

Received: 2015.10.06
Accepted: 2016.05.09
Published: 2016.09.19

Ekspresja i aktywność czynnika transkrypcyjnego SNAIL w trakcie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) w procesie nowotworzenia*

Expression and activity of SNAIL transcription factor during Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in cancer progression

Pamięci Pana Profesora Czesława S. Cierniewskiego

Izabela Papiewska-Pająk, Maria A. Kowalska, Joanna Boncela

Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź, Polska

Streszczenie

Hamowanie transkrypcji genu kodującego E-kadherynę przez czynnik transkrypcyjny SNAIL jest uznawane za podstawowy etap w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego – EMT. Epigenetyczna regulacja ekspresji E-kadheryny polega na wiązaniu się SNAIL do sekwencji E-box w promotorze genu *CDH1* i tworzeniu kompleksu z enzymami wchodzącymi w skład kompleksów represorowych, które są bezpośrednio odpowiedzialne za modyfikacje histonów oraz metylację DNA prowadzące do zmian w strukturze chromatyny. Udział SNAIL w nabywaniu przez komórki fenotypu migracyjno-inwazyjnego polega przede wszystkim na bezpośrednim wpływie na spadek poziomu białek budujących połączenia ścisłe i szczelinowe komórek.

Do utrzymania aktywności SNAIL w komórce niezbędne jest jego jądrowe umiejscowienie, zabezpieczające czynnik przed degradacją proteasomalną w cytoplazmie. Główną rolę w tym procesie pełni kinaza syntazy glikogenu 3 (*GSK-3β*). Ekspresja i stabilność SNAIL poza tym jest regulowana na poziomie transkrypcji oraz na etapach potranskrypcyjnych przez cząsteczki sygnałowe i czynniki biologiczne, np.: *TGF-β*, *TNF-α*, *ILK* czy *NF-κB*. SNAIL w komórkach nowotworowych jest regulowany również przez mikroRNA, głównie *miR-34*.

Podwyższony poziom SNAIL, występujący w wielu nowotworach, jest powiązany ze wzrostem oporności komórek nowotworowych na chemio-, radio – czy immunoterapię, z nabywaniem właściwości komórek CSC oraz właściwości migracyjnych i inwazyjnych, prowadzących do metastazy guzów. Poznanie mechanizmów działania SNAIL umożliwi tworzenie nowych terapii skierowanych na modulację konkretnych ścieżek sygnałowych aktywujących lub aktywowanych przez SNAIL w czasie progresji nowotworowej.

Słowa kluczowe: czynnik transkrypcyjny SNAIL • EMT • epigenetyczna regulacja ekspresji genów

*Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/02/A/NZ3/00068



Summary

Inhibition of E-cadherin gene expression by transcription factor SNAIL is known to be a crucial element of Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT. Epigenetic regulation of E-cadherin expression is regulated by SNAIL binding to E-box sequences in the *CDH1* gene promoter and recruiting enzymes belonging to repressor complexes that are directly engaged in histone modifications and DNA methylation leading to the modification of chromatin structure. SNAIL involvement in cell acquisition of invasive phenotype is based on direct suppression of tight-junction and gap junction proteins.

The nuclear localization of SNAIL is required for SNAIL activity and protects this factor from proteasomal degradation in the cytoplasm. The main factor engaged in that process is GSK-3 β kinase. Expression and stability of SNAIL is regulated on the transcriptional and post-transcriptional levels by a number of signaling molecules and biological factors, for example: TGF- β , TNF- α , ILK and NF κ B. The expression of SNAIL in cancer cells is also regulated by micro-RNA, mainly by miR-34.

Increased expression of SNAIL, observed in many human cancers, has been correlated with increased resistance to chemo-, radio- or immunotherapy, gain of cancer stem cells features and migrative and invasive characteristics, which leads to tumor metastases. Understanding of the SNAIL's mechanism of action may lead to new treatment strategies in cancer directed to interfere with signaling pathways that either activate SNAIL or are activated by SNAIL.

Keywords: SNAIL transcription factor • EMT • epigenetic regulation of gene expression

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1219401>

Word count: 3968

Tables: 1

Figures: 2

References: 118

Adres autorki: dr. hab. Joanna Boncela, Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź; e-mail: boncela@wp.pl

Wykaz skrótów: **AP4** – czynnik transkrypcyjny AP4 (activator protein 4); **CAFs** – fibroblasty towarzyszące nowotworom (cancer-associated fibroblasts); **CSC** – nowotworowe komórki macierzyste (cancer stem cells); **CDH1** – gen kodujący E-kadherinę; **CRC** – rak jelita grubego (colorectal cancer); **CK2** – kinaza kazeinowa 2 (casein kinase-2); **DNMT** – metylotransferaza DNA (DNA methyltransferase); **4E-BP** – białko wiążące czynnik inicjacji translacji 4E (4E Binding Protein); **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **EGFR** – receptor czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor receptor); **EMT** – przejście nabłonkowo-mezenchymalne (epithelial-mesenchymal transition); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **FGFR** – receptor czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor receptor); **GSK-3 β** – kinaza syntazy glikogenu 3 (Glycogen synthase kinase-3 beta); **HDAC** – deacetylaza histonowa (histone deacetylase); **HIF-1 α** – czynnik indukowany przez hipoksję-1 α (hypoxia inducible factor-1 α); **ILK** – kinaza związana z integrinami (integrin-linked kinase); **LOX** – oksydaza lizylowa (lysyl oxidase); **LSD1** – lizynoswoista-specyficzna demetylaza 1 (Lysine-specific histone demethylase 1); **MEK1/2** – aktywator kinazy ERK/kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 1 i 2 (ERK activator kinase); **MMP** – metaloproteaza macierzy zewnątrzkomórkowej (Matrix metalloproteinases); **NF- κ B** – czynnik jądrowy κ B (nuclear factor κ B); **NES** – sygnał eksportu jądrowego (nuclear export signal); **NICD** – wewnętrzkomórkowa domena Notch (Notch intracellular domain); **NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal); **PI3K** – 3 kinaza fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase); **PKA** – kinaza białkowa A (protein kinase A); **PRC** – kompleks białkowy grupy Polycomb (Polycomb Repressive Complex); **PRMT** – metylotransferaza argininowa (arginine N-methyltransferase); **Ras** – błonowa GTP-aza odpowiedzialna za stymulację rozlicznych szlaków transmisji sygnałów; **SCP** – mała fosfataza domeny C-końcowej (small C-terminal domain phosphatase); **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor β); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor α).

WSTĘP

Czynniki transkrypcyjne należące do rodziny Snail pełnią zachowaną ewolucyjnie rolę w procesach związanych z rozwojem u bezkręgowców i kręgowców. Czynniki transkrypcyjne SNAIL, opisany po raz pierwszy w 1987 r. u *Drosophila melanogaster*, uczestniczy w procesie powstawania mezodermy, reguluje profil genowy komórek nabłonka (epitelium) [3,10]. U kręgowców, wpływając na adhezję komórek nabłonka i na ich właściwości migracyjne pełni kluczową rolę w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Proces zachodzi nie tylko w czasie embriogenezy (np. tworzenie grzebienia nerwowego), ale również jest jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za progresję i przerzutowanie nowotworów [1]. Zaangażowanie SNAIL w regulację tak ważnych procesów biologicznych spowodowało w ostatnich latach wzrost liczby doniesień związanych z poznaniem szczegółowych zjawisk odpowiedzialnych za regulację ekspresji oraz funkcji tego czynnika. Podobnie jak inne regulatory transkrypcji, SNAIL jest trudnym celem terapeutycznym. Dotychczas nie powiodły się próby bezpośredniej regulacji jego aktywności transkrypcyjnej. Obecnie uwaga została zwrócona na modulację konkretnych ścieżek sygnałowych aktywujących lub aktywowanych przez SNAIL.

RODZINA CZYNNIKÓW SNAIL

Do rodziny czynników transkrypcyjnych Snail należą białka: SNAIL (inne stosowane nazwy: Snail, Snail1, Snai1), SLUG (inne nazwy: Slug Snail2, Snai2) oraz SMUC (Smuc, Snail3) [53]. Wszystkie te białka wykazują homologię sekwencji aminokwasowej, w domenie końca C (ryc. 1) [39].

W warunkach fizjologicznych, w dorosłym organizmie SNAIL nie jest wykrywany w komórkach nabłonka. Białko to jest identyfikowane w komórkach nowotworowych pochodzenia nabłonkowego, w fibroblastach

w obrębie uszkodzonych tkanek, w makrofagach w tkankach objętych stanem zapalnym oraz w nowotworach pochodzenia mezenchymalnego [2,32,42,86].

STRUKTURA BIAŁEK RODZINY SNAIL

Ludzkie czynniki należące do rodziny Snail, o średniej masie 30 kDa, są zbudowane z 264-292 aminokwasów. W strukturze białek rodziny Snail wyróżnia się trzy domeny: rejon końca N, zachowaną ewolucyjnie w obrębie rodziny domenę końca C oraz bogaty w serynę i prolinę rejon centralny zawierający sekwencje charakterystyczne dla danego czynnika z rodziny Snail (ryc. 1).

