

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA, CHIRURGIA E ODONTOIATRIA



CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA, FARMACOLOGIA, CLINICA E TERAPIA DELLE MALATTIE
METABOLICHE
CICLO XXIII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**STUDIO BIOCHIMICO E FARMACOLOGICO DI CELLULE
MUSCOLARI LISCE ISOLATE DA TESSUTI DI PAZIENTI
AFFETTI DA TSC2 E LAM. MODIFICAZIONI EPIGENETICHE DEL
GENE TSC2 NELLA PATOGENESI DELLA TSC E DELLA LAM.**

Settore scientifico-disciplinare: BIO/14

DOTTORANDO: Silvia Ancona
MATRICOLA: R07511

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa A.M. DI GIULIO

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiar.ma Prof.ssa A.M. DI GIULIO

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

INTRODUZIONE	pag.4
Manifestazioni cliniche e fisiopatologia	pag.5
<i>Angiomiolipoma</i>	<i>pag.6</i>
<i>Linfangioleiomiomatosi (LAM)</i>	<i>pag.6</i>
Sclerosi tuberosa: genetica	pag.7
Il complesso tuberina/amartina	pag.10
Regolazione del complesso THC	pag.13
Il segnale di mTOR	pag.17
Epithelial To Mesenchymal Transition (EMT)	pag.21
MATERIALI E METODI	pag.24
SCOPO DELLA RICERCA	pag.39
RISULTATI	pag.46
1. Isolamento e caratterizzazione delle cellule muscolari lisce dall'angiomiolipoma di un paziente TSC2	pag.47
1.a <i>Analisi Immunocitochimica</i>	<i>pag.47</i>
1.b <i>Regolazione Della Crescita Nelle Cellule TSC ASM</i>	<i>pag.47</i>
2. Analisi genetica delle cellule TSC ASM	pag.48
2.a <i>Analisi di mutazione</i>	<i>pag.48</i>
2.b <i>Analisi della metilazione del promotore del gene TSC2</i>	<i>pag.48</i>
3. Effetto dei rimodellanti della cromatina sulle cellule TSC2^{-meth} ASM	pag.49
3.a <i>Espressione di tuberina in seguito al trattamento con tricostatina A (TSA) e 5-azacitidina (5-AZA)</i>	<i>pag.49</i>
3.b <i>Positività ad HMB45 in seguito al trattamento con TSA</i>	<i>pag.49</i>
3.c <i>Espressione di tuberina in seguito al trattamento con i rimodellanti della cromatina di origine sintetica</i>	<i>pag.50</i>

4. Effetto della TSA sul fenotipo biochimico delle cellule TSC2^{-meth} ASM	pag.51
5. Valutazione della via di trasduzione del segnale di PI3K/AKT	pag.52
6. Effetto dell'anticorpo anti-EGFR e della rapamicina sulla fosforilazione di S6 e ERK	pag.52
7. Effetto della rapamicina sulle cellule TSC2^{-meth} ASM	pag.53
<i>7.a Regolazione della crescita</i>	<i>pag.53</i>
<i>7.b Studio dell'apoptosi</i>	<i>pag.53</i>
8. Isolamento e caratterizzazione delle cellule muscolari lisce presenti nel chilo di una paziente LAM/TSC	pag.54
<i>8.a Analisi immunocitochimica</i>	<i>pag.54</i>
<i>8.b Valutazione dell'espressione di tuberina e amartina</i>	<i>pag.54</i>
9. Analisi genetica delle cellule LAM/TSC isolate dal versamento chiloso	pag.55
10. Effetto della TSA e della 5-AZA nelle cellule LAM/TSC	pag.55
11. Proliferazione delle cellule LAM/TSC isolate dal versamento chiloso	pag.56
12. Valutazione della via di trasduzione del segnale di PI3K/Akt nelle cellule LAM/TSC	pag.57
13. EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION (EMT)	pag.58
<i>13.a Valutazione della sopravvivenza delle cellule in sospensione</i>	<i>pag.58</i>
<i>13.b Valutazione dei marcatori di EMT</i>	<i>pag.59</i>
<i>13.c Studio della fosforilazione di S6 nelle cellule LAM/TSC in sospensione</i>	<i>pag.59</i>
<i>13.d Analisi del ciclo cellulare</i>	<i>pag.60</i>
DISCUSSIONE	pag.61
BIBLIOGRAFIA	pag.68
FIGURE E TABELLE	pag.81

INTRODUZIONE

MANIFESTAZIONI CLINICHE E FISIOPATOLOGIA

La sclerosi tuberosa (TSC) è una patologia multisistemica caratterizzata dalla formazione di amartomi in diversi organi, come il cervello, il polmone, la pelle, il cuore e i reni. Circa l'80% dei pazienti affetti da TSC hanno complicazioni a livello del sistema nervoso centrale che includono epilessia, difficoltà nell'apprendimento e autismo. Le lesioni renali più comuni comprendono angiomiolipomi (AMLs), amartomi e cisti renali. La TSC è una malattia ereditaria che ha un'incidenza di circa 1:6000 tra i nuovi nati (Orlova and Crino, 2010). La TSC può presentarsi anche in forma sporadica, nuove mutazioni sono state riconosciute in più del 75% dei casi. Maschi e femmine possono essere colpiti in egual modo da TSC e la possibilità di trasmettere la patologia alla progenie è del 50%.

Le manifestazioni dermatologiche sono già presenti in età pediatrica e includono macchie ipomelanotiche, che sono state riscontrate in più del 90% dei pazienti, e angiofibromi facciali, presenti nel 75% della popolazione con TSC (Jozwiak et al., 2000).

Le anomalie neurologiche includono epilessia (Thiele, 2004), disfunzioni neurocognitive (Prather et al., 2004) e disordini dello sviluppo come l'autismo (Smalley, 1998). L'esame istopatologico dei campioni di cervello di pazienti TSC rileva la presenza di tuber corticali, noduli subependimali e astrocitomi subependimali a cellule giganti (SEGA). I tuber corticali sono malformazioni dello sviluppo focale della corteccia cerebrale che causano la perdita della normale struttura laminare. I noduli subependimali sono lesioni proliferative benigne che protrudono dalla superficie ventricolare dentro il lume del ventricolo e sono ritenuti asintomatici. I noduli subependimali possono evolvere in SEGA e portare a un progressivo idrocefalo e alla morte (Goh et al., 2004).

Le lesioni renali si presentano nel 50-80% dei pazienti affetti da TSC, queste includono angiomiolipomi (AML), cisti renali, carcinoma renale, e oncocitoma.

ANGIOMIOLIPOMA

Gli AMLs sono tumori benigni composti, principalmente, da cellule adipose, cellule muscolari lisce e vasi sanguigni (Eble, 1998). Possono svilupparsi negli individui sani o in associazione con la TSC o con la linfangioleiomiomatosi (LAM) sporadica. L'80% dei pazienti TSC sviluppa AMLs renali, con una frequenza maggiore nelle donne rispetto agli uomini. Questo potrebbe indicare una regolazione ormonale della crescita, infatti, spesso, gli AMLs esprimono recettori per gli estrogeni e il progesterone (Logginidou et al., 2000).

I diversi tipi cellulari che costituiscono gli AMLs sembrano derivare da una cellula epitelioide perivascolare in grado di differenziarsi in cellule con caratteristiche di melanociti, di cellule muscolari lisce e cellule adipose (Neumann et al., 1998). Gli AMLs di pazienti affetti da TSC contengono diversi tipi di vasi sanguigni, quattro dei quali (cellulari, emangiopericitici, glomeruloidi e aneurismatici) mostrano perdita di eterozigosità (*loss of heterozygosity, LOH*) indice della loro origine neoplastica, mentre un tipo di vaso (collagenoso) non mostra LOH (Karbowniczek et al., 2003). La presenza di perdita di eterozigosità nei vasi sanguigni, nelle cellule muscolari lisce e in quelle adipose, e' in accordo con l'ipotesi che gli AMLs possano derivare da un comune precursore mesenchimale che ha la capacità di differenziarsi in differenti linee cellulari.

LINFANGIOLEIOMIOMATOSI (LAM)

La LAM è stata osservata nel 40% delle pazienti donne con TSC (Moss et al., 2001). La LAM e' caratterizzata dall'anormale proliferazione di cellule muscolari lisce nel polmone e nel sistema linfatico assiale, con il coinvolgimento dei linfonodi e dei dotti toracici. La conseguente alterazione della struttura polmonare determina insufficienza respiratoria nelle pazienti che nella fasi più avanzate della malattia sono costrette all'ossigenoterapia. La LAM sembra dipendere da stimoli ormonali di tipo estrogenico. La diagnosi precoce è difficile perchè spesso si confondono i sintomi della LAM con quelli di altre patologie come l'asma, l'enfisema e le bronchiti. Nelle fasi avanzate della malattia, l'insufficienza respiratoria diventa incompatibile con la vita ed è necessario il trapianto di polmone. Le pazienti affette da LAM possono sviluppare AMLs renali.

SCLEROSI TUBEROSA: GENETICA

L'analisi genetica molecolare delle famiglie affette da TSC ha permesso di identificare due loci genici indipendenti associati alla TSC sul cromosoma 9 e sul cromosoma 16. Il gene *TSC2* è stato identificato nel 1993 (*The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium*, 1993). In seguito, nel 1997, è stato isolato e clonato il gene *TSC1* sul cromosoma 9 (van Sleightenhorst et al., 1997).

TSC1 e *TSC2* sono geni oncosoppressori e la mutazione o la delezione di un solo allele è sufficiente affinché si manifesti la patologia. La trasmissione della TSC è, quindi, a carattere dominante.

Sono oggi note più di 400 diverse mutazioni a carico dei due geni *TSC1* e *TSC2*, con un'uguale distribuzione nell'ambito dei casi familiari e con una maggior frequenza di mutazioni a carico del gene *TSC2* nell'ambito dei casi sporadici. I pazienti con mutazioni a carico del gene *TSC1* hanno generalmente un fenotipo clinico più lieve con una minore frequenza di tubercoli corticali epilettogenici e ritardo cognitivo di grado più moderato, un minor numero di noduli subependimali, un coinvolgimento renale e cutaneo meno grave e assenza di amartomi retinici. Al contrario, le mutazioni del gene *TSC2* sono associate ad una più precoce comparsa di crisi epilettiche e ad una maggior frequenza di spasmi infantili.

La diversa natura degli amartomi osservati nei pazienti con TSC ha suggerito che questi tumori si possano sviluppare secondo la teoria del "doppio colpo" (*second hit*) proposta da Knudson (Knudson, 1971). Nei casi ereditari una prima alterazione genetica ("primo colpo") viene ereditata nella linea germinale da un genitore affetto, mentre la seconda mutazione ("secondo colpo") avviene in una cellula che ha già la prima mutazione. La seconda mutazione può causare la completa inattivazione di uno dei due geni della TSC, *TSC1* o *TSC2*, e, di conseguenza, perdita di eterozigotità. Prove a favore di questa ipotesi sono state fornite dallo studio genetico di tessuto prelevato da pazienti affetti da TSC in cui è stata dimostrata LOH per *TSC1* (Carbonara et al., 1994) o per *TSC2* (Henske et al., 1995). LOH è stata osservata prevalentemente negli AMLs, e in percentuale minore nei rhabdomiomi e nelle cellule LAM. LOH non è stata osservata con alta frequenza nei tubercoli corticali cerebrali (Henske et al., 2005) e

negli astrocitomi a cellule giganti subependimali (SEGA) (Han et al., 2004). Non è chiaro se l'inattivazione di entrambi gli alleli sia una condizione necessaria per la formazione degli amartomi. In uno studio condotto recentemente (Qui et al., 2010) sono stati sequenziati tutti gli introni codificanti dei geni *TSC1* e *TSC2* di 46 tuber corticali provenienti da pazienti TSC. Nell'81% dei campioni analizzati sono state identificate mutazioni della linea germinale in eterozigosi e solo in uno di questi è stato possibile dimostrare la presenza di LOH.

L'incapacità di determinare la seconda mutazione che causa il silenziamento dei geni TSC può essere attribuita alle metodiche finora a disposizione e al fatto che la maggior parte degli studi vengono condotti su campioni di tessuto e non su una popolazione cellulare omogenea. In una pubblicazione di Niida e colleghi (2001) sono stati analizzati 25 amartomi provenienti da 10 pazienti ed in nessuno dei campioni è stato possibile determinare il coinvolgimento di una modificazione epigenetica che determina l'inattivazione del secondo allele del gene. Recentemente, nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato che LOH può essere causata da fattori epigenetici che sono difficilmente individuabili a causa dell'eterogeneità dei tipi cellulari presenti negli amartomi (Lesma et al., 2009).

La metilazione del DNA, a livello delle isole CpG presenti nel promotore del gene, consiste nel legame covalente di gruppi metilici alle basi azotate del DNA ed è una modificazione epigenetica comune e importante che causa un rimodellamento della cromatina senza cambiamento dell'informazione genetica che viene conservata nel patrimonio genetico della cellula, ma non viene più tradotta in proteina. La metilazione delle citosine negli eucarioti è un evento molto frequente ed è associata a ridotti livelli di trascrizione dei geni. Grazie all'azione di alcuni enzimi, metiltransferasi specifiche, viene legato al C-5 della citosina un gruppo metile che la modifica in 5-metilcitosina. La metilazione delle isole CpG a livello della regione regolatrice di un gene determina il silenziamento del gene stesso poiché la cromatina non è più accessibile ai complessi di trascrizione. Molti geni umani contengono isole CpG all'interno della regione del promotore, e nelle cellule normali le isole CpG non metilate vengono protette dalla metilazione (Bailyn et al., 1998). La metilazione *de novo* delle isole CpG è un evento comune nella tumorigenesi e causa la perdita della funzione del gene in modo simile ad altri meccanismi come la delezione o le mutazioni puntiformi (Jones et al., 1999).

L'aploinsufficienza, dovuta alla presenza di un singolo allele di TSC1 o TSC2 funzionante, può essere osservata a livello centrale e in altre lesioni presenti in pazienti affetti da TSC (Kwiatkowski et al., 2003).

TSC1: è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 9 (9q34). *TSC1* è costituito da 23 esoni di cui 21 contengono sequenze codificanti. L'esone 2 è soggetto a *splicing* alternativo. Il trascritto primario ha una dimensione di 8.6 kb e contiene in posizione 3' e 5' due regioni non tradotte. *TSC1* codifica per la proteina amartina che è costituita da 1164 aminoacidi (AA). E' stato dimostrato recentemente che il gene *TSC1* è regolato dal fattore di trascrizione FoxO3a che si lega al promotore del gene transattivandolo (Khattri et al., 2010).

L'esone 15 ha un'elevata frequenza di mutazioni, è costituito da 559 bp e rappresenta il 16% della regione codificante. La percentuale di pazienti affetti da TSC con mutazioni sul gene *TSC1* è più bassa rispetto a quella dei pazienti con mutazioni sul gene *TSC2*. Le mutazioni osservate in *TSC1* sono rappresentate da piccole delezioni, inserzioni e mutazioni puntiformi, la maggior parte di queste sembrano inattivare la funzione del gene, poichè causano la formazione di una proteina tronca.

TSC2: è localizzato sul braccio corto del cromosoma 16, in posizione 16p13.3 ed è distante approssimativamente 2.25 Mb dal telomero ed immediatamente adiacente al gene della *PKD1*. E' costituito da 41 esoni e il suo trascritto primario ha una dimensione di 5.5 kb. Il prodotto del gene *TSC2* è una proteina, tuberina, costituita da 1807 AA, ampiamente espressa.

Tuberina possiede una regione di omologia con le proteine ad attività GTPasica (*GTP Activating Protein*) GAP3, e il prodotto del gene esiste in almeno tre forme diverse dovute a *splicing* alternativo.

Il gene *TSC2* è quello maggiormente soggetto a mutazioni ed è coinvolto in circa l'80% dei casi di sclerosi tuberosa, rispetto al 20% della patologia con mutazione su *TSC1*.

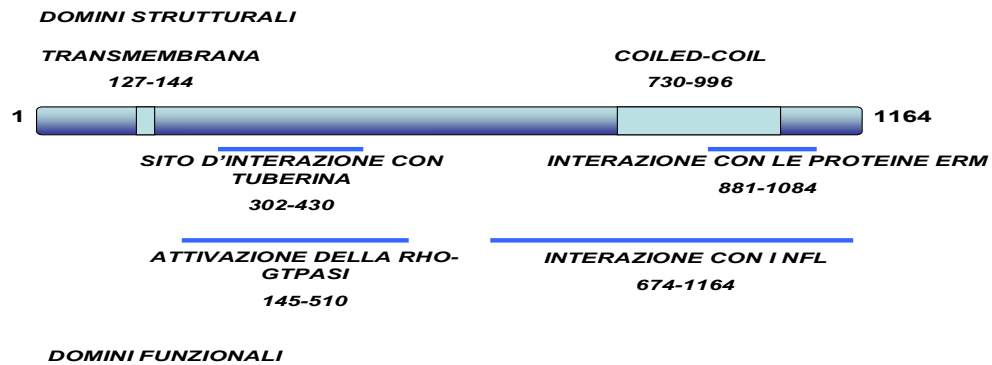
LOH del gene *TSC2* è stata documentata nell'AML, nel rhabdomioma cardiaco, nei tuberi corticali e negli astrocitomi a cellule giganti. Sul gene *TSC2* sono presenti mutazioni missenso, nonsense, delezioni, inserzioni e mutazioni a livello del sito di *splicing*.

Mutazioni a carico degli esoni 40 e 41 sono associate ad una più elevata incidenza di LAM che potrebbe far pensare che la parte carbossi-terminale della tuberina contenga un dominio in grado di controllare la proliferazione delle cellule muscolari lisce (Galina et al., 2000).

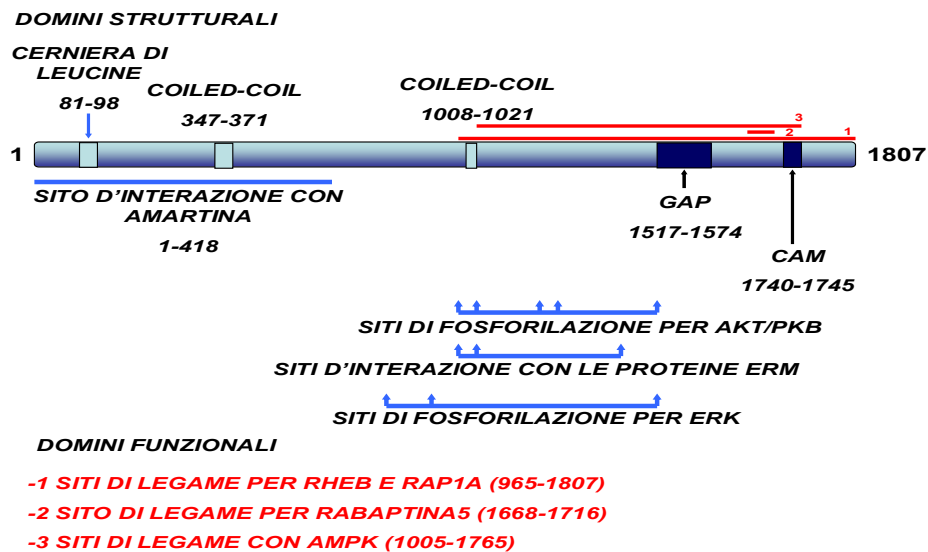
Il 6% delle pazienti con LAM presentano AMLs renali. Sono state riscontrate mutazioni identiche nel gene *TSC2* e nelle cellule di LAM e di AML, suggerendo che queste cellule potrebbero essere geneticamente correlate e, quindi, è stato ipotizzato che queste cellule possano generarsi da un progenitore comune (Karbowiczek et al., 2003). Questi dati suggeriscono, anche, che la LAM possa essere causata da metastasi benigne dovute a cellule con mutazioni in *TSC1* o *TSC2* che hanno acquisito la capacità di migrare dall'AML renale al polmone, o viceversa. Questa ipotesi è oggetto di studio e la comprensione dei meccanismi migratori delle cellule con mutazione nel gene *TSC1* o *TSC2* è uno degli aspetti chiave per correlare la LAM e la TSC e comprendere la capacità di metastatizzare delle cellule TSC. La LAM si manifesta nelle donne in età fertile suggerendo una possibile regolazione ormonale da parte degli estrogeni che potrebbero essere coinvolti nella migrazione delle cellule *TSC2*-deficienti (Crino et al., 2006).

