

Efecto del cloruro de cadmio sobre la expresión del represor transcripcional REST/NRSF y su gen blanco CDH1 en tejido pulmonar de ratones ICR-CD1

Francisco Yovani Vargas Santiago¹

y.ni7@hotmail.com

<https://orcid.org/0009-0007-0998-0542>

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Universidad Autónoma de Guerrero
México

Mayrut Osdely Urióstegui Acosta

mayruturiostegui@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-6213-183X>

Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del IPN
Universidad Autónoma de Guerrero
México

Aida Castillo

<https://orcid.org/0000-0002-6939-9625>

Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
México

Yanet Romero Ramírez

yanetromero7@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-8383-4128>

Universidad Autónoma de Guerrero
México

Antonio Cuenca Rojo

rojocuenca.bt9@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0000-3534-5445>

Universidad Autónoma de Guerrero
México

Eduardo Castañeda Saucedo

ecastaneda@uagro.mx

<https://orcid.org/0000-0002-0669-4408>

Universidad Autónoma de Guerrero
México

Napoleón Navarro Tito

nnavarro@uagro.mx

<https://orcid.org/0000-0003-4911-0545>

Universidad Autónoma de Guerrero
México

Miguel Ángel Mendoza Catalán

mglmendoza7@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6247-8590>

Universidad Autónoma de Guerrero
México

Carlos Ortuño Pineda

ortunoc@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1757-1964>

Universidad Autónoma de Guerrero
México

¹ Autor Principal

RESUMEN

REST (*RE1-Silencing Transcription factor*) es un factor de transcripción con dedos de zinc que reprime a sus blancos transcripcionales a través de su interacción con la secuencia RE1 (*Restrictive Element 1*). Aunque algunos metales como el cadmio pueden alterar la función de proteínas al competir con el zinc, no se han realizado estudios a nivel molecular para determinar dicho efecto sobre REST. El gen CDH1 es un blanco transcripcional de REST que codifica para la glicoproteína de adhesión celular E-cadherina y la desregulación de su expresión ha sido asociada al proceso canceroso. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición a 1.3 μM /3 días con CdCl_2 en ratones ICR-CD1 sobre los niveles de REST y de su gen blanco CDH1 en tejido pulmonar. Los niveles del mRNA de CDH1 se determinaron por RT-PCR, mientras que los niveles de las proteínas E-cadherina y REST se evaluaron mediante *Western blot*. Después del tratamiento con CdCl_2 los niveles de CDH1 y de su producto E-cadherina se incrementaron en relación con la pérdida de la expresión de REST. En conclusión, el cadmio promueve la disminución de REST a nivel de proteína, así como el incremento de los niveles de ARN mensajero de CDH1 y de su producto E-cadherina. El incremento de E-cadherina probablemente se debe a la relajación transcripcional de CDH1 mediado por la pérdida de la expresión de REST.

Palabras clave: *CDH1; E-cadherina; REST; CdCl₂.*

Effect of cadmium chloride on the expression of the REST/NRSF transcriptional repressor and its target gene CDH1 in lung tissue of ICR-CD1 mice

ABSTRACT

REST (RE1-Silencing Transcription factor) is a transcription factor with zinc fingers that represses its transcriptional targets through its interaction with the RE1 (Restrictive Element 1) sequence. Although some metals such as cadmium can alter protein function by competing with zinc, studies at the molecular level have not been performed to determine this effect on REST. The CDH1 gene is a transcriptional target of REST that codes for the cell adhesion glycoprotein E-cadherin and the deregulation of its expression has been associated with the cancerous process. The objective of this work was to evaluate the effect of exposure to 1.3 μM /3 days with CdCl₂ in ICR-CD1 mice on the levels of REST and its target gene CDH1 in lung tissue. CDH1 mRNA levels were determined by RT-PCR, while E-cadherin and REST protein levels were assessed by Western blot. After CdCl₂ treatment, the levels of CDH1 and its product E-cadherin increased in relation to the loss of REST expression. In conclusion, cadmium promotes a decrease in REST at the protein level, as well as an increase in the levels of CDH1 messenger RNA and its E-cadherin product. The increase in E-cadherin is probably due to CDH1 transcriptional relaxation mediated by loss of REST expression.

