

Tesi di Laurea: “Regolazione dell’attività trascrizionale del mecano-trasduttore YAP da parte della MAPK ERK5” (Sintesi)

Autore: V. Consalvi

Relatore: L. Amicone

Introduzione. YAP

YAP (Yes-associated protein) è un co-fattore trascrizionale che in seguito alla risposta a diversi stimoli extracellulari, soprattutto quelli di origine meccanica, regola l’espressione di un elevato numero di geni coinvolti in diversi processi come proliferazione, differenziamento, omeostasi tissutale e mantenimento della staminalità^{1, 2}.

YAP è coinvolto nella fisiologia di molti organi e tessuti e per la sua azione positiva sulla proliferazione cellulare e per la sua attività antiapoptotica, è considerato un importante fattore pro-oncogenico. La sua overespressione, o attività costitutiva, è associata infatti a molti tumori umani^{3,4}.

Il ruolo più studiato di YAP è quello di co-fattore trascrizionale. La sua funzione è strettamente correlata a quella di TAZ, un altro co-fattore trascrizionale ad esso paralogo, con cui interagisce formando un complesso dimerico¹.

Per poter svolgere questa funzione, il complesso YAP/TAZ, non avendo domini di legame al DNA, si lega a fattori trascrizionali, principalmente a quelli appartenenti alla famiglia TEAD¹.

Una volta avvenuta l’interazione con il fattore TEAD sul DNA, essi possono reclutare il complesso modificatore della cromatina SWI/SNF e la H3K4 metiltrasferasi NcoA6, attivando la trascrizione di diversi geni target, tra cui i più noti sono CTGF e Cry61⁵⁻⁸. YAP e TAZ presentano anche una funzione di repressione trascrizionale. Recentemente è stato visto che YAP/TAZ bloccano

l’espressione di geni come DDIT4 e Trail andando a reclutare il complesso NuRD⁹. Dati recenti indicano il gene master della Transizione Epitelio-Mesenchima (EMT) Snail ed il gene master della Transizione Mesenchima-Epitelio (MET) e differenziamento epatocitario HNF4 α , come nuovi target trascrizionali, rispettivamente positivo e negativo, di YAP¹⁰.

YAP rappresenta l’effettore finale di un’importante via molecolare di segnalazione, il pathway di Hippo, in grado di rispondere a diversi stimoli, sia di natura meccanica che biochimica, provenienti dal microambiente cellulare. Il pathway di Hippo comprende un vasto numero di proteine, la maggior parte delle quali conservata evolutivamente dalla *Drosophila* fino ai mammiferi¹¹. Nella cascata di eventi molecolari del pathway che portano all’attivazione di YAP, la fosforilazione e l’attivazione della Ser/Thr chinasi chiamata LATS1/2 gioca un ruolo importante. LATS1/2, infatti, è in grado di fosforilare YAP sui residui S127 e S381 favorendone il sequestro citoplasmatico oppure la degradazione proteasoma-mediata^{1, 12}. Quindi un pathway di Hippo attivo comporta l’inattivazione funzionale della proteina YAP. Invece se la chinasi LATS1/2 non viene attivata, YAP non viene fosforilata e potrà traslocare nel nucleo per svolgere la sua funzione sul DNA, grazie all’interazione con fattori trascrizionali, la maggior parte dei quali appartenenti alla famiglia TEAD¹³. Per quanto riguarda l’attivazione di LATS1/2, essa in generale è dovuta all’intervento della chinasi MST1/2 anche se si hanno sempre più evidenze di vie

di attivazione alternative MST1/2 indipendenti^{14, 15}.

A questo riguardo è importante la proteina delle giunzioni baso laterali Scribble (SCRIB). La delocalizzazione di SCRIB dalla membrana e quindi una riduzione della sua attività sulle chinasi inibenti YAP/TAZ, comporta una traslocazione nucleare di questi ultimi e la conseguente attivazione di specifici profili trascrizionali^{16, 17}.

Un'altra proteina di membrana che sembra giocare un ruolo importante nel trasdurre segnali extracellulari in grado di regolare il pathway di Hippo nelle cellule epiteliali, è la Neurofibromina 2 (NF2). NF2 è un potente soppressore tumorale in grado, quando localizzata in membrana, di interagire con numerose proteine e di reclutare le chinasi LATS coordinandone l'attivazione¹⁵.

Oltre che dalle chinasi LATS1/2, YAP e TAZ possono essere inibiti da regolatori a monte del pathway di Hippo i quali li sequestrano e ne impediscono l'accesso al nucleo. Tra questi regolatori troviamo AMOT^{18, 19}, Tirosin Fosfatasi 14 (PTPN14)^{20, 21} e alfa-catenina.

Per anni si è ritenuto che il meccanismo di attivazione di YAP, per lo meno nel cancro, fosse quasi esclusivamente da attribuire allo "spegnimento" del pathway di Hippo con conseguente perdita delle funzioni delle chinasi LATS1/2 e delle fosforilazioni inattivanti^{12, 22}.

D'ogni modo una crescente letteratura dimostra che le condizioni note per presentare uno YAP attivo (es. trattamento con fattori di crescita e stimolazione meccanica o trasformazione neoplastica della cellula) siano caratterizzate da meccanismi di attivazione del co-fattore trascrizionale del tutto indipendenti dal signalling di Hippo oppure LATS1/2-dipendenti ma MST1/2-indipendenti²³⁻²⁶.

Vie di segnalazione in grado di attivare YAP in maniera Hippo o MST1/2-

indipendente, sono quelle che coinvolgono le GTPasi della famiglia Rho, SRC/Yes e quelle che partono da recettori associati a proteine G²⁷.

La MAPK ERK5

L'attivazione di ERK5 è coinvolta nella regolazione di molti processi cellulari, inclusi la proliferazione, la sopravvivenza, l'angiogenesi, il differenziamento, la transizione epitelio-mesenchima e il cancro²⁸.

Studi sui topi knock-out per ERK5, hanno dimostrato un ruolo importante della proteina nello sviluppo embrionale e, in particolare, nel differenziamento muscolare, neuronale ed endoteliale.

La mancanza della funzione di ERK5 induce infatti la morte dell'animale durante lo sviluppo dovuta principalmente al fallimento dell'angiogenesi, a un ridotto differenziamento neuronale e a difetti cardiovascolari²⁹⁻³¹.

Recentemente, è stato descritto un ruolo di ERK5 nella transizione epitelio-mesenchimale, il processo di transdifferenziamento durante il quale le cellule epiteliali, in determinate condizioni e sotto l'azione di fattori specifici, perdono la morfologia cuboidale e la polarità e acquisiscono un fenotipo fibroblastoide con capacità migratorie³². In particolare, ERK5 è stata coinvolta nella regolazione trascrizionale e post-traduzionale di proteine master dell'EMT (Slug e Snail, rispettivamente)³³.