IL COMPLESSO TUBERINA/AMARTINA (THC)

Amartina, il prodotto di *TSC1*, è composta da 1164 AA e pesa 130kDa. Amartina è espressa in modo ubiquitario (van Slegtenhorst et al., 1997), contiene un dominio putativo transmembrana tra gli AA 127-144, mentre tra gli AA 719-998 si trova un dominio *coiled-coil*. Tra i residui 145-510, amartina contiene un sito d'interazione con la proteina GTPasica Rho. I residui AA 881-1084 interagiscono con l'N-terminale delle proteine della famiglia ERM (ezrina-radixina-moesina) che lega l'actina (Lamb et al., 2000; Goncharova et al., 2004). Queste proteine sono espresse ubiquitariamente e collegano i filamenti di actina corticale alla membrana plasmatica, in questo modo organizzano il citoscheletro e agiscono come substrato per la tirosina chinasi del recettore del fattore di crescita epidermico. E' stato dimostrato che amartina interagisce anche con i neurofilamenti L (Haddad et al., 2002).



Tuberina è una proteina di peso molecolare di 200kDa codificata dal gene *TSC2*. La regione compresa tra gli AA 1517-1674, e codificata dagli esoni 34-38, ha un'omologia significativa con le proteine ad attività GTP-asi (GAP) Rap-1 GAP umana e Spa1 murina (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993). Rheb, una proteina della superfamiglia di Ras è il substrato dell'attività GTPasi di tuberina (Garami et al., 2003) con cui interagisce a livello dei residui 965-1807; in questa regione si trova anche il sito di legame per Rap1 (Castro et al., 2003).



Sono state identificate le regioni responsabili dell'eterodimerizzazione di tuberina e amartina (Crino et al., 2006). Il dominio d'interazione di amartina si trova nella regione tra gli amino acidi 302-430, mentre i primi 418 amino acidi di tuberina contengono il sito di legame con amartina. In assenza di fattori di crescita o stimolazione insulinica, amartina stabilizza tuberina e promuove la sua localizzazione sulla membrana intracellulare, dove è in grado di svolgere la sua attività GTPasica. In risposta a fattori di crescita, tuberina può essere fosforilata e inattivata dalla chinasi Akt, in questo modo si dissocia da amartina. Questo evento promuove la ricollocazione di tuberina nel citosol, dove si lega alle proteine 14-3-3 e viene altamente ubiquitinata. La dissociazione del complesso THC può essere dovuta anche dal legame di tuberina con l'ubiquitina ligasi HERC1 (Chong-Kopera et al., 2006). E' stato dimostrato che la degradazione di tuberina mediata dal proteosoma è indotta dal suo legame con l'oncoproteina E6 del papilloma virus umano (HPV16 E6), questo porta all'attivazione della chinasi ribosomiale S6 (S6K1), un substrato di tuberina (Lu et al., 2004). FIP200 (*FAK-family Interacting Protein*, di 200kDa) è stata recentemente identificata come un componente centrale nel regolare in modo coordinato differenti eventi cellulari attraverso la sua capacità d'interagire con diverse vie di trasduzione del segnale (Gan e Guan, 2008). E' stato dimostrato che il legame di amartina con FIP200 impedisce la formazione del complesso delle proteine THC (Gan et al., 2005). Un'altra proteina in grado di legare amartina e regolare la formazione del complesso THC è TBC7 (*TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) 1 domain protein*). L'interazione con questa proteina determina un aumento dell'ubiquitinizzazione e della degradazione di amartina (Nakashima et al., 2007).

Tuberina è stata identificata come il primo target citoplasmatico di HtrA1 una serina proteasi appartenente alla famiglia delle *heat-shock protein* umane. HtrA1 colocalizza con tuberina e si lega nella sua regione N-terminale causandone il clivaggio, questo evento determina l'aumento della fosforilazione della proteina che lega il fattore di elongazione 4E (4E-BP1) e S6K1. Poiché HtrA1 è particolarmente attiva durante l'embriogenesi, si è supposto che uno dei suoi principali target durante lo sviluppo fetale sia la via di trasduzione di TSC1/TSC2 (Campioni et al., 2010).

REGOLAZIONE DEL COMPLESSO THC

L'eterodimero TSC2/TSC1 integra le informazioni sullo stato energetico della cellula con la disponibilità di nutrienti e il segnale dei fattori di crescita.

Entrambe le proteine, amartina e tuberina, sono regolate dalla fosforilazione su molteplici siti.

Amartina viene fosforilata dalla chinasi 1 ciclina dipendente (CDK1) durante la fase G₂/M del ciclo cellulare (Astrinidis et al., 2003). E' stato dimostrato che amartina si localizza al centrosoma e interagisce con la chinasi mitotica Plk1, i cui livelli sono regolati negativamente dalla stessa amartina (Astrinidis et al., 2006). Amartina interagisce con le proteine che legano l'actina appartenenti alla famiglia delle proteine ERM e regola la formazione di adesioni focali attraverso un meccanismo mediato da Rho (Lamb et al., 2000). Amartina viene regolata negativamente anche dalla fosforilazione della chinasi IKK β sulla Ser487 e Ser511 probabilmente in maniera correlata alla risposta cellulare all'infiammazione (Lee et al., 2007).

Molte chinasi fosforilano tuberina regolando la sua attività come Erk, Akt, la chinasi attivata dall'AMP (AMPK), e la chinasi 3 glicogeno sintetasi (GSK3). I fattori di crescita inibiscono tuberina poiché attivano la via di trasduzione delle chinasi attivate dai mitogeni (MAPK) (Ras-Raf-MEK1/2-Erk1/2) e la via della fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) (PI3K-PDK1-Akt).

La famiglia dei recettori per l'EGF comprende quattro recettori: EGF/ErbB-1, HER (*Human Epidermal growth factor Receptor*)/ErbB-2, HER3/ErbB-3 e HER4/ErbB-4. Questi sono recettori transmembrana composti da un dominio catalitico extracellulare di legame con il ligando, e una regione citoplasmatica ad attività enzimatica.

Molecole simili ad EGF e il TGF α (*Transforming Growth Factor α*) attivano i recettori dell'EGF (EGFR) legandosi al dominio extracellulare, e inducono la formazione di un omodimero o di un eteromero recettoriale. La fosforilazione dei residui di tirosina dell'EGFR avviene presumibilmente a carico di altri recettori promuovendo la formazione di enzimi citoplasmatici e proteine adattatrici.

La successiva dissociazione di questi complessi coincide con il rilascio nel citoplasma di effettori ed adattatori che attivano diverse vie di trasduzione del segnale, come la cascata delle MAPK (con le molecole adattatrici attivanti Ras) e della via di PI3K/Akt (Yarden, 2001).

Il recettore per l'EGF lega la proteina Ras e l'attiva portandola alla forma Ras-GTP. Ras legata a GTP è in grado di attivare Raf (una serina/treonina chinasi) a cui si lega sulla regione amino-terminale. Raf attivata lega e fosforila MEK (*MAP kinase kinase*) che attiva Erk con una contemporanea fosforilazione su una treonina e su una tirosina (Payne et al., 1991). Erk fosforila direttamente tuberina su due siti principali: Ser664 e Ser540 (Ma et al., 2005). La fosforilazione di tuberina da parte di Erk conduce alla dissociazione del complesso. In linee cellulari TSC2^{+/-}, è stato osservato che, mutazioni del gene TSC2, rendono insensibile tuberina alla fosforilazione di Erk e bloccano la tumorigenesi nonostante l'attivazione costitutiva di Erk (Ma L. et al., 2005).

La p90 S6 chinasi ribosomiale (RSK1) fa parte della superfamiglia di chinasi basofile che regolano la sopravvivenza, la motilità e la divisione cellulare.

RSK1 è un substrato di Erk e fosforila direttamente tuberina sulla Ser1798 inibendo la formazione del complesso e causando l'aumento dell'attività di mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) sui suoi substrati (Roux et al., 2004).

I glucocorticoidi (GC) sono utilizzati come agenti antinfiammatori e immunosoppressivi. La via attivata dal legame dei GC con il loro recettore, interagisce con la via delle MAPK (Clark et al., 2003). Il desametasone, un GC di origine sintetica, sopprime l'attivazione di Erk in diversi sistemi cellulari (Kassel et al., 2001). I GC inducono l'espressione di un fattore di trascrizione che possiede un dominio a cerniera di leucine (GILZ) (Cannarile et al., 2001). GILZ si lega ed inibisce Raf-1 e di conseguenza inibisce i suoi bersagli (Ayroldi et al., 2002). E' stato osservato che l'aumento dell'espressione di GILZ inibisce la fosforilazione di Erk nelle cellule epiteliali del rene, confermando che GILZ è coinvolto nel controllo e nella modulazione della via delle MAPK attraverso una via attivata dagli ormoni glucocorticoidi (Soundararajan et al., 2005). GILZ interagisce direttamente con Ras inibendo la proliferazione e la trasformazione cellulare indotta dalla stessa proteina. Questo effetto è associato con una diminuzione della fosforilazione di Erk e Akt (Ayroldi et al., 2007).

L'insulina e i fattori di crescita insulino simili (IGFs) inibiscono il complesso TSC principalmente attraverso la fosforilazione mediata da Akt che inattiva tuberina. Il legame dei fattori di crescita insulino simili al loro recettore determina il reclutamento e la fosforilazione del substrato recettoriale IRS (*insulin receptor substrate*) e la conseguente attivazione di PI3K (Manning e Cantley, 2007). Questa chinasi una volta attivata determina la conversione del fosfatidilinositolo (4,5) bifosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo (3,4,5) trifosfato (PIP3), questo processo determina il reclutamento alla membrana plasmatica della chinasi Akt che viene, quindi, fosforilata e attivata dalla chinasi fosfatidilinositolo-indipendente-1 (PDK1) a livello della Thr308, e dalla PDK2 sulla Ser473 (Wullschleger et al. 2006). La conversione del PIP2 in PIP3 mediata da PI3K è revertita dalla fosfatasi PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*). PTEN è un oncosoppressore e la perdita della sua funzione causa un aumento dei livelli di PIP3 e dell'attività di Akt.

L'aggiunta di fattori di crescita o di siero a colture cellulari di mammifero determina la fosforilazione di tuberina da parte di PI3K. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che Akt è in grado di fosforilare tuberina su sette distinti residui (Dan et al. 2002). Mutazioni su due di questi residui, Ser939 e Thr1462, rendono tuberina insensibile alla fosforilazione da parte di Akt, allo stesso modo, l'espressione di una forma dominante negativa di Akt inibisce la fosforilazione di S6K dipendente dall'insulina (Manning et al. 2002). La fosforilazione di tuberina sul residuo di Ser939 in risposta allo stimolo con il fattore di crescita insulino simile di tipo I (IGF-I) è necessaria per la traslocazione del complesso dalla membrana al citosol, e per l'attivazione di mTOR (Myazaki et al., 2010).

L'espressione esogena di PTEN, un inibitore della via di PI3K/Akt, causa una diminuzione della fosforilazione di tuberina, e linee cellulari in cui PTEN è stato inibito mostrano una fosforilazione costitutiva di tuberina sulla Thr1462 (Inoki K, et al. 2002).

La fosforilazione di tuberina da parte di Akt può inibire la funzionalità del complesso sia diminuendo l'interazione tra tuberina e mTOR, sia causando l'aumento della degradazione dell'eterodimero attraverso la via del proteasoma.

Il complesso TSC è regolato negativamente da altre vie di trasduzione del segnale. E' stato recentemente dimostrato che tuberina può legarsi alla proteina

chinasi DAPK (*death-associated protein kinase*), che fosforila tuberina e causa la dissociazione del complesso (Stevens et al 2009). DAPK è una serina treonina chinasi con diverse funzioni, tra cui la regolazione dell'apoptosi e dell'autofagia in risposta a diversi segnali di morte (Bialik e Kimchi 2006). L'espressione esogena di DAPK in cellule HEK293 determina un aumento della fosforilazione di S6K1 e S6 in seguito alla deprivazione di siero, mentre, invece, il silenziamento di questa chinasi attenua l'attivazione di S6K1 e S6 dovuta alla via di trasduzione di Erk mediata dall'EGF (Bialik e Kimchi 2006). DAPK è inoltre in grado di fosforilare direttamente S6 sulla Ser235 (Schumacher et al. 2006). L'inibizione del complesso THC può essere causata anche dal legame del fattore di trascrizione FoxO1 a tuberina, questo determina la conseguente attivazione della cascata di mTOR (Cao et al. 2006). FoxO1 appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione FoxO1 che sono degradati in presenza d'insulina o di altri fattori di crescita attraverso la fosforilazione mediata da Akt e GSK, in assenza di fattori di crescita vengono traslocati nel nucleo dove regolano l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione del DNA (Greer e Brunet 2005).

Il complesso THC è invece attivato dall'AMPK e da GSK3. AMPK attiva tuberina tramite la fosforilazione sui residui di Thr1227 e Ser1345 attraverso un segnale mediato dalle riserve energetiche della cellula (Inoki et al. 2003). L'utilizzo di ATP per formare l'analogo del glucosio 2-desossiglucosio (2DG) causa un aumento della fosforilazione di tuberina e la conseguente diminuzione della fosforilazione degli effettori di mTOR, S6K e 4E-BP1 (Inoki K, et al. 2003).

Un elevato rapporto AMP/ATP determina un cambiamento conformazionale di AMPK che la rende un substrato più suscettibile all'azione di alcune chinasi come LKB1 (Shaw et al. 2004). Quando il rapporto tra l'AMP e l'ATP cellulare diminuisce, AMPK viene inibita da Akt che in questo modo può esercitare anche un controllo indiretto sull'inibizione di tuberina (Hahn-Windgassen et al. 2005). Nei fibroblasti embrionali murini deficienti di LKB1 (LKB1^{-/-} MEF) AMPK non è fosforilata e attivata determinando, quindi, un anormale segnale "a valle". I LKB1^{-/-} MEF sono simili ai fibroblasti murini TSC2^{-/-} (TSC2^{-/-} MEF) per quanto riguarda l'incapacità di regolare il segnale "a valle" di mTOR e inibire l'apoptosi durante i periodi d'insufficienza energetica (Shaw et al. 2004). La scarsità di

riserve energetiche induce l'attivazione di AMPK da parte di LKB1, in questo modo anche il complesso TSC viene attivato ed è in grado di regolare mTOR.

L'ipossia è un altro fattore in grado d'inibire il segnale di mTOR attraverso un meccanismo dipendente dal complesso TSC. Per questo processo è necessario la sintesi *de novo* di mRNA e l'aumento dell'espressione del gene indotto dall'ipossia RDD1. RDD1 agisce inibendo mTOR tramite il complesso TSC, infatti nelle cellule in cui tuberina non è espressa si ha un elevato livello di proliferazione anche in condizioni ipossiche (Brugarolas et al. 2004).

La fosforilazione di tuberina da parte di AMPK predispone la chinasi alla sua fosforilazione da parte di GSK3, dimostrando in questo modo un collegamento tra il segnale delle proteine Wnt e il complesso TSC (Inoki et al. 2004). Le proteine Wnt regolano molti aspetti della fisiologia cellulare come la proliferazione, il differenziamento, la crescita e lo sviluppo (Sofer et al. 2004). Le glicoproteine Wnt si legano ai recettori della famiglia *Frizzled* (FZ) determinando l'attivazione di *disheveled* (DSH) e la fosforilazione e inattivazione di GSK3 (Sofer et al. 2004).

Le proteine Wnt mediano l'attivazione di TORC1, infatti l'aumento della fosforilazione di S6K1 e 4E-BP1 è modulato dalla rapamicina (Inoki et al. 2004), mentre GSK3 fosforila e attiva tuberina sulla Ser1337 e sulla Ser1341 solo dopo la fosforilazione da parte di AMPK sulla Ser1345 (Inoki et al. 2004).

IL SEGNALE DI mTOR

Il complesso TSC è il principale regolatore cellulare di mTOR. Tuberina agisce come una GTPasi che attiva Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), una proteina G della famiglia di Ras (Garami et al. 2003). Quando Rheb lega il GTP è in grado di attivare mTOR (Long et al. 2005) prevenendo la sua associazione con il suo inibitore endogeno FKBP38 (Bai et al. 2007). Il complesso TSC inibisce l'attività di mTOR stimolando la conversione della forma attiva di Rheb legato la GTP alla forma inattiva legata al GDP (Inoki et al. 2003).

mTOR è una serina/treonina chinasi di 280kDa conservata nel corso dell'evoluzione che regola una gran numero di processi biologici che includono la crescita cellulare, la trasduzione, la trascrizione, la biogenesi ribosomale, l'autofagia e il metabolismo (Wullschleger et al. 2006).

mTOR è il componente centrale di due complessi: TORC1 e TORC2.

TORC1 è sensibile alla rapamicina. In questo complesso mTOR è legato a due proteine: raptor e mLst8/GβL. mTOR interagisce con i suoi substrati grazie a raptor. Raptor riconosce S6K1 e 4E-BP1 i quali possiedono un motivo TOS (*Tor Signaling*) (Schalm et al., 2002). Mutazioni di TOS in 4E-BP1 inibiscono la capacità della proteina di essere fosforilata da mTOR. Mutazioni di S6K1 riducono del 75% la capacità fosforilativa di mTOR su S6K1.

mLst8/GβL è invece necessaria per un'efficace risposta del complesso ai segnali provenienti dai nutrienti e dallo stato energetico cellulare (Kim et al., 2002). I nutrienti cellulari come gli AA, il glucosio e gli acidi grassi possono agire come mediatori della trasduzione del segnale in alcune vie intracellulari. La via di mTOR è attivata dalla stimolazione di alcuni AA, tra i quali il più importante è l'amminoacido leucina. L'aggiunta di AA, in assenza d'insulina o di altri fattori di crescita, causa una rapida e acuta fosforilazione dei due substrati di mTOR: p70S6K1 e 4E-BP1.

I nutrienti agiscono su mTOR indipendentemente dal complesso TSC (Smith et al., 2005). E' stato osservato che la presenza di amminoacidi attiva p70S6K1, ma non Akt/PKB; inoltre, i livelli di Rheb legato a GTP non cambiano in cellule TSC1^{-/-} e TSC2^{-/-} in seguito alla mancanza di AA. Questo suggerisce che gli AA attivano mTOR attraverso una via parallela a quella del complesso TSC (Nobukuni et al., 2005).