Keywords: *CDH1; E-cadherin; REST; CdCl₂*

Artículo recibido 05 Mayo 2023

Aceptado para publicación: 20 Mayo 2023

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd^{2+}) es un metal pesado cuya exposición laboral y ambiental es de gran preocupación, ya que ha sido clasificado como un carcinógeno potente por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). El cadmio, es un elemento metálico, que se encuentra ampliamente en el medio ambiente debido principalmente a las actividades industriales y agrícolas (Hong et al., 2021). Otras fuentes de exposición incluyen el empleo en industrias primarias del metal y como fuente principal el consumo de productos de tabaco (IARC, 1993; Waalkes, 2000; Person et al., 2013). La exposición a cadmio se da a través de la absorción dérmica, inhalación de polvo, ingesta de alimentos o aguas contaminadas y tabaquismo (Wang et al., 2021). Su acumulación en la célula se debe principalmente a la competencia que genera con metales esenciales como el Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} . Una vez que el cadmio entra a la célula, se ve involucrado en mecanismos que dan lugar a su transformación maligna. Las principales proteínas que se han visto alteradas en células expuestas a cadmio son aquellas asociadas con las uniones adherentes como integrinas y cadherinas (Fotakis and Timbrell, 2006; Achanzar et al., 2001; Prins et al., 2014). Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para estudiar el mecanismo de toxicidad del cadmio, el cual genera cambios en la actividad enzimática, cambios en proteínas con grupos sulfhidrilo (tioleínas), inducción de estrés oxidativo y apoptosis, cambios en la estructura y/o función de la membrana celular, en la expresión génica, inhibición de la producción de ATP en mitocondrias, entre otros (Matović et al., 2011). Particularmente, el cadmio puede desplazar y reemplazar al zinc en las proteínas que contienen motivos de dedos de zinc, que están implicadas en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, en la reparación del DNA o en la señalización del DNA dañado (Bertin & Averbeck, 2006; Waalkes, 2003). Además, el cadmio puede actuar a través de mecanismos epigenéticos, incluyendo los efectos mitogénicos sobre la expresión génica, la inhibición de la reparación del DNA y la inhibición de apoptosis (Templeton & Liu, 2010).

REST es una proteína con dedos de zinc que silencia sus blancos transcripcionales a través de la interacción con las secuencia RE1 (TTCAGCACCCACGGACAGCGCC) presente en sus genes blanco (Palm et al., 1999). En humanos, REST regula aproximadamente 2000 genes, principalmente específicos de neuronas, por lo que es considerado como un regulador maestro de la neurogénesis (Bruce et al.,

2004; Ballas & Mandel, 2005). Su desregulación está relacionada con distintos tipos de cáncer, por ejemplo, su disminución se relaciona con la adquisición del fenotipo neuroendocrino en cáncer de pulmón, colorectal, mama, cervical y de próstata, mientras que un incremento de REST se ha encontrado en neuroblastomas, glioblastomas y meduloblastomas (Coulson et al., 2000; Zuccato et al., 2003; Lv et al., 2005, Westbrook et al., 2005; Cortés-Sarabia et al., 2022; Palm et al., 1999; Lawinger et al., 2000; Conti et al., 2012). Adicionalmente, se ha observado una alteración de la función de REST en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington y Parkinson (Zuccato et al., 2003; González-Castañeda et al., 2013; Suo et al., 2013). Interesantemente, una amplia gama de evidencias han revelado que la alteración en los niveles y la función de REST puede ocurrir a través de distintos mecanismos, por ejemplo, la regulación transcripcional, el *splicing* alternativo, la degradación proteasomal, y otros (Koenigsberger et al., 2000; Coulson et al., 2000; Westbrook et al., 2008).