In accordo con il coinvolgimento di ERK5 in funzioni cellulari deregolate nei tumori, la sua via di segnalazione è stata trovata costitutivamente attiva in molti tumori umani, in seguito all'attivazione di diversi oncogeni o per amplificazione genica, dove contribuisce all'acquisizione di un fenotipo più maligno e metastatico, resistenza all'apoptosi, angiogenesi, farmacoresistenza e correla con una prognosi infausta^{34- 39}.

Scopo di questa tesi sperimentale è stato valutare il ruolo svolto dalla proteina chinasi ERK5 nella regolazione positiva di YAP.

L'ipotesi di lavoro parte da una serie di osservazioni, in gran parte raccolte nel laboratorio in cui ho preparato la tesi, tra le quali:

- a. ERK5 è risultato coinvolto nella trasduzione di diversi stimoli meccanici, nei quali il ruolo di YAP è stato ampiamente dimostrato, quali: lo stress da scorrimento di liquidi (shearstress) e lo stiramento della matrice (stretching);
- b. ERK5 ha un importante ruolo di controllo positivo della EMT indotta dal TGF β , processo in cui anche la proteina YAP risulta up-regolata;
- c. ERK5 è un importante regolatore positivo della proteina master della EMT Snail, che recentemente abbiamo dimostrato essere sottoposta ad un controllo diretto da parte di YAP.

Risultati

L'attività di YAP correla positivamente con quella di ERK5 in cellule epatiche.

Come già anticipato, diversi dati, sia provenienti dal nostro laboratorio che tratti dalla letteratura scientifica, indicano ERK5 come un possibile regolatore dell'attività del mecano-trasduttore YAP.

L'ipotesi sperimentale alla base del mio lavoro di tesi, e cioè che ERK5 possa guidare una via di regolazione a monte di YAP alternativa o cooperante con quella canonica LATS-dipendente, è stata verificata in linee cellulari di origine epatica, precedentemente caratterizzate per la loro attività trascrizionale YAP-dipendente. Le cellule precursori/staminali RLSC esprimono YAP a livello sia trascrizionale che proteico e localizzano la proteina nel nucleo, in cui essa funziona come attivatore/inibitore della

trascrizione di specifici geni target. Inversamente, gli epatociti differenziati HepE14 mostrano solo una residuale presenza della proteina YAP, prevalentemente citoplasmatica, incapace di accendere uno specifico profilo trascrizionale^{10, 40}.

Nell'ipotesi di una regolazione di YAP ERK5-dipendente, prima di tutto abbiamo voluto verificare se il comportamento biologico già noto della proteina YAP in queste linee cellulari correlasse in maniera diretta con l'attività di ERK5.

Come mostrato nella Figura 1, e a conferma di dati già prodotti nel nostro laboratorio⁴⁰, nelle RLSC la proteina YAP viene prodotta a livelli significativamente maggiori che nelle HepE14, la sua localizzazione, indagata tramite immunofluorescenza indiretta, è esclusivamente nucleare (Fig. 1A) e, coerentemente con questi dati, risulta significativamente trascritto il suo principale gene target positivo, CTGF (Fig. 1B).

Nelle cellule HepE14 la proteina YAP che ancora viene prodotta è in larga parte trattenuta nel citoplasma, con conseguente bassa espressione di CTGF (Fig. 1A e 1B).

La correlazione tra la funzione di ERK5 e quella di YAP è stata indagata nelle RLSC e nelle HepE14 tramite un doppio saggio di luciferasi in grado di valutare l'attività trascrizionale delle due proteine.

Nelle due linee cellulari è stata valutata la luminescenza emessa in seguito all'attività di due vettori esprimenti il gene della luciferasi sotto il controllo di:

- a) un promotore responsivo al fattore trascrizionale MEF2, uno dei principali target positivi dell'attività chinasi di ERK5 (vettore MEF2-LUC);
- b) un promotore responsivo a YAP, costituito dalla ripetizione di otto sequenze consensus per TEAD, suo principale partner trascrizionale (vettore 8XGTII-LUC) (Fig. 2A).

Come atteso, nelle RLSC è stato riscontrato un livello di attività della luciferasi del costrutto 8XGTII-LUC maggiore che nelle HepE14; nelle stesse cellule anche l'attività

della luciferasi del costrutto MEF2-LUC risulta significativamente maggiore di quella riscontrata nelle cellule con minore attività trascrizionale YAP-dipendente (Fig. 2B).

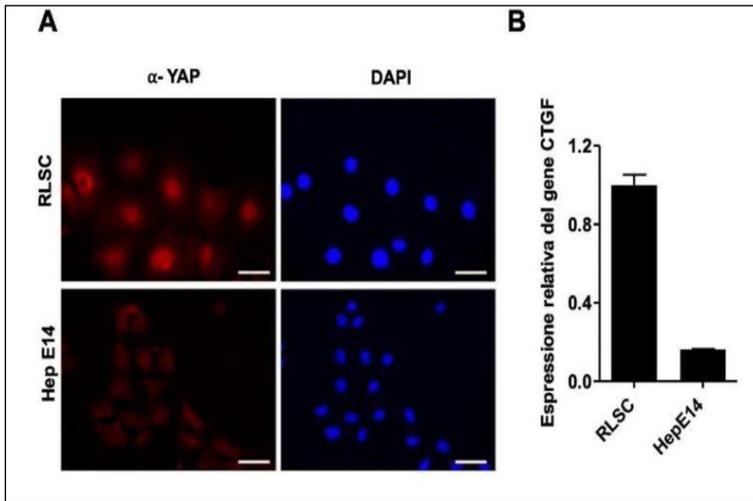


Figura 1: YAP viene prodotta in livelli significativamente maggiori nelle RLSC che nelle HepE14.

A: Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti-YAP (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

B: Analisi di espressione genica ottenuta mediante RT-qPCR del gene CTGF nelle RLSC e nelle HepE14. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come "volte di induzione" rispetto al campione di controllo posto arbitrariamente pari a 1. Risultati rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

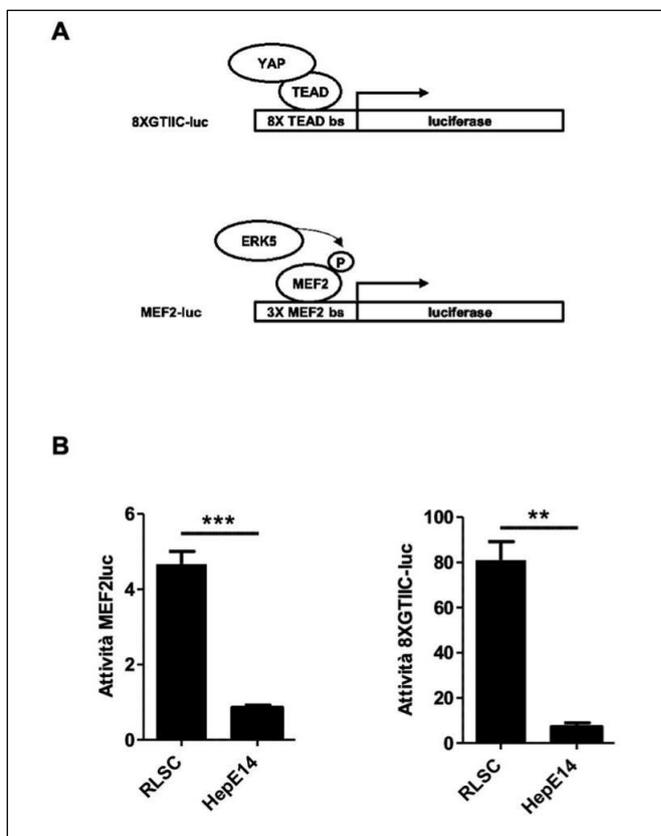


Figura 2: Attività di ERK5 e YAP in RLSC e HepE14.