S6K1 è fosforilata da mTOR sulla Thr371 e Thr389 (Dufner e Thomas, 1999), quest'ultima fosforilazione determina l'attivazione della chinasi (Proud, 2007). S6K1 regola le dimensioni cellulari: la delezione del gene che codifica per la chinasi determina la riduzione delle dimensioni corporee nel topo (Potter, 2001). Questa regolazione è mediata dalla proteina ribosomale S6 che viene fosforilata sulla Ser235 e Ser236 (Shima H et al., 1998). Il segnale di mTOR mediato da S6K1 viene regolato da un *feed-back* negativo attraverso il substrato 1 del recettore insulinico (IRS1) (Um et al., 2004). L'aumento dell'attivazione della via di PI3K/Akt che porta all'attivazione della cascata di mTOR con aumento della fosforilazione di S6K1, determina l'attenuazione dell'attività della stessa via di trasduzione di PI3K/Akt. Nella via di attivazione di mTOR, sensibile agli AA, è coinvolta la PI3K di classe 3, o hVps34 (*Human Vacuolar protein sorting 34*). La

stimolazione delle cellule con AA porta ad un aumento di PIP3 che è il prodotto di hVps34. I livelli di PIP3 diminuiscono, invece, in mancanza di AA nel terreno di coltura (Byfield et al., 2005).

Nelle cellule TSC2^{-/-} questa via non è alterata; ciò è dimostrato dallo stato di attivazione di S6K1 in queste cellule (Nobukuni et al., 2005).

hVps34 sembra essere regolata anche da altri stimoli, come lo stress osmotico, suggerendo un possibile ruolo di questa proteina come un comune sensore per i nutrienti che porta alla stimolazione di S6K1 attraverso la via di mTOR (Byfield et al., 2005).

E' stato supposto che questa via di attivazione di TORC1 possa comunicare, tramite un *cross-talk*, con la via in cui agisce TORC2 e con altre vie metaboliche che operano nella cellula (Bauer et al., 2005). E' stato dimostrato che l'aumento del glucosio da solo può stimolare la sintesi proteica nel muscolo con elevata attività glicolitica (*fast-twitch glycolytic muscles*). La risposta del muscolo alla stimolazione con glucosio è stata associata ad un aumento della fosforilazione di Akt/PKB e della formazione del complesso d'inizio della traduzione eIF4E-eIF4G, ma non a cambiamenti nella fosforilazione della AMPK, del complesso TSC, di mTOR, di 4E-BP1, di p70S6K1 o di eEIF2. L'aumento di glucosio stimola la sintesi proteica nei neonati, e questa risposta è specifica per i muscoli ad elevata attività glicolitica e si attua attraverso una via indipendente da mTOR e AMPK (Jeyapalan et al., 2007).

mTOR regola la trascrizione attraverso l'inibizione di 4E-BP1, che nel suo stato defosforilato si lega e inibisce il fattore eucariotico d'inizio della trascrizione 4E (eIF4E). eIF4E riconosce e lega la porzione 5' dell'mRNA. 4E-BP1 subisce diverse fosforilazioni che iniziano sulla Thr37 e Thr46 e procedono sulla Ser65 e Thr70. In particolare, la fosforilazione di quest'ultimo residuo aumenta in seguito alla stimolazione con il siero in maniera sensibile a PI3K e alla rapamicina (Gingras et al., 2001). La fosforilazione di 4E-BP1 determina il rilascio di eIF4 e permette l'inizio della trascrizione. Topi *knockout* per 4E-BP1 mostrano importanti disfunzioni metaboliche come l'ipoglicemia, l'aumento del tasso metabolico e una significativa riduzione del tessuto adiposo bianco, dimostrando il coinvolgimento di questo effettore di mTOR nella regolazione del metabolismo e dell'adipogenesi (Tsukiyama-Kohara et al., 2001).

Il segnale mediato da mTOR è coinvolto anche nella regolazione dell'angiogenesi. mTOR regola i livelli di trascrizione e trasduzione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). L'inattivazione del complesso THC che determina un aumento del segnale di mTOR, causa un aumento dei livelli intracellulari del fattore di trascrizione indotto dall'ipossia 1α (HIF1 α), che a sua volta agisce sull'espressione di VEGF. Nei fibroblasti murini TSC2^{-/-} i livelli di HIF1 α e VEGF sono elevati e vengono normalizzati in seguito al trattamento con rapamicina, anche la trasfezione del gene TSC2 è sufficiente per ristabilire i livelli di HIF1 α (Brugarolas et al., 2003). mTOR regola la trascrizione di VEGF anche attraverso la fosforilazione di 4E-BP1 (Klos et al., 2006). L'inizio dell'angiogenesi è, inoltre, regolato da mTOR attraverso una via di trasduzione del segnale mediata dall'infiammazione che converge su I κ B. IKK β fosforila I κ B determinando la dissociazione del complesso THC con la conseguente attivazione di mTOR che causa l'aumento della produzione del VEGF e accelera l'angiogenesi (Lee et al., 2007).

TORC2 è costituito dall'associazione di mTOR con la proteina RICTOR e mLst8/G β L. E' stato dimostrato che questo complesso fosforila direttamente Akt/PKB sul suo dominio carbossi-terminale (Sarbasov et al., 2005). mLst8/G β L mantiene stabile l'interazione tra RICTOR e mTOR; sia mLst8/G β L che RICTOR sono necessari per la fosforilazione di Akt/PKB e la fosfochinasi C (PKC) (Guertin et al., 2006).

Sin1 (sinucleina 1) è stata identificata come componente del complesso TORC2, implicata nella formazione e nell'attività chinasi del complesso. La mancanza di Sin1 causa una diminuzione dei livelli di fosforilazione di Akt/PKB *in vitro* e una diminuzione della funzione della proteina *in vivo* (Yang et al., 2007). Recentemente sono stati identificati due nuovi specifici membri del complesso che appartengono alla famiglia di Bit61: PRR5 e PRR5L (meglio conosciuti come Protor 1 e Protor2) (Pearce, L.R. et al. 2007; Thedieck, K. et al. 2007).

TORC2 non è direttamente inibito dalla rapamicina, tuttavia, in alcuni tipi cellulari, è stato dimostrato che un trattamento prolungato con questo immunosoppressore può inibire indirettamente la formazione e l'attività del complesso TORC2 (Sarbasov et al., 2006).

E' stato dimostrato che mTOR è fosforilato in maniera specifica: in TORC1 mTOR è fosforilato sulla Ser2448, mentre in TORC2 sulla Ser2481 (Copp et al. 2009). Copp e colleghi hanno proposto che questa specifica fosforilazione può essere usata come *biomarker* per la sensibilità di TORC2 alla rapamicina. L'importanza funzionale di questa fosforilazione è tuttavia sconosciuta.

La prima funzione descritta di TORC2 è stata la regolazione dell'actina citoscheletrica. Il *knockdown* di specifici componenti del complesso di TORC2 in *vitro* causa l'alterazione dell'actina citoscheletrica (Jacinto et al. 2004). E' stato ipotizzato che TORC2 regoli l'actina attraverso Rho e la fosfochinasi C (PKC) (Sarbasov et al. 2004). La deregolazione dell'attività di TORC2 causa l'alterazione della motilità cellulare anche in alcuni tipi di cellule tumorali in cui in cui gioca un importante ruolo nella metastasi (Dada et al. 2008).

In un recente lavoro è stato ipotizzato che TORC2 sia regolato dai fattori di crescita attraverso il complesso TSC (Huang et al. 2008). A differenza della regolazione negativa su TORC1, il complesso TSC regola TORC2 positivamente in modo indipendente dalla sua attività GTPasica e senza coinvolgere Rheb, tuttavia il meccanismo attraverso cui TSC regola TORC2 rimane sconosciuto.

TORC2 può localizzarsi a livello della membrana plasmatica. E' stato dimostrato che la mancanza del proteoglicano *sydecin-4* riduce la localizzazione di TORC2 a livello delle frazioni insolubili (*rafts*) della membrana plasmatica. Sydecin-4 recluta PKC α e ne regola l'attività; questo evento è necessario per un'adeguata localizzazione di TORC2 a livello dei *rafts* e per la seguente attivazione di Akt (Partovian et al. 2008)

EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION (EMT)

L'EMT è un processo fondamentale durante lo sviluppo dell'organismo e la formazione dei diversi organi e tessuti. La transizione da cellula epiteliale a mesenchimale non è un evento irreversibile, poiché infatti la cellula può subire anche il processo inverso: *mesenchymal-epithelial transition* (MET). Entrambi questi processi sono necessari per il differenziamento finale dei diversi tipi cellulari e per l'acquisizione della struttura tridimensionale degli organi interni

durante l'embriogenesi. Durante il processo di EMT le cellule acquisiscono capacità migratorie e di invasività; l'EMT è coinvolto anche durante la riparazione dei tessuti e la progressione della metastasi tumorale. Nello stato mesenchimale la cellula possiede capacità migratorie e caratteristiche di staminalità, essendo in grado di staccarsi dal tumore primario e di migrare nel circolo sanguigno e/o linfatico per raggiungere il sito di metastasi dove può differenziarsi in diversi tipi cellulari.

La LAM e gli AMLs sono stati definiti come tumori mesenchimali costituiti da cellule epiteliodi perivascolari distinte a livello istologico e immunohistochimico (Folpe 2002). Questi tumori sono caratterizzati istologicamente dal loro aspetto epitelioide e dalla presenza di vasi sanguigni (Folpe 2002); l'immunofenotipo include cellule positive ai marcatori di melanociti (es. gp100) e ai marcatori di cellule muscolari lisce (es. α -actina), ma non sono presenti cellule che esprimono antigeni epiteliali.

E' stato ipotizzato che la LAM possa essere il risultato di un processo metastatico in cui un precursore cellulare sia in grado di migrare al polmone e invadere il parenchima (Henske, 2003). Le cellule LAM sono in grado di migrare *in vitro* (Goncharova et al., 2006), e sono state identificate nei fluidi corporei, come il sangue e le urine, indicando che le cellule LAM sono in grado di staccarsi dal tumore primario ed entrare nel circolo (Crooks et al., 2004). In supporto a questa ipotesi è stato osservato che la LAM si ripresenta dopo il trapianto di polmone (Bittmann et al., 2003) e che la stessa mutazione sul gene *TSC2* presente nelle cellule del polmone si trova anche nelle cellule presenti nei linfonodi dello stesso individuo (Karbowiczek et al., 2003). Il fenotipo delle cellule LAM non è né di origine epiteliale né mesenchimale, ma piuttosto una miscela di cellule di origine epitelioide e di tipo muscolare, suggerendo un *pattern* di differenziamento variabile pur avendo un'origine clonale (Krymskaya, 2008). E' stato supposto che la presenza di tumori di origine mesenchimale nei reni dei pazienti TSC possa indicare che amartina e tuberina siano responsabili della regolazione del differenziamento di un precursore cellulare renale coinvolto nella patogenesi degli AML TSC (Karbowiczek, M. & Henske, E.P. 2005). Queste osservazioni riguardo alla capacità migratoria delle cellule LAM, al loro potenziale metastatico e all'alterato differenziamento sono in accordo con l'ipotesi che queste cellule potrebbero andare incontro ad EMT.

E-caderina è una proteina presente sulla superficie cellulare nelle giunzioni di aderenza cellula-cellula. La perdita dell'espressione di E-caderina è considerato un evento fondamentale nell'EMT. Questa proteina può essere repressa a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Tra i fattori di trascrizione che reprimono l'attività del promotore di E-caderina c'è SNAIL (Thiery et al., 2009). Oltre alla sua funzione inibitoria su E-caderina, SNAIL è considerato un induttore dell'EMT, infatti elevati livelli di SNAIL sono stati associati a una forma aggressiva di cancro alla mammella (Edmokinova et al., 2009). In un recente studio di Barnes e colleghi (2010) è stato dimostrato che nelle cellule $TSC2^{-/-}$, isolate da ratti Eker, la localizzazione alla membrana di E-caderina è regolata dalla via Akt/TORC1, sensibile alla rapamicina. Inoltre, la perdita di $TSC2$ causa una significativa riduzione della presenza di E-caderina nella membrana plasmatica e una ridotta adesione cellula-cellula. Le cellule tuberina deficienti vanno incontro ad EMT poiché i livelli di SNAIL aumentano, sono in grado di crescere in sospensione e sono resistenti all'*anoikisi*.

MATERIALI E METODI

ISOLAMENTO DELLE LINEE CELLULARI PRIMARIE

Isolamento Delle Cellule Dall'angiomiolipoma

Nelle unità di Nefrologia e Chirurgia che afferiscono al gruppo di ricerca che studia la TSC presso l'ospedale San Paolo dell'Università di Milano, ad un paziente è stato asportato un AML dal quale sono state isolate colture cellulari in seguito a passaggi di dissociazione del tessuto. Il tessuto è stato sminuzzato e dissociato con collagenasi di tipo II (3µg/ml) (Sigma) e tripsina (2,5%) (Euroclone) meccanicamente, spipettando ad intervalli di 10-15' a 37°C. Gli enzimi sono stati neutralizzati con il terreno di coltura contenente siero e i campioni sono stati centrifugati. Il pellet è stato risospeso nel terreno *Type II Complete Medium* (costituito da DMEM e Ham-F12 in proporzione 1:1 e addizionato con il 15% di siero fetale bovino, EGF 10 µM, idrocortisone $2 \cdot 10^{-7}$ M, FeSO₄ $1,6 \cdot 10^{-6}$ M, 1% streptomicina/penicillina, 0,5% glutammina 200mM) (Arbiser et al., 2001) e le cellule sono state piastrate in petri.

Isolamento Delle Cellule Dal Chilo

Nell'ambito del Programma di Studio e Cura della Sclerosi Tuberosa attivo presso il Polo San Paolo, è stata arruolata una paziente affetta da LAM/TSC. Questa donna soffriva di chilotorace una complicanza della LAM causata dal versamento di liquido linfatico, chilo, nella cavità pleurica. La paziente ha donato al nostro laboratorio il chilo che gli è stato drenato. Il chilo è stato centrifugato a 1200rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il sovrantante è stato rimosso e il pellet è stato lavato 3 volte con PBS1X a 1200rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 10ml di *Type II Complete Medium* e piastrato in petri.

Lo studio è in accordo con gli standard etici stabiliti nella Dichiarazione di Helsinki e che il consenso informato è stato ottenuto da tutti i partecipanti prima del loro arruolamento allo studio.

MANTENIMENTO DELLE CELLULE

Le cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} ASM e le cellule provenienti dal chilotorace crescono adese alle petri. Il terreno, *Type II complete medium*, è stato cambiato ogni due o tre giorni.

Il terreno utilizzato per le cellule muscolari lisce VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cells*), per le cellule MCF7 (*Michigan Cancer Foundation - 7*), per le

cellule COS-7 (*cells being CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material*), e per le cellule A549 (cellule epiteliali di adeno carcinoma umano), scelte come controllo nei nostri esperimenti, è il *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

Quando è stata raggiunta la confluenza le cellule sono state lavate in PBS 1X, incubate con tripsina-EDTA 0,05% (Euroclone) e staccate dalla petri spipettandole più volte nel terreno di coltura. Le cellule sono state piastrate ottenendo generalmente due nuove petri a confluenza. Il giorno seguente al passaggio di tripsinizzazione il terreno è stato aspirato e cambiato.

Soluzioni:

Type II complete medium:

- DMEM (Euroclone)/Ham-F12 (Euroclone)
- 2×10^{-7} M idrocortisone (Sigma)
- $1,6 \times 10^{-6}$ M FeSO₄ (Sigma)
- 10 µM EGF (Sigma)
- 15% FBS (Euroclone)
- 1% streptomicina/penicillina (Euroclone)
- 0,5% glutamina 200 mM (Euroclone)

DMEM:

- 10% FBS (Euroclone)
- 2% penicillina/streptomicina (Euroclone)
- 1% glutamina (Euroclone)

PBS 1X:

- 137 mM NaCl (Sigma)
- 2,7 mM KCl (Sigma)
- 1,47 mM KH₂PO₄
- 8,1 mM NaHPO₄ (Sigma)

CONSERVAZIONE DELLE CELLULE

Le cellule, una volta staccate meccanicamente dalla piastra, vengono raccolte in una nuova provetta sterile e centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti. Viene eliminato il surnatante e il pellet viene risospeso in 1 ml di terreno di congelamento. Le cellule vengono congelate a -80°C e successivamente in azoto liquido. A causa delle esigenze sperimentali, le cellule sono state

scongolate velocemente a 37°C, risospese e piastrate in *Type II complete medium*. Il congelamento-scongelo ha permesso di effettuare esperimenti comparabili in tempi successivi.

Soluzioni:

Terreno di congelamento:

- *Type II complete medium*
- 20% FBS
- 10% DMSO

CONTA DELLE CELLULE MEDIANTE CAMERA DI NEUBAUER

Dopo aver staccato le cellule dalla petri con tripsina 0,005%, una piccola aliquota della sospensione cellulare (10µl) è stata caricata nella camera di Neubauer. La conta è stata eseguita sulla media ottenuta dal conteggio relativo ai quattro campi che compongono la camera stessa.

IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule sono state piastrate su vetrini e dopo qualche giorno dal piastramento il terreno viene aspirato e le cellule lavate con PBS 0,01M e lasciate asciugare a temperatura ambiente. In seguito le cellule sono state permeabilizzate con Cytoskelfix (Cytoskeleton, Denver, CO, USA). I vetrini sono stati incubati per 1 ora e 45 minuti a temperatura ambiente con tampone di blocco dei siti aspecifici; sottoposti a tre lavaggi di 5 minuti in PBS 0,01M e quindi incubati per una notte a 4°C in una camera umida con gli anticorpi primari specifici ad una diluizione 1:100 in PBS 0,01M, 1,5% di BSA e Triton 0,1%.

Gli anticorpi utilizzati sono:

- α-actina per le cellule muscolari (Sigma)
- HMB-45 marcatore di cellule TSC2 (Dako)
- Tubulina (C-20) (Santa Cruz)
- Vimentina (Santa Cruz)
- CD44v6 marcatore di cellule LAM (Invitrogen)
- Amartina (donato dal Dr. Nellist e dal Dr. Halley, Erasmus University, Rotterdam, Netherlands)
- Cheratina 8/18 (Santa Cruz)
- S100 (Dako)

- E-caderina (Cell Signaling)

Sono stati compiuti tre lavaggi da 10' ciascuno in PBS 1X. I vetrini sono stati incubati per 3h al buio a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti-coniglio o anti-topo coniugati a FITC (Alexa) o a Rodamina (Alexa), ad una diluizione 1:100. Al termine sono stati effettuati tre lavaggi con PBS della durata di 10' ciascuno. I vetrini sono stati montati con *Fluorsave* (Calbiochem), a cui è stato aggiunto 1 µg/ml di DAPI (4,6diaminio-2-fenilIndoledidrodoride) (Pierce). Il DAPI è un colorante fluorescente specifico per il nucleo, s'intercala al DNA nelle sequenze ricche di A-T, viene eccitato nell'ultravioletto ed emette solo nel blu. I preparati sono stati osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini sono state acquisite grazie al sistema LEICA IM 1000 IMAGE MANAGER nell'esperimento di reversione del fenotipo e con microscopio confocale (LEICA DMIRE2).

Soluzioni

Tampone di blocco:

PBS 1X

Triton (0,1%)

FBS (10%)

BSA (1,5%)

PBS pH 7,4:

PBS 1X

TRATTAMENTO DELLE CELLULE

Effetto dei rimodellanti della cromatina: le cellule TSC2^{-meth} sono state trattate per 2 giorni con tricostatina A (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 3.3mM; con 5-azacitidina (Sigma-Aldrich) per 96 ore alle concentrazioni di 1 o 10 µM; e con i composti sintetici BDTCOCF₃ e BDT2COCF₃ alle concentrazioni di 1nM, 100nM, 1µM e 50µM per 72 ore.

Analisi di apoptosi: per l'analisi dell'apoptosi con il metodo del TUNEL, le cellule TSC2^{-meth} sono state trattate con rapamicina alle concentrazioni di 1 ng/ml e 5 ng/ml al momento del piastramento e 3 ore dopo. L'effetto sull'apoptosi è stato valutato dopo 10 giorni d'incubazione. Per l'analisi con il TUNEL, le cellule VSMC sono state incubate con staurosporina (100 nM) per un'ora e 30 minuti.