CDH1 es un gen supresor de tumor ubicado en el cromosoma 16q22.1 que codifica para E-cadherina, una glicoproteína que cumple un papel clave en la adhesión célula-célula, ayudando en el mantenimiento de la integridad del tejido. En las células de pulmón, E-cadherina se localiza principalmente en el cinturón de adhesión de los complejos de unión, contiene un dominio intracelular que está vinculado al citoesqueleto de actina a través de un grupo de cateninas (α , β y γ catenina), un dominio transmembranal, y un dominio extracelular que contiene sitios de unión a Ca^{2+} , así como regiones de adhesión de la molécula (Shashikanth et al., 2015). E-cadherina es fundamental para establecer y mantener epitelios polarizados y diferenciados a través de complejos de adhesión intercelular. La función de E-cadherina es suprimir la invasión celular y su desregulación se correlaciona con la capacidad infiltrativa y metastásica en tumores (Massari et al., 2021). La expresión del gen CDH1 puede ser regulada negativamente por la represión transcripcional mediada por los factores de transcripción SNAIL, SLUG, ZEB1 y ZEB2/SIP1 (Bücker & Lehmann, 2022; Verschueren et al., 1999). ZEB1 está asociado con dos secuencias E-box ubicadas en la región promotora proximal del gen E-cadherina (CDH1) para regular a la baja su expresión mediante el reclutamiento de histonas desacetilasas en las regiones promotoras. El nivel de expresión de E-cadherina y ZEB1 es un indicador útil de la sensibilidad de las células cancerosas a la terapia dirigida (Zhang et al., 2012; Wong et al., 2014). ZEB1 también contribuye al silenciamiento epigenético de la E-cadherina al reclutar DNA metiltransferasa 1 para CDH1 región

promotora y mantiene su metilación del DNA en el subtipo basal de célula de mama (Otake et al., 2020). Recientemente se ha reportado una secuencia RE1 en el gen CDH1, lo que lo convierte en un blanco potencial de REST (Cortés-Sarabia et al., 2023), sin embargo, se desconoce si la exposición a metales pesados podría alterar la función de REST, repercutiendo en la expresión de sus blancos transcripcionales.

METODOLOGÍA

Tratamiento de ratones con CdCl₂. Se trataron 15 ratones ICR-CD1 machos adultos con CdCl₂ (Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V) a una concentración de 1.3 µM/día durante tres días, la administración fue por vía oral. En contraste, se usaron 15 ratones controles. Al finalizar el tratamiento, ambos grupos fueron sacrificados por dislocación cervical para disectar los pulmones. El manejo de los ratones se realizó bajo las especificaciones descritas en la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y todas las sustancias químicas utilizadas se identificaron y clasificaron de acuerdo con la NOM-052-SEMARNAT-2005.

Extracción de proteínas. La extracción de proteínas del tejido pulmonar se realizó con buffer RIPA de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Santa Cruz Biotechnology Inc) previa maceración con nitrógeno líquido, mientras que la cuantificación se hizo por el método de Bradford.

Western blot. Las proteínas desnaturalizadas por calor a 90 °C fueron cargadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente ya sea anti-E-caderina (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-REST (Santa Cruz Biotechnology Inc.) o anti-Actina (Santa Cruz Biotechnology Inc.), a una dilución 1:1500. Como anticuerpos secundarios se usaron anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology Inc.). La membrana se reveló por quimioluminiscencia en películas radiográficas utilizando el kit de quimioluminiscencia *Western blotting luminol reagent* (Biorad).

Extracción de RNA y RT-PCR. La extracción del ARN total se realizó por el método del Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para la síntesis del cDNA se usó el kit comercial (Invitrogen). Para la PCR el programa de amplificación para todos los genes consistió de 35 ciclos de,

95°C/5 min, 95°C/30 s, 55°C/30 s, 72°C/30 s, 72°C/10 min. Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % aplicando una corriente eléctrica de 90 V durante 20 minutos. Para ello el gel fue teñido con SYBR Gold (SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain, Thermo Fisher Scientific) y posteriormente visualizados en un fotodocumentador con luz UV.

Densitometría y análisis estadístico. Las imágenes fueron analizadas por densitometría en el programa *Image J*, para conocer los valores *IntDen* de las bandas y determinar los niveles relativos de expresión. Se realizó una *t* de *student* para la comparación entre grupos. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de REST se pierde en tejido pulmonar de ratones tratados con Cloruro de cadmio.