U kręgowców czynniki transkrypcyjne z rodziny Snail zawierają w części końca N charakterystyczną, krótką domenę SNAG (Snail-Gfi1), zbudowaną u SNAIL z 9 aa.

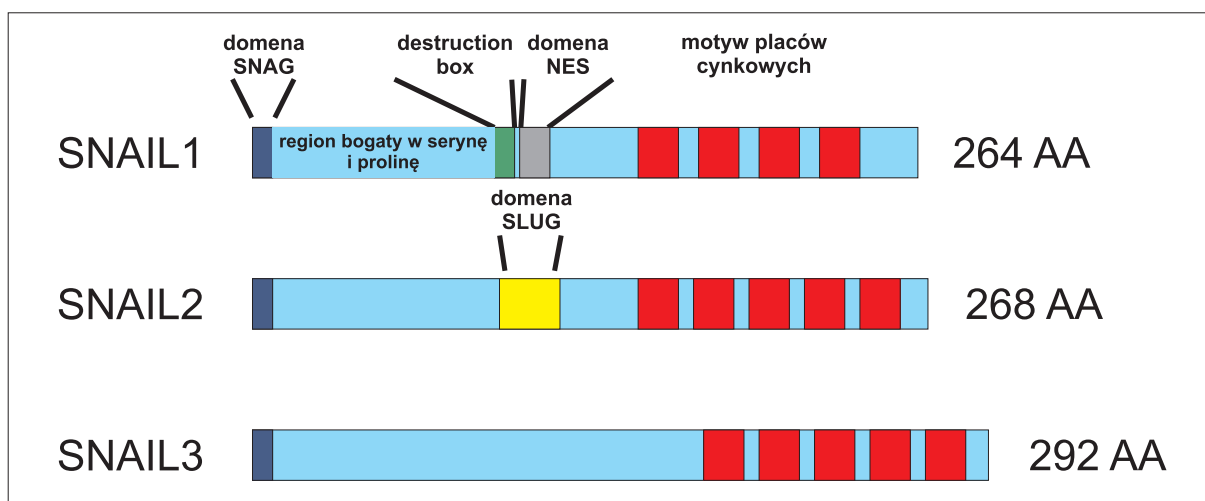
Rejony końca C łańcucha białkowego czynników rodziny Snail są zbudowane z 4-6 tandemowo ułożonych motywów palca cynkowego klasy C2H2, przy czym obecność 4 motywów warunkuje ich prawidłowe funkcjonowanie [33,73]. Domena zawiera również sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal, NLS) [106].

SNAIL w centralnej części sekwencji ma dwa motywy docelowe dla kinazy serynowo-treoninowej GSK-3 β : miejsce I – sekwencja destrukcyjna (aa 96-104) i bogate w leucyny miejsce II – sygnał eksportu jądrowego – NES (aa 107-119) [116].

SLUG natomiast w centralnej części cząsteczki ma domenę SLUG, która bierze udział w represji genu E-kadheryny przez wiązanie z korepresorem CtBP1 (C-terminal binding protein-1) (ryc. 1) [71].

REPRESJA GENÓW ZALEŻNA OD SNAIL

Przejście nabłonkowo-mezenchymalne jest głównym procesem zachodzącym podczas morfogenezy zarówno



Ryc. 1. Porównanie sekwencji czynników transkrypcyjnych należących do rodziny Snail (opis w tekście)



u kręgowców, jak i bezkręgowców. W dorosłym organizmie proces, jako fizjologiczny, występuje np. podczas gojenia się ran. EMT został również poznany i dokładnie opisany w stanach patologicznych, ponieważ stanowi jeden z podstawowych mechanizmów progresji nowotworowej [84]. Wiele wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów, indukowanych przez czynniki mikrośrodowiska nowotworu, składających się na EMT, prowadzi do utraty połączeń międzykomórkowych, zmiany polarności komórki, zwiększenia jej mobilności i nabycia zdolności migracji.

MECHANIZM DZIAŁANIA CZYNNIKA SNAIL NA PRZYKŁADZIE REGULACJI GENU *CDH1*

Przejście nabłonkowo-mezenchymalne podlega złożonej regulacji na poziomie transkrypcyjnym. Czynniki transkrypcyjne SNAIL bierze udział w podstawowym dla EMT etapie, oddziałuje bezpośrednio na promotor genu *CDH1* kodującego E-kadherynę, co powoduje obniżenie poziomu tego białka w komórkach epitelialnych [7,13]. E-kadheryna jest glikozylowanym białkiem transbłonowym odgrywającym istotną rolę w utrzymywaniu polarności komórek, ich integralności oraz w zależnym od jonów wapnia tworzeniu połączeń adhezyjnych między komórkami. Białko jest zaliczane również do supresorów transformacji nowotworowej, gdyż spadek jego ekspresji jest powiązany ze wzrostem progresji nowotworowej i przerzutowaniem [100].

Odwrotna korelacja między poziomem SNAIL a E-kadheryny została zaobserwowana w wielu nowotworach, m.in. w czerniaku, raku wątrobowokomórkowym (hepatocellular carcinoma), raku płaskonabłonkowym ust (oral squamous cell carcinoma), raku piersi czy w typie rozlanym raka żołądka [8,48,82,85,111].

Zahamowanie transkrypcji genów zależne od SNAIL polega na związaniu SNAIL do sekwencji E-box (CAGGTG, CACCTG, GGCCGG) w promotorze genu przez domenę końca C czynnika oraz zaangażowaniu kompleksów białek korepresorowych przez ich wiązanie z sekwencją SNAG.

W obrębie fragmentu od -178 do +92 promotora ludzkiego genu kodującego E-kadherynę znajdują się trzy sekwencje E-box. Wszystkie są jednocześnie zaangażowane w proces regulacji transkrypcji genu, przy czym wiązanie SNAIL do miejsca w pozycji od +22 do +27 powoduje najsilniejszy efekt represji [7].

Białka wchodzące w skład kompleksów korepresorowych są enzymami bezpośrednio odpowiedzialnymi za epigenetyczną regulację ekspresji genów. Regulacja obejmuje modyfikacje histonów oraz metylację DNA doprowadzające do zmian w strukturze chromatyny [5]. Dotąd zidentyfikowano wiele kompleksów białek korepresorowych mogących wiązać się bezpośrednio z represorami transkrypcji [101].

Liczne badania wykazały współdziałanie czynnika SNAIL zarówno z enzymami modyfikującymi chromatynę, jak

i metylującymi DNA w regionach regulatorowych genów, tzw. wyspach CpG. Mechanizmy tworzenia niektórych z tych kompleksów (np. z LSD1) zostały szczegółowo opisane, a inne nie zostały jeszcze tak dokładnie poznane.

Czynnik SNAIL współdziała w kompleksach z następującymi enzymami:

- z deacetylazami histonowymi 1 i 2 (HDAC1 i HDAC2) oraz korepresorem Sin3A (wchodzącym w skład kompleksu SIN3), co prowadzi do deacetylacji histonów 3 i 4 oraz metylacji lizyny w pozycji 9 w histonie 3, a w konsekwencji do modyfikacji organizacji chromatyny [75];
- z deacetylazą histonową 3 (HDAC3), aktywowaną przez czynnik indukowany przez hipoksję-1 α (hypoxia inducible factor-1 α – HIF-1 α). W warunkach niedotlenienia komórek nowotworowych, wiążąc się ze SNAIL prowadzi do represji *CDH1* [102];
- z metylotransferazą argininy 5 (PRMT5) oraz korepresorem AJUBA, powodując metylację argininy w pozycji 3 w histonie 4 [43];
- z kompleksem białkowym grupy Polycomb PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), przez bezpośrednie oddziaływanie z należącymi do kompleksu białkami SUZ12 i EZH2, co indukuje trimetylację lizyny w pozycji 27 w histonie 3 (H3K27me3) [40];
- z lizynoswoistą demetylazą 1 (LSD1) oraz kompleksem CoREST [62]. LSD1 powoduje demetylację lizyny w pozycji 4 oraz 9 w ogonie histonu 3 (H3K4, H3K9). Tworzący kompleks z LSD1 korepresor CoREST przeciwdziała jej proteasomalnej degradacji oraz moduluje strukturę domeny katalitycznej (catalytic amino oxidase domain) w LSD1, wpływając na jej interakcję z substratem – ogonem histonu 3 [91]. SNAIL, przez domenę SNAG, oddziałuje z domeną katalityczną LSD1, dzięki podobieństwu sekwencji SNAG do sekwencji wiążącej LSD1 w ogonie histonu H3. Dla tego oddziaływania są niezbędne arginina w pozycji 3 i 8 oraz lizyna w pozycji 9 w sekwencji SNAG czynnika. Utworzenie kompleksu SNAIL-LSD1-CoREST stabilizuje cząsteczkę SNAIL; N-końcowa domena SNAIL staje się niedostępna dla GSK3 β , a w konsekwencji nie dochodzi do degradacji SNAIL w proteasomie. CoREST wpływa również na stabilność wiązania LSD1-SNAIL w kompleksie. Lin i wsp., na przykładzie regulacji genu *CDH1*, zaproponowali następujący model wyciszania genów z udziałem SNAIL: SNAIL, przez domenę SNAG (pełniącą rolę molekularnego „haczyka”), oddziałuje z kompleksem LSD1-CoREST. Powstały, stabilny kompleks SNAIL-LSD1-CoREST jest przyłączany do sekwencji promotorowej genu dzięki wiązaniu motywów palca cynkowego w C-końcowej domenie SNAIL do sekwencji E-box w promotorze. Następnie dochodzi do demetylacji H3K4me2 w promotorze genu kodującego E-kadherynę. Dalszych wyjaśnień wymaga sposób w jaki, równocześnie do opisanego modelu, zachodzi deacetylacja (H3 i H4) oraz metylacja (H3K27 i H4R3);