Effetto di rapamicina e dell'anticorpo anti-EGFR sulla fosforilazione di S6 ed ERK: le cellule TSC2^{-meth} e le cellule LAM/TSC per 24 ore e 6 giorni con rapamicina (Roche) alle concentrazioni di 1 e 5 ng/ml e con anticorpo anti-EGFR (Calbiochem; 5 µg/ml) 3 ore dopo il piastramento.

Valutazione della via di PI3K/Akt: prima della valutazione tramite western blotting le cellule sono state incubate per 2 ore con IGF-I (50 ng/ml) con o senza LY24002 (20 µM) (Sigma), con rapamicina (1ng/ml) in presenza o in assenza di LY24002.

Proliferazione cellulare: le cellule TSC2^{-meth} e le cellule LAM/TSC isolate dal chilo sono state trattate fino a 30 giorni con gli anticorpi anti-EGF-R e anti-IGF-IR alla concentrazione di 5 µg/ml, con IGF-I alla concentrazione di 50ng/ml, e per 24 giorni con rapamicina (1 e 5 ng/ml) aggiunta al terreno standard al momento del piastramento e 3 ore dopo il piastramento. La valutazione della crescita cellulare è stata effettuata ai tempi indicati, contando le cellule con camera di Neubauer.

RACCOLTA DELLE CELLULE

Le cellule sono state lavate in PBS 1X e staccate meccanicamente con l'aggiunta di *lysis buffer* per permettere la lisi delle membrane plasmatiche. I campioni sono stati sottoposti a 3 cicli di congelamento e scongelamento rapido in azoto liquido o ghiaccio secco e bolliti per 10' a 100°C.

Soluzioni:

Lysis buffer:

- 5 mM EDTA (Sigma)
- 3% SDS (Sigma)
- 0,1 M CH₃COONa (Sigma)
- 0,4mM PMSF (Sigma)
- 1mM Sodio azide (NaN₃) (BDH)
- 1mM Benzamidina (Sigma)
- 10µg/ml Aprotinina (Sigma)
- 5µg/ml Leupeptina (Sigma)

OMOGENEIZZAZIONE DEI TESSUTI

Campioni di fegato, cute e dell'AML asportati dalla paziente nelle unità di Nefrologia e Chirurgia che afferiscono al gruppo di ricerca che studia la TSC presso l'ospedale San Paolo/Università di Milano sono stati omogeneizzati con politron nel tampone di omogeneizzazione. Successivamente sono stati centrifugati 15' a 3000 rpm a 4°C ed è stato raccolto il surnatante.

Soluzioni:

Tampone di omogenizzazione:

- 25mM Tris pH 7,4 (Sigma)
- 0,4mM Acido 1,2-Di(2-aminoetossi)etano-N,N,N',N'-tetraacetico (EGTA) (BDH)
- 0,4mM PMSF (Sigma)
- 1mM Sodio azide (NaN₃) (BDH)
- 1mM Benzamidina (Sigma)
- 10µg/ml Aprotinina (Sigma)
- 5µg/ml Leupeptina (Sigma)
- 250mM Saccarosio (Sigma)
- 1% Triton X-100 (Merck)

DOSAGGIO PROTEICO: METODO DI LOWRY-CIOCALTEAU'S

Un'aliquota dell'omogenato cellulare è stata prelevata per determinare la concentrazione proteica dei campioni. Ad ogni aliquota è stata aggiunta un'opportuna quantità di NaOH 0,5N (Sigma) allo scopo di solubilizzare le proteine e di creare un ambiente basico, necessario per la reazione colorimetrica. Ai campioni sono stati aggiunti 4ml del reagente, composto da NaCO₃ (2%; Merk), da CuSO₄ (0,005%; BDH) e da NaK (0,01%; BDH), rispettivamente in rapporto 50:0,5:0,5. Dopo 10' sono stati aggiunti 400µl di Folin Ciocalteau's (Fulka Buchs) diluito in rapporto 1:1 con acqua deionizzata. I campioni sono stati incubati a 37°C in un bagno termostato per 30'. La determinazione quantitativa è stata effettuata con uno spettrofotometro a 605nm. La concentrazione delle proteine è stata calcolata su una retta di taratura costruita coi valori ottenuti da campioni contenenti concentrazioni note di albumina sierica.

Soluzioni:

Reagente C:

- 2% NaCO₃ (Sigma)
- 0,005% CuSO₄ (Sigma)
- 0,01% NaK (Sigma)

ELETTROFORESI SU GEL DI SDS PAGE

Ogni campione è stato incubato con acido tricloroacetico (TCA) (Sigma) al 20%, per facilitare la precipitazione delle proteine, e centrifugato a 14000 rpm per 20'. Sono stati caricati 50 µg di campione in ogni pozzetto. Il pellet, costituito dalle proteine totali di ogni gruppo sperimentale, è stato trattato con TRIS, per tamponare il pH acido dovuto al trattamento con TCA a cui è stato aggiunto *Laemmli Sample Buffer*. I campioni sono stati processati elettroforeticamente tramite SDS-PAGE. È stata utilizzata come standard una miscela di proteine con un peso molecolare compreso fra 250 KDa e 10 KDa (BioRad).

WESTERN BLOTTING

Dopo essere state separate per elettroforesi, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham). Prima del trasferimento, il gel e la membrana sono stati equilibrati in transfer buffer mantenuto a 4°C. Il trasferimento è avvenuto per 2 ore e 30 minuti in orizzontale a 30V. Per verificare l'avvenuto trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata colorata con *Ponceau's* ed il gel è stato colorato con *staining solution* e decolorato con *destaining solution* in costante agitazione. La membrana è stata incubata per 2-3 ore con latte in polvere (Merck) al 5% in T-TBS 1X. L'incubazione è avvenuta a temperatura ambiente in continua agitazione. Sono stati eseguiti poi sulla membrana due lavaggi da 10' ciascuno in T-TBS e quindi è stata messa ad incubare con l'anticorpo specifico per le proteine d'interesse.

Gli anticorpi utilizzati sono:

- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-fosfo-S6 (titolo 1:1000) di topo che riconosce la forma fosforilata di S6 a livello della Ser235/236, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-S6 (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la proteina ribosomiale S6, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)

- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-fosfo-tuberina (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la forma fosforilata della tuberina umana a livello della Thr1462, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Santa Cruz)
- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-tuberina (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la sequenza N-terminale (N-19) della tuberina umana, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-tuberina (titolo 1:500) di coniglio che riconosce la sequenza carbossi-terminale della tuberina umana a livello degli amminoacidi 1535-1784, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Santa Cruz)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-fosfo-Erk (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la forma fosforilata di Erk a livello della Thr202 e della Tyr204, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-Erk (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la MAP chinasi p42/44 Erk, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti- β -actina (titolo 1:1000) di topo riconosce un epitopo localizzato nella sequenza ammino-terminale della β -actina, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Sigma)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-fosfo-Akt (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la forma fosforilata di Akt a livello della Ser473, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-Akt (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la chinasi Akt, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-p53 (titolo 1:100) di coniglio che riconosce l'oncosoppressore p53, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Santa Cruz Biotechnology)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG2a anti-p21 (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce l'oncosoppressore p21, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-fosfo-PTEN (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la forma fosforilata di PTEN a livello della Ser380 e della Thr382/383, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)

- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-PTEN (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la forma fosforilata di PTEN a livello della Ser380 e della Thr382/383, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-E-caderina (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce la glicoproteina E-caderina, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo monoclonale IgG anti-SNAIL (titolo 1:1000) di coniglio che riconosce il fattore di trascrizione SNAIL, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Cell Signaling)
- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-ciclina D1 (titolo 1:100) di coniglio che riconosce un peptide nella regione carbossi-terminale della proteina, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Santa Cruz)
- ✓ anticorpo policlonale IgG anti-vimentina (titolo 1:1000) di capra che riconosce un peptide nella regione carbossi-terminale della proteina, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Santa Cruz)
- ✓ anticorpo policlonale IgG CdK4 (titolo 1:100) di coniglio che riconosce un peptide nella regione carbossi-terminale della proteina, l'incubazione è avvenuta *over-night* (Santa Cruz)

Al termine dell'incubazione sono stati compiuti due lavaggi di 10' ciascuno in T-TBS. L'anticorpo secondario IgG anti-coniglio-HRP (Pierce) o anti-topo (Pierce) (titolo 1:5000 e 1:10000 rispettivamente) è stato incubato per 1h a temperatura ambiente. Sono stati effettuati tre lavaggi in T-TBS e uno in TBS della durata di 10' ciascuno.

Per il riconoscimento del complesso antigene-anticorpo è stato utilizzato il kit Super Signaling Chemiluminescent Substrate (Pierce), che contiene luminolo e soluzione stabile di perossido d'idrogeno. L'anticorpo secondario coniugato con una perossidasi reagisce con il perossido: la fluorescenza emessa dal luminolo attivato in corrispondenza delle proteine d'interesse (emissione luminosa della lunghezza d'onda di 425 nm) impressiona la lastra (lastre kodak-X-OMAT AR 5).

Ogni membrana è stata riutilizzata più volte dopo essere stata incubata nella soluzione di *Restore* (Pierce) per 7' a temperatura ambiente per eliminare il legame con gli anticorpi in precedenza utilizzati.

Soluzioni:

Running gel 10X:

- 0,375 M Tris
- 13% acrilamide (Biorad)
- 0,34% bisacrilamide (Biorad)
- 0,1% SDS
- Temed (1:2000) (Biorad)
- 1% ammonio persolfato (AP) (Biorad)

Stacking gel:

- 0,125M Tris
- 3% acrilamide
- 0,008% bisacrilamide
- 0,1% SDS
- Temed (1:1000)
- 1% AP

Electrode buffer 1X:

- 1,29 mM glicina (BDH)
- 1% SDS
- 250 mM TRIS

ANALISI DI PERDITA DI ETEROZIGOSITA'

I micro satelliti vicino al locus del gene *TSC2* sul cromosoma 16p13.3 sono D16S287, D16S291, D16S525, D16S663, D16S664, D16S3024 and D16S3394. I primers sono stati marcati con la sonda fluorescinata 6-FAM (M-Medical, Cornaredo, Italy). Le sequenze dei primers sono state ottenute da Genome Database (www.gdb.org). La perdita di eterozigosità è stata analizzata come precedentemente descritto da Lesma et al. (2005).

ANALISI DI METILAZIONE

Per quantificare i livelli di metilazione del promotore di *TSC2* è stata utilizzata la tecnica del *pyrosequencing*. Sono state analizzate le isole CpG precedentemente studiate con il saggio con gli enzimi di restrizione sensibili alla metilazione. Dopo l'estrazione, il DNA genomico è stato modificato con bisolfito in modo da convertire le citosine non metilate in uracile e quindi poter

distinguere i siti metilati delle sequenze studiate. La conversione con bisolfito è stata ottenuta utilizzando *EZ DNA methylation kit* (Zymo Research, Orange, CA). In seguito alla conversione con bisolfito, un volume di 50 µl è stato amplificato tramite PCR con 2,5U di Promega Go-Taq Start Polymerase (Promega). I primer per le sequenze modificate sono: *forward primer* 5_-tтыgtagaggggyggtatagaat-3_ (chr16: 2037,899-2037, 921, UCSC Genome Browser) e *reverse primer* 5_-acactacraaatccrcctctc-3_ (chr16: 2038,141-2038,121, UCSC Genome Browser).

40 µl del prodotto di PCR sono stati utilizzati per l'analisi al pyrosequencing utilizzando il *primers* 5_-atyggaagtgygggt-3_ (chr16: 2037,969-2037,983, UCSC Genome Browser).

La reazione è stata eseguita con il sistema PSQ HS 96 (Biotage, Uppsala, Sweden) con l'utilizzo di reagenti Pyro Gold (Biotage). La metilazione è stata quantificata con Pyro Q-CpG Software (Biotage), che calcola il rapporto tra le citosine convertite e non di ogni CpG Island. Come controllo normale è stato utilizzato DNA genomico proveniente da linfociti del sangue periferico.

ANALISI DELL'APOPTOSI COL METODO DEL TUNEL

Le cellule apoptotiche sono state esaminate con la tecnica del TUNEL utilizzando un sistema colorimetrico *in situ* DeadEnd (Pierce). È stato seguito il protocollo del kit, le cellule sono state fissate per 25 minuti in paraformaldeide al 4%, lavate 2 volte in PBS per 5 minuti, permeabilizzate in triton X-100 al 0,2% per 5 minuti, e lavate 2 volte in PBS per 5 minuti. Le cellule sono state poi incubate con il mix di reazione rTdT per un'ora a 37°C, quindi, le perossidasi endogene sono state bloccate con perossido d'idrogeno allo 0,3% per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione con streptavidina-HRP, le cellule apoptotiche sono state localizzate usando la 3',3'-diaminobenzide tetraidrocloride. Sono state contate le cellule positive al TUNEL, i dati presentati si riferiscono ad una media delle percentuali.

MARCATURA CON PKH26

Le cellule LAM/TSC isolate dal chilo sono state contate e, quindi, centrifugate in terreno privo di siero a 1200 rpm per 5 minuti e lavate 2 volte in PBS 1x. Il surnatante è stato aspirato lasciando circa 25 µl di PBS 1x nei quali sono state

risospese le cellule. Alla sospensione cellulare è stato aggiunto il diluente C (Sigma) con una proporzione di circa 500 µl ogni 500.000 cellule e la PHK26 (Sigma) alla concentrazione di 4×10^{-6} M incubando per 4 minuti a 37°C e agitando di tanto in tanto per favorire la marcatura. La reazione è stata bloccata aggiungendo una quantità di siero pari al volume della sospensione cellulare lasciando incubare per 1 minuto a temperatura ambiente e quindi aggiungendo terreno standard e risospesando le cellule. Le cellule sono state centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e lavate in PBS 1x per 2-3 volte. Al termine il pellet è stato risospeso nell'opportuno volume di terreno *Type II complete*.

VALUTAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA CELLULARE CON TRYPAN BLUE

Le cellule LAM/TSC isolate dal chilo in sospensione sono state centrifugate a 1200rpm per 10 minuti, risospese in PBS1X e incubate per 10 minuti con *Trypan Blue* (1:100) (SIGMA). Le cellule vitali e quelle che risultano blu per aver incorporato il *Trypan Blue* sono state contate con camera di Neubauer al microscopio ottico invertito. La colorazione è indice della rottura della membrana cellulare e conseguentemente di morte cellulare. La sopravvivenza è stata valutata rapportando il numero di cellule che non hanno incorporato il *Trypan Blue* su il numero di cellule totali.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Analisi della fosforilazione di S6: le cellule LAM/TSC isolate dal chilo (1×10^6), sia sospese che adese alla petri, sono state lavate due volte con PBS1X e centrifugate a 1200rpm per 10 minuti e, quindi, fissate con *fixation buffer* (BD) per 30 minuti a 4°C. I campioni sono stati permeabilizzati con *Perm/Wash buffer* (BD) per 30 minuti a 4°C. L'incubazione con l'anticorpo monoclonale di topo anti-fosfo-S6 (titolo 1:100), che riconosce la fosforilazione della Ser235 e 236 ed è marcato con Alexa fluor 647 (BD), è avvenuta per 1 ora a 4°C. Al termine dell'incubazione sono stati compiuti due lavaggi di 10' ciascuno in PBS1X. I campioni sono stati analizzati con BD FACS Canto II (BD) utilizzando il *software FACS Diva version 6.1.3*.

Analisi del ciclo cellulare: le cellule floating e adese LAM/TSC isolate dal chilo e le cellule VSMC (1×10^6) sono state lavate con *saline GM* fredda. I campioni

sono stati fissati con etanolo freddo (concentrazione finale 70%) e infine marcati con ioduro di propidio (10µg/ml) ed RNAsi (1mg/ml) *over-night* a 4°C. I campioni sono stati centrifugati a 1200rpm e risospesi in PBS1X e, quindi, analizzati con FACS Cytomics FC500 (Beckman Coulter) utilizzando il *software CXP software*.

Soluzioni:

Saline GM:

- glucosio 1,1gr/Lt
- NaCl 8gr/Lt
- KCl 0,4gr/Lt
- NaHPO₄2HO₂ 0,2gr/Lt
- KH₂PO₄ 0,15gr/Lt
- EDTA 0,5mM

ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

I dati sperimentali ottenuti dai diversi tipi di analisi effettuate sono stati espressi come media ± deviazione standard (s) di almeno quattro misurazioni distinte. Quando si confrontano medie ricavate da più campioni occorre determinare quale test statistico sia più specifico per accertare se esiste una differenza significativa tra i diversi campioni esaminati, prima di saggiare se una qualsiasi coppia di campioni in esame differisce significativamente da un'altra. Per il confronto tra due campioni si è utilizzato il test di Student (t di Student).

T di Student: è riferito a distribuzioni statistiche di piccoli campioni di ampiezza N, estratti da una popolazione normale (o cosidarabile tale) con media m.

Vogliamo saggiare l'ipotesi che m₁ (media campionaria estratta da un campione con n₁ osservazioni indipendenti) sia uguale a m₂ (media campionaria con n₂ osservazioni indipendenti).

Il valore di t si calcola mediante la seguente formula:

$$t = (m_1 - m_2) / [s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}] \quad \text{con } n-2 \text{ gradi di libertà}$$

dove:

m₁ è la media campionaria del campione 1

m₂ è la media campionaria del campione 2

s è la deviazione standard

n₁ e n₂ sono il numero di osservazioni indipendenti rispettivamente dei campioni 1 e 2

Al valore t calcolato (t_c) corrisponde la probabilità $P = \Pr(t > t_c)$ per il test monodirezionale. Se il valore P è inferiore o uguale al valore "a" (significatività) prefissato, la differenza deve essere considerata significativa. Se è superiore indica che la differenza tra le medie m_1 e m_2 è casuale.

Per determinare il valore di "a" si utilizza un'apposita tabella delle distribuzioni t di probabilità, dove se $P < 0,05$, la probabilità che la differenza tra i due campioni sia significativa è del 95%, se $P < 0,01$ la probabilità è del 99%, e se $P < 0,001$ la probabilità è del 99,9%.

SCOPO DELLA
RICERCA

Lo scopo di questo studio è stato isolare e caratterizzare linee cellulari umane primarie derivate da un AML asportato ad un paziente TSC e dal versamento chiloso di una paziente affetta da LAM/TSC al fine di ottenere un modello *in vitro* di cellule TSC e LAM umane in cui la perdita di tuberina è dovuta a una mutazione costitutiva sul gene *TSC2*. L'uso di questi modelli sperimentali ci ha permesso di studiare i meccanismi biochimici coinvolti nell'iperproliferazione di queste cellule e gli eventi epigenetici che determinano la mancanza di tuberina al fine di proporre un nuovo approccio terapeutico per le lesioni associate alla TSC e alla LAM.

La LAM è una patologia polmonare degenerativa caratterizzata dall'iperproliferazione di cellule muscolari lisce anomale (cellule ASM), con degenerazione cistica del parenchima polmonare, infiltrazione del sistema linfatico assiale e tumori renali (es. AML). La LAM colpisce circa il 30-40% delle donne con TSC, malattia genetica causata da mutazioni nei geni *TSC1* e *TSC2*, che codificano rispettivamente per amartina e tuberina, e che agiscono formando il complesso TSC. La mancata funzionalità del complesso, dovuta a mutazioni nei geni *TSC*, causa l'aumento della fosforilazione della chinasi S6K1 e del suo substrato, la proteina ribosomale S6 (Goncharova et al. 2002). Il complesso TSC regola S6K1 attraverso mTOR (Inoki et al. 2002). Circa il 50% delle pazienti affette da LAM sviluppa AML renali, presenti nella maggior parte dei pazienti affetti da TSC (Avila et al. 2000). E' stato ipotizzato che le diverse componenti dell'AML derivino da un comune precursore cellulare che possiede una mutazione sui geni *TSC* (Karbowiczek et al. 2003).