Amplia evidencia señala que la disminución de la expresión de REST o la pérdida de la funcionalidad permite la re-expresión de algunos de sus genes blanco. La presencia de metales pesados podría alterar la función de REST por el remplazamiento del zinc en el dominio de unión al ADN. Además de la función, también se puede ver alterada la expresión de REST en presencia de agentes químicos debido a la dinámica de su regulación transcripcional. Debido a ello nosotros determinamos los niveles de REST por Western blot a partir de extractos de proteínas totales de tejido pulmonar de ratones tratados con 1.3 µM/3días de cloruro de cadmio. Los resultados mostraron una pérdida de la expresión de la proteína en un 56% en el grupo de ratones tratados comparados con los ratones control (Figura 1), con un P value de 0.01, indicando un efecto negativo del cloruro de cadmio.

El gen CDH1 es un blanco potencial de la represión transcripcional mediada por REST.

Para relacionar el efecto de la disminución de la expresión de REST sobre la transcripción del gen CDH1, primero realizamos un mapeo *in silico* en la secuencia completa de dicho gen, con la finalidad de determinar la localización de posibles secuencias RE1 en la región promotora, que pudieran estar regulando su transcripción. El análisis de los alineamientos mostró al menos dos secuencias RE1, una en la región promotora (RE1a, score=57%) y otra en una región intrónica (RE1b, score=71%), indicando que CDH1 es un blanco transcripcional potencial de REST (Figura 2).

El mRNA el mensajero de E-Cadherina está incrementado en tejido pulmonar de ratones tratados con Cloruro de cadmio.

REST regula la expresión de sus genes blanco a través de su interacción con la secuencia RE1, esta secuencia puede estar localizada en la región promotora, en exones, intrones e incluso a largas distancias de los genes que regula. La presencia de secuencias RE1 en el gene CDH1 con scores superiores al 50% lo convierten en un blanco transcripcional de REST, por lo que su expresión podría estar influenciada por la disminución de los niveles de REST o la pérdida de su función. En concordancia con esta hipótesis nuestros experimentos de RT-PCR mostraron un aumento en los niveles del mRNA de CDH1 en los ratones tratados con CdCl₂ en comparación con los ratones sin tratar (**Figura3**).

El tratamiento con CdCl₂ altera la adherencia celular en cultivos de células MRC5

El producto del gen CDH1 es la proteína E-cadherina, la cual es una glicoproteína de 120 KDa que se localiza en la superficie celular de las células epiteliales en las regiones de contacto y media la adhesión intercelular. Diversos estudios han mostrado que la pérdida de su función o la disminución de su expresión están relacionada con la adherencia celular y la metástasis en algunos tipos de cáncer. Nosotros tratamos con CdCl₂ cultivos de células MRC5 a alta confluencia y observamos los cambios morfológicos de las células 24 horas después del tratamiento. Los resultados mostraron una pérdida de adherencia de las células a la superficie de cultivo así como pérdida las uniones intercelulares (Figura 4).

Este efecto debido al CdCl₂ puede tener varias explicaciones, por ejemplo puede deberse a una posible competencia del cadmio por el calcio en la estructura de E-cadherina, pero también pueden ser efectos ocasionados por el metal en otras proteínas o sobre la expresión de otros genes no incluidos en este trabajo.