A: Schematizzazione dei vettori 8XGTII-LUC e MEF2LUC.

B: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (**p<0,01; ***p<0,001).

I dati appena riportati indicano quindi una contemporanea attività di ERK5 e YAP nelle cellule RLSC coltivate in condizioni standard, senza alcuno stimolo istruttivo particolare.

La conferma della correlazione tra le due funzioni è stata ottenuta in esperimenti di stimolazione delle due linee cellulari con segnali noti per modificare dinamicamente l'attività delle due proteine. In particolare, le cellule RLSC sono state fatte crescere su un substrato costituito da un hydrogel con un modulo di elasticità (stiffness) di 0,6 kPa, condizione nota per indurre un cambiamento morfologico e funzionale in senso epiteliale/epatocitario e una contemporanea delocalizzazione della proteina YAP dal nucleo al citoplasma. Al contrario, le cellule HepE14 sono state indotte in EMT tramite trattamento con TGF β , condizione nota per indurre un cambiamento morfologico e funzionale delle cellule in senso mesenchimale/staminale e una contestuale attivazione di ERK5. Come mostrato nella Fig. 3, nelle cellule RLSC cresciute su bassa

stiffness, rispetto a cellule cresciute con metodiche standard su plastica (stiffness dell'ordine dei MegaPa), la proteina YAP delocalizza nel citoplasma e la sua attività trascrizionale scende significativamente (Fig. 3A e 3B). In queste condizioni l'attività di ERK5, testata con saggio di luciferasi tramite vettore MEF2-LUC, diminuisce in modo altrettanto significativo (Fig. 3C).

Al contrario, nelle cellule HepE14 indotte in EMT, oltre che all'atteso incremento dell'attività del vettore MEF2-LUC, si osserva un significativo incremento dell'attività del vettore 8XGTII-LUC (Fig. 3D) e un coerente e notevole aumento dell'espressione dei due geni target positivi di YAP, CTGF e Cyr61 (Fig. 3E), senza che si riscontri un significativo aumento della proteina YAP (Fig. 3F).

In conclusione, i dati fin qui presentati dimostrano una correlazione diretta tra l'attività di ERK5 e quella di YAP, correlazione riscontrabile anche quando si adottano condizioni di crescita in grado di modulare dinamicamente uno dei due fattori.

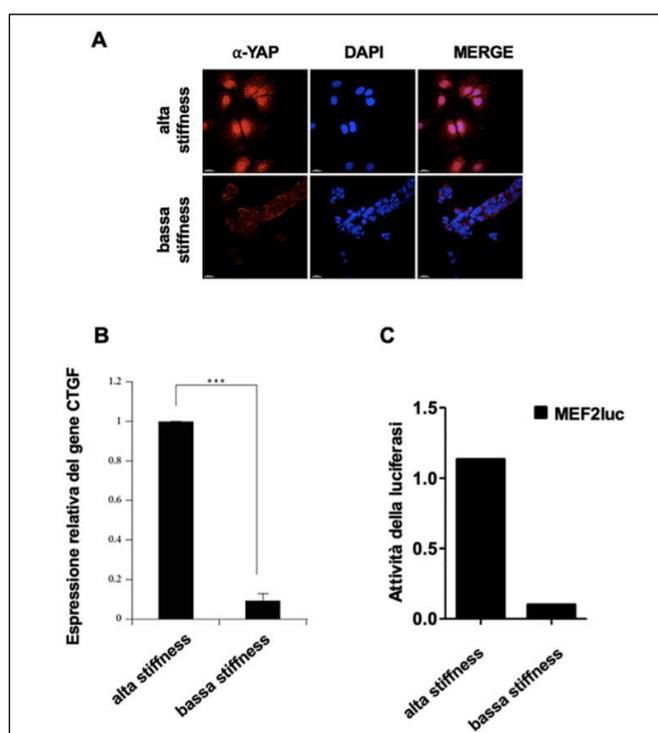


Figura 3: Attività di YAP ed ERK5 in RLSC cresciute su diversi moduli di elasticità.

A: Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti YAP (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

B: Analisi di espressione genica ottenuta mediante RT-qPCR del gene CTGF in condizioni di alta stiffness (plastica) e bassa stiffness (Hydrogel; 0,4 kPa). I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come "volte di induzione" rispetto al campione di controllo posto arbitrariamente pari a 1. Risultati rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

C: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da un singolo esperimento effettuato in triplicato.

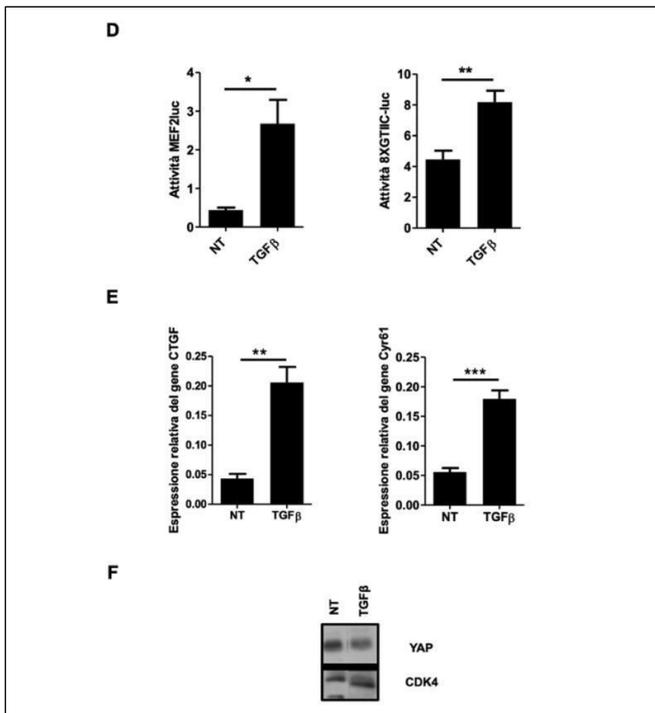


Figura 3 continua: Attività di ERK5 e YAP in HepE14 trattate con TGFβ.