Durante lo svolgimento di questo studio, da un AML di un paziente affetto da TSC2 sono state isolate e caratterizzate due popolazioni di cellule muscolari lisce entrambe positive all'anticorpo α -actina. Le cellule isolate risultano, inoltre, positive ai marcatori specifici di LAM e TSC: CD44v6 (Pacheco-Rodriguez et al., 2007) e HMB45 (El-Hashimete et al., 2005), rispettivamente. In entrambe le popolazioni cellulari non è stato possibile rilevare l'espressione di tuberina né con *western blotting* né con immunofluorescenza.

Nel nostro laboratorio di ricerca, precedentemente, sono state isolate e caratterizzate cellule muscolari lisce da un AML di una paziente affetta da TSC2, in cui la perdita di tuberina è causata da una mutazione sull'esone 18 di *TSC2* con il cambio di una base e conseguente *stop codon* (K698X) e perdita di

eterozigosità (*loss of heterozigosity*: LOH) per il gene *TSC2* (*TSC2*^{-/-} ASM) (Lesma et al., 2005).

Per caratterizzare la mutazione sul gene *TSC2* che causa la mancata espressione di tuberina nelle due nuove popolazioni cellulari, sono stati condotti l'analisi di sequenziamento del DNA e l'analisi di perdita di eterozigosità con un pannello di microsatelliti che mappano al *locus* di *TSC2*. Poiché entrambe le tecniche non sono state in grado di dimostrare la perdita di eterozigosità, è stato ipotizzato che la perdita dell'espressione di tuberina fosse causata da modificazioni epigenetiche del gene *TSC2*. Per dimostrare che un evento epigenetico fosse la causa della mancata espressione di tuberina le cellule *TSC2* isolate dall'AML e le cellule LAM/*TSC* isolate dal chilo sono state incubate con i rimodellanti della cromatina: tricostatina A (TSA) e 5-azacitidina (5-AZA), e con i composti chetonici di origine sintetica (BDTCOCF₃ e BDT2COCF₃). In seguito all'esposizione a questi farmaci è stata valutata l'espressione di tuberina e della sua forma fosforilata.

Allo scopo di caratterizzare l'evento epigenetico responsabile della mancata espressione di tuberina, le cellule *TSC2* isolate dall'AML sono state analizzate con un enzima di restrizione sensibile alla metilazione HpaII, e con la tecnica del *pyrosequencing*. In seguito alla dimostrazione della presenza di metilazione del promotore del gene *TSC2*, le cellule isolate dall'AML sono state chiamate *TSC2*^{-meth} ASM.

Come già citato, la positività all'anticorpo HMB45, che riconosce la glicoproteina di membrana gp100, è una caratteristica del fenotipo patologico delle cellule muscolari lisce *TSC*. Allo scopo di studiare l'effetto dell'induzione di tuberina sulla reversione del fenotipo patologico delle cellule *TSC2*^{-meth} ASM, è stata quantificata la positività di queste cellule all'anticorpo HMB45 in seguito al trattamento con TSA.

L'effetto del trattamento con TSA è stato valutato anche sul fenotipo biochimico delle cellule *TSC2*^{-meth} ASM. La fosforilazione di S6, così come quella di Erk, sono costitutivamente elevate nelle cellule *TSC2*^{-/-} (Robb et al., 2006; Karbowniczek et al., 2005). La reversione del fenotipo biochimico è stata valutata tramite lo studio dei livelli di fosforilazione di S6 e Erk, nelle cellule *TSC2*^{-meth} ASM e LAM/*TSC* isolate dal chilo, dopo il trattamento con i rimodellanti della cromatina TSA e 5-AZA.

Le cellule TSC2^{-/-} ASM necessitano del fattore di crescita epidermico (EGF) per proliferare; questa dipendenza è causata dalla mancanza di tuberina, infatti, tale caratteristica è revertita in seguito alla trasfezione stabile con il gene *TSC2* (Lesma et al., 2008). Poiché la dipendenza dall'EGF sembra essere una caratteristica comune delle cellule TSC, la crescita delle cellule TSC2^{-/-meth} ASM e delle cellule LAM/TSC isolate dal versamento chiloso in presenza o in assenza di EGF, o sostituendo l'EGF con un tipico fattore di crescita delle cellule muscolari lisce, il fattore di crescita insulino simile (IGF-I).

Abbiamo dimostrato che nelle cellule TSC2^{-/-} ASM l'IGF-I non è in grado di sostituire l'effetto proliferativo dell'EGF; in queste cellule la via intracellulare attivata dall'IGF-I sembra essere deregolata, infatti, LY294002 (LY), un inibitore specifico di PI3K, substrato del recettore dell'IGF-I (IGF-IR), non è in grado di svolgere la sua azione inibitoria (Lesma et al., 2005). Poiché anche nelle cellule TSC2^{-/-meth} ASM e nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo l'IGF-I non è in grado di sostituire l'EGF nella sua azione proliferativa, la via di trasduzione del segnale attivata dall'IGF-IR è stata studiata anche in queste nuove popolazioni cellulari, valutando il grado di attivazione delle proteine Akt, PTEN ed S6 in seguito all'incubazione con LY e IGF-I. Questa via di trasduzione è stata studiata anche in seguito al trattamento con TSA nelle cellule TSC2^{-/-meth} ASM al fine di valutare l'effetto dell'espressione di tuberina sulla regolazione di PI3K dopo incubazione con LY e IGF-I.

Studi recenti hanno dimostrato che la rapamicina, inibitore specifico di mTOR, riduce le dimensioni degli AML e dei tubercoli cerebrali in pazienti TSC, ma con la sospensione della terapia si osserva un ingrandimento degli amartomi (Bissler et al., 2008; Pollizzi et al., 2009). La rapamicina ha un effetto citostatico e citotossico sulle cellule TSC2^{-/-} solo se incubata quando le cellule non sono ancora adese alla petri (Lesma et al., 2008). Allo scopo di valutare l'effetto della rapamicina sulla proliferazione delle cellule TSC2^{-/-meth} e LAM/TSC isolate dal chilo, questo farmaco è stato addizionato al terreno di coltura, al momento del piastramento, quando le cellule non hanno ancora attivato i meccanismi di adesione che coinvolgono il riarrangiamento del citoscheletro, e 3 ore dopo, quando ormai sono adese alla petri.

Poiché nelle cellule TSC2^{-/-meth} ASM la rapamicina è efficace in entrambe le condizioni sperimentali, è stato studiato l'effetto dell'inibitore di mTOR

sull'apoptosi valutando l'espressione di p21 e p53 e la vitalità cellulare con il metodo del TUNEL dopo 10 giorni di esposizione al farmaco somministrato al momento del piastramento e dopo 3 ore.

L'esposizione agli anticorpi specifici che bloccano i recettori dell'EGF (EGFR) e dell'IGF-I causa la morte delle cellule TSC2^{-/-} ASM in circa 12 giorni (Lesma et al., 2008). Poiché anche le cellule TSC2^{-/meth} e LAM/TSC isolate dal chilo necessitano di EGF per crescere, la proliferazione di queste popolazioni cellulari è stata studiata in presenza dell'anticorpo anti-EGFR, che riconosce il sito del recettore che lega il ligando (clone Ab5) e di un altro anticorpo anti-EGFR che riconosce il sito del recettore dell'EGF vicino al sito di legame con il ligando (clone Ab3) ed in presenza di un anticorpo anti-IGF-IR (clone aIR3). Questi anticorpi potrebbero essere alla base di una nuova terapia farmacologica per la TSC.

L'alterazione del complesso THC ha come conseguenza l'attivazione di mTOR che determina un aumento della proliferazione cellulare principalmente attraverso la fosforilazione di due molecole effettrici: la chinasi ribosomiale S6K e la proteina che inibisce il fattore di elongazione eucariotico 4E-BP1. Come detto in precedenza, è stato dimostrato che in cellule con mutazione sul gene TSC2, S6K1 e il suo substrato, S6, sono costitutivamente fosforilati (Goncharova et al., 2006).

Allo scopo di studiare la proliferazione tramite parametri biochimici caratteristici delle cellule TSC2, in seguito al trattamento con la rapamicina e con l'anticorpo anti-EGFR, sono stati valutati i livelli di fosforilazione di Erk ed S6.

L'*epithelial to mesenchymal transition (EMT)* è un processo importante durante l'embriogenesi, e negli ultimi anni, è stato dimostrato un suo ruolo nella progressione del cancro. Nelle cellule tumorali l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali sembra essere un evento transiente e cruciale per le capacità migratoria e invasiva. Lo stato mesenchimale è, infatti, associato alla capacità delle cellule di migrare negli organi e di mantenere le caratteristiche di "staminalità", permettendo solo successivamente una differenziazione nel sito bersaglio con l'inizio delle metastasi. Inoltre, è stata dimostrata la presenza di cellule mesenchimali nei tumori renali di pazienti affetti da TSC (Kato et al., 2009). Durante il processo di EMT le caratteristiche cellulari vengono profondamente modificate. In particolare, l'acquisizione della capacità migratoria

è dovuta all'alterata interazione tra cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. La maggior parte delle cellule sono dipendenti dall'ancoraggio alla matrice cellulare per la loro crescita e sopravvivenza, a differenza delle cellule cancerose. E' stato dimostrato che la resistenza all'*anoikis* promuove la metastasi e durante il processo di EMT le cellule mostrano resistenza a questo particolare processo di apoptosi. Poiché abbiamo osservato che le cellule LAM/TSC isolate dal chilotorace sono vitali e passano da uno stato in cui sono adese alla piastra di coltura ad uno in cui si trovano sospese, è stata valutata la vitalità delle cellule LAM/TSC in mancanza d'interazione con la matrice (che in coltura è rappresentata dall'adesione con la piastra). E' stato, inoltre, dimostrato che durante l'EMT l'attività delle giunzioni di aderenza è profondamente modificata attraverso l'inibizione dell'E-caderina. La perdita di questa proteina, inoltre, promuove la metastasi inducendo, in parte, la resistenza all'*anoikis* (Onder et al., 2008). SNAIL è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di E-caderina inibendola (Battle et al., 2000), è considerato un marcatore di EMT (Cano et al., 2000) ed è associato alle metastasi nei tumori (Peinado et al., 2007). Un altro marcatore mesenchimale di cellule indifferenziate è la vimentina, una proteina strutturale. Allo scopo di studiare se le cellule LAM/TSC isolate dal chilo potessero avere delle caratteristiche di EMT è stata valutata l'espressione di E-caderina, di vimentina e del fattore di trascrizione SNAIL nelle cellule in sospensione e adese alla petri.

Al fine di valutare le caratteristiche biochimiche peculiari delle cellule TSC nelle cellule LAM/TSC quando sono in sospensione e adese alla piastra di coltura, è stata valutata la fosforilazione di S6, marcatore biochimico di cellule TSC2, paragonandola alle popolazioni cellulari precedentemente isolate.

E' noto che un'alterata progressione della fase G1/S è una caratteristica generale delle cellule che vanno incontro al processo di EMT indotto dai fattori di trascrizione della famiglia di SNAIL (Mejlvang et al., 2007). Per studiare il ciclo cellulare delle cellule LAM/TSC isolate dal versamento chilo in nelle fasi di sospensione e adesione alla petri, è stato studiato il ciclo cellulare tramite incubazione con ioduro di propidio ed è stata valutata l'espressione della proteina ciclina D1.

Nella TSC e nella LAM non è chiaro come le cellule possano raggiungere i vari organi e causare la formazione di amartomi. L'opportunità di avere a

disposizione cellule di chilo, che migrano nel sistema linfatico in maniera molto simile alle cellule tumorali, può aiutare a comprendere alcuni importanti meccanismi di migrazione delle cellule TSC e di poter valutare in questo modello sperimentale un nuovo approccio farmacologico per inibire lo *spreading* delle cellule muscolari lisce TSC2.

RISULTATI

1. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE DALL'ANGIOMIOLIPOMA DI UN PAZIENTE TSC2

1.a Analisi Immunocitochimica

Presso l'ospedale San Paolo è stato attivato un programma di tipo assistenziale e di ricerca di base che prevede l'arruolamento e l'assistenza dei pazienti affetti da sclerosi tuberosa. Un paziente afferente al gruppo di studio ha subito una nefrectomia con asportazione di un AML. Da questo tessuto è stata isolata e subclonata una popolazione cellulare omogenea in seguito ad una serie di passaggi di tripsinizzazione. Queste cellule presentano morfologia allungata ed esprimono in modo marcato la proteina α -actina, dimostrando caratteristiche tipiche delle cellule muscolari lisce; per questo motivo sono state chiamate cellule ASM (*α -actin smooth muscle*). L'assenza di immunoreattività per vimentina ci ha permesso di escludere la presenza di fibroblasti dalla nostra coltura.

S100 è una proteina espressa negli adipociti bianchi e bruni che non è presente nelle cellule isolate, indicando, quindi, che nella popolazione cellulare subclonata da noi non sono presenti cellule di origine lipidica. Cheratina 8/18 è un marcatore specifico delle cellule epiteliali, anche questa proteina non è presente nella coltura cellulare.

Le cellule isolate risultano, inoltre, positive ai marcatori specifici di LAM e TSC: CD44v6 (Pacheco-Rodriguez et al., 2007) e HMB45 (El-Hashimete et al., 2005), rispettivamente (**Fig. 1**).

1.b Regolazione Della Crescita Nelle Cellule TSC ASM

È stato precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio che nelle cellule TSC2^{-/-} la proliferazione è dipendente dall'EGF (Lesma et al., 2005) e il blocco dell'EGFR, attraverso anticorpi specifici, determina la morte cellulare in 15 giorni (Lesma et al., 2008). È stata, quindi, valutata l'espressione dell'EGFR nelle cellule ASM. I livelli di espressione del recettore sono paragonabili a quelli delle cellule TSC2^{-/-}, delle cellule muscolari lisce di aorta umane (VSMC) e delle cellule A549 (pneumociti umani di tipo II) (**Fig. 2a**).

Anche le cellule ASM necessitano dell'EGF per la loro crescita; inoltre quando questo fattore viene sostituito dal fattore di crescita insulino simile (50ng/ml),

IGF-I, le cellule smettono di proliferare (**Fig.2a**). L'esposizione ad anticorpi diretti contro il recettore dell'EGF (50ng/ml) e dell'IGF1 (50ng/ml) determina la progressiva morte cellulare (**Fig. 2a**). Il tasso di proliferazione delle cellule ASM è comparabile a quello delle cellule $TSC2^{-/-}$ ASM in tutte le condizioni sperimentali (**Fig. 2b**).

2. ANALISI GENETICA DELLE CELLULE TSC ASM

2.a Analisi di mutazione

Il sequenziamento del DNA condotto sulle cellule ASM, sull'AML (dati non mostrati) e sul sangue del paziente ha evidenziato la presenza di una mutazione nel gene *TSC2* nella giunzione tra l'esone 8 e l'introne 9 (867-2 AG) senza perdita di eterozigotità (**Fig. 3a**). Non è stato possibile rilevare LOH (*loss of heterozigosity*) anche con l'uso di un pannello di microsatelliti vicini al *locus* del gene *TSC2* sul cromosoma 16p13.3 (dati non mostrati); tuttavia, non è stato possibile rilevare l'espressione di tuberina né tramite l'analisi di *western blotting* (**Fig. 3b**) né con la tecnica dell'immunofluorescenza (**Fig. 3c**). E' stata invece confermata l'espressione di amartina (**Fig. 3b e c**).

2.b Analisi della metilazione del promotore del gene TSC2

L'assenza di LOH e la perdita di espressione di tuberina ci ha portato ad ipotizzare che il secondo "*hit*" della teoria di *Knudson* potesse essere causato da un evento epigenetico. E' stata analizzata la metilazione delle isole CpG del promotore di *TSC2* utilizzando un'enzima di restrizione sensibile alla metilazione, *HpaII*. La metilazione del promotore (presenza di un amplificato dopo PCR) è stata rilevata nelle cellule ASM *TSC2*, mentre non è stata rilevata nel controllo normale VSMC (assenza di amplificato dopo PCR). La metilazione del promotore di *TSC2* è stata osservata anche nell'AML, tuttavia, l'eterogeneità del tessuto permette l'amplificazione del DNA tramite PCR con bassa efficienza (**Fig. 4a**).

L'efficienza della digestione enzimatica è stata valutata con due differenti approcci. È stato utilizzato l'enzima di restrizione *MspI*, un'isoschizomero di *HpaII*, che, diversamente da quest'ultimo, non è in grado di riconoscere le

sequenze metilate che vengono clivate. L'efficienza della digestione enzimatica è stata, in seguito, valutata anche con l'amplificazione del promotore del gene *ZTF*, che non è metilato. La completa digestione del DNA in entrambi i controlli (assenza di un amplificato dopo PCR) ha permesso di accertare l'efficienza e la specificità della reazione enzimatica (**Fig. 4a**).

Per quantificare la metilazione del promotore del gene *TSC2* è stata utilizzata la tecnica del *pyrosequencing* che ha permesso di analizzare le isole CpG metilate con gli enzimi di restrizione sensibili alla metilazione. Il controllo normale *TSC2* risulta demetilato in tutte le isole CpG analizzate. In accordo con i risultati ottenuti precedentemente, nelle cellule *TSC2* ASM sono state individuate alcune isole CpG metilate al 29%, 6% e 6%. La percentuale di metilazione non è elevata probabilmente perché solo un allele del gene ha il promotore metilato, mentre il promotore dell'allele con la mutazione costitutiva non lo è (**Fig. 4b**). In seguito alla dimostrazione della metilazione del DNA delle isole CpG della regione del promotore di *TSC2*, queste nuove cellule sono state chiamate cellule *TSC2*^{-meth} ASM.

3. EFFETTO DEI RIMODELLANTI DELLA CROMATINA SULLE CELLULE *TSC2*^{-meth} ASM

3.a Espressione di tuberina in seguito al trattamento con tricostatina A (TSA) e 5-azacitidina (5-AZA)

Il silenziamento epigenetico è stato, inoltre, dimostrato dalla riattivazione trascrizionale e dall'espressione di tuberina in seguito a trattamento farmacologico con tricostatina A (TSA) e 5-azacitidina (5-AZA), entrambi rimodellanti della cromatina.

La TSA è un inibitore delle deacetilasi istoniche di classe I e II (HDAC) ed è in grado di riattivare geni che sono stati silenziati a causa di un evento epigenetico (Sirchia et al., 2005). Sono state testate concentrazioni crescenti di TSA (330nM, 33μM e 3,3μM) a tempi diversi (96 e 72 ore) al fine di determinare la dose adeguata per il rimodellamento della cromatina. E' stata scelta la

concentrazione 3.3 μ M con un'incubazione di 72 ore che permette l'espressione di tuberina mantenendo le cellule vitali (**Fig. 5a**).

La 5-AZA è un rimodellante della cromatina che attiva la trascrizione genica con un meccanismo diverso dalla TSA. La 5-AZA è un analogo della citosina, viene incorporato nel DNA al posto della citidina e non può essere legato dalla DNA metil-transferasi (DNMT) l'enzima coinvolto nel processo di metilazione; in questo modo previene il trasferimento di un gruppo metile in posizione C-5 della citosina. Nelle cellule TSC2^{-meth}, il trattamento con 5-AZA, per 96 ore alle concentrazioni di 1 μ M e 10 μ M, è in grado di riattivare la trascrizione del gene TSC2. La 5-AZA è più efficace nell'indurre l'attivazione della trascrizione di tuberina rispetto alla TSA (**Fig. 5b**).