FIGURAS

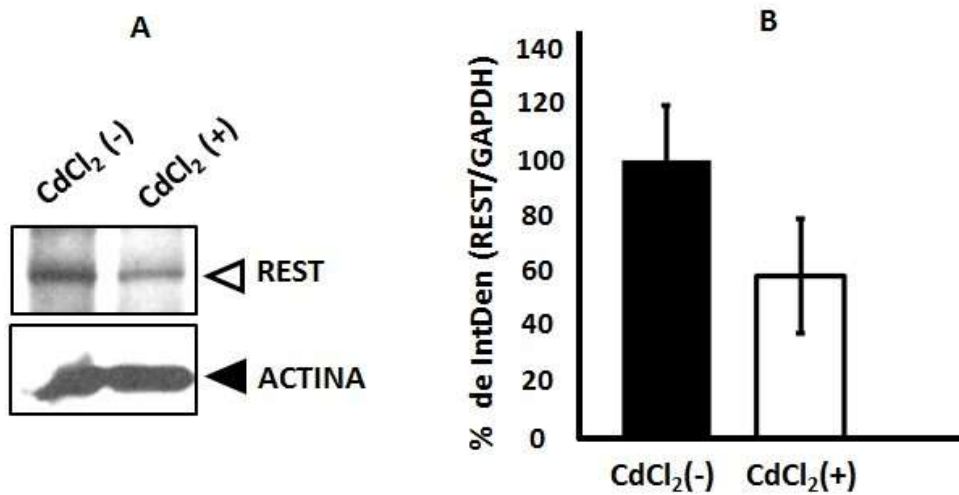


Figura 1. El CdCl₂ altera los niveles de REST en tejido pulmonar de ratones ICR. A) Western blot realizado a partir de extractos de proteínas totales de tejido pulmonar de ratones ICR tratados con CdCl₂. Como control de carga en el Western blot se usó el anticuerpo anti-actina. B) Análisis densitométricos realizados con *Image J* a partir de las bandas del *Western blot*. Las señales del *Western blot* de los ratones tratados y sin tratar fueron divididas entre las señales correspondientes al control de actina y graficadas como promedio del grupo de ratones tratados y sin tratar con CdCl₂.

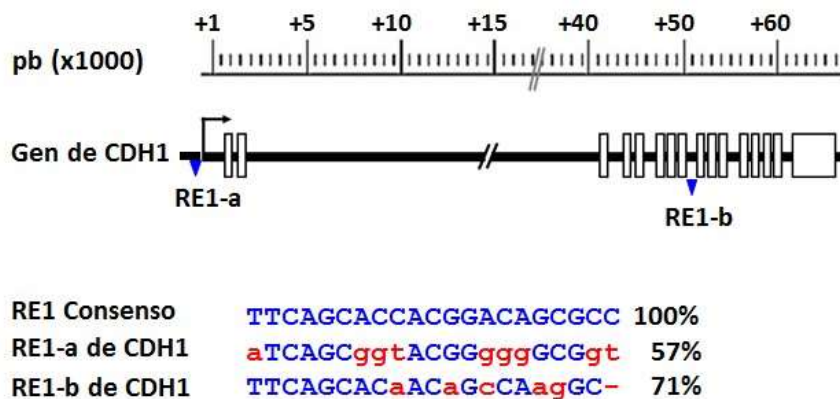


Figura 2. El gen CDH1 contiene al menos dos secuencias RE1. (Arriba) Representación esquemática del gen CDH1. La flecha al inicio del esquema representa el sitio de inicio de la transcripción. Las cajas blancas corresponden a los exones en el marco abierto de lectura. Los dos triángulos azules invertidos señalan la posición de las secuencias RE1. (Abajo) Alineamiento de las secuencias RE1-a y RE1-b con respecto al RE1 consenso de vertebrados.