- z metylotransferazą G9a, odpowiedzialną za mono – i dimetylację lizyny w pozycji 9 w histonie 3 (H3K9me1, H3K9me2) w euchromatynie oraz heterochromatynie fakultatywnej. Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że SNAIL wchodzi w interakcję z metylotransferazą G9a i jest zaangażowany w demetylację H3K9me2 [28]. Utworzenie kompleksu G9a ze SNAIL następuje dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu enzymatycznej domeny SET i domeny strukturalnej zawierającej powtórzenia ankiry (ankyrin-repeat domain) w G9a z C-końcowym regionem palców cynkowych w SNAIL. Dong i wsp. wykazali również współistnienie SNAIL w kompleksach z metylotransferazami DNA; DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Kompleksy te są tworzone pośrednio przez metylotransferazę G9a. SNAIL więc może być ważnym czynnikiem łączącym modyfikacje histonów i metylację DNA w celu wyciszenia transkrypcji genów;

- z metylotransferazą Suv39H1, odpowiedzialną za trimetylację lizyny 9 w histonie 3 (H3K9me3), co ma miejsce głównie w heterochromatynie konstytutywnej. Kompleks SNAIL-Suv39H1 powstaje przez oddziaływanie domeny SNAG czynnika z domeną katalityczną metylotransferazy i wykazano, że jest niezbędny do zahamowania transkrypcji genu kodującego E-kadherynę w modelowych liniach komórkowych raka piersi HMLE i MCF10A oraz w liniach komórkowych raka piersi podstawopodobnego BLBC [27];

- z ligazami Ring1A i Ring1B, które należąc do kompleksu PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1), powodują monoubikwitynację histonu H2A w lizynie w pozycji 119 [17]. Tak jak w przypadku metylotransferazy G9a, dzięki zaangażowaniu domeny palców cynkowych (a nie domeny SNAG) białka SNAIL oraz domen RING ligaz dochodzi do powstania kompleksu obu białek. Wykazano, że proces jest odpowiedzialny za zwiększenie migracji komórek nowotworowych trzustki. Ponadto zaobserwowano, że utworzenie kompleksu SNAIL z białkiem składowym kompleksu PRC2-EZH2 prowadzi do wydajniejszego tworzenia kompleksów SNAIL z Ring1A/B.

SNAIL, poprzez tworzenie kompleksów z szeregiem kofaktorów i enzymów modulujących chromatynę, wpisuje się w ideę „reader-writer”. W modelu tym SNAIL „czyta” promotor genu docelowego (np. sekwencje E-box w promotorze *CDH1*), a współdziałające z czynnikiem enzymy „redagują” chromatynę, modulując informację epigenetyczną, a powstały kompleks aktywuje lub hamuje transkrypcję genów [61].

ROLA SNAIL W EPIGENETYCZNEJ REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

SNAIL jest uważany za jeden z głównych węzłów ścieżek sygnałowych w EMT. Jest on nie tylko represorem genu *CDH1*, ale również pod jego kontrolą znajduje się wiele innych genów kodujących białka komórek nabłonkowych.

W tabeli 1 zestawiono geny bezpośrednio regulowane przez SNAIL, których produkty są zaangażowane w EMT oraz utrzymanie polarności komórek. Zmiany zachodzące pod wpływem czynnika SNAIL potwierdzają jego udział w nabywaniu przez komórki fenotypu migracyjno-inwazyjnego. SNAIL powoduje spadek poziomu białek budujących połączenia ściśle komórek (tight junctions), m.in. kładyny-3, -4, -7 oraz okładyny, zmianę lokalizacji wewnątrzkomórkowej białka strefy zamykającej ZO-1 i spadek poziomu tworzącej połączenia szczelinowe typu gap koneksyny 43 [23,45]. SNAIL bierze również udział w regulacji ekspresji metaloproteaz (MMP) degradujących macierz zewnątrzkomórkową, takich jak: MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 i MT1-MMP [49,69,110].

Mimo, że SNAIL uważany jest przede wszystkim za represora transkrypcji, bierze również udział w bezpośredniej indukcji transkrypcji niektórych genów, np. interleukiny 8 czy miozyny Va [44,57].

SNAIL ma zdolność działania plejotropowego; jest zaangażowany nie tylko w represję genów na poziomie transkrypcji, ale także na etapie potranskrypcyjnym, np. wpływając na alternatywne składanie mRNA białek p120 i ZO-1 oraz modulując proces inicjacji translacji kładyny-1 [74].

WSPÓLDZIAŁANIE SNAIL Z INNYMI CZYNNIKAMI TRANSKRYPCYJNYMI

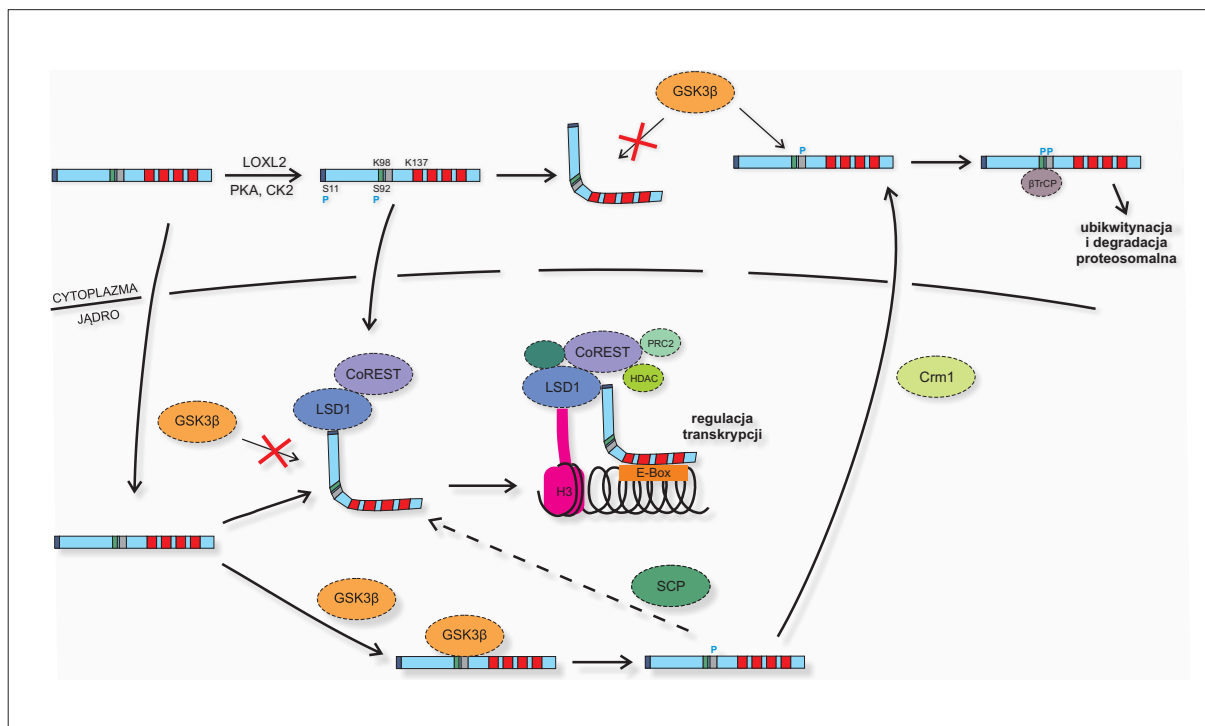
W czasie EMT, podczas embriogenezy oraz w warunkach patologicznych, wiele czynników transkrypcyjnych współdziała synergicznie lub addytywnie.

