con glutaraldeide ed usate successivamente per ottenere estratti citosolubili (C) e materiale insolubile (S) in Triton X-100. Gli estratti sono poi sottoposti ad SDS-PAGE e immunoblotting con l'anticorpo anti-E-caderina per ottenere l'autoradiografia mostrata in figura. **Pannello D.** Effetto della YTX sulla ripartizione di E-caderina ed ECRA<sub>100</sub> nelle frazioni solubile ed insolubile in Triton X-100 da cellule MCF-7 dopo crosslinking. Le autoradiografie ottenute da almeno tre esperimenti identici a quanto descritto nel pannello C sono usati per quantificare l'abbondanza relativa di ECRA<sub>100</sub> negli estratti citosolubili (C) e insolubili in Triton X-100 (S) come il rapporto tra l'assorbanza di ECRA<sub>100</sub> e quella della E-caderina per ciascun campione presente nell'autoradiografia. la risposta normalizzata di ECRA<sub>100</sub> viene poi calcolata come il rapporto tra l'abbondanza relativa nei campioni preparati da cellule trattate con YTX e cellule di controllo. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.D. di tre esperimenti separati.

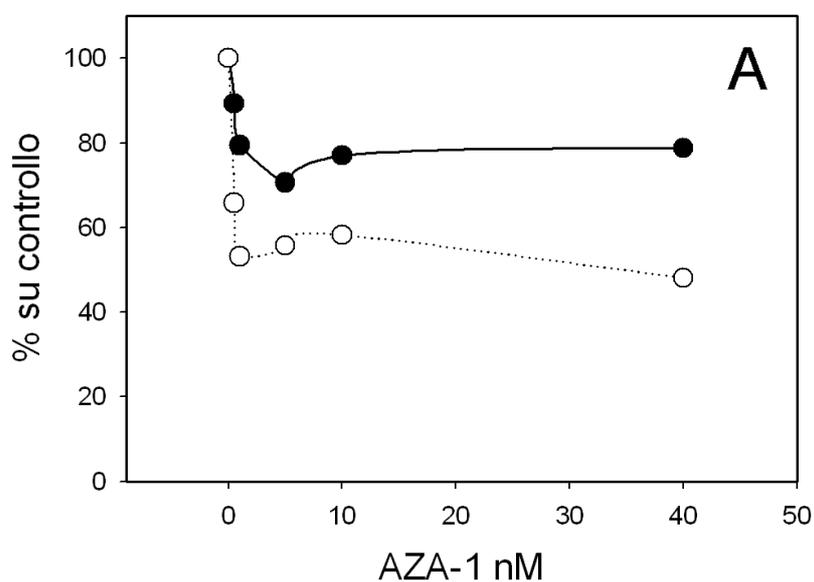
In figura 18 (pannello A) è mostrata la distribuzione del materiale reattivo all'anticorpo HECD-1 e si può osservare come in assenza del crosslinker circa il 90 % della E-caderina si ritrova nella frazione solubile in Triton X-100 mentre il 10% è nella frazione insolubile. In seguito alla stabilizzazione, come atteso, si osserva invece che almeno il 60% della E-caderina è presente nella frazione insolubile, mentre nella frazione

solubile si ha solo il 40%. In seguito siamo andati a valutare l'effetto del trattamento di crosslinking sulla immunoreattività totale all' HECD-1, sulla E-caderina e su ECRA<sub>100</sub>, presenti nella sola frazione insolubile in Triton X-100. In assenza di crosslinking si ha circa un 10-20% per tutti gli antigeni presi in considerazione. In seguito al trattamento con il crosslinker, si osserva un brusco aumento della quantità di antigene presente nella frazione insolubile. In particolare per la E-caderina si passa a circa il 50% della quantità totale mentre per ECRA<sub>100</sub> l'aumento risulta maggiore (più di tre volte) arrivando ad una percentuale del 70%. In seguito abbiamo analizzato l'effetto del trattamento con la YTX sulla ripartizione della E-caderina e delle sue altre forme immunoreattive verso l'HECD-1 nelle due frazioni solubile e insolubile in Triton X-100. Quanto mostrato in figura indica chiaramente come il trattamento con YTX non alteri significativamente il livello di ECRA<sub>100</sub> nella frazione insolubile ma al contrario vi sia un forte aumento della sua abbondanza relativa nella frazione solubile (figura 6. pannelli C e D). Tutti questi dati presi insieme consentono di stabilire che una porzione di ECRA<sub>100</sub> sia presente a livello di membrana plasmatica e coinvolta nell'adesione cellulare. Inoltre dai dati emerge come il trattamento con la YTX non influenzi il livello di E-caderina ed ECRA<sub>100</sub> presente in quel compartimento cellulare. L'accumulo del frammento in seguito al trattamento con la tossina determinerebbe perciò una redistribuzione delle strutture contenenti

ECRA<sub>100</sub>, con un conseguente aumento nella frazione citosolubile.

### 4.3 Gli azaspiracidi alterano la E-caderina in cellule epiteliali [53].

Dovendo valutare l'effetto di una tossina mai utilizzata nel nostro sistema cellulare siamo andati ad individuare l'intervallo di concentrazioni nel quale AZA-1 esplicasse un effetto tossico.

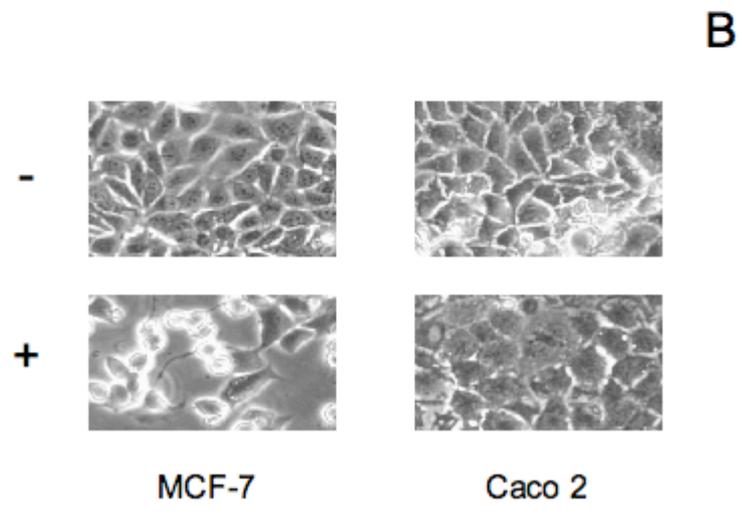
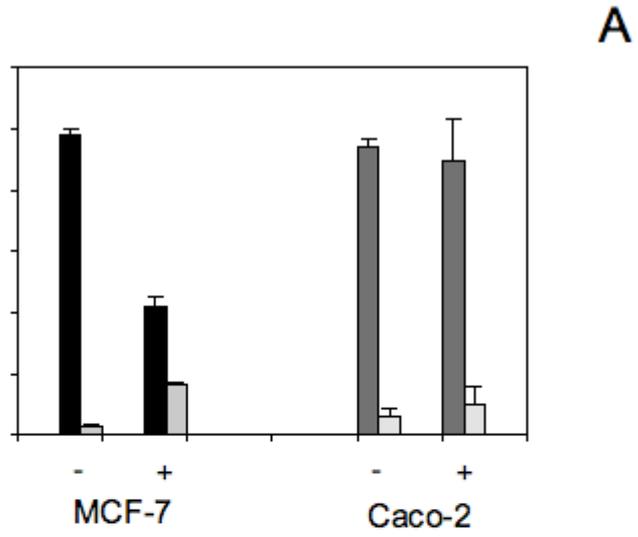


**Figura 19.** Dose-risposta AZA-1. Cellule MCF-7 sono state incubate per 2 giorni a 37°C con le concentrazioni indicate di AZA-1 prima di essere processate per la misurazione del DNA (●) e del numero di cellule (○).