D: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (**p<0,01; ***p<0,001).

E: Analisi RT-qPCR dei geni CTGF e Cyr61. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati riportati come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti.

F: Analisi di Western Blot. La proteina CDK4 è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

ERK5 controlla positivamente la funzione di YAP

I dati presentati finora indicano una correlazione tra le funzioni delle due proteine ERK5 e YAP. Per dimostrare formalmente il ruolo di ERK5 di regolatore positivo a monte di YAP, abbiamo proceduto alla manipolazione della chinasi con esperimenti di over-espressione e di inibizione.

Gli effetti di una over-espressione di ERK5 sulla proteina YAP sono stati valutati nelle cellule HepE14 che, come detto, presentano una bassa attività della chinasi. Cellule HepE14 sono state trasfettate con un vettore esprimente ERK5 e con uno esprimente una forma costitutivamente attiva della chinasi MEK5, suo principale attivatore (questo al fine di garantire non solo una overspressione di ERK5 ma anche una sua efficiente attivazione). L'avvenuta overespressione, e quindi iperattività, di ERK5 e l'eventuale modulazione di risposta della proteina YAP, sono stati valutati mediante saggi di luciferasi. I vettori utilizzati sono stati ancora una volta MEF2-LUC, per la valutazione dell'attività chinasi di ERK5, e 8XGTII-LUC, per la valutazione dell'attività trascrizionale di YAP.

Come mostrato in Fig. 4, ad un aumento significativo dell'espressione della luciferasi ERK5-dipendente corrisponde un significativo aumento dell'attività del vettore YAP-dipendente 8XGTII-LUC (Fig. 4A e 4B), senza che vari il livello della proteina stessa (Fig. 4C).

Questo risultato dà una prima conferma all'ipotesi di una regolazione attiva (diretta o indiretta) di ERK5 sulla funzione trascrizionale di YAP.

Nonostante l'attivazione del gene reporter controllato da elementi responsivi a YAP, nelle cellule HepE14 over-esprimenti ERK5 non si è riscontrato un coerente aumento del gene endogeno CTGF, su cui il cofattore trascrizionale agisce utilizzando le stesse sequenze regolatrici (Fig. 4D).

Per valutare se il diverso comportamento tra espressione del gene reporter e quello del gene target endogeno potesse dipendere dallo stato differenziativo della cellula e quindi da uno specifico stato cromatinico in grado di condizionare l'accessibilità a determinati promotori di fattori trascrizionali, abbiamo esteso l'analisi a cellule che per il loro stato indifferenziato o di trasformazione potessero essere meglio

responsive alla modulazione dell'espressione di geni mesenchimali, come il CTGF. L'over-espressione di ERK5 nelle cellule di epatoma umano HepG2 e nelle cellule indifferenziate RLSC, in effetti, ha confermato l'influenza della chinasi su YAP, i cui geni target positivo e negativo, CTGF e DDIT4, aumentano e diminuiscono rispettivamente in modo significativo il loro livello di espressione (Fig. 4E).

Per dare maggiore consistenza ai dati ottenuti con esperimenti di over-espressione di ERK5, si è voluto valutare l'effetto su YAP di una inibizione dell'attività dell'enzima.

A tal fine si sono allestiti esperimenti di inibizione farmacologica dell'attività di ERK5 in cellule RLSC che, come precedentemente dimostrato, la presentano a livelli significativi.

In particolare, è stata usata una molecola sintetica in grado di inibire in maniera altamente specifica ERK5, la 2-[[2-Ethoxy-4-(4-idrossi-1-piperidinil) fenil] amino] - 5,11-dihidro-5,11-dimetil-6H-pirimidol[4,5-b] [1,4] benzodiazepine-6, nota con il nome commerciale di XMD8-92. Questo inibitore in vivo e in vitro si è dimostrato particolarmente efficace nella soppressione della progressione tumorale in quei tumori dove c'è una iperattivazione di ERK5 (Stecca et al. 2019). In RLSC coltivate in condizioni standard e trattate con XMD8-92, si osserva l'attesa diminuzione dell'attività di ERK5, dimostrata mediante diminuzione dell'attività di luciferasi del costrutto MEF2-LUC, rispetto al campione non trattato (Fig. 5A).

L'inibizione dell'attività di ERK5 determina una significativa diminuzione dell'attività del vettore 8XGTII-LUC rispetto a quanto osservato nelle cellule non trattate (Fig. 5B) con una coerente diminuzione dei target positivi di YAP, CTGF e Cyr61 (Fig. 5C) senza che ci sia una sostanziale diminuzione della proteina (Fig. 5D).

Poiché quindi l'inibizione di ERK5 è sufficiente a ridurre significativamente

l'espressione genica YAP-dipendente in condizioni cellulari di base, abbiamo verificato l'efficacia del trattamento con XMD8-92 anche in cellule epiteliali indotte in EMT tramite il TGF β che, come dimostrato in precedenza, induce una importante attivazione della chinasi e una up-regolazione dell'attività trascrizionale YAP-dipendente.

In cellule HepE14 trattate sia con il TGF β che con XMD8-92, abbiamo osservato la completa inibizione dell'aumento dell'espressione del vettore MEF2-LUC indotto dalla citochina e, cosa rilevante, un altrettanto significativo blocco dell'aumento dell'attività del vettore 8XGTII-LUC (Fig. 6A).

I dati ottenuti con i saggi di luciferasi sono coerenti quelli della trascrizione dei geni target di YAP, CTGF e CYR61, i cui livelli di espressione non risultano più up-regolati dal TGF β dopo il trattamento con l'inibitore di ERK5 (Fig. 6B).

L'ulteriore conferma della funzione esercitata da ERK5 su YAP è stata infine ottenuta in cellule HepE14 over-esprimenti ERK5, dove, in seguito al trattamento con XMD8-92, accanto alla diminuzione dell'attività del vettore MEF2-LUC si osserva quella del vettore 8XGTII-LUC (Fig. 6C).

In conclusione, i dati riportati in questa prima parte del lavoro dimostrano per la prima volta il controllo positivo sull'attività trascrizionale di YAP esercitato dalla proteinkinasi ERK5, ed inseriscono a monte del trasduttore del segnale meccanico un nuovo elemento regolativo alternativo o cooperante con quelli già caratterizzati.

ERK5 regola l'attività di YAP controllando il suo legame al DNA, attraverso una via di segnalazione Hippo-indipendente

Dopo aver dimostrato la funzione regolativa di ERK5 su YAP, abbiamo cercato di caratterizzare i meccanismi molecolari coinvolti.