Wykazano, że represję genu kodującego E-kadherynę, poza rodziną Snail, wywołują: czynnik TWIST, białka z rodziny ZEB: delta-EF1 (ZEB-1) i SIP1 (ZEB-2) oraz produkty alternatywnego składania genu *E2A* – czynniki E12/E47 [21,37,81,108]. Stopień udziału poszczególnych czynników transkrypcyjnych w obniżeniu poziomu E-kadheryny jest zależny od stopnia powinowactwa wiązania do badanej sekwencji E-box w danym typie komórek. Może to wskazywać na istnienie pewnej hierarchii

Tabela 1. Geny bezpośrednio regulowane przez czynnik Snail, kodujące białka zaangażowane w EMT oraz utrzymanie polarności komórek

Proces	Geny bezpośrednio regulowane przez Snail
EMT	Snail1 [79], CDH1 [7,13], CK17/18 [24], VDR [59], CLDN7 [45], CLDN3 [38], CLDN1 [67], OCLN [45], HNF4a [19], HNF1b [11], MMP2 [110]
Utrzymanie polarności komórki	Crumbs3 [99], Hugn-2 [52]





Ryc. 2. Mechanizmy komórkowe regulujące stabilność i aktywność Snail (opis w tekście)

udziału czynników w represji w konkretnych warunkach *in vivo*. Tę teorię potwierdza analiza wiązania czynników transkrypcyjnych do elementu E-pal (E-box2 i E-box1) w mysim promotorze genu *cdh1* przez zastosowanie metod EMSA (electrophoretic mobility shift assay) oraz CEMSA (capillary electrophoretic mobility shift assays), wykazały one dwukrotnie wyższe powinowactwo SNAIL niż E47, natomiast powinowactwo wiązania SLUG było najniższe spośród tych trzech badanych czynników [9].

Oprócz różnego stopnia zaangażowania w represję genów, obserwuje się również zróżnicowany udział czynników represorowych w poszczególnych etapach inwazji nowotworowej. Przejściowy wzrost poziomu SNAIL lub ZEB-2 w komórkach, w czasie EMT, jest związany z inicjacją inwazji, podczas gdy wzrost SLUG, E47 oraz ZEB-1 z utrzymaniem fenotypu migracyjno-inwazyjnego komórek [77]. Model taki wyjaśniałby rozbieżności w publikowanych wynikach badań, np. obserwowane występowanie różnych represorów transkrypcyjnych w analizach linii komórkowych raka piersi może być uzależnione od stopnia progresji nowotworowej i inwazyjności badanych komórek. W progresji czerniaka następuje zmiana poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych obejmująca spadek poziomu SLUG i ZEB2 przy jednoczesnym wzroście poziomu TWIST1 i ZEB1 [14].

Czynniki transkrypcyjne biorące udział w EMT są powiązane szeregiem wzajemnych oddziaływań. Badanie tych interakcji poprzez analizę "interaktomu EMT" pokazało, że rodzina czynników ZEB jest zależna od czynników SNAIL oraz TWIST [97]. Mianowicie, SNAIL (współdziała-

jąc z TWIST) wpływa na wzrost ekspresji ZEB-1 na poziomie transkrypcyjnym oraz potranskrypcyjnym w trakcie EMT wywołanego przez TGF- β . SNAIL jest niezbędny do stabilizacji poziomu białka TWIST i wzrostu ekspresji mRNA TWIST1 oraz translokacji do jądra czynnika ETS1. TWIST i ETS1 bezpośrednio oddziałują na promotor genu ZEB-1 [22].

REGULACJA EKSPRESJI I AKTYWNOŚCI SNAIL

Umieszczenie SNAIL w komórce jest istotne dla jego aktywności. Ekspresja i aktywność czynników należących do rodziny Snail jest regulowana na poziomie transkrypcji oraz na różnych etapach potranskrypcyjnych i obejmuje wiele ścieżek przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych.

LOKALIZACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWA SNAIL

Pośród czynników należących do rodziny Snail tylko SNAIL jest białkiem zidentyfikowanym zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym. Obecny w cytoplazmie SNAIL jest białkiem niestabilnym (czas połowicznego zaniku 25 min), bardzo szybko degradowanym przez proteasom w sposób zależny od ubikwitynacji. W procesie tym najistotniejszym enzymem jest kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK-3 β), która fosforylując seryny w pozycjach 96 oraz 100 w miejscu I powoduje, że SNAIL jest rozpoznawany przez ligazę β -TrCP (β -transducing repeat-containing protein), a następnie ubikwitynowany i degradowany w proteasomie. Fosforylacja seryn w tym motywie jest poprzedzona fosforylacją seryny w pozycji

104 przez kinazę CK1ε [105]. Natomiast w jądrze komórkowym, fosforylacja miejsca docelowego NES (seryn w pozycjach 107, 111, 115, 119) przez GSK-3β powoduje eksport czynnika z jądra do cytoplazmy (ryc. 2) [116].

Translokację SNAIL do cytoplazmy umożliwia również fosforylacja w przyległej do NES sekwencji bogatej w serynę (serine-rich sequence) powodująca, że NES staje się dostępna dla eksportyny jądrowej Crm1 [26]. Brak sekwencji NES u innych przedstawicieli rodziny Snail powoduje, że ich lokalizacja ogranicza się do jądra komórkowego.

Domena C-końca SNAIL jest fosforylowana przez kinazę PAK-1, która fosforylując serynę w pozycji 246 powoduje stabilizację białka w jądrze [109].

Ponadto za zwiększenie stabilności SNAIL w jądrze jest odpowiedzialna fosfataza SCP (small C-terminal domain phosphatase), która, wiążąc się z końcem C cząsteczki SNAIL, indukuje defosforylację seryn w rejonach destruction box i NES (ryc. 2) [104].

Wykazano również dodatkowy mechanizm stabilizacji SNAIL w cytoplazmie. Aktywowana w odpowiedzi na uszkodzenie DNA kinaza ATM fosforyluje serynę w pozycji 100 w SNAIL, co blokuje powstawanie kompleksu SNAIL-GSK-3β, a zatem zahamowanie procesu degradacji w proteasomie. Do ufosforylowanej seryny w pozycji 100 przyłącza się białko HSP90α, dodatkowo stabilizując SNAIL [94].

ROLA BIAŁEK SYGNAŁOWYCH W REGULACJI EKSPRESJI I AKTYWNOŚCI SNAIL

Ekspresja SNAIL jest regulowana przez wiele cząsteczek sygnałowych i czynników biologicznych. Wiązanie się czynników wzrostu do swoistych receptorów, np. czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) do receptora FGFR1 lub czynnika wzrostu naskórka (EGF) do EGFR, aktywuje ścieżki przekazywania sygnału prowadzące do wzrostu poziomu SNAIL.

FGFR1 oraz FGF-2 i FGF8 są niezbędne do indukcji ekspresji SNAIL w czasie rozwoju zarodkowego [20,46].

Natomiast EGF w linii komórek ludzkiego raka łuskowatokomórkowego A431 (epidermoid carcinoma) powoduje wzrost poziomu SNAIL przez obniżenie ekspresji kawoliny-1, co podwyższa, niezależną od GSK-3β, aktywność transkrypcyjną kompleksu β-kateniny z czynnikiem transkrypcyjnym TCF/LEF-1 (białka szlaku Wnt) [65].

Rola rodziny transformujących czynników wzrostu β (transforming growth factor β – TGF-β) w EMT, w tym EMT w progresji nowotworowej została szczegółowo poznana i opisana [15,55].

TGF-β1 indukuje ekspresję SNAIL w linii komórkowej raka płuc H441 [88]. Wpływ TGF-β1 na poziom SNAIL jest

podwyższony w komórkach nowotworowych z aktywną onkogeną GTP-azą Ras, co wskazuje na synergizm wpływu tych dwóch czynników na SNAIL [89].

W komórkach epitelialnych wątroby, będących w fazie przejścia w fenotyp „fibroblastoidalny” pod wpływem TGF-β1, w indukcję ekspresji *Snail* zależną od TGF-β1 i Ras jest zaangażowana kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) oraz aktywator kinazy ERK/kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenami 1 i 2 (ERK activator kinase, MEK1/2) [34,78]. W nowotworowych liniach pochodzenia nabłonkowego potwierdzono, że w przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych generowanych przez TGF-β1 na drodze zależnej od PI3K jest zaangażowana aktywna Akt [36].

Znany jest wpływ cytokiny prozapalnej – czynnika martwicy nowotworu (tumor necrosis factor, TNF-α) na wiele procesów powiązanych z nowotworzeniem [58]. TNF-α zwiększa migrację komórek, obniża poziom E-kadheryny oraz powoduje translokację SNAIL do jądra w komórkach raka nabłonka przewodów żółciowych [98]. Wydzielany przez makrofagi obecne w mikrośrodowisku nowotworu (tumor associated macrophages, TAMs) TNF-α stabilizuje SNAIL w komórkach nowotworowych przez aktywację szlaku jądrowego czynnika κB (nuclear factor-κB, NFκB). NFκB indukuje transkrypcję sygnałom COP9 (podjednostka CSN2), który następnie hamuje fosforylację SNAIL przez GSK-3β, a przez to degradację SNAIL [103].

Podwyższony poziom lub aktywność kinazy ILK są skorelowane ze wzrostem poziomu SNAIL w wielu typach nowotworów złośliwych [6,90,115]. ILK powoduje wzrost migracji i inwazyjności komórek nowotworowych przez indukowanie procesu EMT [16]. Obserwacje te potwierdziły się również w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowej raka jelita grubego (colorectal cancer, CRC) SW480 z nadekspresją ILK. Nadekspresja ILK w badanych komórkach obniża poziom E-kadheryny przez aktywację szlaku NFκB. ILK podwyższa poziom SNAIL i SLUG, jednak zaangażowanie w ten proces ścieżki NFκB wymaga dalszych badań [107]. W komórkach CRC ze zmutowanym genem supresora APC, kinaza ILK powoduje wzrost ekspresji genu kodującego SNAIL. W opisanym układzie ani APC ani białka szlaku Wnt (β-katenina, TCF) nie mają wpływu na poziom SNAIL [95].

