

INDICE

INTRODUZIONE	4
HCC: Epidemiologia e Fattori di rischio	5
HBV	6
HCV	7
ALCOL.....	9
AFLATOSSINA B1.....	11
MALATTIE GENETICHE E METABOLICHE.....	12
Diagnosi dell'epatocarcinoma	13
Caratteristiche anatomopatologiche e stadiazione dell'Hcc	16
Epatocarcinogenesi	20
Alterazioni delle vie di segnalazione	24
Fattori diagnostici e prognostici dell' HCC	30
YY1.....	34
RKIP	45
Trattamenti dell'epatocarcinoma	55
OBIETTIVI	61
MATERIALI E METODI	64
Pazienti.....	65
Colture Cellulari.....	65
Estrazione dell'RNA	66
RT-PCR semiquantitativa.....	66
Analisi immunoistochimica	68

Analisi Statistica	69
Western Blotting	70
Estrazione del DNA.....	71
Saggi di Metilazione: conversione DNA con sodio bisolfito ed MSP (Methylation-specific PCR)	72
RISULTATI	75
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	89
BIBLIOGRAFIA.....	97

INTRODUZIONE

HCC: Epidemiologia e Fattori di rischio

Il Carcinoma Epatocellulare (HCC) è uno dei tumori maligni più comuni nel mondo.

Globalmente, esso risulta essere il quinto tra le forme di neoplasia più diffuse e rappresenta la terza causa di morte per cancro, con una stima di più di 500.000 nuovi casi ogni anno.

Esiste una notevole eterogeneità geografica nell'incidenza dell'HCC con un 80% di nuovi casi nei paesi in via di sviluppo. Le aree ad alta incidenza, infatti, includono l'Africa Sub-Sahariana e il Sud-Est Asiatico mentre le aree a bassa incidenza includono il Nord-Europa, l'Europa Occidentale e il Nord America (1).

Inoltre, il tasso di incidenza dell'HCC varia ampiamente anche in base al sesso con un rapporto maschi/femmine di 2-4:1 nella maggior parte delle popolazioni (1). Le ragioni di ciò possono essere correlate alle differenze sesso-specifiche esistenti nell'esposizione ai fattori di rischio. Tuttavia, studi sperimentali condotti su topi hanno mostrato un aumento di insorgenza dell'HCC da 2 a 8 volte maggiore in topi maschi e ciò supporta l'ipotesi che, accanto all'esposizione sesso-specifica ai fattori di rischio per l'HCC, anche fattori maschili endogeni possono essere correlati allo sviluppo del tumore, inclusi i maggiori livelli circolanti di ormoni androgenici. D'altronde, è stata dimostrata negli uomini un'associazione positiva tra l'aumento del livello di testosterone circolante e l'HCC-HBV correlato (2).

Lo sviluppo asintomatico di questo tipo di tumore, la sua progressione maligna, la scarsa efficacia dei trattamenti attualmente in uso, rendono infausta, spesso, la prognosi dell'HCC, con un indice di sopravvivenza minore del 5% a 5 anni dalla diagnosi (3).

Tuttavia, il migliore controllo dei fattori di rischio ha determinato un recente declino dell'incidenza dell'HCC in alcuni paesi, come in Cina e in Taiwan. Al contrario, recentemente, si è registrato un trend in aumento di casi di HCC nei paesi sviluppati, soprattutto in Europa e in Nord America, probabilmente da correlare alla maggiore diffusione del virus HCV (1, 4); si riscontra perciò un crescente interesse alla sua patogenesi molecolare e agli aspetti correlati all'epidemiologia e al trattamento.

L'ampia variabilità geografica dell'incidenza dell'HCC nelle diverse aree del mondo può essere spiegata con l'eterogeneità della penetrazione, all'interno delle popolazioni, dei diversi fattori di rischio (5).