3.b Positività ad HMB45 in seguito al trattamento con TSA

E' stato valutato se l'espressione di tuberina, in seguito al trattamento con la tricostatina A, potesse avere un effetto sul fenotipo patologico delle cellule TSC2^{-meth}. E' stata quantificata l'espressione della glicoproteina gp100 tramite l'esposizione all'anticorpo HMB45, marcatore di cellule TSC e LAM. Dopo 72 ore di esposizione al farmaco l'immunoreattività ad HMB45 era notevolmente ridotta. Le cellule sono state classificate come positive (+) o negative (-) all'anticorpo HMB45. Le cellule TSC2^{-meth} ASM sono positive ad HMB45 nel 70% della popolazione e negative all'anticorpo nel 30% (**Fig. 5c**). In seguito ad incubazione con TSA per 72 ore la percentuale di cellule positive diminuisce fino al 45%, mentre aumenta al 55% la percentuale di cellule negative ad HMB45 (**Fig. 5d**).

3.c Espressione di tuberina in seguito al trattamento con i rimodellanti della cromatina di origine sintetica

Le istone deacetilasi (HDAC) sono enzimi che catalizzano la deacetilazione degli istoni regolando in questo modo l'espressione genica. Negli ultimi anni gli inibitori di questa classe di enzimi hanno ricevuto una grossa attenzione per le loro proprietà antitumorali. Queste molecole sono di origine sia naturale sia sintetica; esse possono essere classificate in base alla loro struttura chimica in derivati dell'acido idrossamico, piccoli acidi grassi, benzamidi, chetoni elettrofilici e peptidi ciclici. I loro maggiori effetti biologici determinano l'induzione del

differenziamento nelle cellule tumorali, l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/G0, l'attivazione dei geni apoptotici, l'aumento della sensibilità alla chemioterapia e radioterapia (Bi and Jiang, 2006). Nelle cellule $TSC2^{-/meth}$ è stata testata l'efficacia di composti chetonici di origine sintetica nel riattivare la trascrizione di $TSC2$. I composti $BDTCOCF_3$ e $BDT2COCF_3$ (**Fig. 6a**), di peso molecolare 286,29272 kDa e 382,30078 kDa rispettivamente, sono stati incubati con le cellule $TSC2^{-/meth}$ per 72 ore alle concentrazioni di 1nM, 100nM, 1 μ M e 50 μ M. Il trattamento con entrambi i composti è in grado di riattivare la trascrizione e l'espressione tuberina. In modo particolare, $BDTCOCF_3$ sembra essere più efficace nel rimodellamento della cromatina mantenendo le cellule vitali (**Fig. 6b**).

4. EFFETTO DELLA TSA SUL FENOTIPO BIOCHIMICO DELLE CELLULE $TSC2^{-/meth}$ ASM

La fosforilazione di S6, così come quella di Erk, è costitutivamente elevata nelle cellule $TSC2^{-/}$ (Robb et al., 2006; Karbowniczek et al., 2005). Entrambe queste attivazioni sono indice del tasso proliferativo della cellula il quale può avvenire a seguito di vari eventi tra cui l'attivazione della cascata dell'EGF (Pearson et al., 2001). Nelle cellule tuberina-deficienti viene a mancare l'attività regolatoria del complesso tuberina/amartina su S6K1, per cui l'attivazione di S6K1 non è più regolata. La chinasi risulta costitutivamente attivata e, di conseguenza, il suo substrato S6 è iperfosforilato. La fosforilazione costitutiva di S6 è perciò considerata un caratteristico fenotipo biochimico delle cellule $TSC2^{-/}$ (Goncharova et al., 2006).

In seguito al legame dell'EGF con il suo recettore si attiva una cascata di eventi tra cui la fosforilazione di Erk che tramite RSK1 fosforila tuberina causando la scissione e l'inibizione dell'attività del complesso. Questa serie di eventi causa l'attivazione di mTOR e l'aumento della proliferazione cellulare. L'aumento della fosforilazione di Erk è stata recentemente dimostrata nelle cellule $TSC2^{-/}$ (Karbowniczek et al., 2005).

È stato, quindi, valutato l'effetto della TSA sul fenotipo biochimico nelle cellule $TSC2^{-/meth}$ ASM. In seguito ad esposizione al farmaco per 72 ore sia la fosforilazione di S6 che di Erk vengono inibite. Come aspettato, questo effetto

non viene invece osservato nelle cellule TSC2^{-/-} ASM trattate con lo stesso farmaco (**Fig. 7**). L'espressione di tuberina indotta dalla TSA determina l'inibizione della fosforilazione costitutiva di S6.

5. VALUTAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE DI PI3K/AKT

Nelle cellule muscolari lisce TSC2^{-/-} ASM, con perdita di eterozigotità dovuta ad una mutazione sull'allele *wild type*, LY294002 (LY), inibitore specifico della PI3K, non è in grado di svolgere la sua azione inibitoria (Lesma et al., 2005). Allo stesso modo nelle cellule TSC2^{-meth}, PI3K non è sensibile ad LY. L'aggiunta del fattore di dell'IGF-I alla concentrazione di 50 ng/ml al terreno di coltura per 2 ore, determina l'aumento della fosforilazione di Akt e PTEN, ma non è in grado d'indurre variazioni nei livelli di fosforilazione di S6. Il trattamento per 2 ore con LY alla concentrazione di 20 µM, non modifica né la fosforilazione basale di Akt, PTEN ed S6 né quella indotta dall'IGF-I. In seguito all'induzione della trascrizione di tuberina con TSA (3.3 µM) per 72 ore, LY è in grado di inibire il livello basale di fosforilazione di Akt e di ridurre l'incremento prodotto dall'IGF-I. In queste condizioni l'IGF-I induce l'aumento della fosforilazione di S6 che viene inibita da LY (**Fig. 8**). Questo risultato è simile a quello ottenuto con l'introduzione del gene TSC2 nelle cellule TSC2^{-/-} ASM (Lesma et al., 2009), indicando che la sensibilità di PI3K ai farmaci è correlata all'espressione di tuberina.

6. EFFETTO DELL'ANTICORPO ANTI-EGFR E DELLA RAPAMICINA SULLA FOSFORILAZIONE DI S6 E ERK

L'effetto dell'anticorpo anti-EGFR sulla proliferazione delle cellule TSC2^{-meth} ASM è stato valutato anche biochimicamente. I livelli di fosforilazione di S6 possono essere considerati un caratteristico fenotipo biochimico delle cellule TSC. Nelle cellule TSC2^{-meth} ASM sono stati studiati i livelli di fosforilazione di S6 e di Erk in seguito a trattamento con rapamicina (1 ng/ml) e anticorpo anti-EGFR (50 ng/ml) per 24 e 48 ore. La rapamicina è l'inibitore specifico di mTOR ed è un agente immunosoppressore ampiamente utilizzato per prevenire il

rigetto dei trapianti, inoltre, è in trial clinico per il trattamento dell'AML nella TSC e nella LAM (Bissler et al., 2008). Il trattamento con entrambi farmaci riduce marcatamente la fosforilazione di S6 senza cambiamenti nell'espressione della proteina. La fosforilazione di Erk è ridotta dopo 48 ore d'incubazione con l'anticorpo anti-EGFR e i livelli di Erk non vengono alterati. La rapamicina sembra essere invece meno efficace sulla fosforilazione di Erk (**Fig. 9**).

7. EFFETTO DELLA RAPAMICINA SULLE CELLULE TSC2^{-meth} ASM

7.a Regolazione della crescita

E' stato valutato l'effetto della rapamicina sulla proliferazione delle cellule TSC2^{-meth}. Il farmaco è stato aggiunto al terreno di coltura alle concentrazioni di 1 e 5 ng/ml al momento del piastramento e 3 ore dopo. La rapamicina riduce in modo significativo il tasso di proliferazione cellulare sia quando viene somministrata al momento del piastramento che 3 ore dopo, in maniera dose dipendente (**Tab. 1**). Questo effetto della rapamicina sulle cellule TSC2^{-meth} differisce rispetto a quello osservato nelle cellule TSC2^{-/-} nelle quali il farmaco era efficace solo se aggiunto al terreno di crescita al momento del piastramento quando le cellule non erano ancora adese (Lesma et al., 2008).

7.b Studio dell'apoptosi

p53 è il principale oncosoppressore presente nell'organismo, si accumula nella cellula in seguito al danno al DNA, all'attivazione di oncogeni o a stress di altro tipo. p53 agisce come un fattore di trascrizione che regola l'attivazione di geni coinvolti nell'apoptosi e nel ciclo cellulare (Green and Kroemer, 2009); in questo modo p53 regola la trascrizione di p21 che agisce come inibitore della ciclina chinasi dipendente. p21 è un mediatore dell'arresto del ciclo cellulare dipendente da p53 e agisce, quindi, come oncosoppressore (Gartel, 2009). Per valutare se l'effetto della rapamicina sulla crescita cellulare fosse dovuto ad un aumento dell'apoptosi sono stati studiati i livelli di espressione delle proteine p21 e p53 nelle cellule TSC2^{-meth}. Dopo 10 giorni di trattamento con rapamicina alla concentrazione di 1 e 5 ng/ml, al momento del piastramento e 3 ore dopo, non sono stati rilevati cambiamenti dei livelli di espressione delle due proteine rispetto al controllo (**Fig. 10**).

La presenza di apoptosi in seguito al trattamento con la rapamicina è stata valutata anche con la tecnica del TUNEL che permette di rilevare il DNA frammentato in seguito all'attivazione della cascata delle cicline attivata da segnali apoptotici. Dopo il trattamento con rapamicina, il numero di cellule positive al TUNEL è paragonabile a quello del gruppo non esposto al farmaco. Una percentuale elevata di cellule VSMC, utilizzate come controllo, è positiva al TUNEL dopo il trattamento con staurosporina alla concentrazione di 100 Mm per un'ora e 30 minuti (**Tab. 2**).

8. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE PRESENTI NEL CHILO DI UNA PAZIENTE LAM/TSC

8.a Analisi immunocitochimica

Più recentemente sono state isolate cellule dal versamento chiloso (o chilo torace) di una paziente inglese affetta da LAM/TSC. Il chilotorace è una complicanza frequente nella LAM ed è dovuto a versamento linfatico nella cavità pleurica. Dal chilotorace è stata ottenuta una popolazione cellulare omogenea in seguito a diversi passaggi in centrifuga. Queste cellule, diversamente da quelle isolate in precedenza (TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} che derivano da un tumore solido come l'AML), sono circolanti, poiché presenti nel liquido linfatico. Come le cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} ASM, anche le cellule isolate da chilo sono muscolari lisce, infatti, esprimono la proteina α -actina. Diversamente dalle altre due popolazioni isolate da AML, presentano immunoreattività per l'anticorpo che riconosce la proteina strutturale vimentina. Le cellule isolate dal chilo risultano, inoltre, positive ai marcatori specifici di LAM e TSC, CD44v6 (Pacheco-Rodriguez et al., 2007) e HMB45 (El-Hashimete et al., 2005), rispettivamente. Anche in questa nuova popolazione cellulare l'assenza di immunoreattività per cheratina 8/18 e S100 ci ha permesso di escludere la presenza di cellule di tipo epiteliale e adipociti nella nostra coltura (**Fig. 11**).

8.b Valutazione dell'espressione di tuberina e amartina

E' stata valutata la presenza delle proteine che formano il complesso TSC, tuberina e amartina, tramite *western blotting*. Le cellule isolate dal chilo non esprimono tuberina come le cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} analizzate

precedentemente (Lesma et al., 2005, 2009), mentre le cellule VSMC, utilizzate come controllo, esprimono la proteina in maniera marcata (**Fig. 12a**). E' stato, quindi, valutato il grado di fosforilazione di tuberina. Come mostrato nella **Fig. 12a**, tuberina è marcatamente fosforilata solo nelle cellule VSMC, non è stato rilevato alcun segnale nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo e nelle cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth}. Tutti i campioni analizzati esprimono amartina.

Nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo è stata valutata l'espressione di tuberina e amartina anche con la tecnica dell'immunofluorescenza che ha confermato i risultati ottenuti con il *western blotting* (**Fig. 12b**).

9. ANALISI GENETICA DELLE CELLULE LAM/TSC ISOLATE DAL VERSAMENTO CHILOSO

Il sequenziamento del DNA condotto sulle cellule LAM/TSC isolate dal chilo ha evidenziato la presenza di una mutazione sull'esone 21 del gene *TSC2* (R750X-2251) con sostituzione C>T che codifica per un codone di "stop". Non è stato possibile rilevare LOH anche con l'uso di un vasto pannello di microsatelliti vicini al *locus TSC2* sul cromosoma 16 (**Fig. 13a**) nonostante non sia stato possibile rilevare l'espressione di tuberina né tramite l'analisi di *western blotting* né con la tecnica dell'immunofluorescenza.

10. EFFETTO DELLA TSA E DELLA 5-AZA NELLE CELLULE LAM/TSC

Come per le cellule TSC2^{-/meth}, data l'assenza di una mutazione sull'allele *wild type* e la perdita di espressione di tuberina, anche per questa nuova popolazione cellulare è stato ipotizzato che il secondo "*hit*" potesse essere causato da un evento epigenetico. Le cellule sono state incubate con i rimodellanti della cromatina TSA e 5-AZA. Il trattamento con TSA alla concentrazione di 3.3µM per 72 ore, e con 5-AZA alla concentrazione di 1 µM per 96 ore è in grado di attivare la trascrizione genica e la conseguente espressione di tuberina. L'espressione di tuberina, in seguito a trattamento con TSA, è correlata, inoltre, ad una diminuzione della fosforilazione di ERK. La 5-AZA, inducendo l'attivazione trascrizionale di tuberina, determina l'inibizione della fosforilazione di S6, marcatore biochimico delle TSC2^{-/-} (Goncharova et al., 2006).

Il diverso effetto dei due agenti rimodellanti della cromatina è probabilmente dovuto al loro diverso meccanismo d'azione.

11. PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE LAM/TSC ISOLATE DAL VERSAMENTO CHILOSO

Abbiamo precedentemente dimostrato che le cellule TSC2^{-/-} ASM (Lesma et al., 2005) e TSC2^{-/meth} ASM (Lesma et al., 2009) necessitano della presenza di EGF per proliferare e questa dipendenza è dovuta alla mancanza di tuberina (Lesma et al., 2008); inoltre, gli anticorpi anti-EGFR e anti-IGF-IR causano la morte di queste cellule in circa 12 giorni (Lesma et al., 2008; Lesma et al., 2009). Queste caratteristiche proliferative delle cellule TSC sono state valutate anche per le cellule LAM/TSC in presenza di EGF (10 ng/ml), nello stesso terreno deprivato dell'EGF, in un terreno in cui l'EGF è stato sostituito dall'IGF-I (50 ng/ml), e in presenza degli anticorpi anti-EGFR (5 µg/ml) e anti-IGF-IR (5 µg/ml). Nelle cellule isolate dal chilotorace, come nelle cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} ASM, la crescita è dipendente dall'EGF la cui azione non è sostituita dall'IGF-I (**Fig. 14a**). Le cellule LAM/TSC sono più sensibili delle cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} ASM all'azione dell'anticorpo anti-IGF-IR che causa l'arresto della proliferazione dopo 24 ore. L'anticorpo anti-EGFR Ab5, che riconosce il sito del recettore che si lega al ligando, è in grado di svolgere la sua azione inibitoria sulla crescita dopo 24 ore, tuttavia le cellule riprendono a crescere dopo circa 6 giorni con un blocco proliferativo dopo 20 giorni fino a un completo arresto della crescita dopo circa 30 giorni di trattamento (**Fig. 14a**). Per comprendere questo evento è stato utilizzato anche un altro anticorpo anti-EGFR (Ab3) che si lega ad un sito del recettore dell'EGF vicino al sito di legame con il ligando. L'anticorpo anti-EGFR Ab3 è più efficace nell'inibire la crescita delle cellule LAM/TSC e causa l'arresto della proliferazione già dopo 24 ore (**Fig. 14a**).

L'effetto dell'anticorpo anti-EGFR Ab5 sulla proliferazione è stato, quindi, analizzato a livello biochimico studiando i livelli di attivazione di Erk e S6 dopo 24 ore e 6 giorni di trattamento. Dopo 24 ore i livelli di fosforilazione di Erk sono leggermente aumentati rispetto al controllo, mentre la fosforilazione di S6 è inibita. Dopo 6 giorni, invece, la fosforilazione di Erk è paragonabile al controllo, mentre risulta marcatamente inibita l'attivazione di S6 (**Fig. 14c**).

La rapamicina, inibendo mTOR, mima l'azione del complesso tuberina/amartina. Nelle cellule $TSC2^{-/-}$ ASM il farmaco è risultato più efficace se somministrato al momento del piastramento, mentre nelle cellule $TSC2^{-/meth}$ ASM la rapamicina è in grado d'inibire la proliferazione sia delle cellule in sospensione sia delle cellule adese (Lesma et al., 2005, 2009).

Nelle cellule isolate dal versamento chiloso è stato valutato l'effetto della rapamicina alla concentrazione di 1ng/ml e 5ng/ml addizionata al terreno al momento del piastramento e 3 ore dopo. Queste cellule LAM/TSC, a differenza delle cellule $TSC2^{-/-}$ e $TSC2^{-/meth}$ ASM, sembrano sensibili all'azione del farmaco, ad entrambe le concentrazioni, sia in sospensione che quando sono adese alla petri (**Fig. 14b**). La rapamicina è in grado di ridurre marcatamente la fosforilazione di S6 sia dopo 24 ore che dopo 6 giorni di trattamento, mentre non è in grado di modificare i livelli di fosforilazione di Erk (**Fig. 14c**).

12. VALUTAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE DI PI3K/AKT NELLE CELLULE LAM/TSC

Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che nelle cellule $TSC2^{-/-}$ ASM e $TSC2^{-/meth}$ ASM, LY294002 (LY) non è in grado di svolgere la sua attività inibitoria su PI3K. Tuttavia, dopo l'introduzione di *TSC2* nelle cellule $TSC2^{-/-}$ ASM e la riattivazione trascrizionale del gene di tuberina con la tricostatina A nelle cellule $TSC2^{-/meth}$ ASM, l'efficacia di LY viene restaurata. Questi risultati indicano che la sensibilità di PI3K ai farmaci è correlata all'espressione di tuberina. Diversamente alle popolazioni isolate precedentemente, nelle cellule LAM/TSC del chilo il trattamento per 2 ore con LY (20 μ M) è in grado di inibire sia la fosforilazione basale che quella indotta dall'IGF-I (50ng/ml) di Akt, Erk ed S6 senza modificare i livelli delle proteine (**Fig. 15**). L'inibitore di PI3K agisce, inoltre, sinergicamente con la rapamicina (1ng/ml) nell'inibire la fosforilazione di Akt, Erk ed S6 (**Fig. 15**). La valutazione dei livelli di β -actina è stata utilizzata come controllo del corretto caricamento di un'uguale quantità proteica.

13. EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION (EMT)

13.a Valutazione della sopravvivenza delle cellule in sospensione

L'*epithelial to mesenchymal transition (EMT)* è un processo importante durante l'embriogenesi, e negli ultimi anni, è stato suggerito ed in seguito dimostrato un suo ruolo nella progressione del cancro. Durante il processo di EMT le caratteristiche cellulari vengono profondamente modificate. In particolare, l'acquisizione della capacità migratoria è dovuta all'alterata interazione tra cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. La maggior parte delle cellule sono dipendenti dall'ancoraggio alla matrice cellulare per la loro crescita e sopravvivenza, a differenza delle cellule cancerose. E' stato dimostrato che la resistenza all'*anoikis* promuove la metastasi e durante il processo di EMT le cellule mostrano resistenza a questo particolare processo di apoptosi.