Należące do rodziny Ras, onkogenne białko K-Ras stabilizuje SNAIL na drodze zależnej od kinazy ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, FRP1) [60].

Transbłonowe białko Notch dwójako wpływa na poziom SNAIL w komórkach nowotworowych. Wewnątrzkomórkowa domena Notch (Notch1 intracellular domain, NICD), stanowiąca aktywną postać tego receptora, wiąże się do promotora *SNAIL*, powodując wzrost transkrypcji. NICD, w warunkach niedotlenienia, nasila również wiązanie się czynnika HIF1α do promotora genu oksydazy lizylowej (lysyl oxidase, LOX), powodując wzrost ekspresji



sji oksydazy [87]. LOXL2, przez oksydację lizyny w pozycji 98 lub/i lizyny w pozycji 137 w sekwencji SNAIL, powoduje konformacyjną zmianę cząsteczki SNAIL, co chroni ją przed degradacją zależną od GSK-3 β (ryc. 2) [76]. A zatem aktywność SNAIL jest regulowana poprzez utrzymanie dynamicznej równowagi między działaniem GSK-3 β i LOXL2 w komórce. Aktywowanie ścieżki sygnałowej Notch podwyższające poziom SNAIL w liniach komórkowych raka piersi oraz fibroblastach związanych z nowotworem (cancer-associated fibroblasts, CAFs) jest stymulowane przez 17 β -estradiol oraz jego receptor GPR30/GPER [83].

Na stabilność SNAIL w komórce mają wpływ również kinaza kazeinowa 2 (casein kinase-2, CK2) oraz kinaza białkowa A (protein kinase A, PKA), fosforylując odpowiednio seryny w pozycjach 92 i 11 (ryc. 2). Być może procesy te modulują interakcje między czynnikiem SNAIL a jego korepresorem mSin3A, wpływając na represorową aktywność SNAIL w stosunku do *CDH1* [66].

Opisano powiązania między czynnikiem SNAIL a elementami ścieżki sygnałowej Wnt. Białka klasycznej ścieżki sygnałowej Wnt mogą hamować fosforylację SNAIL przez GSK-3 β [112]. W doświadczeniach z użyciem linii gruczolakoraka piersi MCF-7 wykazano, że aksyna 2 kontroluje poziom GSK-3 β w jądrze komórkowym [113]. W badaniach na liniach komórkowych raka jelita grubego wykazano, że SNAIL, przez stymulację transkrypcji zależnej od kompleksu β -katenina/TCF, wpływa na wzrost poziomu aksyny 2 oraz innych genów zależnych od ścieżki Wnt [93]. W warunkach indukowanego EMT w linii HepG2 raka wątrobowokomórkowego potwierdzono istnienie wzajemnych oddziaływań między SNAIL a β -kateniną, w następstwie aktywacji białek szlaku MAPK [118].

SNAIL reguluje swoją ekspresję przez ujemne sprzężenie zwrotne. Promotor *SNAIL* w pozycji – 146 od miejsca startu transkrypcji zawiera aktywną sekwencję E-box (5'-CACCTG-3') [79].

WPLYW CZYNNIKÓW REGULUJĄCYCH TRANSKRYPCJĘ NA REGULACJĘ EKSPRESJI SNAIL

Poznanie powiązań i wzajemnych zależności między białkami w EMT umożliwiło zidentyfikowanie czynników transkrypcyjnych i epigenetycznych, które regulują poziom SNAIL w komórkach.

Kompleks NF- κ B ma wpływ zarówno na ekspresję *Snail*, zwiększając poziom transkrypcji *SNAIL*, jak i na aktywność białka przez stabilizację cząsteczki SNAIL w komórkach [50,103]. Barberà i wsp. wykazali, że ludzki NF- κ B stymuluje transkrypcję genu *SNAIL*, wiążąc się do jego promotora w miejscu – 195 a – 78 pz [6]. Wpływ NF- κ B na transkrypcję czynnika w komórkach epitelialnych, może być znoszony przez działanie kinazy GSK-3 β [4]. Również czynniki SNAIL wpływa na poziom NF- κ B, w komórkach raka prostaty podwyższony pod wpływem działania

TGF- β lub EGF poziom SNAIL powodował obniżenie transkrypcji NF- κ B/p65 [18].

Zaktywowany przez c-MYC czynniki transkrypcyjny AP4 powoduje wzrost ekspresji SNAIL w komórkach raka jelita grubego [47].

Niezbędny do proliferacji komórek czynniki transkrypcyjny B-Myb jest pozytywnym regulatorem procesu EMT w liniach komórkowych raka piersi, gdzie odpowiada za podwyższenie poziomu SNAIL [96].

Czynniki SNAIL i TWIST w różnym stopniu wzajemnie oddziałują na siebie w czasie EMT indukowanym przez TGF- β . Obniżenie poziomu TWIST skutkuje opóźnieniem w indukcji ekspresji SNAIL przez TGF- β [22].

Wykazano również wiązanie regionu końca N sekwencji aminokwasowej metylotransferazy DNA 1 (DNMT1) do sekwencji SNAG czynnika SNAIL. DNMT1 uniemożliwia wiązanie SNAIL do promotora *CDH1*. Oddziaływanie to nie wymaga zaangażowania domeny katalitycznej DNMT1 odpowiedzialnej za metylację DNA [29].

ROLA MIKRORNA W REGULACJI AKTYWNOŚCI CZYNNIKA SNAIL

W ostatnich latach wiele badań skupia się na niekodujących RNA, a zwłaszcza mikroRNA (miRNA, miR), jako czynnikach regulujących ekspresję genów, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Niektóre z miRNA mogą wpływać na fenotyp komórek przez supresję genów zaangażowanych w kontrolowanie (epitelialnego lub mezenchymalnego) stanu komórki. Poziom SNAIL w komórkach nowotworowych jest regulowany przez miR-34a/b/c [54,92]. Aktywne białko supresorowe p53 indukuje ekspresję miR-34, które bezpośrednio wpływa na obniżenie poziomu mRNA kodującego SNAIL. W nowotworach ze zmutowanym lub epigenetycznie zainaktywowanym genem TP53 hamowanie ekspresji SNAIL przez miR-34 jest obniżone. W tym przypadku jest obserwowane sprzężenie zwrotne – powstający SNAIL wiąże się do sekwencji E-box w promotorach miR34a/b/c, hamując ich aktywność. Negatywne sprzężenie zwrotne między SNAIL a miRNA było obserwowane również w przypadku mir-203 w liniach komórkowych raka piersi [70].

Natomiast w komórkach czerniaka nadekspresja miR-9 wpływa na obniżenie poziomu SNAIL, bezpośrednio oddziałując na NF- κ B1 [63]. Ponadto w hepatocytarnej linii AML12 czy w czasie EMT w niedrobnokomórkowym raku płuc miR-30 wpływa bezpośrednio na obniżenie poziomu SNAIL, hamując wywołany przez TGF- β proces EMT [56,114]. SNAIL bezpośrednio hamuje również miR-200, który obniża poziom *Slug* [25].

REGULACJA NA POZIOMIE TRANSLACJI

Zidentyfikowano również wiele innych procesów, które regulują SNAIL na poziomie translacji. Zahamowanie

funkcji represora translacji 4E-BP1, charakterystycznego dla epitelium białka wiążącego eIF-4E, uniemożliwia powstawanie kompleksu eIF4F inicjującego translację onkogennych mRNA [12]. W nowotworach szlaki przekazywania sygnałów PI3K/AKT i Ras-MAPK prowadzą do fosforylacji 4E-BP1, która znosi funkcję inhibitorową tego czynnika. Obniżenie poziomu 4E-BP1 w komórkach linii raka piersi i raka jelita grubego powoduje wzrost ekspresji SNAIL, a co za tym idzie wzrost właściwości migracyjnych i inwazyjnych badanych linii komórkowych oraz zwiększenie metastazy w modelu myszy bezgranicznych. Ponadto w badanych liniach komórkowych MDA-MB-468 i HCT116 wykazano, że inhibitor kinazy mTOR AZD8055 hamuje fosforylację 4E-BP1, obniżając poziom SNAIL. Potwierdza to rolę 4E-BP1 w regulacji ekspresji SNAIL na poziomie inicjacji translacji zależnej od czapeczki, a w związku z tym w regulacji EMT [12]. Natomiast czynnik YB-1 (Y-box binding protein) indukuje translację mRNA SNAIL przez proces inicjacji translacji niezależny od czapeczki związany z sekwencją IRES (internal ribosome entry site – wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu) [30].