Tra le cause di danno epatico responsabili dell'insorgenza del tumore al fegato, le più importanti sono i virus dell'epatite B e C (HBV e HCV), l'alcol, l'emocromatosi e il morbo di Wilson, la steatoepatite non-alcolica e la cirrosi biliare primaria (Fig. 1).

HBV

Globalmente, l'infezione da HBV rappresenta il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma, soprattutto nelle aree in cui il virus è endemico. In particolare, l'infezione da HBV ha un'elevata prevalenza nei paesi sottosviluppati ed in alcune aree dell'Asia : qui, l'infezione viene acquisita alla nascita o nei primi anni di vita (4).

L' HBV potrebbe iniziare la trasformazione dell'epatocita, tramite l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula che condurrebbe ad una instabilità genomica a causa di mutazioni, delezioni, traslocazioni e riarrangiamento; si tratta, infatti, di un virus a DNA che presenta un ciclo vitale peculiare che include una fase di integrazione del genoma virale all'interno del genoma cellulare dell'ospite.

Questo processo può determinare l'attivazione di geni endogeni, come la ciclina A e SERCA1 che stimolano la proliferazione cellulare, provocando una rigenerazione epatica incontrollata.

L'integrazione dell'HBV-DNA nel genoma cellulare dell'ospite, inoltre, potrebbe deregolare l'espressione di oncogeni e oncosoppressori che, fisiologicamente, sono in grado di controllare e bilanciare i segnali di morte e sopravvivenza cellulare.

Infine, l'HBV può indurre epatocarcinogenesi attraverso l'espressione di proteine virali che hanno proprietà oncogene, come l'HBx. Attraverso la sua capacità di agire a livello di specifici promotori, l'HBx è in grado di modificare l'espressione di alcuni geni che sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, come, ad esempio, il gene che codifica la proteina p53, importante oncosoppressore e induttore del processo apoptotico. Questi effetti della proteina x su p53 potrebbero favorire la trasformazione maligna degli epatociti infettati da HBV. E' verosimile che in questi casi entrino in gioco altri fattori di rischio, quali la coinfezione con HCV, l'alcool, l'aflatossina o altri agenti sconosciuti in grado di dare cirrosi e/o promozione della trasformazione neoplastica (6).

HCV

HCV è un agente virale trasmesso attraverso il contatto con sangue infetto e rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di HCC in Europa, Giappone e America. Spesso l'infezione da HCV si sovrappone all'assunzione cronica di alcol che, in alcune aree, come in Francia rappresenta il maggiore agente oncogenico. L'incidenza crescente dell'HCC HCV-correlato è legata probabilmente alla diffusione massiva del virus verificatasi 20-40 anni fa (4). Il virus entra nell'organismo attraverso il sangue e tramite il circolo ematico raggiunge il fegato, per il quale ha uno spiccato tropismo, replicandosi

negli epatociti. Dopo un periodo di incubazione, variabile da 5 a 12 settimane, può causare una prima sintomatologia caratterizzata da ittero e malessere generale.

Nell'80% dei casi, il virus persiste nell'organismo e causa un'infezione cronica che, può essere ancora asintomatica. Durante questa fase, l'HCV si replica attivamente all'interno degli epatociti infetti e ciò fa sì che tutti i pazienti con infezione cronica sviluppino un'epatite, con quadri istologici compresi tra epatiti croniche lievi e quadri ad evoluzione cirrogena.

Circa il 20% dei pazienti con infezione cronica da HCV sviluppano, infatti, cirrosi epatica a distanza di 10-20 anni dall'inizio dell'infezione.

Tuttavia, esiste una notevole variabilità in termini di suscettibilità allo sviluppo del meccanismo cirrogeno, che sembra più diffusa nei soggetti maschi dediti al consumo di alcol. Altri fattori che possono influenzare il rischio di evoluzione dell'infezione cronica in cirrosi e poi in epatocarcinoma, sembrano essere rappresentati dalla durata dell'infezione e dal genotipo virale: in particolare, sembra che il genotipo 1b di HCV sia associato a forme più gravi (6).