Considerando che uno dei meccanismi spesso adottati dai regolatori dei fattori trascrizionali per controllarne la funzione è la modulazione della loro localizzazione subcellulare, abbiamo indagato su un eventuale ruolo di ERK5 sulla traslocazione/ritenzione nucleare di YAP. Una immunofluorescenza con anticorpo anti-YAP, allestita in RLSC trattate o meno con l'inibitore XMD8-92, pur mostrando un aumento della presenza della proteina a livello citoplasmatico, rileva un sostanziale mantenimento di YAP nel nucleo (Fig. 7A), riducendo quindi la possibilità (che merita comunque ulteriori studi) che ERK5 possa agire sul cofattore trascrizionale regolandone la distribuzione subcellulare.

Se ERK5 non controlla la quantità di YAP né la sua distribuzione cellulare, una delle ipotesi è che ne possa direttamente o indirettamente regolare la capacità di interagire con le sequenze regolatrici dei geni target. Per verificare questo abbiamo effettuato un esperimento di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo anti-YAP da estratti di RLSC trattate o meno con l'inibitore XMD8-92. Nella figura 7B è mostrato il mancato reclutamento della proteina YAP sul promotore del suo gene target CTGF, quando nelle cellule è inibita la funzione di ERK5.

I dati presentati finora indicano ERK5 come un nuovo regolatore positivo di YAP in grado di influenzarne capacità di essere reclutato sui promotori dei suoi geni target. Nel tentativo di identificare il meccanismo attraverso cui si esplica questa regolazione e considerando che la via di attivazione del mecano-trasduttore più nota e meglio caratterizzata è quella che passa attraverso l'inattivazione delle chinasi LATS1/2, abbiamo voluto verificare se l'azione di ERK5 passasse o meno attraverso l'attività di queste chinasi LATS1/2.

A tal fine ci siamo avvalsi dell'utilizzo di un costrutto che esprime una forma di YAP costitutivamente attiva (YAP5SA) (Zhao B. et

al. 2007), in quanto mutata nei siti specificamente fosforilati dalle chinasi LATS1/2.

Cellule HepE14 sono state trasfettate con il vettore esprimente YAP wild-type (YAPWT) e con il mutante YAP5SA e ne è stata valutata l'attività trascrizionale YAP-dipendente con saggio di luciferasi con il vettore 8XGTII-LUC, in presenza ed in assenza dell'inibitore di ERK5 XMD8-92.

Come mostrato in Fig. 8 e come atteso, l'attività di luciferasi del vettore 8XGTII-LUC è indotta sia nelle cellule trasfettate con YAPWT che in quelle trasfettate con YAP5SA. Il trattamento con XMD8-92 comporta una diminuzione dell'attività del vettore 8XGTII-LUC, sia nelle cellule trasfettate con YAPWT che in quelle esprimenti YAP5SA, senza che sia modulato il loro livello proteico (Fig. 8B).

Visto che ERK5 controlla funzionalmente anche un mutante di YAP resistente alle fosforilazioni inibitrici di LATS1/2, abbiamo voluto verificare se ERK5 fosse richiesto anche per il suo reclutamento sulle sequenze regolatrici dei geni target. A tal fine, abbiamo effettuato un esperimento di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo anti-YAP su estratti di HepE14 overesprimenti YAP5SA, trattate o meno con l'inibitore di ERK5 XMD8-92. Nella figura 9 è mostrato che anche il legame di YAP5SA sul promotore del suo gene target CTGF, è compromesso dall'inibizione della funzione di ERK5.

I dati riportati finora, quindi, indicano che ERK5 agisce positivamente sull'attività di YAP in maniera LATS-indipendente e senza modificare i livelli della proteina.

L'attività di ERK5 controlla l'interazione tra YAP e STAT3

I dati riportati precedentemente dimostrano che l'attività di ERK5 permette a YAP di essere reclutato sui promotori legati dal fattore trascrizionale TEAD.

In un lavoro recente del nostro laboratorio (cui ho contribuito con i risultati che seguono), è stato individuato il gene master della EMT, Snail, come un nuovo gene target di YAP. Su questo gene, YAP viene reclutato in una regione cromatinica che comprende la consensus per un diverso fattore trascrizionale, STAT3 (Fig. 10A).

Le cellule progenitrici in cui YAP è presente a livello nucleare e attiva, evidenziano una netta presenza di STAT3 nucleare rispetto a cellule differenziate, dove YAP è assente o citoplasmatica (Fig. 10B e 10C).

Dati preliminari, ottenuti da esperimenti di co-immunoprecipitazione su estratti ottenuti da cellule trattate o non trattate con l'inibitore di ERK5, suggeriscono che l'attività della chinasi è richiesta anche per l'interazione fisica tra YAP e STAT3 (Fig. 10D).

Questi ultimi dati suggeriscono la possibilità che ERK5 possa modulare l'attività di YAP agendo direttamente sulla proteina piuttosto che sui fattori trascrizionali con cui interagisce sui geni target.

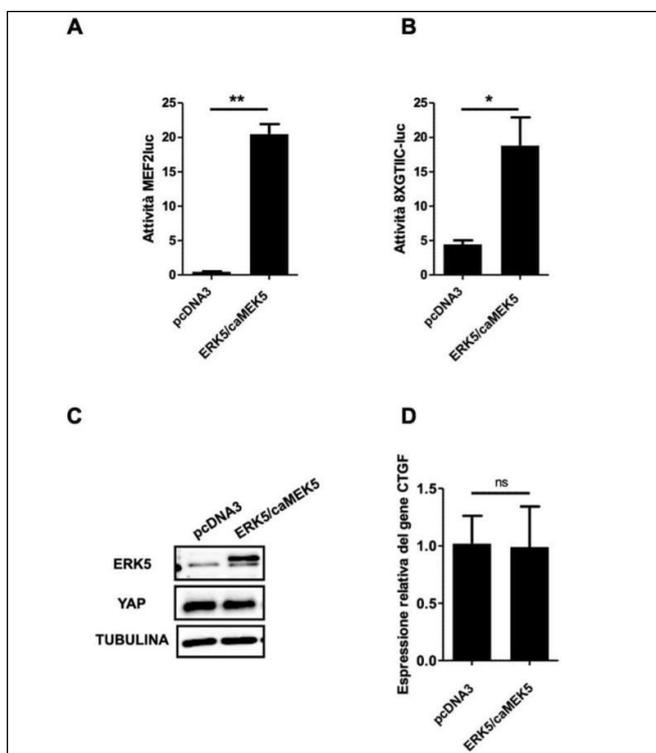


Figura 4: Analisi dell'attività di YAP in HepE14 overesprimenti ERK5/caMEK5.

A/B: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

C: Analisi di Western Blot. La proteina tubulina è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

D: Analisi di RT-qPCR del gene CTGF. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti.