ZNACZENIE SNAIL W NOWOTWORZENIU I INWAZYJNOŚCI NOWOTWOROWEJ

Na podstawie badań przeprowadzonych na materiale uzyskanym od chorych wnioskuje się, że SNAIL jest potencjalnym czynnikiem prognostycznym, m.in. w przeżywalności pacjentów i nawrocie choroby nowotworowej po nefrektomii w raku jasnokomórkowym nerki, przeżywalności chorych na raka pęcherza moczowego poddanych chemioterapii czy chorych na raka piersi [35,64,72].

W raku jelita grubego oraz w liniach komórkowych wywodzących się z nowotworów jelita grubego zwiększony poziom czynnika SNAIL powoduje wzrost właściwości migracyjnych i inwazyjnych komórek w wyniku procesu EMT [44].

Obserwuje się także wpływ SNAIL na indukcję swoistego fenotypu nowotworowych komórek macierzystych (cancer stem cells, CSC) [31,44]. W przypadku raka trzustki SNAIL jest istotnym czynnikiem podtrzymującym

ekspresję markerów CSC i ich zdolność samoodnowy (wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych Sox2 i Oct-4) [117]. SNAIL indukuje również fenotyp CSC linii komórkowych raka płaskonabłonkowego głowy i szyi oraz wzmacnia ich oporność na chemioterapię [68].

SNAIL wpływa także na zahamowanie mechanizmów komórkowych prowadzących do apoptozy, a więc na wzrost oporności komórek nowotworowych na chemio-, radio – czy immunoterapię. Wykazano, że czynnik ten w warunkach uszkodzenia DNA, obniża poziom i stabilność białka p53, kontrolującego szlaki indukcji apoptotycznej śmierci komórkowej [51]. W badaniach *in vivo* SNAIL wykazuje właściwości ochronne, zmniejszając zmiany indukowane uszkodzeniami DNA powstającymi w wyniku stosowania radioterapii [80].

SNAIL jest wykrywany w dużej mierze w fibroblastach zrębu guzów, a jego ekspresja w zrębie jest związana z krótszą przeżywalnością chorych [32]. Poziom mRNA SNAIL w fibroblastach związanych z nowotworem (CAFs) koreluje ze wzrostem migracji i proliferacji komórek raka jelita grubego, co wraz z dostępną, zmienioną pod wpływem SNAIL, pulą cytokin wydzielanych przez CAFs wskazuje na ich własności sprzyjające procesowi nowotworzenia [41].

PODSUMOWANIE

Patologiczna indukcja procesu EMT w komórkach nowotworowych jest powiązana między innymi ze zniekształconym profilem metylacji DNA, zahamowaniem mechanizmów komórkowych prowadzących do apoptozy, a więc wzrostem oporności komórek nowotworowych na chemio-, radio – czy immunoterapię, z nabywaniem właściwości komórek CSC, właściwości migracyjnych i inwazyjnych, prowadzących do metastazy guzów. Czynnik transkrypcyjny SNAIL stanowi ważny element indukujący EMT przez opisane powyżej mechanizmy epigenetycznej regulacji genów. Lepsze zrozumienie procesów jakim podlega SNAIL w komórkach, może mieć istotne znaczenie w projektowaniu innowacyjnych terapii mających na celu zahamowanie metastazy nowotworowej, a także służyć do celów diagnostycznych i prognostycznych.

PISMIENICTWO

[1] Aclouque H., Adams M.S., Fishwick K., Bronner-Fraser M., Nieto M.A.: Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 1438-1449

[2] Alba-Castellón L., Batlle R., Francí C., Fernández-Aceñero M.J., Mazzolini R., Peña R., Loubat J., Alameda F., Rodríguez R., Curto J., Albanell J., Muñoz A., Bonilla F., Ignacio Casal J., Rojo F., García de Herreros A.: Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia*, 2014; 16: 413-421

[3] Alberga A., Boulay J., Kempe E., Dennefeld C., Haenlin M.: The *snail* gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development*, 1991; 111: 983-992

[4] Bachelder R.E., Yoon S.O., Franci C., de Herreros A.G., Mercurio A.M.: Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.*, 2005; 168: 29-33

[5] Bannister A.J., Kouzarides T.: Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, 2011; 21: 381-395

[6] Barberà M.J., Puig I., Domínguez D., Julien-Grille S., Guaita-Esteruelas S., Peiró S., Baulida J., Francí C., Dedhar S., Larue L., Garcia de Herreros A.: Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene*, 2004; 23: 7345-7354



- [7] Batlle 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; 2: 84-89
- [8] Blanco M.J., Moreno-Bueno G., Sarrío D., Locascio A., Cano A., Palacios J., Nieto M.A.: Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 2002; 21: 3241-3246
- [9] Bolós V., Peinado H., Pérez-Moreno M.A., Fraga M.F., Esteller M., Cano A.: The transcription factor Slug represses *E-cadherin* expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 499-511
- [10] Boulay J.L., Dennefeld C., Alberga A.: The *Drosophila* developmental gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature*, 1987; 330: 395-398
- [11] Boutet A., De Frutos C.A., Maxwell P.H., Mayol M.J., Romero J., Nieto M.A.: Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.*, 2006; 25: 5603-5613
- [12] Cai W., Ye Q., She Q.B.: Loss of 4E-BP1 function induces EMT and promotes cancer cell migration and invasion via cap-dependent translational activation of snail. *Oncotarget*, 2014; 5: 6015-6027
- [13] Cano A., Pérez-Moreno M.A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M.J., del Barrio M.G., Portillo F., Nieto M.A.: The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 76-83
- [14] Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L., Browne G., Richard G., Wierinckx A., Saldanha G., Osborne J., Hutchinson P., Tse G., Lachuer J., Puisieux A., Pringle J.H., Ansieau S., Tulchinsky E.: A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell*, 2013; 24: 466-480
- [15] Chapnick D.A., Warner L., Bernet J., Rao T., Liu X.: Partners in crime: the TGF β and MAPK pathways in cancer progression. *Cell Biosci.*, 2011; 1: 42
- [16] Chen D., Zhang Y., Zhang X., Li J., Han B., Liu S., Wang L., Ling Y., Mao S., Wang X.: Overexpression of integrin-linked kinase correlates with malignant phenotype in non-small cell lung cancer and promotes lung cancer cell invasion and migration via regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related genes. *Acta Histochem.*, 2013; 115: 128-136
- [17] Chen J., Xu H., Zou X., Wang J., Zhu Y., Chen H., Shen B., Deng X., Zhou A., Chin Y.E., Rauscher F.J., Peng C., Hou Z.: Snail recruits Ring1B to mediate transcriptional repression and cell migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 2014; 74: 4353-4363
- [18] Chen X.H., Liu Z.C., Zhang G., Wei W., Wang X.X., Wang H., Ke H.P., Zhang F., Wang H.S., Cai S.H., Du J.: TGF- β and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. *Mol. Immunol.*, 2015; 65: 34-42
- [19] Cicchini C., Filippini D., Coen S., Marchetti A., Cavallari C., Laudadio I., Spagnoli F.M., Alonzi T., Tripodi M.: Snail controls differentiation of hepatocytes by repressing HNF4 α expression. *J. Cell. Physiol.*, 2006; 209: 230-238
- [20] Ciruna B., Rossant J.: FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell*, 2001; 1: 37-49
- [21] Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschuere K., Van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., Van Roy F.: The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell*, 2001; 7: 1267-1278
- [22] Dave N., Guaita-Esteruelas S., Gutarra S., Frias À., Beltran M., Peiró S., García De Herreros A.: Functional cooperation between snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 12024-12032
- [23] de Boer T.P., van Veen T.A., Bierhuizen M.F., Kok B., Rook M.B., Boonen K.J., Vos M.A., Doevendans P.A., de Bakker J.M., van der Heyden M.A.: Connexin43 repression following epithelium-to-mesenchyme transition in embryonal carcinoma cells requires Snail1 transcription factor. *Differentiation*, 2007; 75: 208-218
- [24] De Craene B., Gilbert B., Stove C., Bruyneel E., van Roy F., Berx G.: The transcription factor Snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.*, 2005; 65: 6237-6244
- [25] Díaz-López A., Díaz-Martín J., Moreno-Bueno G., Cuevas E.P., Santos V., Olmeda D., Portillo F., Palacios J., Cano A.: Zeb1 and Snail1 engage miR-200f transcriptional and epigenetic regulation during EMT. *Int. J. Cancer*, 2015; 136: E62-E73
- [26] Dominguez D., Montserrat-Sentís B., Virgós-Soler A., Guaita S., Grueso J., Porta M., Puig I., Baulida J., Francí C., García de Herreros A.: Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the Snail transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 5078-5089
- [27] Dong C., Wu Y., Wang Y., Wang C., Kang T., Rychahou P.G., Chi Y.I., Evers B.M., Zhou B.P.: Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer. *Oncogene*, 2013; 32: 1351-1362
- [28] Dong C., Wu Y., Yao J., Wang Y., Yu Y., Rychahou P.G., Evers B.M., Zhou B.P.: G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 2012; 122: 1469-1486
- [29] Espada J., Peinado H., Lopez-Serra L., Setián F., Lopez-Serra P., Portela A., Renart J., Carrasco E., Calvo M., Juarraz A., Cano A., Esteller M.: Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 9194-9205
- [30] Evdokimova V., Tognon C., Ng T., Ruzanov P., Melnyk N., Fink D., Sorokin A., Ovchinnikov L.P., Davicioni E., Triche T.J., Sorensen P.H.: Translational activation of Snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*, 2009; 15:402-415
- [31] Fan F., Samuel S., Evans K.W., Lu J., Xia L., Zhou Y., Sceusi E., Tozzi F., Ye X.C., Mani S.A., Ellis L.M.: Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.*, 2012; 1: 5-16
- [32] Francí C., Gallén M., Alameda F., Baró T., Iglesias M., Virtanen I., Garcia de Herreros A.: Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. *PLoS One*, 2009; 4: 1-7
- [33] Fuse N., Hirose S., Hayashi S.: Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes Dev.*, 1994; 8: 2270-2281
- [34] Gotzmann J., Huber H., Thallinger C., Wolschek M., Jansen B., Schulte-Hermann R., Beug H., Mikulits W.: Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF- β 1 and Ha-Ras: steps towards invasiveness. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 1189-1202
- [35] Gou Y., Ding W., Xu K., Wang H., Chen Z., Tan J., Xia G., Ding Q.: Snail is an independent prognostic indicator for predicting recurrence and progression in non-muscle-invasive bladder cancer. *Int. Urol. Nephrol.*, 2015; 47: 289-293
- [36] Grille S.J., Bellacosa A., Upson J., Klein-Szanto A.J., van Roy F., Lee-Kwon W., Donowitz M., Tschlis P.N., Larue L.: The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2172-2178
- [37] Grootclaes M.L., Frisch S.M.: Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 2000; 19: 3823-3828
- [38] Grotegut S., von Schweinitz D., Christofori G., Lehembre F.: Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J.*, 2006; 25: 3534-3545