Le cellule LAM/TSC isolate dal chilotorace sono vitali e passano da uno stato in cui sono adese alla piastra di coltura ad uno in cui si trovano sospese. Per valutare la vitalità delle cellule LAM/TSC in mancanza d'interazione con la matrice (che in coltura è rappresentata dall'adesione con la piastra) è stata utilizzata la marcatura con *trypan blu*, un colorante in grado di penetrare la membrana delle cellule necrotiche o apoptotiche. L'81,52% delle cellule in sospensione sono vitali, dimostrando la capacità delle cellule LAM/TSC di sopravvivere in modo indipendente dall'ancoraggio (**Fig. 16a**).

Per studiare la capacità delle cellule in sospensione di aderire alla piastra di coltura, probabilmente in un ciclo di adesione/sospensione ripetuto, le cellule in sospensione sono state marcate con PKH26 e rimesse in coltura in una piastra dove erano state piastrate in subconfluenza le stesse cellule non marcate. Dopo 15 minuti le cellule marcate sono nuovamente adese alla piastra. Dopo 24 ore il terreno è stato ripiastrato in un nuovo piattino di coltura osservando che la maggioranza di cellule risospese non è marcata ed è in grado di aderire alla petri a sua volta dopo circa 15 minuti. Questo dato dimostra che le cellule in sospensione sono vitali e passano, probabilmente, ciclicamente da uno stato di adesione alla petri (forse breve) ad uno di sospensione nel terreno di coltura (**Fig. 16b**).

13.b Valutazione dei marcatori di EMT

Uno dei passaggi cruciali dell'EMT è la perdita di E-caderina che causa la soppressione dell'interazione tra cellule. L'E-caderina è una glicoproteina integrale di membrana che media l'adesione cellulare ed è in uno stato di inattivazione nei tumori (Hajra et al., 2002). E' stato dimostrato che durante l'EMT l'attività delle giunzioni di aderenza è profondamente modificata attraverso l'inibizione dell'E-caderina. La perdita di questa proteina, inoltre, promuove la metastasi inducendo, in parte, la resistenza all'*anoikis* (Onder et al., 2008). E' stata quindi valutata l'espressione di E-caderina, tramite *western blotting*, nelle cellule LAM/TSC in sospensione e in quelle adese alla petri. E-caderina non è rilevabile in nessuno dei due stadi, mentre è presente nelle cellule epiteliali MCF7, (*Michigan Cancer Foundation-7*) isolate da un tumore al seno, utilizzate come controllo (**Fig. 17a**). Anche con la tecnica dell'immunofluorescenza non è stato possibile rilevare l'E-caderina nelle cellule isolate dal versamento chiloso (**Fig. 17b**).

SNAIL è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di E-caderina inibendola (Battle et al., 2000), è considerato un marcatore di EMT (Cano et al., 2000) ed è associato alle metastasi nei tumori (Peinado et al., 2007). SNAIL, valutato tramite *western blotting*, è espresso nelle cellule LAM/TSC in sospensione e adese alla petri e nelle cellule COS7 (una linea cellulare epiteliale isolata dal rene della scimmia verde africana) utilizzate come controllo positivo dell'esperimento (**Fig. 17a**).

La vimentina è una proteina strutturale ed è considerata un marcatore mesenchimale di cellule indifferenziate. Vimentina è presente nelle cellule LAM/TSC sia in sospensione che nelle cellule adese a differenza delle cellule MCF7 che non la esprimono. La presenza di vimentina è stata rilevata sia con *western blotting* (**Fig. 17a**) sia con la tecnica dell'immunofluorescenza (**Fig. 17b**).

13.c Studio della fosforilazione di S6 nelle cellule LAM/TSC in sospensione

Come detto in precedenza, la fosforilazione di S6 è elevata nelle cellule TSC. Il grado di fosforilazione di S6 nelle cellule LAM/TSC in sospensione e adese è stato valutato con *western blotting* e citofluorimetria. Nelle cellule LAM/TSC in sospensione, il grado di attivazione di S6 è significativamente più basso, rispetto

alle stesse cellule LAM/TSC che crescono adese alla piastra di coltura che hanno un grado di fosforilazione simile a quello delle cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-/meth} ASM (**Fig. 18a**). L'analisi quantitativa con il citofluorimetro ha rilevato che solo il 5,2% delle cellule LAM/TSC in sospensione presenta S6 in forma fosforilata, a differenza delle cellule che crescono adese alla petri in cui la percentuale è del 74,55% (**Fig. 18b**). Questo risultato suggerisce che lo stato in cui si trova la cellula LAM/TSC è determinato o determina cambiamenti a livello biochimico nel grado di fosforilazione di S6.

13.d Analisi del ciclo cellulare

E' noto che un'alterata progressione della fase G1/S è una caratteristica generale delle cellule che vanno incontro al processo di EMT indotto dai fattori di trascrizione della famiglia di SNAIL (Mejlvang et al., 2007). E' interessante notare che SNAIL previene l'entrata nella fase S del ciclo reprimendo la trascrizione delle cicline D (Vega et al., 2004). L'espressione della ciclina D1 nelle cellule LAM/TSC in sospensione non è rilevabile tramite *western blotting*, mentre nelle cellule che crescono adese alla piastra di coltura la proteina è presente a livelli simili a quelli delle cellule VSMC usate come controllo (**Fig. 19a**). Il ciclo cellulare è stato studiato anche con l'analisi citofluorimetrica con l'uso di ioduro di propidio. Lo ioduro di propidio è una sostanza fluorescente che si intercala al DNA e dà una stima della quantità di questo acido nucleico nella cellula indicando in quale stadio del ciclo si trova. Le cellule LAM/TSC che crescono adese alla petri si trovano per il 75,47% nella fase G0-G1, nel 5,61% nella fase S e per il 11,3% nella fase G2-M (**Fig. 19b**), mentre le cellule VSCM, utilizzate come controllo, si trovano per l'80,98% in fase G0-G1, nell'1,92% in fase S e per il 6,85% in fase G2-M (**Fig. 19b**). Le cellule LAM/TSC non adese non incorporano lo ioduro di propidio (dati non mostrati). Questo risultato indica che le cellule LAM/TSC non adese hanno smesso di dividersi, in modo temporaneo o irreversibile, e sono in uno stato di quiescenza (fase G0). E' stato dimostrato che l'incapacità di incorporare lo ioduro di propidio può essere una caratteristica di progenitori cellulari neoplastici con caratteristiche di staminalità (Yasin et al., 2010). Le cellule VSCM, utilizzate come controllo, si trovano per l'80,98% in fase G0-G1, nell'1,92% in fase S e per il 6,85% in fase G2-M (**Fig. 19b**).

DISCUSSIONE

La TSC è una malattia autosomica dominante che causa l'insorgenza di tumori benigni, l'angiomiolipoma (AML) è il tumore renale più comune nella TSC. Gli AMLs sono costituiti principalmente da cellule muscolari lisce, grasso e vasi sanguigni (Henske et al., 1997). Il 40% delle pazienti TSC sviluppa la LAM (Moss et al., 2001), e il 6% delle pazienti con LAM sporadica sviluppa AML renali. Sono state riscontrate mutazioni identiche nel gene *TSC2* e nelle cellule di LAM e di AML, suggerendo che queste cellule potrebbero essere geneticamente correlate e, quindi, è stato ipotizzato che queste cellule possano generarsi da un progenitore comune (Karbowiczek et al., 2003). Tuberina è la proteina codificata dal gene oncosoppressore *TSC2*, e regola la crescita e la progressione del ciclo cellulare (Tapon et al., 2001). La perdita di questa proteina può portare ad un'anormale proliferazione cellulare. La perdita di eterozigotà (LOH) nelle cellule TSC è un evento presente nel 60% delle cellule che costituiscono gli AMLs delle donne con LAM sporadica (Carsillo et al., 2000). Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente isolato e caratterizzato cellule *TSC2*^{-/-} ASM da un AML renale con LOH (Lesma et al., 2005). In queste cellule, la perdita di tuberina è strettamente correlata alla dipendenza dall'EGF per proliferare (Lesma et al., 2005).

In questo studio abbiamo dimostrato che la perdita di tuberina nelle cellule *TSC2* può essere causata da un meccanismo epigenetico, la metilazione del promotore del gene *TSC2*.

Da un AML di un paziente affetto da *TSC2* abbiamo isolato e purificato una nuova popolazione di cellule muscolari lisce (ASM). L'analisi genetica condotta sul sangue del paziente e sulle cellule ASM ha dimostrato la presenza di una mutazione somatica tra l'introne 8 e l'esone 9 (867-2AG) del gene *TSC2* senza perdita di eterozigotà, tuttavia la nuova popolazione isolata non esprime tuberina. Nel nostro laboratorio sono state inoltre isolate cellule provenienti dal versamento chiloso di una paziente inglese affetta da LAM/TSC. Dal chilo sono state isolate e purificate cellule muscolari lisce. Il sequenziamento del DNA ha evidenziato la presenza di una mutazione sull'esone 21 del gene *TSC2* (R750X-2251) con sostituzione C>T che codifica per un codone di "stop" senza perdita di eterozigotà, e anche questa nuova popolazione isolata non esprime tuberina. L'incapacità di trovare l'allele *wild type* di *TSC2* potrebbe avere differenti spiegazioni come ad esempio una mutazione secondaria su un diverso gene,

come è stato dimostrato per i geni *PDK1* e *PDK2* nella sindrome autosomica dominante del rene policistico (Koptides et al., 2000), o con la presenza di metilazione sull'allele *wild type* che è stata frequentemente osservata nei tumori umani (Merlo et al., 1995; Toyooka et al., 2003). Nelle cellule TSC2 ASM isolate dall'AML abbiamo dimostrato la presenza di una metilazione delle isole CpG del promotore del gene *TSC2* che ha causato l'inibizione del gene *TSC2* e la perdita dell'espressione di tuberina. Questa nuova popolazione cellulare è stata quindi chiamata TSC2^{-/meth} ASM.

La metilazione del DNA a livello dei dinucleotidi CpG è un meccanismo epigenetico comune e importante per l'inattivazione dei geni oncosoppressori nei tumori, ed è regolato da DNA metiltransferasi (Holliday et al., 1975). Molti geni umani contengono un'isola CpG all'interno della regione del promotore, e nelle cellule normali le isole CpG non metilate sono di solito protette (Baylin et al., 1998). La metilazione *de novo* delle isole CpG che si trovano nella regione del promotore è una caratteristica comune nei tumori umani e determina la perdita della funzione genica in maniera simile ad altri meccanismi come la delezione o le mutazioni puntiformi (Toyooka et al., 2003; Jones et al., 1999). La metilazione del promotore del gene *TSC2* è biologicamente rilevante nel caso delle cellule TSC2^{-/meth} a causa dell'effetto funzionale sulla trascrizione di tuberina che viene completamente bloccata per la presenza di una mutazione somatica tra l'introne 8 e l'esone 9 dell'altro allele del gene *TSC2*.

In un precedente studio di Niida e colleghi non era stato dimostrato la presenza di metilazione sull'allele *wild type* del gene *TSC2* in amartomi prelevati da pazienti affetti da TSC. L'impossibilità di dimostrare la presenza di modificazioni epigenetiche potrebbe essere dovuta all'eterogeneità del tessuto tumorale, mentre la dimostrazione di *CpG Island* metilate nelle cellule TSC2^{-/meth} è stata possibile per la disponibilità di una linea cellulare pura e omogenea. In letteratura sono presenti diversi esempi della modificazione funzionale di *TSC2* attraverso la metilazione in patologie diverse dalla TSC. Nei pazienti con cancro alla mammella la prognosi sfavorevole è correlata alla metilazione dei geni TSC (Jang et al., 2005). Nel carcinoma orale a cellule squamose la *down*-regolazione della funzione del gene *TSC2* può essere ascritta ad un'alterazione epigenetica dovuta alla metilazione del promotore di *TSC2* (Charkraborty et al., 2008).

Il ruolo della metilazione del promotore dell'allele *wild type* nell'anormale sviluppo delle cellule $TSC2^{-/meth}$ è confermato dall'effetto normalizzante degli agenti rimodellanti della cromatina, TSA e 5-AZA. Questi agenti promuovono l'espressione di tuberina e determinano la diminuzione della fosforilazione costitutiva di S6 e della positività ad HAMB45.

Anche nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo il trattamento con la TSA e la 5-AZA è in grado di riattivare la trascrizione genica e la conseguente espressione di tuberina. In questa popolazione cellulare la TSA sembra essere più efficace nell'inibire la fosforilazione di Erk, mentre la 5-AZA agisce inibendo la fosforilazione di S6. Il diverso effetto dei due agenti rimodellanti della cromatina è probabilmente dovuto al loro diverso meccanismo d'azione, la TSA è un'inibitore delle istoni deacetilasi mentre la 5-AZA inibisce la DNA metil transferasi, e alla loro efficacia in questo particolare tipo cellulare.

Nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo lo studio dell'evento epigenetico che causa la mancanza di tuberina è tutt'ora in fase di studio.

Gli inibitori delle istoni deacetilasi (HDAC), come la tricostatina A, sono una nuova classe di agenti antitumorali che inducono il differenziamento cellulare, l'arresto della crescita e la morte cellulare, e sono efficaci sia *in vitro* che *in vivo* (Bi et al., 2006). Tramite l'acetilazione reversibile, gli inibitori delle HDAC modificano la struttura degli istoni e delle proteine che costituiscono il complesso d'inizio della trascrizione e che sono coinvolte nella regolazione dell'espressione genica. L'inibizione delle HDAC potrebbe determinare un aumento del tasso di remissione di molti tumori solidi tramite un cotrattamento con altri tipi di agenti antitumorali (Mark et al., 2007). In questo caso, l'uso degli inibitori delle HDAC potrebbe essere un'importante approccio terapeutico aggiuntivo al trattamento della TSC che è tutt'ora in fase di sviluppo (Lesma et al., 2005; Bissler et al., 2008).

Come è già stato descritto per le cellule $TSC2^{-/-}$ ASM (Lesma et al., 2005), anche le cellule $TSC2^{-/meth}$ ASM e le cellule LAM/TSC isolate dal versamento chiloso necessitano l'aggiunta dell'EGF nel terreno di coltura, e l'esposizione ad anticorpi diretti contro il recettore dell'EGF determina il blocco della crescita e causa la morte cellulare. Il tasso di proliferazione delle cellule $TSC2^{-/-}$, $TSC2^{-/meth}$ e LAM/TSC è simile, quindi la perdita di tuberina, anche se causata da differenti lesioni genetiche, determina la dipendenza dall'EGF per la proliferazione. Il

segnale attivato dal recettore dell'EGF (EGFR) regola il differenziamento cellulare, la proliferazione, e la migrazione e può essere coinvolto nella fosforilazione costitutiva di S6. Gli anticorpi anti-EGFR hanno dimostrato la loro efficacia nel trattamento di differenti tipi di tumori, come nel cancro del colon retto e nel tumore della testa e del collo (Vokes et al., 2006). In questo studio proponiamo che gli anticorpi monoclonali anti-EGFR possano avere un effetto terapeutico anche nel trattamento della TSC e della LAM.

La rapamicina, un inibitore specifico di mTOR, è stato identificato come un potenziale farmaco per il trattamento della TSC e della LAM (Lee et al., 2005; Meikle et al., 2008). Nelle cellule TSC2^{-/-} ASM la rapamicina causa morte cellulare solo quando è aggiunta al terreno di coltura al momento del piastramento (Lesma et al., 2005). Il trattamento con la rapamicina determina la riduzione della fosforilazione costitutiva di S6 nelle cellule TSC2^{-meth} ASM ed è in grado d'inibire significativamente la proliferazione cellulare, sia al momento del piastramento sia quando le cellule sono adese alla piastra di coltura. L'effetto inibitorio della rapamicina sulla proliferazione delle cellule TSC2^{-meth} non è dovuto all'attivazione del processo apoptotico.

I nostri dati sulla rapamicina sono in accordo con quelli riportati in studi recenti *in vivo* nei quali è stato dimostrato che la rapamicina riduce le dimensioni degli amartomi ma solo durante la terapia. Infatti, quando il trattamento viene sospeso le dimensioni degli amartomi, diventano anche superiori a quelle registrate all'inizio della cura farmacologica (Bissler et al., 2008). Anche nei topi TSC^{-/+} la rapamicina è efficace nel ridurre le dimensioni dei tumori, che ritornano alle dimensioni iniziali con la sospensione del trattamento (Pollizzi et al. 2009). Le cellule LAM/TSC, a differenza delle cellule TSC2^{-/-} e TSC2^{-meth} ASM, sembrano essere molto più sensibili all'azione del farmaco sia quando viene somministrato al momento del piastramento sia quando le cellule sono adese alla piastra di coltura.

Oltre all'effetto sulla proliferazione dovuto alla perdita di tuberina, abbiamo osservato che nelle cellule TSC2^{-meth} ASM LY294002, inibitore specifico di PI3K, non è in grado d'inibire la fosforilazione di Akt indotta dal fattore di crescita insulino simile di tipo I (IGF-I). In seguito al trattamento con la TSA viene restaurata la capacità inibitoria di LY294002 sulla fosforilazione di Akt. Anche nelle cellule TSC2^{-/-} ASM LY294002 non è efficace sull'attività di PI3K, tuttavia

in seguito all'introduzione del gene *TSC2* il farmaco ha di nuovo effetto (Lesma et al., 2008). Questi risultati indicano che la diversa sensibilità ai farmaci è correlata all'espressione di tuberina. Diversamente dalle due popolazioni provenienti da AML, le cellule LAM/TSC isolate dal chilo sembrano essere invece sensibili all'effetto di LY294002 che è in grado di indurre la diminuzione della fosforilazione di Akt, Erk ad S6 indotta dall'IGF-I. Il farmaco è inoltre in grado di agire in maniera sinergica con la rapamicina nell'inibire l'attività di PI3K. L'*epithelial to mesenchymal transition (EMT)* è un processo importante durante l'embriogenesi, e negli ultimi anni, è stato dimostrato un suo ruolo nella progressione del cancro. Nelle cellule tumorali l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali sembra essere un evento transiente e cruciale per le capacità migratoria e invasiva. Lo stato mesenchimale è, infatti, associato alla capacità delle cellule di migrare negli organi e di mantenere le caratteristiche di "staminalità" permettendo solo successivamente nel sito bersaglio una differenziazione con l'inizio delle metastasi. Inoltre, è stata dimostrata la presenza di cellule mesenchimali nei tumori renali di pazienti affetti da TSC (Kato et al., 2009). Nella TSC e nella LAM non è chiaro come le cellule possano raggiungere i vari organi e causare la formazione di amartomi quindi, l'evidenza di caratteristiche di EMT nelle cellule TSC e LAM suggerisce un possibile meccanismo simile a quello delle cellule tumorali per la TSC e la LAM.

Durante il processo di EMT le caratteristiche cellulari vengono profondamente modificate. In particolare, l'acquisizione della capacità migratoria è dovuta all'alterata interazione tra cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. La maggior parte delle cellule sono dipendenti dall'ancoraggio alla matrice cellulare per la loro crescita e sopravvivenza, a differenza delle cellule cancerose. È stato dimostrato che la resistenza all'*anoikis* promuove la metastasi e durante il processo di EMT le cellule mostrano resistenza a questo particolare processo di apoptosi. Le cellule LAM/TSC isolate dal versamento chiloso sono vitali e passano da uno stato in cui sono adese alla piastra di coltura ad uno in cui si trovano sospese. Durante lo stadio in sospensione la fosforilazione di S6 è fortemente inibita.