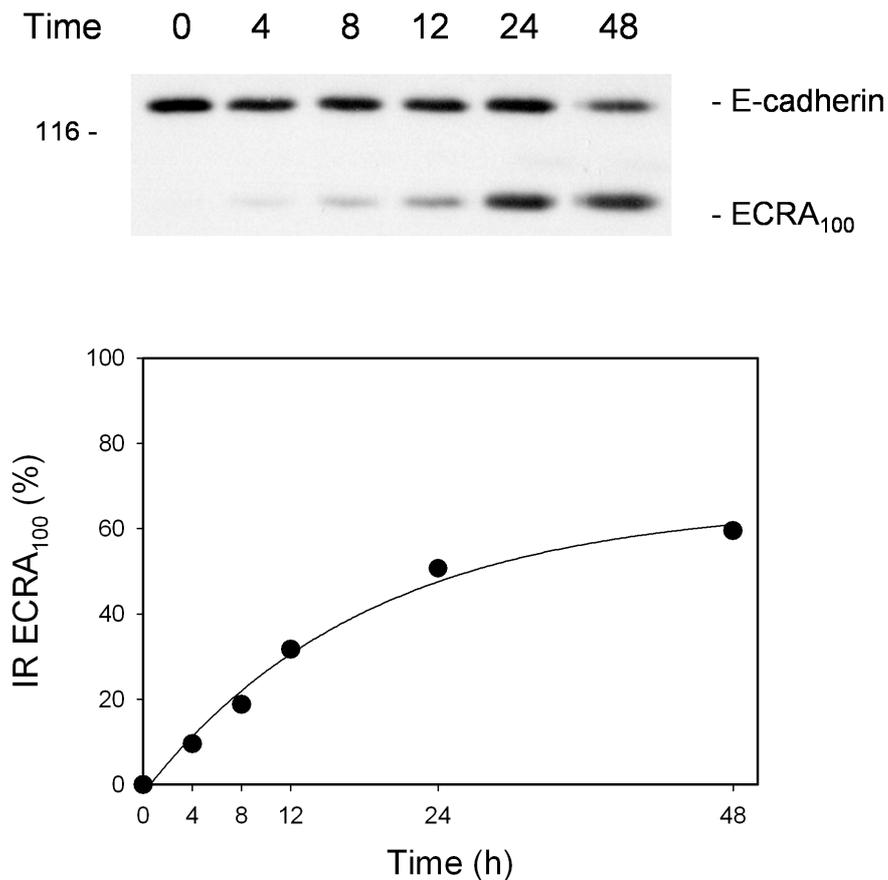
Come si vede dai dati di figura 1, già alla concentrazione di 1 nM AZA-1 determina una diminuzione del quantitativo di DNA per petri pari a circa il 30%, con la contemporanea diminuzione del numero di cellule per petri del 50%. Trattando le cellule con concentrazioni fino a 40 volte più alte non si osservano effetti maggiori, quindi abbiamo deciso di utilizzare come concentrazione d'uso l'1 nM.

A questo punto siamo andati a valutare l'effetto di AZA-1 in due diversi sistemi cellulari, le MCF-7 e le Caco-2. Come mostrato in figura 20A, il trattamento con AZA-1 alla concentrazione di 1 nM, induce una significativa diminuzione della quantità di DNA per petri in cellule MCF-7 ma non in Caco-2. Anche dal punto di vista morfologico, le MCF-7 mostrano evidenti alterazioni, al contrario delle Caco-2 che non sembrano subire effetti così evidenti a quella concentrazione di tossina.

Dal momento che il trattamento con AZA-1 induce il distacco delle cellule dalla piastra nonché una significativa alterazione morfologica, siamo andati a valutare quali fossero gli effetti della tossina sulla E-caderina, una molecola di adesione espressa in entrambi i tipi cellulari e che ha mostrato essere coinvolta nei meccanismi di risposta ad altre tossine algali [54,55].



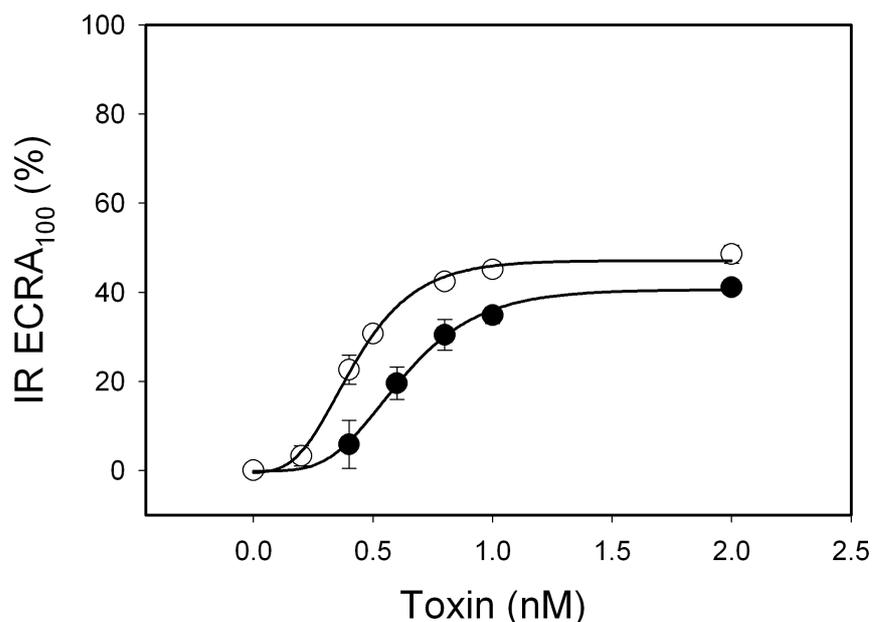
**Figura 20.** Effetto dell'AZA-1 sulla proliferazione di cellule MCF-7 e Caco-2. **Pannello A.** Cellule MCF-7 e Caco-2 sono state trattate con 1 nM AZA-1 (+) oppure con il veicolo (-) per 2 giorni a 37°C. Al termine è stato misurato il DNA sia nelle cellule adese (barre scure) che in quelle in sospensione (barre chiare), come descritto in materiali e metodi. I valori riportati espressi come percentuale del controllo, derivano da due distinti esperimenti. **Pannello B.** microfotografie delle cellule indicate dopo incubazione con 1 nM AZA-1 (+) o veicolo (-) per 2 giorni a 37°C.



**Figura 21.** Tempo-risposta della frammentazione della E-caderina indotta da AZA-1. Cellule MCF-7 sono state incubate per il tempo indicato (h) con 1 nM AZA-1. Al termine le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting con l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1. **Pannello A.** elettroferogramma ottenuto tramite rivelazione con ECL ed autoradiografia, la mobilità elettroforetica della  $\beta$ -galattosidasi (116 Kda) usata come marker è indicata sulla sinistra. **Pannello B.** Quantificazione densitometrica dei risultati, l' IR ECRA<sub>100</sub> quantificata come descritto in materiali e metodi è espressa come media e SD ottenute in due esperimenti separati.