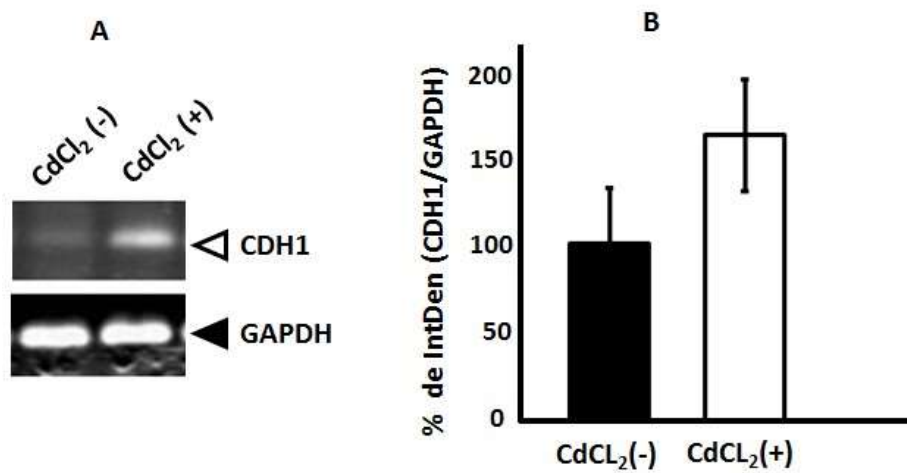


Figura 3. El CdCl₂ altera los niveles de expresión del gen CDH1 en tejido pulmonar de ratones ICR. A) RT-PCR realizada a partir de ARN total de tejido pulmonar de ratones ICR tratados con CdCl₂. Como control de carga se determinó la expresión del gen GAPDH. B) Análisis densitométricos realizados con *Image J* a partir de las señales de la PCR en el gel de agarosa. Las señales de la PCR de los ratones tratados y sin tratar fueron divididas entre las señales correspondientes al control de GAPDH y graficadas como promedio del grupo de ratones tratados y sin tratar con CdCl₂.

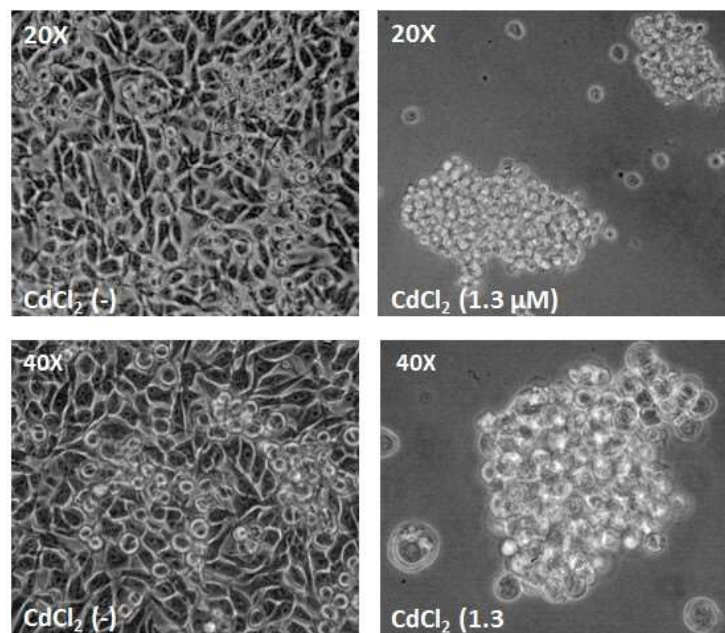


Figura 4. El CdCl₂ altera la adhesión celular en cultivos de fibroblastos de pulmón MRC5. A la izquierda se muestran imágenes a 20X y 40X de un cultivo de células MRC5 sin tratar. A la derecha se muestran células de un cultivo tratado con 1.3 μM de CdCl₂.

CONCLUSIONES

Usando el modelo de ratones ICR tratados con CdCl₂, observamos una disminución de los niveles de REST y sobre-expresión del mRNA de CDH1. Coincidentemente, el análisis *in silico* mostró que CDH1 es un blanco transcripcional de REST, ya que posee dos secuencias RE1 en su marco de lectura. Esto sugiere que la disminución de la expresión de REST puede ser la causa del incremento transcripcional de CDH1. Sin embargo, para demostrar esto, otros enfoques experimentales adicionales deben ser implementados, como ensayos de silenciamiento usando siRNAs contra REST e inmunoprecipitación de la cromatina. Debido a que no estudiamos el mecanismo por el cual el cloruro de cadmio regula la expresión de REST, es necesario realizar la búsqueda minuciosa de una cascada de genes relacionados con el sistema REST/CDH1.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con recursos propios del Laboratorio de Ácidos Nucleicos y Proteínas en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro, agradecemos la colaboración de los estudiantes **Francisco Yovani Vargas Santiago** y **David Eduardo Balderas Muñoz**.