Contrariamente all'HBV, l'HCV è un virus ad RNA che non si integra nel genoma cellulare dell'ospite ma è in grado di indurre epatocarcinogenesi attraverso un'interazione proteica.

Nel processo di infezione, dopo una prima fase di adsorbimento, il virus libera il suo genoma all'interno del citoplasma cellulare. E' noto che una volta penetrato nel citoplasma, il genoma di HCV, essendo costituito da un filamento di RNA a polarità positiva, viene direttamente tradotto in una poliproteina che subisce una serie di processi proteolitici che porteranno poi alla produzione delle proteine virali mature (6).

In particolare, la proteina core e le proteine non strutturali NS3 e NS5A sono i fattori più coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi HCV-correlata (7).

La proteina core di HCV, infatti, agisce da proteina polifunzionale, con capacità regolatrici della proliferazione cellulare e della regolazione trascrizionale di alcuni geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare, come il proto-oncogene c-myc. Inoltre, questa proteina potrebbe indurre epatocarcinogenesi attraverso altri meccanismi, come la modifica del rilascio del fattore di necrosi tumorale α che, come è noto, influenza il fisiologico equilibrio che si instaura tra i processi di morte e sopravvivenza cellulare (7).

Nella trasformazione cellulare degli epatociti cronicamente infettati da HCV è stato ipotizzato un possibile ruolo anche delle proteine di HCV non strutturali, note come NS3, che negli stadi precoci porterebbe a mutazione di p53, e NS5A che reprimerebbe la trascrizione del gene regolatore del ciclo cellulare p21WAF1 (6).

ALCOL

L'abuso di alcol, definito dal consumo di più di 50-70 g/giorno per prolungati periodi di tempo, rappresenta un fattore di rischio accertato per lo sviluppo di epatocarcinoma (8).

Il meccanismo esatto di epatocarcinogenesi alcol-correlata è ancora poco chiaro, dal momento che, di per sé, l'etanolo non è un carcinogeno.

E' noto, comunque, che molteplici meccanismi possono essere coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi alcol-correlata tra cui: l'effetto locale dell'etanolo, l'accumulo nei tessuti e nelle cellule di acetaldeide, metabolita dell'etanolo, agente tossico e cancerogeno, l'induzione dell'isoforma 2E1 del citocromo P450, coinvolta nel metabolismo dell'etanolo, deficit nutrizionali, interazione con retinoidi, cambiamento nel grado di metilazione.

L'alcol, inoltre, potrebbe agire come co-carcinogeno amplificando l'effetto di carcinogeni diretti come quelli ritrovati nel fumo di tabacco o nella dieta, attraverso l'induzione di diverse isoforme degli enzimi della famiglia CYP450 (9).

Durante la reazione metabolica catalizzata dall'isoforma CYP2E1, si formano radicali idrossietilici responsabili del danno genotossico al DNA (8, 9).

L'induzione del citocromo CYP2E1, inoltre, determina un abbassamento dei livelli di acido retinoico, per aumento del suo metabolismo, ed un'incrementata espressione del gene AP1 associata all'aumentata attività delle proteine c-jun e c-fos. Tale fattore di trascrizione è responsabile dell'espressione della ciclina D1, associata ad iperproliferazione cellulare (9). D'altra parte, studi sperimentali condotti su animali hanno mostrato che la somministrazione esogena di acido retinoico è in grado di ristabilire il normale livello di espressione del gene AP-1 bloccando il processo di iperproliferazione epatocitaria. Questi dati sottolineano che bassi livelli di acido retinoico, determinati dall'ingestione cronica di alcol, rivestono un ruolo fondamentale nella promozione dell'epatocarcinogenesi (10).