Dai risultati mostrati si vede come il trattamento con AZA-1 induce l'accumulo di un frammento di E-caderina denominato ECRA<sub>100</sub> il cui livello è direttamente proporzionale al tempo di esposizione alla tossina e che raggiunge il massimo dell'effetto nell'arco delle 24 ore circa.

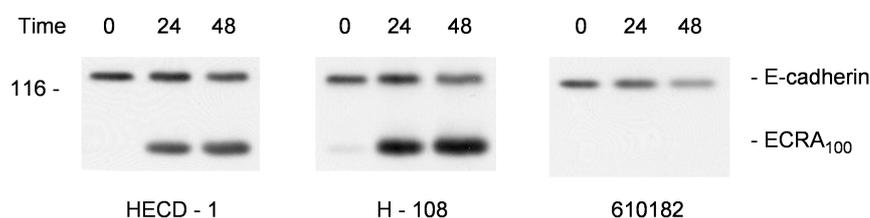
Questo fenomeno come già detto (vedi par. 1.3) è stato già descritto in letteratura per un'altra tossina, la YTX. Per questo motivo siamo andati a confrontare direttamente gli effetti delle due tossine in un esperimento di dose-risposta.



**Figura 22.** Effetto del trattamento con AZA-1 e YTX. Cellule MCF-7 in crescita logaritmica sono state trattate con le concentrazioni indicate di YTX (●) e di AZA-1 (○) per 24 h a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili, separati in SDS-PAGE e sottoposti a immunoblot con l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1. L' IR ECRA<sub>100</sub> quantificata come descritto in materiali e metodi è espressa come media e SD ottenute in due esperimenti separati.

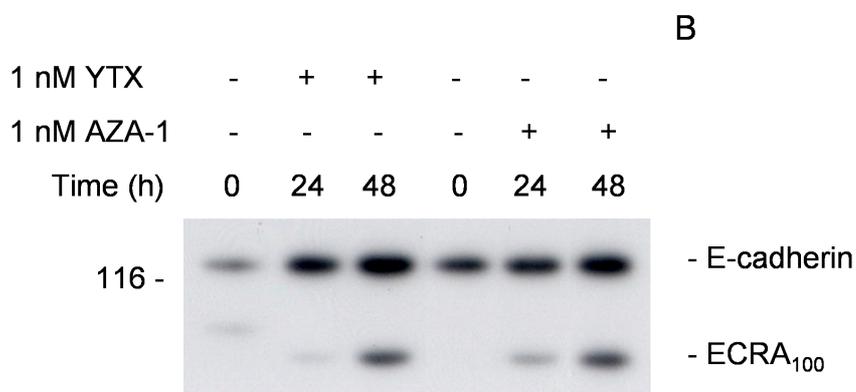
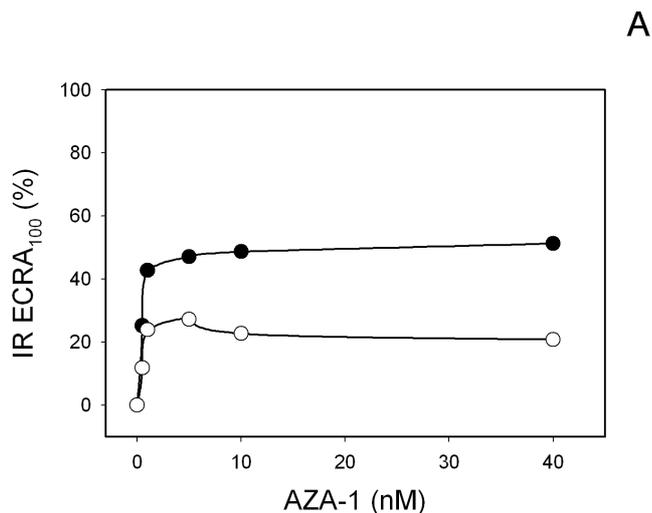
Come si vede in figura, le curve dose-risposta delle due tossine sono praticamente sovrapponibili ed entrambe le tossine raggiungono il massimo dell'effetto alla concentrazione di 1 nM. Anche nel caso degli azaspiracidi, il frammento di E-caderina, sottoposto ad analisi

immunologica, risultava privo della porzione citosolica, come mostrato in figura 23.



**Figura 23.** Caratterizzazione immunologica di ECRA<sub>100</sub>. Cellule MCF-7 sono state incubate con AZA-1 1nM per i tempi indicati (h) a 37°C. Alla fine dell'incubazione le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili separati in SDS-PAGE e sottoposti a immunoblot con gli anticorpi anti-E-caderina indicati in basso.

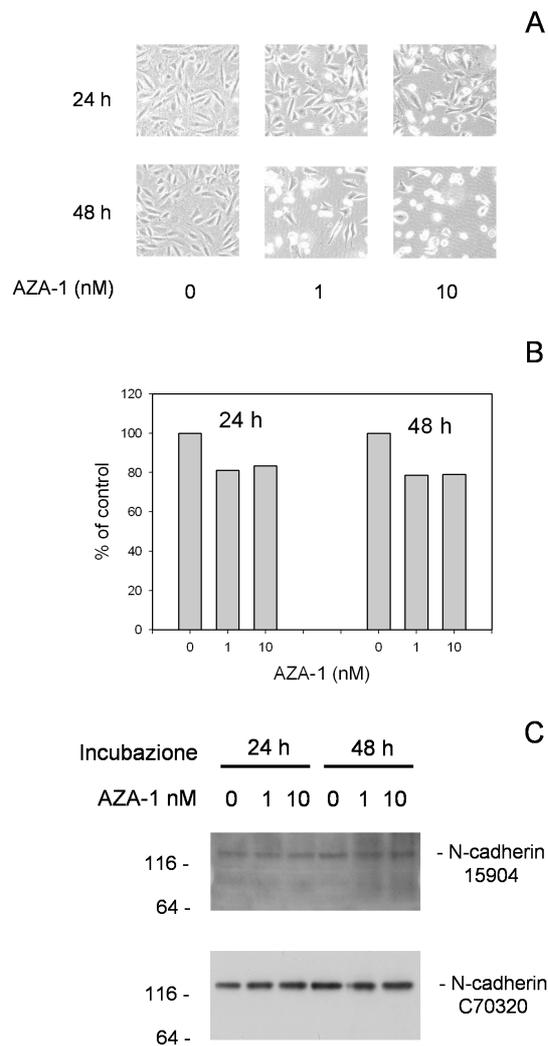
I due anticorpi rivolti verso la porzione extracitosolica della E-caderina, l'HECD-1 e l'H-108, riconoscono ECRA<sub>100</sub>, al contrario invece il 610182 che lega un epitopo intracitosolico non è in grado di evidenziare la presenza del frammento. Questi dati ci inducono ad affermare che ECRA<sub>100</sub> sia una molecola di E-caderina priva della porzione citosolica. Questo risultato era emerso anche per ciò che riguardava la risposta alla YTX (vedi par. 1.3), per questo motivo siamo andati a valutare in parallelo la risposta alle due tossine in due distinti sistemi cellulari, le MCF-7 e le Caco-2.