REFERENCIAS

- Achanzar, W.E., Diwan, B.A., Liu, J., Quader, S.T., Webber, M.M., Waalkes, M.P. (2001). Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 61, 455–458
- Ballas, N., Mandel G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol*, 15(5):500-6. doi: 10.1016/j.conb.2005.08.015
- Bertin, G., & Averbek, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(11), 1549–1559. doi:10.1016/j.biochi.2006.10.001
- Bruce, A.W., Donaldson, I.J., Wood, I.C., Yerbury, S.A., Sadowski, M.I., Chapman, M., Göttgens, B., Buckley, N.J. (2004). Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 13;101(28):10458-63. doi: 10.1073/pnas.0401827101

- Bücker, L., & Lehmann, U. (2022). CDH1 (E-cadherin) Gene Methylation in Human Breast Cancer: Critical Appraisal of a long and Twisted Story. *Cancers (Basel)*. 14(18): 4377. doi: 10.3390/cancers14184377
- Conti, L., Crisafulli, L., Caldera, V., Tortoreto, M., Elisa Brilli, Paola Conforti, Franco Zunino, Lorenzo Magrassi, Davide Schiffer, Elena Cattaneo. (2012). REST controls self-renewal and tumorigenic competence of human glioblastoma cells. *PLoS One*, 7(6):e38486. doi: 10.1371/journal.pone.0038486
- Cortés-Sarabia, K., Alarcón-Romero L.C., Mendoza-Catalán, M.A., Carpio-Pedroza, J.C., Castañeda-Saucedo, E., Ortuño-Pineda, C. (2023). REST/NRSF Silencing Modifies Neuronal Gene Expression in siRNA-Treated HeLa Cells: A Preliminary Exploration in the Search for Neuronal Biomarkers of Cervical Cancer. *Medicina*, 9;59(3):537. doi: 10.3390/medicina59030537
- Cortés-Sarabia, K., Alarcón-Romero L.C., Mendoza-Catalán, M.A., Carpio-Pedroza, J.C., Castañeda-Saucedo, E., Ortuño-Pineda, C (2023). REST/NRSF Silencing Modifies Neuronal Gene Expression in siRNA-Treated HeLa Cells: A Preliminary Exploration in the Search for Neuronal Biomarkers of Cervical Cancer. *Medicina*, 9;59(3):537. doi: 10.3390/medicina59030537
- Coulson, J.M., Edgson, J.L., Woll, P.J., Quinn, J.P. (2000). A splice variant of the neuron-restrictive silencer factor repressor is expressed in small cell lung cancer: a potential role in derepression of neuroendocrine genes and a useful clinical marker. *Cancer Res*, 1;60(7):1840-4
- Fotakis G., Timbrell J. (2006). Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol Lett*. 164(2):97-103.
- González-Castañeda, R.E., Sánchez-González, V.J., Flores-Soto, M., Vázquez-Camacho, G., Macías-Islas, M.A., Ortiz, G.G. (2013). Neural restrictive silencer factor and choline acetyltransferase expression in cerebral tissue of Alzheimer's Disease patients: A pilot study. *Genet Mol Biol*, 36(1):28-36. doi: 10.1590/S1415-47572013000100005
- Hong, H., Xu, Y., Xu, J., Zhang, J., Xi, Y., Pi, H., Yang, L., Yu, Z., Wu, Q., Meng, Z., Ruan, W. S., Ren, Y., Xu, S., Lu, Y. Q., & Zhou Z. (2021). Cadmium exposure impairs pancreatic β -cell function and exaggerates diabetes by disrupting lipid metabolism. A review. *Environment International*, 149, 106406. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106406>