- [39] Hemavathy K., Ashraf S.I., Ip Y.T.: Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, 2000; 257: 1-12
- [40] Herranz N., Pasini D., Díaz V.M., Franci C., Gutierrez A., Dave N., Escrivà M., Hernandez-Muñoz I., Di Croce L., Helin K., García de Herreros A., Peiró S.: Polycomb complex 2 is required for *E-cadherin* repression by the Snail1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 4772-4781
- [41] Herrera A., Herrera M., Alba-Castellón L., Silva J., García V., Loubat-Casanovas J., Álvarez-Cienfuegos A., Miguel García J., Rodríguez R., Gil B., Ma Jesús Citores, Ma Jesús Larriba, Ignacio Casal J., de Herreros A.G., Bonilla F., Pena C.: Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2014; 134: 2984-2990
- [42] Hotz B., Visekruna A., Buhr H.J., Hotz H.G.: Beyond epithelial to mesenchymal transition: a novel role for the transcription factor Snail in inflammation and wound healing. *J. Gastrointest. Surg.*, 2010; 14: 388-397
- [43] Hou Z., Peng H., Ayyanathan K., Yan K.P., Langer E.M., Longmore G.D., Rauscher F.J.: The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 3198-3207
- [44] Hwang W.L., Yang M.H., Tsai M.L., Lan H.Y., Su S.H., Chang S.C., Teng H.W., Yang S.H., Lan Y.T., Chiou S.H., Wang H.W.: SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*, 2011; 141: 279-291
- [45] Ikenouchi J., Matsuda M., Furuse M., Tsukita S.: Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 1959-1967
- [46] Isaac A., Cohn M.J., Ashby P., Ataliotis P., Spicer D.B., Cooke J., Tickle C.: FGF and genes encoding transcription factors in early limb specification. *Mech. Dev.*, 2000; 93: 41-48
- [47] Jackstadt R., Röh S., Neumann J., Jung P., Hoffmann R., Horst D., Berens C., Bornkamm G.W., Kirchner T., Menssen A., Hermeking H.: AP4 is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer. *J. Exp. Med.*, 2013; 210: 1331-1350
- [48] Jiao W., Miyazaki K., Kitajima Y.J.: Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer*, 2002; 86: 98-101
- [49] Jordà M., Olmeda D., Vinyals A., Valero E., Cubillo E., Llorens A., Cano A., Fabra A.: Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 3371-3385
- [50] Julien S., Puig I., Caretti E., Bonaventure J., Nelles L., van Roy F., Dargemont C., de Herreros A.G., Bellacosa A., Larue L.: Activation of NF- κ B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene*, 2007; 26: 7445-7456
- [51] Kajita M., McClintock K.N., Wade P.A.: Aberrant expression of the transcription factors Snail and Slug alters the response to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 7559-7566
- [52] Kashyap A., Zimmerman T., Ergül N., Bosserhoff A., Hartman U., Alla V., Bataille F., Galle P.R., Strand S., Strand D.: The human Lgl polarity gene, Hugel-2, induces MET and suppresses Snail tumorigenesis. *Oncogene*, 2013; 32: 1396-1407
- [53] Katoh M., Katoh M.: Identification and characterization of human SNAIL3 (SNAI3) gene in silico. *Int. J. Mol. Med.*, 2003; 11: 383-388
- [54] Kim N.H., Kim H.S., Li X.Y., Lee I., Choi H.S., Kang S.E., Cha S.Y., Ryu J.K., Yoon D., Fearon E.R., Rowe R.G., Lee S., Maher C.A., Weiss S.J., Yook J.I.: A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.*, 2011; 195: 417-433
- [55] Kim S., Lee J., Jeon M., Nam S.J., Lee J.E.: Elevated TGF- β 1 and - β 2 expression accelerates the epithelial to mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells. *Cytokine*, 2015; 75: 151-158
- [56] Kumarswamy R., Mudduluru G., Ceppi P., Muppala S., Kozlowski M., Niklinski J., Papotti M., Allgayer H.: MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail1 and is down-regulated in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2012; 130: 2044-2053
- [57] Lan L., Han H., Zuo H., Chen Z., Du Y., Zhao W., Gu J., Zhang Z.: Upregulation of myosin Va by snail is involved in cancer cell migration and metastasis. *Int. J. Cancer*, 2010; 126: 53-64
- [58] Landskron G., De La Fuente M., Thuwajit P., Thuwajit C., Hermoso M.A.: Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.*, 2014; 2014: 149185
- [59] Larriba M.J., Bonilla F., Muñoz A.: The transcription factors Snail1 and Snail2 repress vitamin D receptor during colon cancer progression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2010; 121: 106-109
- [60] Lee S.H., Lee S.J., Jung Y.S., Xu Y., Kang H.S., Ha N.C., Park B.J.: Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia*, 2009; 11: 22-31
- [61] Lin Y., Dong C., Zhou B.P.: Epigenetic regulation of EMT: the Snail story. *Curr. Pharm. Des.*, 2014; 20: 1698-1705
- [62] Lin Y., Wu Y., Li J., Dong C., Ye X., Chi Y.I., Evers B.M., Zhou B.P.: The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.*, 2010; 29: 1803-1816
- [63] Liu S., Kumar S.M., Lu H., Liu A., Yang R., Pushparajan A., Guo W., Xu X.: MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- κ B1-Snail1 pathway in melanoma. *J. Pathol.*, 2012; 226: 61-72
- [64] Liu W., Liu Y., Liu H., Zhang W., An H., Xu J.: Snail predicts recurrence and survival of patients with localized clear cell renal cell carcinoma after surgical resection. *Urol. Oncol.*, 2015; 33: e69.e1-e69.e10
- [65] Lu Z., Ghosh S., Wang Z., Hunter T.: Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of β -catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell*, 2003; 4: 499-515
- [66] MacPherson M.R., Molina P., Souchelnytskyi S., Wernstedt C., Martin-Pérez J., Portillo F., Cano A.: Phosphorylation of serine 11 and serine 92 as new positive regulators of human Snail1 function: potential involvement of casein kinase-2 and the cAMP-activated kinase protein kinase A. *Mol. Biol. Cell*, 2010; 21: 244-253
- [67] Martínez-Estrada O.M., Cullerés A., Soriano F.X., Peinado H., Bolós V., Martínez F.O., Reina M., Cano A., Fabre M., Vilaró S.: The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem. J.*, 2006; 394: 449-457
- [68] Masui T., Ota I., Yook J.-I., Mikami S., Yane K., Yamanaka T., Hosoï H.: Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 2014; 44: 693-699
- [69] Miyoshi A., Kitajima Y., Sumi K., Sato K., Hagiwara A., Koga Y., Miyazaki K.: Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, 2004; 90: 1265-1273
- [70] Moes M., Le Bécheç A., Crespo I., Laurini C., Halavaty A., Vetter G., Del Sol A., Friederich E.: A novel network integrating a mirn RNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One*, 2012; 7: e35440
- [71] Molina-Ortiz P., Villarejo A., MacPherson M., Santos V., Montes A., Souchelnytskyi S., Portillo F., Cano A.: Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. *PLoS One*, 2012; 7: e36132