**Figura 24.** Analisi comparativa delle due tossine nell'indurre ECRA<sub>100</sub> in cellule epiteliali. **Pannello A.** Cellule MCF-7(●) o Caco-2 (○) sono state incubate con le concentrazioni indicate di AZA-1 per 24 h a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili separati in SDS-PAGE e sottoposti a immunoblot con l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1. L'IR ECRA<sub>100</sub> è stata quantificata come descritto in materiali e metodi. **Pannello B.** Cellule Caco-2 sono state incubate con le concentrazioni di YTX o AZA-1 e con i tempi indicati a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili separati in SDS-PAGE e sottoposti a immunoblot con l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1.

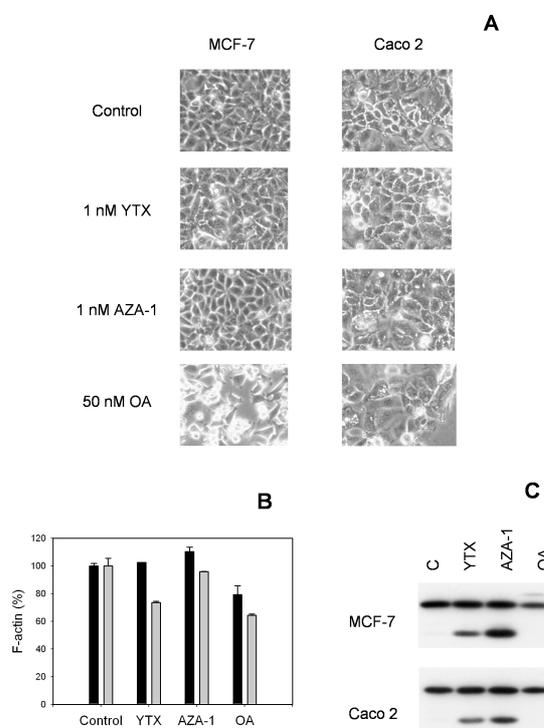
Come si vede dalla figura 24, l'effetto degli azaspiracidi è osservabile anche in cellule Caco-2, nelle quali però si riscontra un effetto inferiore rispetto alle MCF-7. Confrontando l'effetto prodotto dagli azaspiracidi con

quello della YTX su cellule di tipo Caco-2, si osserva come la mobilità elettroforetica della proteina accumulata sia la medesima. Inoltre anche le modalità di accumulo sono le medesime, con il livello di ECRA<sub>100</sub> accumulata che raggiunge il livello massimo nell'arco delle 48 ore. Allo scopo di stabilire la specificità della risposta agli azaspiracidi verso la E-caderina, abbiamo scelto di analizzare gli effetti da esso indotti su un tipo cellulare che esprimesse la N-caderina, una caderina della stessa famiglia ma, con caratteristiche leggermente differenti dalla E-caderina. Come mostrato in figura 25A, anche i fibroblasti risultano sensibili a concentrazioni nanomolari dell'AZA-1. Infatti il trattamento con la tossina determina l'assunzione di una morfologia di tipo "stressato", con distacco dal substrato e crescita. Il trattamento con AZA-1 determina solo lievi modifiche del contenuto in DNA anche dopo un trattamento con AZA-1 alla concentrazione di 10 nM protratto per 48 h (fig 25B). Infine come mostrato negli elettroferogrammi, il trattamento con AZA-1 non determina l'accumulo di alcun frammento di N-caderina, la caderina che in questo tipo cellulare risulta essere quella maggiormente espressa. Considerando i dati finora mostrati, l'accumulo del frammento di caderina sembra essere un fenomeno piuttosto specifico, poiché circostanziato alle sole cellule di origine epiteliale.



**Figura 25.** Effetti dell'AZA-1 su fibroblasti normali di topo (FT I). Gli FT I sono stati incubati con le concentrazioni indicate di AZA-1 per 24 e 48 h a 37°C. **Pannello A.** Microfotografie di cellule di controllo e trattate. **Pannello B.** Cellule di controllo e cellule trattate con 1 e 10 nM AZA-1 per i tempi indicati sono state trattate per la misurazione del contenuto di DNA combinando le cellule adese e quelle in sospensione. I valori sono espressi come percentuale del controllo. **Pannello C.** Cellule di controllo e trattate con AZA-1 alle concentrazioni indicate sono state incubate per i tempi indicati a 37°C. Al termine le cellule sono state processate per ottenere estratti citosolubili separati in SDS-PAGE e sottoposti a immunoblot con l'anticorpo anti-E-caderina HECD-1.

Diversi gruppi hanno riportato come il trattamento di cellule in coltura con AZA-1 determinasse la depolimerizzazione del citoscheletro di actina con conseguente perdita della morfologia cellulare. Per comprendere se l'accumulo di ECRA<sub>100</sub> fosse legato a questo tipo di fenomeno, siamo andati a valutare nelle due linee cellulari, in parallelo l'effetto di tre tossine algali sia sull'accumulo di ECRA<sub>100</sub> che sulla depolimerizzazione dell'actina.



**Figura 26.** Effetto di YTX AZA-1 e OA su cellule MCF-7 e Caco-2. Le cellule sono state trattate con 1 nM YTX, 1 nM AZA-1, 50 nM OA, oppure veicolo (controllo), per 24 h a 37°C prima di essere utilizzate come descritto più avanti. **Pannello A.** Microfotografie delle cellule dopo il trattamento indicato. **Pannello B.** Livelli cellulari di F-actina in Caco-2 (barre nere) ed MCF-7 (barre chiare). I valori sono espressi in percentuale rispetto a quelli del controllo. **Pannello C.** Autoradiografia con anticorpo anti-E-caderina di estratti citosolubili ottenuti da cellule MCF-7 e Caco-2 trattate con le tossine indicate.

Il trattamento per 24 ore con AZA-1 e YTX non determina evidenti alterazioni morfologiche, al contrario il trattamento con 50 nM di acido okadaico determina una estesa morte cellulare soprattutto in MCF-7, con perdita della morfologia e distacco dal substrato. La misurazione del contenuto cellulare di F-actina indica come il trattamento con YTX determini una variazione del contenuto di actina filamentosa solo nelle MCF-7, mentre il trattamento con AZA-1 non induce alcuna modifica. L'acido okadaico al contrario determina una diminuzione della actina polimerizzata pari a circa il 30-40 % in entrambi i tipi cellulari. L'accumulo di ECRA<sub>100</sub> come da figura, lo si osserva in entrambi i tipi cellulari solo in seguito al trattamento con YTX e AZA-1. Il trattamento con acido okadaico invece determina l'accumulo di un frammento di peso molecolare superiore (circa 130 kDa) che si ritiene possa essere il precursore della E-caderina.

## 5. DISCUSSIONE

Dai risultati emerge chiaramente come le linee di ricerca affrontate durante il mio periodo di dottorato si siano orientate su due ambiti fondamentali. Da un lato lo studio delle risposte cellulari indotte dall'accumulo di ECRA<sub>100</sub> nella cellula e, dall'altro, lo studio preliminare dell'effetto dell'AZA-1 sullo stesso fenomeno.

Dal punto di vista degli effetti dell'accumulo di ECRA<sub>100</sub> nelle cellule in coltura, siamo andati a valutare innanzitutto come esso influenzasse la distribuzione delle catenine.