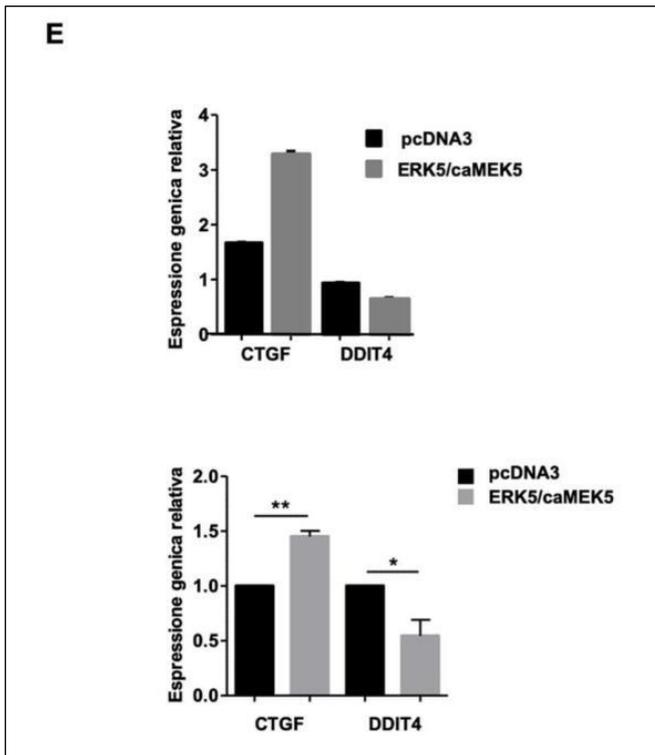


Figura 4 bis: Espressione genica YAP-dipendente in RLSC (pannello superiore) e HepG2 (pannello inferiore) overesprimenti ERK5/caMEK5.

E: Analisi di RT-qPCR del gene CTGF e DDIT4. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti.

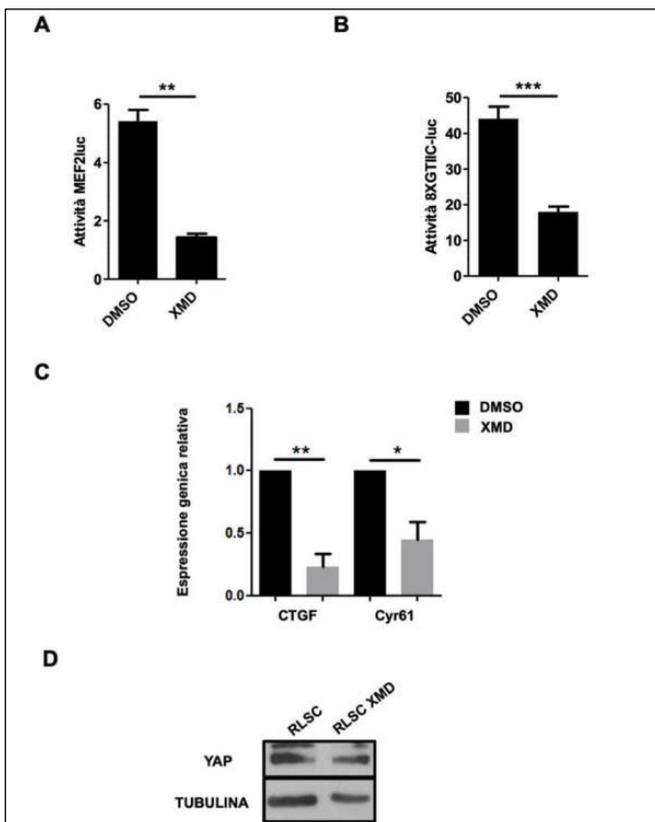


Figura 5: Analisi dell'attività di YAP in RLSC trattate con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

A/B: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

C: Analisi RT-qPCR del gene CTGF e CYR61. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti.

D: Analisi di Western Blot. La proteina tubulina è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

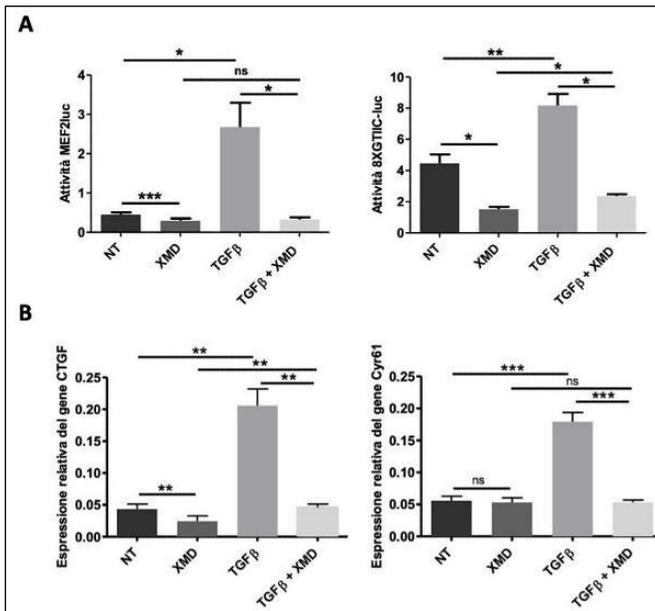


Figura 6: Analisi dell'attività di YAP in HepE14 trattate con TGFβ e con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

A: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,00; ns=non significativo).

B: Analisi RT-qPCR del gene CTGF e CYR61. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti. (**p<0,01; ***p<0,00; ns=non significativo).

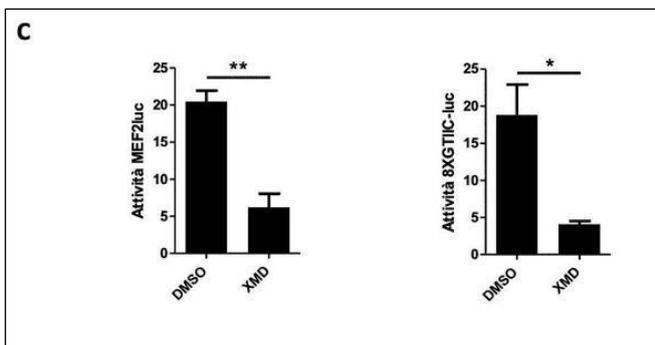


Figura 6 continua: Analisi dell'attività di YAP in HepE14 overesprimenti ERK5/caMEK5 trattate con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

C: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (*p<0,05; **p<0,01).