- [72] Muenst S., Däster S., Obermann E.C., Droeser R.A., Weber W.P., von Holzen U., Gao F., Viehl C., Oertli D., Soysal S.D.: Nuclear expression of Snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer. *Dis. Markers*, 2013; 35: 337-344
- [73] Nakayama H., Scott I.C., Cross J.C.: The transition to endoreplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev. Biol.*, 1998; 199: 150-163
- [74] Ohkubo T., Ozawa M.: The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 1675-1685
- [75] Peinado H., Ballestar E., Esteller M., Cano A.: Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 306-319
- [76] Peinado H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz M., Olmeda D., Csiszar K., Fong K.S., Vega S., Nieto M.A., Cano A., Portillo F.: A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.*, 2005; 24: 3446-3458
- [77] Peinado H., Portillo F., Cano A.: Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2004; 48: 365-375
- [78] Peinado H., Quintanilla M., Cano A.: Transforming growth factor β -1 induces Snail transcription factor in epithelial cell lines. Mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 21113-21123
- [79] Peiró S., Escrivà M., Puig I., Barberà M.J., Dave N., Herranz N., Larriba M.J., Takkunen M., Francí C., Muñoz A., Virtanen I., Baulida J., García de Herreros A.: Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: 2077-2084
- [80] Pérez-Mancera P.A., Pérez-Caro M., González-Herrero I., Flores T., Orfao A., de Herreros A.G., Gutiérrez-Adán A., Pintado B., Sagreña A., Sánchez-Martín M., Sánchez-García I.: Cancer development induced by graded expression of Snail in mice. *Hum. Mol. Genet.*, 2005; 14: 3449-3461
- [81] Pérez-Moreno M.A., Locascio A., Rodrigo I., Dhondt G., Portillo F., Nieto M.A., Cano A.: A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 27424-27431
- [82] Poser I., Domínguez D., García De Herreros A., Varnai A., Buettner R., Bosserhoff A.K.: Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 24661-24666
- [83] Pupo M., Pisano A., Abonante S., Maggiolini M., Musti A.M.: GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014; 46: 56-67
- [84] Rhim A.D., Mirek E.T., Aiello N.M., Maitra A., Bailey J.M., McAllister F., Reichert M., Beatty G.L., Rustgi A.K., Vonderheide R.H., Leach S.D., Stanger B.Z.: EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 2012; 148: 349-361
- [85] Rosivatz E., Becker I., Specht K., Fricke E., Luber B., Busch R., Höfler H., Becker K.F.: Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 1881-1891
- [86] Rowe R.G., Li X.Y., Hu Y., Saunders T.L., Virtanen I., Garcia de Herreros A., Becker K.F., Ingvarsen S., Engelholm L.H., Bommer G.T., Fearon E.R., Weiss S.J.: Mesenchymal cells reactivate Snail1 expression to drive three-dimensional invasion programs. *J. Cell Biol.*, 2009; 184: 399-408
- [87] Sahlgren C., Gustafsson M.V., Jin S., Poellinger L., Lendahl U.: Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 6392-6397
- [88] Saito R.A., Watabe T., Horiguchi K., Kohyama T., Saitoh M., Nagase T., Miyazono K.: Thyroid transcription factor-1 inhibits trans-
- forming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 2009; 69: 2783-2791
- [89] Saitoh M.: Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor- β signaling during tumor progression. *Cancer Sci.*, 2015; 106: 481-488
- [90] Schaeffer D.F., Assi K., Chan K., Buczkowski A.K., Chung S.W., Scudamore C.H., Weiss A., Salh B., Owen D.A.: Tumor expression of Integrin-linked kinase (ILK) correlates with the expression of the E-cadherin repressor Snail: an immunohistochemical study in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch.*, 2010; 456: 261-268
- [91] Shi Y.J., Matsun C., Lan F., Iwase S., Baba T., Shi Y.: Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol. Cell*, 2005; 19: 857-864
- [92] Siemens H., Jackstadt R., Hünten S., Kaller M., Menssen A., Götz U., Hermeking H.: miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle*, 2011; 10: 4256-4271
- [93] Stemmer V., de Craene B., Berx G., Behrens J.: Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with β -catenin. *Oncogene*, 2008; 27: 5075-5080
- [94] Sun M., Guo X., Qian X., Wang H., Yang C., Brinkman K.L., Serrano-Gonzalez M., Jope R.S., Zhou B., Engler D.A., Zhan M., Wong S.T., Fu L., Xu B.: Activation of the ATM-Snail pathway promotes breast cancer metastasis. *J. Mol. Cell Biol.*, 2012; 4: 304-315
- [95] Tan C., Costello P., Sanghera J., Dominguez D., Baulida J., de Herreros A.G., Dedhar S.: Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses β -catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 2001; 20: 133-140
- [96] Tao D., Pan Y., Jiang G., Lu H., Zheng S., Lin H., Cao F.: B-Myb regulates snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cell. *Med. Oncol.*, 2015; 32: 412
- [97] Taube J.H., Herschkowitz J.I., Komurov K., Zhou A.Y., Gupta S., Yang J., Hartwell K., Onder T.T., Gupta P.B., Evans K.W., Hollier B.G., Ram P.T., Lander E.S., Rosen J.M., Weinberg R.A., Mani S.A.: Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 15449-15454
- [98] Techasen A., Namwat N., Loilome W., Bungkanjana P., Khuntikeo N., Puapairoj A., Jearanaikoon P., Saya H., Yongvanit P.: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulates the epithelial-mesenchymal transition regulator Snail in cholangiocarcinoma. *Med. Oncol.*, 2012; 29: 3083-3091
- [99] Whiteman E.L., Liu C.J., Fearon E.R., Margolis B.: The transcription factor snail represses *Crumbs3* expression and disrupts apical-basal polarity complexes. *Oncogene*, 2008; 27: 3875-3879
- [100] Wong A.S., Gumbiner B.M.: Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J. Cell Biol.*, 2003; 161: 1191-1203
- [101] Wong M.M., Guo C., Zhang J.: Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *Am. J. Clin. Exp. Urol.*, 2014; 2: 169-187
- [102] Wu M.Z., Tsai Y.P., Yang M.H., Huang C.H., Chang S.Y., Chang C.C., Teng S.C., Wu K.J.: Interplay between HDAC3 and WDR5 is essential for Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell*, 2011; 43: 811-822
- [103] Wu Y., Deng J., Rychahou P.G., Qiu S., Evers B.M., Zhou B.P.: Stabilization of Snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*, 2009; 15: 416-428
- [104] Wu Y., Evers B.M., Zhou B.P.: Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 640-648
- [105] Xu Y., Lee S.H., Kim H.S., Kim N.H., Piao S., Park S.H., Jung Y.S.,

Yook J.I., Park B.J., Ha N.C.: Role of CK1 in GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation of snail. *Oncogene*, 2010; 29: 3124-3133

[106] Yamasaki H., Sekimoto T., Ohkubo T., Douchi T., Nagata Y., Oza-wa M., Yoneda Y.: Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin β -mediated nuclear import pathway. *Genes Cells*, 2005; 10: 455-464

[107] Yan Z., Yin H., Wang R., Wu D., Sun W., Liu B., Su Q.: Overexpression of integrin-linked kinase (ILK) promotes migration and invasion of colorectal cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via NF- κ B signaling. *Acta Histochem.*, 2014; 116: 527-533

[108] Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A.: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004; 117: 927-939

[109] Yang Z., Rayala S., Nguyen D., Vadlamudi R.K., Chen S., Kumar R.: Pak1 phosphorylation of Snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates Snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res.*, 2005; 65: 3179-3184

[110] Yokoyama K., Kamata N., Fujimoto R., Tsutsumi S., Tomonari M., Taki M., Hosokawa H., Nagayama M.: Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int. J. Oncol.*, 2003; 22: 891-898

[111] Yokoyama K., Kamata N., Hayashi E., Hoteiya T., Ueda N., Fujimoto R., Nagayama M.: Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol.*, 2001; 37: 65-71

[112] Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Fearon E.R., Weiss S.J.: Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J. Biol. Chem.*, 2005;

280; 11740-11748

[113] Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Hu C., Kim H.S., Kim N.H., Cha S.Y., Ryu J.K., Choi Y.J., Kim J., Fearon E.R., Weiss S.J.: A Wnt-Axin2-GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 1398-1406

[114] Zhang J., Zhang H., Liu J., Tu X., Zang Y., Zhu J., Chen J., Dong L., Zhang J.: MiR-30 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 417: 1100-1105

[115] Zhao D., Tang X.F., Yang K., Liu J.Y., Ma X.R.: Over-expression of integrin-linked kinase correlates with aberrant expression of Snail, E-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Implications in tumor progression and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 2012; 29: 957-969

[116] Zhou B.P., Deng J., Xia W., Xu J., Li Y.M., Gunduz M., Hung M.C.: Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.*, 2004; 6: 931-940

[117] Zhou W., Lv R., Qi W., Wu D., Xu Y., Liu W., Mou Y., Wang L.: Snail contributes to the maintenance of stem cell-like phenotype cells in human pancreatic cancer. *PLoS One*, 2014; 9: e87409

[118] Zucchini-Pascal N., Peyre L., Rahmani R.: Crosstalk between β -catenin and snail in the induction of epithelial to mesenchymal transition in hepatocarcinoma: role of the ERK1/2 pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 20768-20792

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