I risultati ottenuti mostrano che il trattamento a breve termine con YTX di cellule in coltura induce la frammentazione della E-caderina senza che avvenga una redistribuzione delle catenine  $\beta$  e  $\gamma$  nei compartimenti subcellulari, con particolare riferimento al compartimento nucleare (fig. 12). Le nostre osservazioni inoltre indicano che il sistema E-caderina-catenine ha una notevole stabilità. Infatti il trattamento con YTX, pur inducendo l'accumulo di una notevole quantità di E-caderina troncata, non determina una diminuzione sensibile della quantità di catenine ad essa legate. Le basi molecolari di questa resistenza sono al momento ignote. Anche se il mantenimento del pool cellulare di questi componenti mediante la loro continua sintesi può rappresentare il sistema di base per mantenere i livelli ottimali di E-caderina e catenine all'equilibrio, la

nostra ipotesi di lavoro è che in cellule epiteliali vi siano diversi meccanismi omeostatici in grado di controllare i livelli nei compartimenti cellulari di tali componenti in maniera coordinata.

Essendo ECRA<sub>100</sub> una proteina incapace di legare le catenine, ci siamo chiesti se essa potesse entrare a far parte dei complessi multimerici che mediano l'adesione cellula-cellula.

La stabilizzazione delle interazioni proteina-proteina tramite cross-linking ha permesso l'individuazione di oligomeri contenenti E-caderina e catenine in estratti ottenuti in condizioni cell-free ed in cellule intatte. Inoltre ha permesso l'identificazione di strutture molecolari alterate, che si accumulano nelle cellule in seguito all'esposizione alla YTX.

I complessi E-caderina-catenine, stabilizzati mediante il trattamento con glutaraldeide negli estratti preparati da cellule MCF-7, comprendono diversi oligomeri (Fig. 13), la cui mobilità elettroforetica è compatibile con la distribuzione dei complessi in 6 gruppi e quattro classi principali: complessi dimerici, trimerici, tetramerici ed esamerici di composizione variegata. Basandosi sui risultati ottenuti mediante immunoprecipitazione, tra questi oligomeri possiamo trovare omodimeri di E-caderina, eterodimeri contenenti sia E-caderina associata alla  $\beta$ -catenina (o  $\gamma$ -catenina) che  $\beta$ -catenina (o  $\gamma$ -catenina) associata alla  $\alpha$ -catenina, tetramerici contenenti E-caderina e  $\beta$ -catenina o  $\gamma$ -catenina e

infine esameri contenenti un dimero di E-caderina e  $\beta$ -catenina o  $\gamma$ -catenina, p120 e/o  $\alpha$ -catenina. I nostri risultati perciò confermano ed espandono risultati ottenuti molto tempo fa [55-63].

Il trattamento di cellule MCF-7 con YTX modifica i complessi a basso peso molecolare contenenti E-caderina e i nostri esperimenti non mostrano alterazioni significative in strutture più grandi dei trimeri (figure 15 e 17). In particolare la YTX ha mostrato aumentare il livello cellulare degli oligomeri contenenti ECRA<sub>100</sub> e ciò implica che la frammentazione della E-caderina indotta dalla YTX non risulta nella immediata distruzione degli oligomeri contenenti E caderina nelle cellule epiteliali. In effetti gli eterodimeri E-caderina-ECRA<sub>100</sub> (E2) possono essere stabilizzati tramite crosslinking in condizioni cell-free ed in cellule intatte e i trimeri contenenti E-caderina, ECRA<sub>100</sub> e una terza proteina (E3 nel quale possono essere presenti sia  $\beta$ -catenina che  $\gamma$ -catenina o p120) vengono stabilizzati anche in seguito a crosslinking svolto su cellule intere (fig 5). Il fatto che la stabilizzazione dell'omodimero di ECRA<sub>100</sub> (E1) sia favorita in condizioni cell-free, mentre bassi livelli di questi complessi vengono ritrovati dopo il crosslinking di cellule intere, indica che la loro formazione può avvenire solo dopo la lisi cellulare e che bassi livelli di queste strutture esistono in vivo anche dopo che le cellule siano state esposte alla YTX (fig 17).

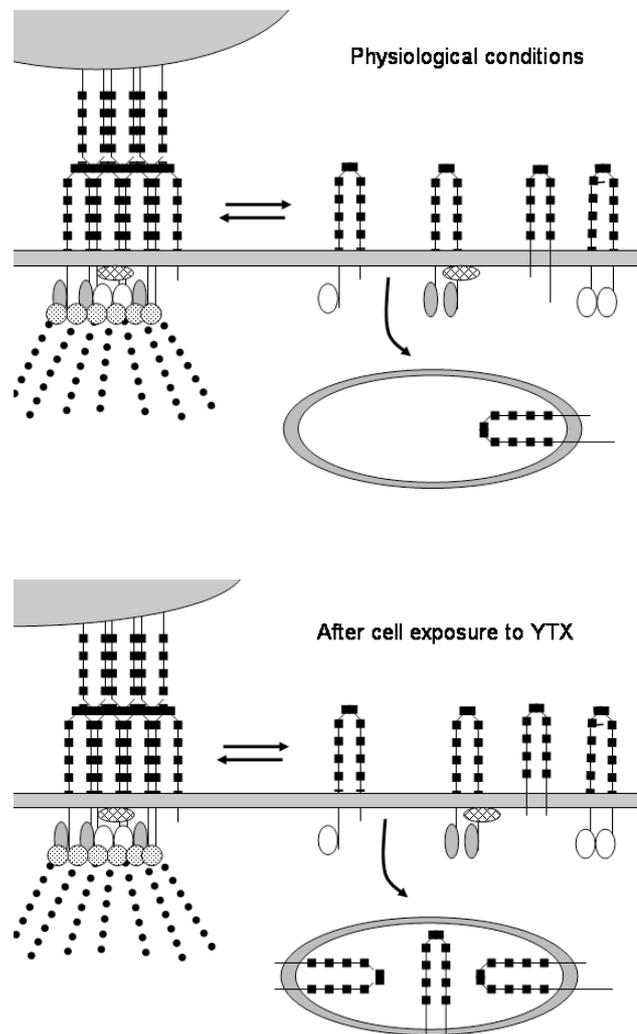
I dimeri di E-caderina sono considerati la struttura fondamentale dei

complessi E-caderina-catenine [55,58,63] e la loro individuazione dopo cross-linking di cellule intatte è stata già riportata in letteratura[63]. Due differenti dimeri di E-caderina sono stati trovati in cellule intatte, una forma cis che consiste di due molecole di E-caderina appaiate e inserite nella membrana plasmatica della stessa cellula, mentre la forma trans dei dimeri è formata da due molecole di E-caderina che interagiscono attraverso il loro dominio ammino-terminale e che sporgono dalla superficie di due cellule adiacenti ma distinte [55,58,63]. Mentre i dimeri trans sono ritenuti responsabili della formazione delle strutture di adesione cellulare, i dimeri cis sono considerati come strutture transienti [55,58,63].

La metodologia che abbiamo impiegato in questo studio non è in grado di fornire informazioni dirette sulla natura dei dimeri che abbiamo stabilizzato.