Uno dei passaggi cruciali dell'EMT è la perdita di E-caderina che causa la soppressione dell'interazione tra cellule. È stato dimostrato che durante l'EMT l'attività delle giunzioni di aderenza è profondamente modificata attraverso

l'inibizione dell'E-caderina. La perdita di questa proteina, inoltre, promuove la metastasi inducendo, in parte, la resistenza all'*anoikis* (Onder et al., 2008). Nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo viene persa l'espressione di E-caderina che non viene espressa nelle cellule metastatizzanti. Le cellule LAM/TSC sono inoltre positive ai marcatori mesenchimali vimentina e SNAIL.

In conclusione questo studio ha dimostrato per la prima volta che la metilazione del gene *TSC2* può causare la mancanza dell'espressione di tuberina e lo sviluppo del fenotipo cellulare TSC2. L'inibitore delle HDAC, TSA e l'inibitore della DNA metiltransferasi, 5-AZA, sono in grado d'indurre l'espressione di tuberina e revertire le caratteristiche fenotipiche, biochimiche e farmacologiche delle cellule TSC2 isolate. La crescita di queste cellule è dipendente dall'EGF, e il blocco dell'EGFR causa la loro morte. Queste cellule metilate, diversamente dalle cellule TSC2^{-/-}, sono molto più sensibili all'effetto della rapamicina. Inoltre, le cellule LAM/TSC presentano caratteristiche di EMT che potrebbero spiegare la loro capacità invasiva e di metastatizzare.

BIBLIOGRAFIA

Arbiser JL, Yeung R, Weiss SW, Arbiser ZK, Amin MB, Cohen C, Frank D, Mahajan S, Herron GS, Yang J, Onda H, Zhang HB, Bai X, Uhlmann E, Loehr A, Northrup H, Au P, Davis I, Fisher DE, Gutmann DH. The generation and characterization of a cell line derived from a sporadic renal angiomyolipoma, *Am J Pathol*; 159:483-91, 2001.

Astrinidis A, Senapedis W, Coleman TR, Henske EP. Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J Biol Chem* 2003;278:51372–51379.

Astrinidis A, Senapedis W, Henske EP. Hamartin, the tuberous sclerosis complex 1 gene product, interacts with polo-like kinase 1 in a phosphorylation-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2006;15:287–297.

Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol*. 2002 Nov;22(22):7929-41.

Ayroldi E, Zollo O, Bastianelli A, Marchetti C, Agostini M, Di Virgilio R, Riccardi C. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1605-15.

Aubry MC, Myers JL, Ryu JH, Henske EP, Logginidou H, Jalal SM, Tazelaar HD. Pulmonary lymphangiomyomatosis in a man. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:749–752

Avila NA, Kelly JA, Chu SC, Dwyer AJ, Moss J. Lymphangiomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings. *Radiology*. 2000 Jul;216(1):147-53.

Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, Jiang Y. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* 2007;318:977–980.

Barnes EA, Kenerson HL, Jiang X, Yeung RS. Tuberin Regulates E-Cadherin Localization. Implications in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Am J Pathol*. 2010 Sep 2.

Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):84-9

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998, 72:141–196

Bi G, Jiang G: The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects. *Cell Mol Immunol* 2006, 3:285–290

Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* 2006;75:189–210.

Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, Schmithorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J, Salisbury S, Franz DN. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med*. 2008 Jan 10;358(2):140-51.

Bittmann I, Rolf B, Amann G, Lohrs U. Recurrence of lymphangioleiomyomatosis after single lung transplantation: new insights into pathogenesis. *Hum Pathol* 2003, 34:95–98

Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 2004;18:2893–2904.

Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell* 2003;4:147–158.

Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23;280(38):33076-82.

Campioni M, Severino A, Manente L, Tuduce IL, Toldo S, Caraglia M, Crispi S, Ehrmann M, He X, Maguire J, De Falco M, De Luca A, Shridhar V, Baldi A. The serine protease HtrA1 specifically interacts and degrades the tuberous sclerosis complex 2 protein. *Mol Cancer Res*. 2010 Sep;8(9):1248-60.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):76-83.

Cannarile L, Zollo O, D'Adamio F, Ayroldi E, Marchetti C, Tabilio A, Bruscoli S, Riccardi C. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ*. 2001 Feb;8(2):201-3.

Cao Y, Kamioka Y, Yokoi N, Kobayashi T, Hino O, Onodera M, Mochizuki N, Nakae J. Interaction of FoxO1 and TSC2 induces insulin resistance through activation of the mammalian target of rapamycin/p70 S6K pathway. *J Biol Chem* 2006;281:40242–40251.

Carbonara C, Longa L, Grosso E, Borrone C, Garrè MG, Brisigotti M, Migone N.

9q34 loss of heterozygosity in a tuberous sclerosis astrocytoma suggests a growth suppressor-like activity also for the TSC1 gene. *Hum Mol Genet.* 1994 Oct;3(10):1829-32.

Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP: Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:6085–6090

Chakraborty S, Mohiyuddin SMA, Gopinath KS, Kumar A: Involvement of TSC genes and differential expression of other members of the mTOR signalling pathway in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2008, 8:163–175.

Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan KL. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2006;281:8313–8316.

Copp, J. Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res.* 2009 69, 1821–1827

Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med.* 2006 Sep 28;355(13):1345-56

Crooks DM, Pacheco-Rodriguez G, DeCastro RM, McCoy JP Jr, Wang JA, Kumaki F, Darling T, Moss J. Molecular and genetic analysis of disseminated neoplastic cells in lymphangiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 14;101(50):17462-7.

Dada, S. Demartines N, Dormond O. mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008 372, 875–879

Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem* 2002;277:35364–35370.

Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 1999;253:100–109.

Eble JN. Angiomyolipoma of kidney. *Semin Diagn Pathol.* 1998 Feb;15(1):21-40

El-Hashemite N, Walker V, Kwiatkowski DJ: Estrogen enhances whereas tamoxifen retards development of Tsc mouse liver hemangioma: a tumor related to renal angiomyolipoma and pulmonary lymphangiomyomatosis. *Cancer Res* 2005, 65:2474–2481

Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D, Sorokin A, Ovchinnikov LP, Davicioni E, Triche TJ, Sorensen PH. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1

promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*. 2009 May 5;15(5):402-15.

Folpe AL: Neoplasms with perivascular epitheloid cell differentiation (PEComas). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics: Tumors of Soft Tissue and Bone*. Edited by CDM Fletcher, KK Unni, F Mertens. Lyon, France, IARC Press, 2002, pp.221–222

Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 2003;11:1457–1466.

Gartel AL. p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors*. 2009 Mar-Apr;35(2):161-4.

Gingras AC, , Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 2001;15:2852–2864.

Goh S, Butler W, Thiele EA. Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 2004;63:1457–1461.

Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, Walker CL, Noonan D, Kwiatkowski DJ, Chou MM, Panettieri RA, Krymskaya VP, Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the Tsc2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM), *J Biol Chem*; 277:30958–30967, 2002.

Goncharova E, Goncharov D, Noonan D, Krymskaya VP. TSC2 modulates actin cytoskeleton and focal adhesion through TSC1-binding domain and the Rac1 GTPase. *J Cell Biol*. 2004 Dec 20;167(6):1171-82.

Goncharova EA, Goncharov DA, Lim PN, Noonan D, Krymskaya VP. Modulation of cell migration and invasiveness by tumor suppressor TSC2 in lymphangiomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Apr;34(4):473-80.

Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1127-30

Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005;24:7410–7425.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006 Dec;11(6):859-71.

Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):44180-6.

Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 2005;280:32081–32089.

Han S, Santos TM, Puga A, Roy J, Thiele EA, McCollin M, Stemmer-Rachamimov A, Ramesh V. Phosphorylation of tuberin as a novel mechanism for somatic inactivation of the tuberous sclerosis complex proteins in brain lesions. *Cancer Res* 2004;64:812–816.

Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Jul;34(3):255-68.

Hengstschla"ger M, Rodman DM, Miloloza A, Hengstschlager-Otnad E, Rosner M, Kubista M: Tuberous sclerosis gene products in proliferation control. *Mutat Res* 2001, 488:233–239

Henske EP, Tuberous sclerosis and the kidney: from mesenchyme to epithelium, and beyond, *Pediatr Nephrol*; 20(7):854-7, 2005.

Henske EP, Wessner LL, Golden J, Scheithauer BW, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Klein_Szanto AJ, Kwiatkowski DJ, Yeung RS: Loss of tuberin in both subependymal giant cell astrocytomas and angiomyolipomas supports a two-hit model for the pathogenesis of the tuberous sclerosis tumors. *Am J Pathol* 1997, 151:1639–1647

Henske EP. Metastasis of benign tumor cells in tuberous sclerosis complex. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Dec;38(4):376-81.

Holliday R, Pugh JE: DNA modification mechanism and gene activity during development. *Science* 1975, 187:226–232

Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007;130:440–455.

Huang, J. Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol. Cell Biol*. 2008 28, 4104–4115

Inoki K, , Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003;17:1829–1834.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002;4:648–657.

Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 2006;126:955–968.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577–590.

Jacinto, E. Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 2004 6, 1122–1128

Jeyapalan AS, Orellana RA, Suryawan A, O'Connor PM, Nguyen HV, Escobar J, Frank JW, Davis TA. Glucose stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs through an AMPK- and mTOR-independent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Aug;293(2):E595-603.

Jiang WG, Sampson J, Martin TA, Lee-Jones L, Watkins G, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE: Tuberlin and hamartin are aberrantly expressed and linked to clinical outcome in human breast cancer: the role of promoter methylation of TSC genes. *Eur J Cancer* 2005, 41:1628–1636

Jones PA, Laird PW: Cancer epigenetics come to age. *Nat Genet* 1999, 21:163–167

Jozwiak S, Schwartz RA, Janniger CK, Bielicka-Cymerman J. Usefulness of diagnostic criteria of tuberous sclerosis complex in pediatric patients. *J Child Neurol* 2000;15:652–659.

Karbowniczek M, Yu J, Henske EP. Renal angiomyolipomas from patients with sporadic lymphangiomyomatosis contain both neoplastic and non-neoplastic vascular structures. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):491-500

Karbowniczek M, Henske EP. The role of tuberlin in cellular differentiation: are B-Raf and MAPK involved? *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Nov;1059:168-73.

Kassel O, Sancono A, Krätzschar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):7108-16

Kato I, Inayama Y, Yamanaka S, Ohshiro H, Gomi K, Shirai S, Aoki I, Uemura H, Miyoshi Y, Kubota Y, Yao M, Nagashima Y. Epithelioid angiomyolipoma of the kidney. *Pathol Int.* 2009 Jan;59(1):38-43

Khatri S, Yepiskoposyan H, Gallo CA, Tandon P, Plas DR. FOXO3a regulates glycolysis via transcriptional control of tumor suppressor TSC1. *J Biol Chem.* 2010 May 21;285(21):15960-5. Epub 2010 Apr 6.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163–175.

Klos KS. ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:2028–2037.

Knudson AG Jr, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci USA*; 68(4):820-3, 1971.

Koptides M, Mean R, Demetriou K, Pierides A, Deltas CC: Genetic evidence for a trans-heterozygous model for cytogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2000, 9:447–452

Krymskaya VP. Smooth muscle-like cells in pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Jan 1;5(1):119-26.

Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, Hall A. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Biol* 2000;2:281–287.

Lazorchak AS, Liu D, Facchinetti V, Di Lorenzo A, Sessa WC, Schatz DG, Su B. Sin1-mTORC2 suppresses rag and il7r gene expression through Akt2 in B cells. *Mol Cell*. 2010 Aug 13;39(3):433-43.

Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Logginidou H, Ao X, Russo I, Henske EP. Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Chest*. 2000 Jan;117(1):25-30

Lee L, Sudentas P, Donohue B, Asrican K, Worku A, Walker V, Sun Y, Schmidt K, Albert MS, El-Hashemite N, Lader AS, Onda AS, Zhang H, Kwiatkowski DJ, Dabora SL: Efficacy of a rapamycin analog (CCI-779) and IFN-gamma in tuberous sclerosis mouse model. *Genes Chromosom Cancer* 2005, 42:213–227

Lesma E, Grande V, Ancona S, Carelli S, Di Giulio AM, Gorio A. Anti-EGFR antibody efficiently and specifically inhibits human TSC2^{-/-} smooth muscle cell proliferation. Possible treatment options for TSC and LAM. *PLoS One*. 2008;3(10):e3558.

Lesma E, Grande V, Lesma E, Carelli S, Brancaccio D, Canevini MP, Alfano RM, Coggi G, Di Giulio AM, Gorio A: Isolation and growth of smooth muscle-like cells derived from tuberous sclerosis complex-2 human renal angiomyolipoma: EGF is the required growth factor. *Am J Pathol* 2005, 167:1093–1103.

Lesma E, Sirchia SM, Ancona S, Carelli S, Bosari S, Ghelma F, Montanari E, Di Giulio AM, Gorio A. The methylation of the TSC2 promoter underlies the

abnormal growth of TSC2 angiomyolipoma-derived smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2009 Jun;174(6):2150-9.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 2005;15:702–713.

Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005;121:179–193

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell* 2002;10:151–162.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–1274.

Marks PA, Breslow R: Dimethyl sulfoxide to varinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 2007, 25:84–90

McCormack FX, Moss J, S-LAM in a man? *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Jul 1;176(1):3-5.

Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis I, Lane H, Sahin M, Kwiatkowski DJ: Response of a neural model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *J Neurosci* 2008, 28:5422–5432

Mejlvang J, Kriaievska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2007 Nov;18(11):4615-24. Epub 2007 Sep 12.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995, 1:686–692

Miyazaki M, McCarthy JJ, Esser KA. Insulin like growth factor-1-induced phosphorylation and altered distribution of tuberous sclerosis complex (TSC)1/TSC2 in C2C12 myotubes. *FEBS J.* 2010 May;277(9):2180-91.

Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzemberger RA, Bechtle J, Brooks PG, Hedin CJ, Hunsberger S, Kristof AS. Prevalence and clinical characteristics of lymphangioleiomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Aug 15;164(4):669-71.

Nakashima, A., Yoshino, K., Miyamoto, T., Eguchi, S., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K. Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2007, 361: 218-23.

Niida Y, Stemer-Rachamimow AO, Logrip M, Tapon D, Perez R, Kwiatkowski DJ, Sims K, MacCollin M, Louis DN, Ramesh V: Survey of somatic mutations in tuberous sclerosis complex (TSC) hamartomas suggests different genetic mechanisms for pathogenesis of TSC lesions. *Am J Hum Genet* 2001, 69:493–503

Neumann HP, Schwarzkopf G, Henske EP. Renal angiomyolipomas, cysts, and cancer in tuberous sclerosis complex. *Semin Pediatr Neurol.* 1998 Dec;5(4):269-75.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkuis FJ, Thomas G. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 4;102(40):14238-43.

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008 May 15;68(10):3645-54.

Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1184:87-105

Pacheco-Rodriguez G, Steagall WK, Crooks DM, Stevens LA, Hashimoto H, Li S, Wang JA, Darling TN, Moss J. TSC2 loss in lymphangiomyomatosis cells correlated with expression of CD44v6, a molecular determinant of metastasis. *Cancer Res* 2007;67:10573-81.

Partovian, C. Ju R, Zhuang ZW, Martin KA, Simons M. Syndecan-4 regulates subcellular localization of mTOR Complex2 and Akt activation in a PKCalpha-dependent manner in endothelial cells. *Mol. Cell* 2008 32, 140–149

Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 1991 Apr;10(4):885-92.

Pearce, L.R. Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gourlay R, Magnuson MA, Alessi DR. Identification of Protor as a novel Rictorbinding component of mTOR complex-2. *Biochem. J.* 2007 405, 513–522

Pearson G, English JM, White MA, Cobb MH ERK5 and ERK2 cooperate to regulate NF-kappaB and cell transformation. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):7927-31.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun;7(6):415-28.

Pollizzi K, Malinowska-Kolodziej I, Stumm M, Lane H, Kwiatkowski D. Equivalent benefit of mTORC1 blockade and combined PI3K-mTOR blockade in a mouse model of tuberous sclerosis. *Mol Cancer*. 2009 Jun 15;8:38.

Potter CJ, , Huang H, Xu T. *Drosophila* Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 2001;105:357–368.

Prather P, de Vries PJ. Behavioral and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*

Proud CG. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 2007;403:217–234.

Qin W, Chan JA, Vinters HV, Mathern GW, Franz DN, Taillon BE, Bouffard P, Kwiatkowski DJ. Analysis of TSC cortical tubers by deep sequencing of TSC1, TSC2 and KRAS demonstrates that small second-hit mutations in these genes are rare events. *Brain Pathol*. 2010 Nov;20(6):1096-105.

Robb VA, Astrinidis A, Henske EP. Frequent [corrected] hyperphosphorylation of ribosomal protein S6 [corrected] in lymphangioleiomyomatosis-associated angiomyolipomas. *Mod Pathol*. 2006 Jun;19(6):839-46. Erratum in: *Mod Pathol*. 2006 Jun;19(6):889.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 14;101(37):13489-94.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol*. 2004 14, 1296–1302

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098–1101.

Sirchia SM, Ramoscelli L, Grati FR, Barbera F, Coradini D, Rossella F, Porta G, Lesma E, Ruggeri A, Radice P, Simoni G, Miozzo M. Loss of the inactive X chromosome and replication of the active X in BRCA1-defective and wild-type breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Mar 15;65(6):2139-46.

Schalm SS, Blenis J. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol*. 2002 Apr 16;12(8):632-9.

Schumacher AM, Velentza AV, Watterson DM, Dresios J. Death-associated protein kinase phosphorylates mammalian ribosomal protein S6 and reduces protein synthesis. *Biochemistry (Mosc)* 2006;45:13614–13621.

Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:3329–3335

Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J* 1998;17:6649–6659.

Smalley SL. Autism and tuberous sclerosis. *J Autism Dev Disord* 1998;28:407–414.

Smith EM, Finn SG, Tee AR, Browne GJ, Proud CG. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18717-27.

Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):39970-81.

Stevens C, Lin Y, Harrison B, Burch L, Ridgway RA, Sansom O, Hupp T. Peptide combinatorial libraries identify TSC2 as a death-associated protein kinase (DAPK) death domain-binding protein and reveal a stimulatory role for DAPK in mTORC1 signaling. *J Biol Chem* 2009;284:334–344.

Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK: The drosophila tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* 2001, 105:345–355

The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16, *Cell*; 75(7):1305-15, 1993.

Thedieck, K. Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenö P, Arriemerlou C, Hall MN. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. 2007 *PLoS One* 2, e1217

Thiele EA. Managing epilepsy in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004;19:680–686.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Dec;193(9):1969-78; discussion 1978-9.

Toyooka S, Toyooka KO, Miyajima K, Reddy JL, Toyota M, Sathyanarayana UG, Padar A, Tockman MS, Lam S, Shivapurkar N, Gazdar AF: Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Cancer Res* 2003, 9:3034–3041

Tsukiyama-Kohara K, et al. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4EBP1. *Nat Med* 2001;7:1128–1132.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004;431:200–205.

Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004 May 15;18(10):1131-43.

Vokes EE, Chu E: Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology* 2006, 20(5 Suppl2):15–25

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471–484.

Yasin SA, Latak K, Becherini F, Ganapathi A, Miller K, Campos O, Picker SR, Bier N, Smith M, Thom M, Anderson G, Helen Cross J, Harkness W, Harding B, Jacques TS. Balloon cells in human cortical dysplasia and tuberous sclerosis: isolation of a pathological progenitor-like cell. *Acta Neuropathol.* 2010 Jul;120(1):85-96.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37.

FIGURE E TABELLE