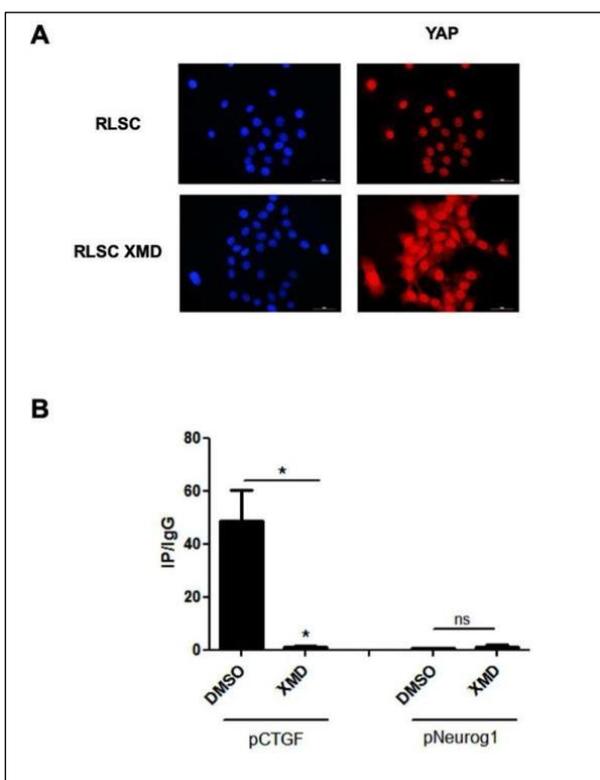


Figura 7: Analisi della localizzazione cellulare e del legame al DNA di YAP in RLSC trattate con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

A: Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti YAP (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

B: Analisi di qPCR su cromatine immunoprecipitate con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. Il promotore di Neurogenina è stato usato come controllo negativo. Valori derivanti da almeno tre esperimenti indipendenti sono calcolati come IP/IgG e riportati come media ± S.E.M. rispetto al campione di controllo. (valore arbitrario=1) (*p<0,05; ns=non significativo).

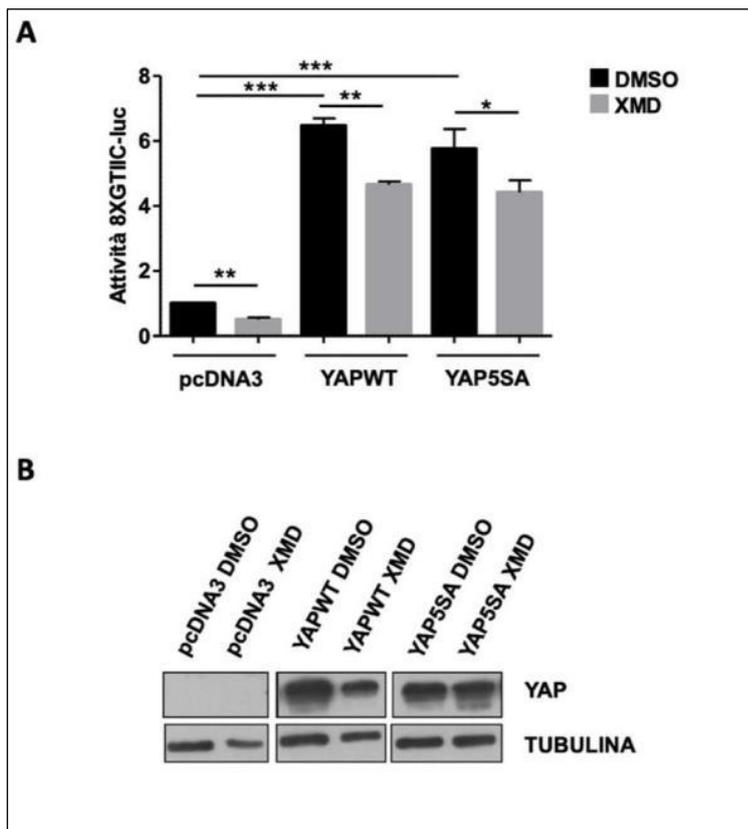


Figura 8: Analisi dell'attività di YAPWT e YAP5SA in cellule HepE14 trattate con XMD8-92.

A: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

B: Analisi di Western Blot. La proteina tubulina è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

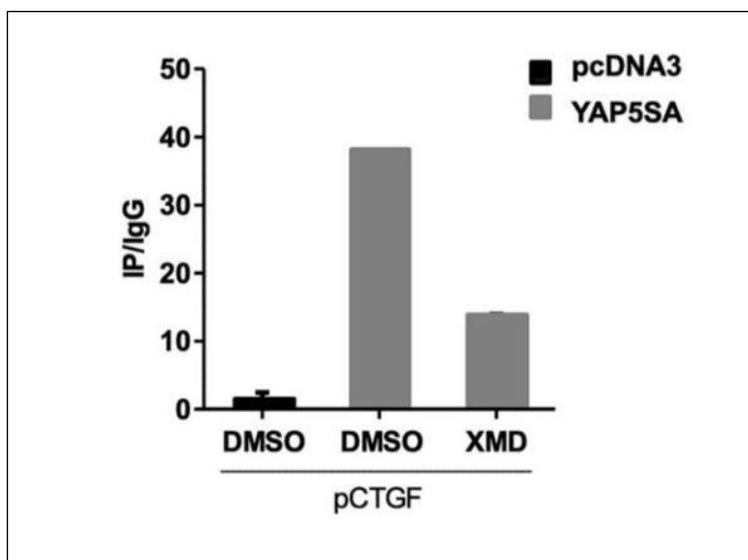


Figura 9: Analisi del legame al DNA di YAP in HepE14 overesprimenti YAP5SA.

Analisi di qPCR su cromatine immunoprecipitate con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. Valori derivanti da un singolo esperimento sono calcolati come IP/IgG e riportati come media \pm S.E.M. rispetto al campione di controllo. (valore arbitrario=1) (* $p < 0,05$; ns=non significativo).