L'ipotesi attuale prevede che i complessi E-caderina-catenine coinvolti nelle strutture di adesione che si instaurano tra cellule contigue, comprendano i dimeri trans i quali non possono essere solubilizzati da detergenti non ionici come ad esempio il Triton X-100. Al contrario il recupero della E-caderina in forma solubile dopo il trattamento con triton X-100 comprende i dimeri cis non coinvolti nella adesione cellula-cellula [55,58,63,64]. Basandosi su questa ipotesi, i nostri risultati sembrano indicare che gli eterodimeri E-caderina-ECRA<sub>100</sub> stabilizzati in cellule

intatte, sono in forma cis. In effetti la frazione Triton X-100 insolubile che abbiamo ottenuta da cellule intatte, è particolarmente ricca di oligomeri ad elevato peso molecolare (fig. 17) ed il suo contenuto in E-caderina ed ECRA<sub>100</sub> monomerici non è sensibilmente modificato dal trattamento con YTX. Inoltre le forme più abbondanti degli oligomeri solubili in Triton X-100 includono gli eterodimeri E-caderina ECRA<sub>100</sub> (fig 17) il cui contenuto in ECRA<sub>100</sub> è aumentato in seguito al trattamento con la YTX (fig. 18). I risultati ottenuti in questo studio quindi confermano che una frazione di ECRA<sub>100</sub> cellulare è resistente alla solubilizzazione con Triton X-100 in cellule MCF-7 di controllo e che fa parte di complessi multimerici che mediano l'adesione cellulare. Inoltre l'esposizione delle cellule alla YTX porta all'aumento dei livelli dei complessi E-caderina ECRA<sub>100</sub> che sono individuabili nella frazione triton X-100 solubile di cellule stabilizzate. Quanto detto è alla base del modello riportato in fig 27 che riassume le teorie correnti riguardanti la solubilità nei detergenti delle strutture cis e trans dei dimeri di E-caderina e in esso introduce le alterazioni da noi osservate in seguito al trattamento delle cellule con YTX.



**Figura 27.** Modello dell'alterazione delle strutture contenenti E-caderina indotta dall'esposizione di cellule in coltura alla YTX. Le strutture adesive sono rappresentate schematicamente, comprendendo dimeri di E-caderina di tipo trans aggregati nelle giunzioni aderenti formate da cellule adiacenti. Il dominio intracellulare della E-caderina è associato con le catenine ed il sistema E-caderina-catenine è associata al citoscheletro di actina. Il sistema viene mostrato in equilibrio con i cis dimeri di E-caderina che possono essere endocitati. Per ulteriori dettagli fare riferimento al testo.

In condizioni fisiologiche la pololazione di E-caderina è presente sia negli oligomeri responsabili dell'adesione cellulare di tipo "strong", ossia i dimeri trans coinvolti direttamente nel legame tra le due cellule, che nei dimeri cis che partecipano alle dinamiche cellulari della E-caderina.

Il trattamento con YTX porta all'accumulo di ECRA<sub>100</sub> senza un effettiva diminuzione dei livelli di E-caderina intatta [44] nonché all'aumento del contenuto cellulare dei dimeri cis che non partecipano alle strutture adesive e che contengono ECRA<sub>100</sub>.

E' noto che il pool cellulare di E-caderina include una frazione localizzata nelle vescicole endocitiche coinvolta nei fenomeni di riciclo o distruzione della proteina stessa [65].

Gli esperimenti svolti nel presente studio mostrano come gli eterodimeri E-caderina-ECRA<sub>100</sub> che si accumulano nelle cellule MCF-7 dopo l'esposizione alla YTX appartengono alla frazione solubile in Triton X-100. Tuttavia non è possibile indicare se essi siano localizzati a livello di membrana plasmatica oppure nelle vescicole endocitiche.

I risultati ottenuti in un'altro lavoro [45], comunque, mostrano che la maggior parte di ECRA<sub>100</sub> non è esposta sulla superficie cellulare. Pertanto gli eterodimeri E-caderina-ECRA<sub>100</sub> possono essere presenti sia a livello della membrana plasmatica che nelle vescicole endocitiche (fig. 7). Presi insieme i nostri risultati mostrano come il trattamento con YTX determini una modifica del pool di E-caderina non coinvolto nelle

strutture cellulari deputate all'adesione.

Questa conclusione risulta essere piuttosto rilevante per la comprensione dei meccanismi della risposta molecolare alla YTX poiché essa spiega perchè l'accumulo di ECRA<sub>100</sub> nel primo giorno di trattamento, nel quale i livelli di E-caderina non sono modificati, non determini alterazioni evidenti nei processi adesivi in cellule MCF-7. Rimane comunque da stabilire quale sia il ruolo di questa alterazione nella risposta alla YTX che porta alla vasta alterazione del funzionamento cellulare in seguito al trattamento per alcuni giorni [44].

Basandosi sui risultati di questo lavoro e su quelli di un altro lavoro recentemente pubblicato [45], la nostra ipotesi di lavoro è che l'accumulo di ECRA<sub>100</sub> e di oligomeri di E-caderina alterati, potrebbe non essere la causa principale dei danni cellulari riscontrati, ma che potrebbe essere solo uno degli eventi conseguenti l'alterazione dei fenomeni endocitici delle proteine di membrana [45]. L'alterazione di tali fenomeni, determinando severe modifiche nei meccanismi di omeostasi cellulare, porterebbe in seguito anche alla distruzione della adesione ed alla morte cellulare [44].

Sorprendentemente, anche il trattamento di cellule epiteliali con AZA-1 determina l'accumulo di un frammento di E-caderina di 100 kDa comprendente la porzione extracellulare della molecola, priva di parte

del dominio citosolico.

Abbiamo già accennato a come queste due porzioni della molecola di E-caderina giochino ruoli distinti nel mantenimento della adesione cellulare.

Il dominio extracellulare in particolare è deputato alla formazione di strutture a cerniera che determinano l'adesione di tipo "strong" che si ritrova normalmente nei tessuti epiteliali.

Le strutture adesive della E-caderina, hanno un ruolo tanto nello sviluppo embrionale che nel mantenimento della architettura cellulare [66,67], e l'alterazione delle strutture della E-caderina e/o dei suoi livelli cellulari è stata legata alla metastatizzazione in molti tumori umani a tal punto che la E-caderina viene descritta come un oncosoppressore [68,69]. Per questo motivo è importante approfondire le modalità con cui AZA-1 induce risposte molecolari in cellule in coltura.

L'accumulo di ECRA<sub>100</sub> indotto da AZA-1 in cellule MCF-7 e Caco-2, infatti, potrebbe costituire un rischio legato al consumo di molluschi contaminati da queste tossine.

Un rischio del genere va tenuto in considerazione, alla luce del fatto che la EC<sub>50</sub> di AZA-1 nell'indurre la frammentazione della E-caderina in cellule umane è pari a 10<sup>-9</sup> M (fig.3), e che la somministrazione ripetuta di AZA nei topi ha portato alla formazione di tumori polmonari nel 10-30% degli animali utilizzati [70].

Prendendo in considerazione i risultati ottenuti, essi mostrano come

AZA-1 sia in grado di perturbare i fenomeni adesivi sia in cellule epiteliali che in fibroblasti normali. I sistemi molecolari coinvolti nell'adesione cellula-cellula nelle linee cellulari prese in considerazione non sono ugualmente sensibili, dal momento che AZA-1 ha effetti sulla E-caderina nelle linee epiteliali, ma non sulla N-caderina dei fibroblasti. Perciò i nostri risultati implicano che AZA-1 sia in grado di alterare l'adesione cellula-cellula ma anche quella cellula-matrice. Le molecole bersaglio per AZA-1 nel caso della adesione cellula-matrice devono tuttavia ancora essere identificate.