Inoltre, l'assunzione cronica di alcol può determinare l'induzione del processo di epatocarcinogenesi, attraverso un altro meccanismo che prevede la riduzione dei livelli di metilazione di alcune citosine a livello di specifiche regioni del DNA.

Cambiamenti del livello di metilazione delle C sono, infatti, frequentemente associate a diverse forme di cancro umano ma la loro rilevanza come fattori epigenetici associati al processo di carcinogenesi è stata solo parzialmente compresa.

E' noto che la metilazione del DNA rappresenta un importante meccanismo di controllo dell'espressione genica, in quanto l'ipermetilazione ha un effetto di silenziamento genico

mentre l'ipometilazione determina un incremento dell'espressione genica. Alterazioni del livello di metilazione del DNA epatico ed, in particolare, condizioni di ipometilazione di alcuni oncogeni, sono state osservate in modelli sperimentali di alcolismo cronico e sono state valutate come fattori favorevoli allo sviluppo di HCC (9).

E' importante comunque sottolineare che in tutti questi processi, l'etanolo assunto cronicamente mediante il consumo di bevande alcoliche, non agisce da carcinogeno diretto in quanto è la sua associazione ad altri fattori ad essere responsabile dell'induzione dell'epatocarcinogenesi.

AFLATOSSINA B1

L'aflatossina B1 (AFB1) è il principale metabolita prodotto dai funghi del genere *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus parasiticus* che possono crescere su diversi prodotti alimentari conservati in condizioni di eccessivo calore e umidità.

Dopo un'esposizione all'AFB1, grandi quantità di DNA danneggiato possono essere ritrovate nel fegato, come risultato della conversione dell'aflatossina nei suoi metaboliti attivi.

L'AFB1 è, infatti, un agente mutageno e i suoi metaboliti attivi reagiscono con le guanine presenti nel DNA causando mutazioni geniche.

La più frequente mutazione indotta dall'aflatossina B1 è rappresentata dalla trasversione GC:TA (11).

In particolare, l'AFB1 è in grado di determinare la sostituzione di un singolo nucleotide nel codone 249 del gene oncosoppressore p53, che si manifesta, a livello proteico, con la sostituzione aminoacidica di un'arginina con una serina.

Questa mutazione è presente in più del 50% dei pazienti con HCC che vivono nelle aree dove è alto il rischio di esposizione all'aflatossina, come Cina e Taiwan (8).

Inoltre, è stato accertato che le aree con elevato rischio di esposizione all'AFB1 sono anche caratterizzate da un'elevata prevalenza dell'infezione di HBV. Tuttavia, l'esposizione all'AFB1 è indipendente dal rischio di HCC conferito dall'infezione di HBV anche se l'esposizione concomitante ad HBV e all'AFB1 aumenta marcatamente il rischio di HCC (8).

MALATTIE GENETICHE E METABOLICHE

Alcune malattie ereditarie, come quelle caratterizzate da un sovraccarico di ferro all'interno dell'organismo ad esempio l'emocromatosi ereditaria, rappresentano dei fattori di rischio accertati, anche se poco prevalenti, di HCC.

Diversi studi hanno mostrato che la progressione verso l'HCC tra i pazienti emocromatosici è altamente variabile da una popolazione ad un'altra, in base principalmente alla concomitante esposizione ad altri fattori ambientali (12).

A livello molecolare, l'emocromatosi ereditaria è causata da mutazioni a carico del gene HFE o da altre mutazioni responsabili del complesso metabolismo del ferro. Proprio a causa dell'eccessivo accumulo di ferro all'interno degli epatociti, i soggetti affetti da emocromatosi ereditaria vanno incontro più facilmente allo sviluppo di diverse patologie epatiche, tra cui l'epatocarcinoma con un rischio 20 volte maggiore rispetto alle altre forme di cancro.