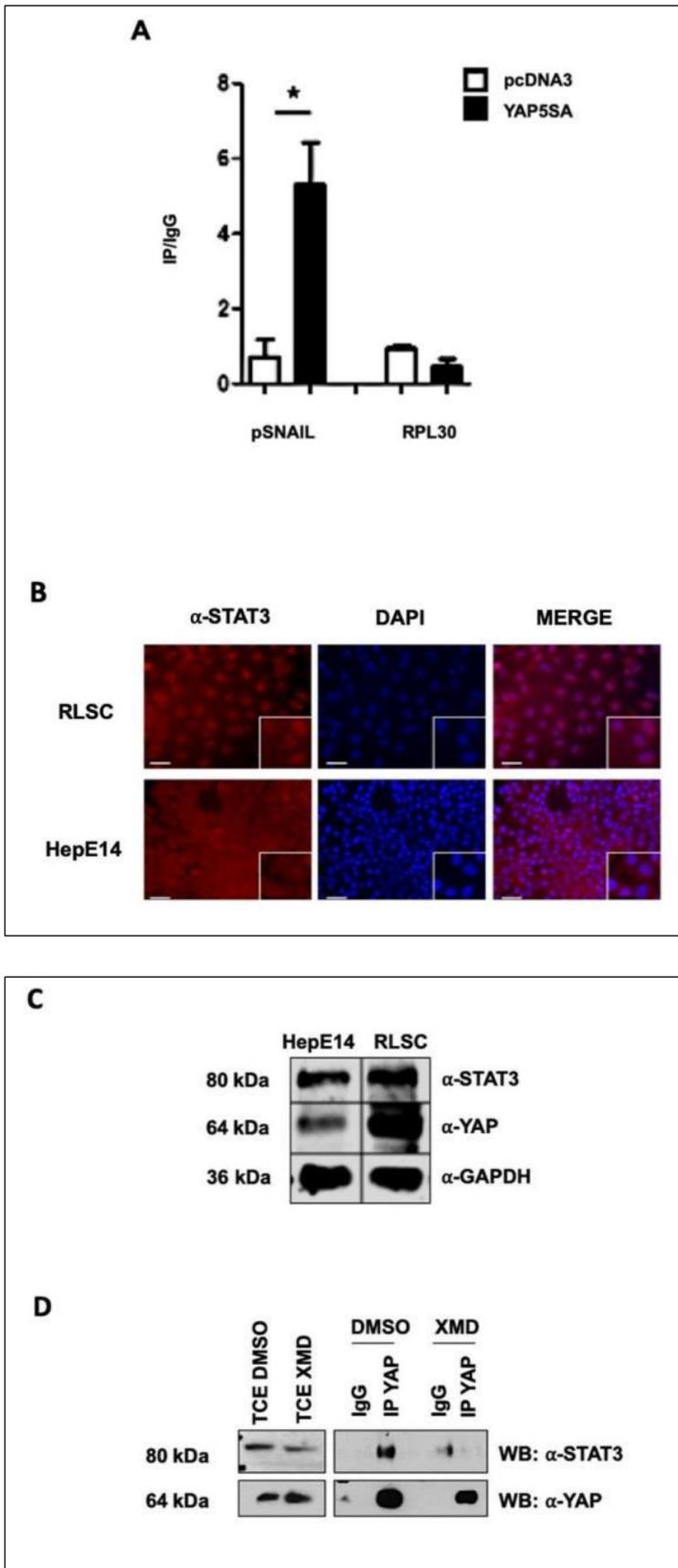


Figura 10: Analisi di STAT3 in RLSC e HepE14.

A: Analisi del legame al DNA di STAT3. Analisi di qPCR su cromatine immunoprecipitate con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. RPL30 è stato usato come controllo negativo. Valori derivanti da almeno tre esperimenti indipendenti sono calcolati come IP/IgG e riportati come media \pm S.E.M. rispetto al campione di controllo. (valore arbitrario=1) (* $p < 0.05$; ns=non significativo).

B: Analisi della localizzazione subcellulare di STAT3. Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti-STAT3 (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

C: Analisi di Western Blot. La proteina GAPDH è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

D: Analisi dell'interazione tra YAP e STAT3 in RLSC trattate con XMD8-92. Western Blot con Ab anti-YAP e anti-STAT3. I campioni proteici sono stati immunoprecipitati con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. TCE=Estratti Proteici Totali.

BIBLIOGRAFIA

1. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* 2014; 141: 1614-26.
2. Panciera T, Azzolin L, Cordenonsi M, Piccolo S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 758-70.
3. Cao J, Huang W. Two faces of Hippo: activate or suppress the Hippo pathway in cancer. *Anti-cancer Drugs* 2017; 28: 1079-85.
4. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 2016; 29: 783-803.
5. Oh H, Slattery M, Ma L, Crofts A, White KP, Mann RS, et al. Genome-wide association of Yorkie with chromatin and chromatin-remodeling complexes. *Cell Rep* 2013; 3: 309-18.
6. Oh H, Slattery M, Ma L, White KP, Mann RS, Irvine KD. Yorkie promotes transcription by recruiting a histone methyltransferase complex. *Cell Rep* 2014; 8: 449-59.
7. Qing Y, Yin F, Wang W, et al. The Hippo effector Yorkie activates transcription by interacting with a histone methyltransferase complex through Nco6. *ELife* 2014; 3: e02564.
8. Skibinski A, Breindel JL, Prat A, et al. The Hippo transducer TAZ interacts with the SWI/SNF complex to regulate breast epithelial lineage commitment. *Cell Rep* 2014; 6: 1059-72.
9. Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim DS. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell Rep* 2015; 11: 270-82.
10. Noce V, Battistelli C, Cozzolino AM, et al. YAP integrates the regulatory Snail/HNF4alpha circuitry controlling epithelial/hepatocyte differentiation. *Cell Death Dis* 2019; 10: 768.
11. Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep* 2014; 15: 642-56.
12. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell* 2010; 19: 491-505.
13. Zhao B, Ye X, Yu J, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 2008; 22: 1962-71.
14. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 246-57.
15. Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell* 2013; 154: 1342-55.
16. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011; 147: 759-72.
17. Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 2007; 21: 2747-61.
18. Chan SW, Lim CJ, Chong YF, Pobbati AV, Huang C, Hong W. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *J Biol Chem* 2011; 286: 7018-26.
19. Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 638-46.
20. Liu X, Yang N, Figel SA, et al. PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP. *Oncogene* 2013; 32: 1266-73.
21. Wang W, Huang J, Wang X, et al. PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes Dev* 2012; 26: 1959-71.
22. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 2016; 30: 1-17.
23. Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, et al. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* 2014; 25: 831-45.
24. Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 11930-5.

25. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Comm* 2015; 6: 8357.
 26. Zhang N, Bai H, David KK, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental Cell* 2010; 19: 27-38.
 27. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 2012; 150: 780-91.
 28. Drew BA, Burow ME, Beckman BS. MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Bioch Biophys Acta* 2012; 1825: 37-48.
 29. Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Nat Acad Scien USA* 2002; 99: 9248-53.
 30. Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 43344-51.
 31. Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, et al. Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 336-45.
 32. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-74.
 33. Marchetti A, Colletti M, Cozzolino AM, et al. ERK5/MAPK is activated by TGFbeta in hepatocytes and required for the GSK-3beta-mediated Snail protein stabilization. *Cell Signall* 2008; 20: 2113-8.
 34. Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 270-85.
 35. Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, et al. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 2003; 22: 1381-9.
 36. Ramsay AK, McCracken SR, Soofi M, et al. ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype. *Br J Cancer* 2011; 104: 664-72.
 37. Simoes AE, Pereira DM, Gomes SE, et al. Aberrant MEK5/ERK5 signalling contributes to human colon cancer progression via NF- kappaB activation. *Cell Death Dis* 2015; 6:e1718.
 38. Weldon CB, Scandurro AB, Rolfe KW, et al. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery* 2002; 132: 293-301.
 39. Zen K, Yasui K, Nakajima T, et al. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 109-20.
 40. Cozzolino AM, Noce V, Battistelli C, et al. Modulating the Substrate Stiffness to Manipulate Differentiation of Resident Liver Stem Cells and to Improve the Differentiation State of Hepatocytes. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 5481493.
- Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 ottobre 2019
- Dott.ssa Veronica Consalvi, Corso di Laurea in Biotecnologie Mediche, Dipartimento di Medicina Molecolare, Facoltà di Farmacia e Medicina, "Sapienza" Università di Roma
- Prof.ssa Laura Amicone, Professore Associato, Dip. Di Medicina Molecolare, "Sapienza" Università di Roma
- Per la corrispondenza:
veronicaconsalvi95@gmail.com