- IARC. (1993). Working Group Views and Expert.
- Koenigsberger, C., Chicca, J. J., 2nd, Amoureux, M. C., Edelman, G. M., & Jones, F. S. (2000). Differential regulation by multiple promoters of the gene encoding the neuron-restrictive silencer factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2291–2296. <https://doi.org/10.1073/pnas.050578797>
- Lawinger, P., Venugopal, R., Guo, Z.S., Immaneni, A., Sengupta, D., Lu, W., Rastelli, L., Marin Dias Carneiro, A., Levin, V., Fuller, G.N., Echelard, Y., Majumder, S. (2000). The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nat Med*, 6(7):826-31. doi: 10.1038/77565
- Lv, H., Pan, G., Zheng, G., Wu, X., Ren, H., Liu, Y., Wen, J. (2010). Expression and functions of the repressor element 1 (RE-1)-silencing transcription factor (REST) in breast cancer. *J Cell Biochem*, 1;110(4):968-74. doi: 10.1002/jcb.22610
- Massari, G., Magnoni, F., Favia, G., Peradze N., Veronesi, P., La Vecchia, C., & Corso, G. (2021). Frequency of CDH1 Germline Mutations in Non-Gastric Cancers (Basel). *Cancers*, 13(10):2321. doi: 10.3390/cancers13102321
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., & Đukić-Ćosić, D. (2011). Cadmium Toxicity Revisited: Focus on Oxidative Stress Induction and Interactions with Zinc and Magnesium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62(1), 65-76. doi:10.2478/10004-1254-62-2011-2075
- Otake, S., Itoh, Y., Omata, C., Saitoh M., & Miyazawa, K. (2020). ZEB1 and oncogenic Ras constitute a regulatory switch for stimulus-dependent E-cadherin downregulation. *Cancer Sci*. 112(1): 205-216. doi: 10.1111/cas.14701
- Palm, K., Metsis, M., and Timmusk, T. (1999). Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Brain Res Mol Brain Res* 72(1), 30-39. doi: 10.1016/s0169-328x(99)00196-5.
- Person, R. J., Tokar, E. J., Xu, Y., Orihuela, R., Ngalame, N. N. O., & Waalkes, M. P. (2013) *Toxicology and applied pharmacology*. 273(2), 281-288.
- Prins, J. M., Fu, L., Guo, L., & Wang, Y. (2014). Cd²⁺-induced alteration of the global proteome of human skin fibroblast cells *Journal of proteome research*. 13(3), 1677-1687.

- Shashikanth, N., Petrova, Y. I., Park, S., Chekan, J., Maiden, S., Spano, M. & Leckband, D. E. (2015). Allosteric Regulation of E-Cadherin Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21749-21761.
- Suo, H., Wang, P., Tong, J., Cai, L., Liu, J., Huang, D., Huang, L., Wang, Z., Huang, Y., Xu, J., Ma, Y., Yu, M., Fei, J., Huang F. (2015). NRSF is an essential mediator for the neuroprotection of trichostatin A in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 99:67-78. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.07.015
- Templeton, D. M., & Liu, Y. (2010). Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 267–275. doi:10.1016/j.cbi.2010.03.040
- Verschueren K, Remacle JE, Collart C, et al. (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem*. 274:20489–98.
- Waalkes, M. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533(1-2), 107–120. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.07.011
- Waalkes, M.P. J. (2000). Cadmium carcinogenesis in review. *Inorg. Biochem*. 79, 241–244.
- Wang, M., Chen, Z., Song, W., Hong, D., Huang, L., & Li, Y. (2021). A review on Cadmium Exposure in the Population and Intervention Strategies Against Cadmium Toxicity. A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106(1), 65–74. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03088-1>
- Westbrook, T.F., Hu, G., Ang, X.L., Mulligan, P., Pavlova, N.N., Liang, A., et al. (2008). SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature* 452(7185), 370-374. doi: 10.1038/nature06780
- Westbrook, T.F., Hu, G., Ang, X.L., Mulligan, P., Pavlova, N.N., Liang, A., et al. (2008). SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature* 452(7185), 370-374. doi: 10.1038/nature06780
- Wong, T., Gao, W., & Chan, J. (2014). Transcription Regulation of E-Cadherin by Zinc Finger E-Box Binding Homeobox Proteins in Solid Tumors. *Biomed Res Int*. 921564. doi: 10.1155/2014/921564

Zhang, J., Lu, C., Zhang, J., Kang, J., Cao, C., & Li, M. (2012). Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 949–956. doi:10.1007/s11033-012-2136-4

Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., Rigamonti, D., Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet*, 35(1):76-83. doi: 10.1038/ng1219