Ad ogni modo, il meccanismo di azione degli azaspiracidi rimane da definire. Essi infatti hanno mostrato di essere in grado di modulare le concentrazioni citosoliche di calcio [14,15,16], aumentare il livello di cAMP [15,16] e modificare il pH intracellulare [17] nei linfociti umani. Al momento non è chiaro se questi tre effetti possano avere un ruolo nell'accumulo di ECRA<sub>100</sub> indotto da AZA-1 nelle cellule epiteliali, comunque la cospicua differenza nelle dosi in grado di modificare i diversi processi sembrano indicare che l'effetto sulla E-caderina non dipenda dallo stesso tipo di meccanismo. Infatti, come già detto, la frammentazione della E-caderina viene indotta da AZA-1 a concentrazioni di circa  $10^{-9}$  M, mentre gli effetti descritti precedentemente avvengono a concentrazioni nell'intervallo  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M [14-17]. Ulteriori studi serviranno a chiarire i dettagli dei due distinti meccanismi di azione

che inducono le risposte descritte in cellule in coltura.

In ogni caso l'effetto determinato da AZA-1 sulla E-caderina, è indistinguibile da quello che provoca la YTX nelle stesse linee cellulari [44]. Se questo viene considerato alla luce dei dati disponibili sui diversi effetti delle due tossine è possibile osservare come entrambe inducano:

1. Un lieve aumento della concentrazione citosolica di calcio nei linfociti a concentrazioni dell'ordine dei  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M [14,15,16].
2. Un aumento del livello di AMP ciclico nei linfociti a concentrazioni di  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M [15,16].
3. L'accumulo di ECRA<sub>100</sub> a concentrazioni di  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  M in cellule epiteliali [questo lavoro e 44].
4. Una diminuzione nel contenuto cellulare di F-actina a concentrazioni al di sopra dei  $10^{-8}$  M con una certa specificità cellulare [15].

Inoltre la cinetica di questi fenomeni risulta essere realmente indistinguibile tra le due tossine.

I dati sperimentali disponibili quindi pongono la questione se gli azaspiracidi e la YTX condividano lo stesso meccanismo di azione.

La rilevanza di una tale osservazione deriva da considerazioni di tipo tossicologico e di gestione del rischio e potrebbe essere particolarmente rilevante in termini meccanicistici. Infatti se le due classi di tossine condividono lo stesso meccanismo di azione, va definito se anche il

recettore è da esse condiviso. Questo è particolarmente interessante alla luce delle notevoli differenze strutturali che si osservano tra le due classi di composti.

Una più approfondita delucidazione delle identità e delle differenze nel meccanismo di azione, così come le possibili interferenze di tipo agonistico o antagonistico fra le due tossine potrebbero dare un importante contributo alla comprensione della loro tossicità sia in termini strettamente chimici che funzionali. Queste conoscenze potrebbero infine essere importanti per la gestione razionale del rischio posto da queste alghe tossiche ai consumatori.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Satake M., MacKenzie L., Yasumoto T., (1997). Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins* **5**: pp.164-167
- (2) Tubaro A., Sidari L., Della Loggia R., Yasumoto T. (1998). Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from north Adriatic sea. In: Reguera B., Blanco J., Fernandez M. L., Wyatt T. pp.470-472
- (3) Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Guerrini F., Pistocchi R., Boni L. (2003). Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon* **42**: pp. 7-14
- (4) Ogino H., Kumagai M., Yasumoto T., (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Natural Toxins* **5**: pp.255-259
- (5) Aune T., Sørby R., Yasumoto T., Ramstad H., Landsverk T. (2002). Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon* **40**: pp.77-82
- (6) Federica Callegari, Silvio Sosa, Sara Ferrari, Maria Rosa Soranzo, Silvia Pierotti, Takeshi Yasumoto, Aurelia Tubaro, Gian Paolo Rossini. (2006). Oral administration of yessotoxin stabilizes

- E-cadherin in mouse colon. *Toxicology* **227**: pp 145-155
- (7) Malaguti C., Ciminiello P., Fattorusso E., Rossini G. P., (2002).  
Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells.  
*Toxicology in Vitro* **16**: pp.357-363
- (8) De La Rosa L. A., Alfonso A., Vilarino N., Vieytes M. R., Botana L. M., (2001). Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochemical Pharmacology* **61**: pp.827-833
- (9) Alfonso A., De La Rosa L. A., Vieytes M. R., Yasumoto T., Botana L. M. (2003): Yessotoxin, a novel phycotoxin activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes. *Biochemical Pharmacology* **65**: pp.193-208
- (10) Pierotti S., Malaguti C., Milandri A., Poletti R., Rossini G. P. (2003). Functional assay to measure yessotoxin in contaminated mussel samples. *Analytical Biochemistry* **312**: pp.208-216
- (11) Kevin J. James, Cian Moroneya, Cilian Rodena, Masayuki Satakeb, Takeshi Yasumoto, Mary Lehanea and Ambrose Fureya. (2003). Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* **41**: pp. 145-151
- (12) Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T. (1998). Azaspiracid, a new marine toxin

- having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels. *J Am Chem Soc* **120**: pp. 9967-9968.
- (13) Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. (1999). Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat Toxins* **7**: pp. 99-102.
- (14) Alfonso A, Roman Y, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM (2005). Azaspiracid-4 inhibits Ca<sup>2+</sup> entry by stored operated channels in human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **69**: pp. 1543-1680.
- (15) Román Y, Alfonso A, Louzao MC, de la Rosa LA, Leira F, Vieites JM, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM. (2002). Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets. *Cell Signal*. **14**: pp. 703-16.
- (16) Román Y, Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Yasumoto T, Botana LM. (2004). Effects of Azaspiracids 2 and 3 on intracellular cAMP, [Ca<sup>2+</sup>], and pH. *Chem Res Toxicol*. **17**: pp. 1338-49.
- (17) Alfonso A, Vieytes MR, Ofuji K, Satake M, Nicolaou KC, Frederick MO, Botana LM. (2006). Azaspiracids modulate intracellular pH levels in human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. **346**: pp. 1091-9.
- (18) Twiner MJ, Hess P, Dechraoui MY, McMahon T, Samons MS,

- Satake M, Yasumoto T, Ramsdell JS, Doucette GJ (2005). Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* **45**: pp. 891-900.
- (19) Tepass U., Truong K., Godt D., Ikura M., Peifer M. (2000): Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* **1**: pp. 91-99.
- (20) Shapiro L., Fannon A. M., Kwong P. D., Thompson A., Lehmann M. S., Grübel G., Legrand J., Als-Nielsen J., Colman D. R., Hendrickson W. A. (1995): Structural basis of cell-cell-adhesion by cadherins. *Nature* **374**: pp. 327-337
- (21) Wijnhoven B. P. L., Dinijens W. N. M., Pignatelli M. (2000): E-cadherin-catenin complex and human cancer. *British Journal of Cancer* **87**: pp. 992-1005
- (22) Peyriéras N., Hyafil F., Louvard D., Ploegh H. L., Jacob F. (1983): Uvomorulin: A nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**: pp. 6274-6277
- (23) Gallin W. J., Edelman G. M., Cunningham B. A. (1983): Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**: pp. 1038-1042
- (24) Takeda H., Shimoyama Y., Nagafuchi A., Hirohashi S., (1999): E-

- cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface *in vivo*. *Nature Structural Biology* **6**: pp. 310-312
- (25) Steinberg M. S., McNutt P. M. (1999): Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Current Opinion in Cell Biology* **11**: pp. 554-560
- (26) Koch A. W., Bozic D., Pertz O., Engel J. (1999): Homophilic adhesion by cadherins. *Current Opinion in Structural Biology* **9**: pp. 275-281
- (27) Jou T. S., Stewart D. B., Stappert J., Nelson W. J., MARRS J. A. (1995): Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: pp. 5067-5071
- (28) Wheelock M. J., Soler A. P., Knudsen K. A. (2001): Cadherin junctions in mammary tumors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **6**: pp. 275-285
- (29) Yap A. S., Niessen C. M., Gumbiner B. M. (1998): The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120<sup>ctn</sup>. *The Journal of Cell Biology* **141**: pp. 779-789
- (30) Moon R. T., Bowerman B., Boutros M., Perrimon N. (2002): The promise and perils of Wnt signaling through  $\beta$ -catenin. *Science* **296**: pp. 1644-1646

- (31) Su L. K., Vogelstein B., Kinzler K. W. (1993): Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* **262**: pp. 1734-1737
- (32) Munemitsu S., Albert I. Souza B., Rubinfeld B., Polakis P., (1995): Regulation of intracellular  $\beta$ -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: pp. 3046-3050
- (33) Molenaar M. Van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O., Clevers H. (1996): XTcf-3 transcription factor mediated beta-catenina-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**: pp. 391-399
- (34) Behrens J., Von Kries J. P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W. (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: pp. 638-642
- (35) Huber O., Korn R., McLaughlin J., Ohsugi M., Herrmann B. G., Kemler R. (1996): Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanism of development* **59**: pp. 3-10
- (36) Hecht A., Litterst C. M., Huber O., Kemler R. (1999): Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro.

- Journal of Biological Chemistry **274**: pp. 18017-18025
- (37) Frame M. C. (2002): Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et Biophysica Acta* **1602**: pp. 114-130
- (38) Reynolds A. B., Daniel J., McCrea P. D., Wheelock M. J., Wu J., Zhang Z. (1994): Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120<sup>ctn</sup> associates with E-cadherin complexes. *Molecular Cell Biology* **14**: pp. 8333-8342
- (39) Thoreson M. A., Anastasiadis P. Z., Daniel J. M., Ireton R. C., Wheelock M. J., Johnson K. R., Hummingbird D. K., Reynolds A. B. (2000): Selective uncoupling of p120<sup>ctn</sup> from E-cadherin disrupts strong adhesion. *Journal of Cell Biology* **148**: pp. 189-202
- (40) Roura S., Miravet S., Piedra J., Garcia de Herreros A., Dunach M. (1999): Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **274**: pp. 36734-36740
- (41) Fukata M., Kaibuchi K. (2001): Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* **2**: pp. 887-897
- (42) Fukata M., Kuroda S., Nakagawa M., Kawajiri A., Itoh N., Shoji I., Matsuura Y., Yonehara S., Fujisawa H., Kikuchi A., Kaibuchi K. (1999): Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with  $\beta$ -

- catenin. *Journal of Biological Chemistry* **274**: pp. 26044-26050
- (43) Kuroda S, Fukata M., Nakagawa M., Fujii K., Nakamura T., Ookubo T., Izawa I., Nagase T., Nomura N., Tani H., Shoji I., Matsuura Y., Yonehara S., Kaibuchi K. (1998): Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin mediated cell-cell adhesion. *Science* **281**: pp. 832-835
- (44) Ronzitti G, Callegari F, Malaguti C, Rossini GP. (2004): Selective disruption of the E-cadherin-catenin system by an algal toxin. *Br J Cancer*. **90**: pp. 1100-7.
- (45) Callegari F, Rossini GP. (2008). Yessotoxin inhibits the complete degradation of E-cadherin *Toxicology*. **244**: pp. 133-44.
- (46) Soule H. D., Vasquez J., Long S., Albert S., Brenner M. (1973) : A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **51**: pp. 1409-1416
- (47) Rossini GP, Pinna C, Malaguti C. (1999). Different sensitivities of p42 mitogen-activated protein kinase to phorbol ester and okadaic acid tumor promoters among cell types. *Biochem Pharmacol*. **58**: pp. 279-84.
- (48) Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: pp. 680-685

- (49) Cunningham CC. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol.* **129**: pp. 1589-99.
- (50) Ronzitti G., Albano C., Callegari F., Rossini G.P. (2005). A short term yessotoxin treatment of cultured cells induces E-cadherin fragmentation without subcellular redistribution of  $\beta$  and  $\gamma$ -catenins. In « *Toxines et Cancer* » pp. 77-80.
- (51) Ronzitti Giuseppe, Gian Paolo Rossini. (2008) Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells. *Toxicology* **244**: pp. 145-56
- (52) Rossini GP, Camellini L. (1994) Oligomeric structures of cytosoluble estrogen-receptor complexes as studied by anti-estrogen receptor antibodies and chemical crosslinking of intact cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **50**: pp. 241-52.
- (53) Ronzitti G., Hess P., Rehmann N., Rossini G. P. (2007) Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells. *Toxicological sciences* **95**: pp. 427-435
- (54) G. P. Rossini, C. Malaguti, S. Ferrari, S. Pierotti, G. Ronzitti, F. Callegari. (2003) Alterazioni della funzionalità cellulare indotte da ficotossine lipofile *Biologia Marina Mediterranea* **10**: fasc. 2-2003
- (55) Chitaev, N.A., and Troyanovsky, S.M. (1998). Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their

- formation. *J. Cell Biol.* **142**: pp. 837-846.
- (56) Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2005).  $\alpha$ -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- $\beta$ -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**: pp. 903-915.
- (57) Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* **125**: pp. 1327-1340.
- (58) Klingelhöfer, J., Laur, O.Y., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2002). Dynamic interplay between adhesive and lateral E-cadherin dimers. *Mol. Cell Biol.* **22**: pp. 7449-7458.
- (59) Koslow, E.R., Maupin, P., Pradhan, D., Morrow, J.S., and Rimm, D.L. (1997).  $\alpha$ -catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with  $\beta$ -catenin. *J. Biol. Chem.* **272**: pp. 27301-27306.
- (60) McCrea, P.D., and Gumbiner, B.M. (1991). Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). *J. Biol. Chem.* **266**: pp. 4514-4520.
- (61) Ozawa, M., and Kemler, R. (1992). Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J. Cell Biol.* **116**: pp. 989-996.

- (62) Ozawa, M., and Kemler, R. (1998). The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *J. Cell Biol.* **142**: pp. 1605-1613.
- (63) Takeda, H., Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., and Hiroashi, S. (1999). E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **6**: pp. 310-312.
- (64) Shore, E.M., and Nelson, W.J. (1991). Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**: pp. 19672-19680.
- (65) Bryant, D.M., and Stow, J.L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *TCB* **14**: pp. 427-434.
- (66) Takeichi M, Inuzuka H, Shimamura K, Matsunaga M, Nose A. (1990) Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis. *Neurosci Res Supp.* **13**: pp. S92-6.
- (67) Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**: pp. 91-100.
- (68) Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. (1999) *Trends Biochem Sci.* **24**: pp. 73-6.
- (69) Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. (1991)

Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. **66**: pp. 107-19.

- (70) Ito E, Satake M, Ofuji K, Higashi M, Harigaya K, McMahon T, Yasumoto T. (2002) Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon*. **40**: pp. 193-203.