Tuttavia, l'emocromatosi ereditaria è solo una delle sindromi da sovraccarico di ferro che porta all'eccessivo deposito di ferro nel fegato e negli altri tessuti: infatti, tutti i pazienti

con un eccesso di ferro, secondario ad altre eziologie, hanno mostrato un più elevato rischio di HCC, pur in assenza di emocromatosi ereditaria (8).

Inoltre, evidenze sempre più numerose suggeriscono che l'eccesso di tessuto adiposo e il diabete possono aumentare l'incidenza e/o la mortalità di numerosi tumori, incluso l'HCC. Obesità e diabete possono correlare con la steatoepatite non-alcolica, che è anche un fattore di rischio accertato per HCC attraverso la progressione della malattia steatoepatitica a cirrosi e ad HCC.

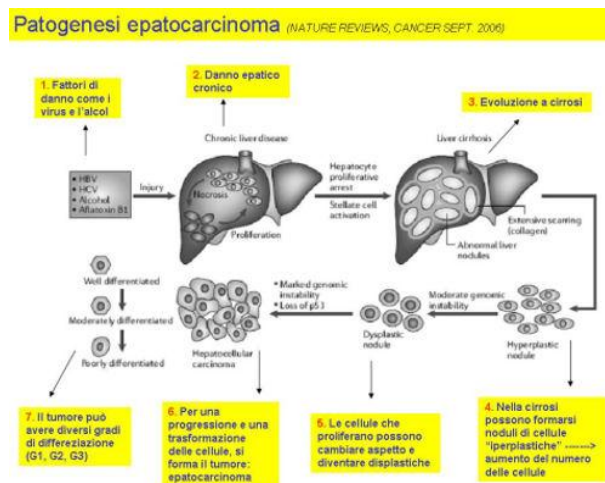


Figura 1: Principali fattori di rischio ed evoluzione dell'epatocarcinoma

Diagnosi dell'epatocarcinoma

Nella maggior parte dei casi la sintomatologia si evidenzia quando la funzionalità epatica è già fortemente compromessa e ciò non consente quasi mai di effettuare diagnosi precoce del carcinoma epatocellulare. I segni clinici più frequenti sono: epatomegalia, dolore addominale, ittero, crepitio o rumori di sfregamento, ascite emorragica, astenia e malessere generale, l'alterazione dei marcatori di funzionalità epatica. Tutto ciò viene

preso in considerazione dal sistema di Child-Pugh Scoring System, utile strumento nella valutazione della gravità della malattia (Tabella 1).

Tabella 1. Classificazione di Child-Pugh

(A)

Parametri	BILIRUBINA	< 2	2-3	> 3
	INR	< 1.7	1.8-2.3	> 2.3
	ALBUMINA (gr/dl)	> 3.5	2.8-3.5	< 2.8
	ASCITE	Assente	Trattabile	Non trattabile
	ENCEFALOPATIA (grado)	0	1-2	3-4

B)

PUNTEGGIO	STADIO
5-6	A
7-9	B
≥ 10	C

Il sistema di Child-Pugh assegna a diversi range di valori di bilirubina, INR e albumina, e al grado di ascite ed encefalopatia il punteggio di 1,2 o 3 (A). Dalla somma dei punteggi relativi ai singoli parametri, si ottengono tre diversi stadi di malattia (B).

L'ecografia epatica e valori di alfa-fetoproteina (AFP, marker di aumentata proliferazione epatocitaria) maggiori di 200 mg/cl consentono di fare una diagnosi certa di carcinoma epatocellulare.

I principali criteri diagnostici istologici sono i seguenti: perdita dell'architettura sinusoidale del fegato e alterazione della rete vascolare, affollamento nucleare degli epatociti e presenza di figure mitotiche atipiche, basofilia dei citoplasmi e presenza di strutture macroacinari.

Il sistema più diffuso per la definizione del grading istologico del carcinoma epatocellulare è quello di Edmonson, che prevede 4 gradi di differenziazione.

Grado 1: tumori estremamente differenziati costituiti da epatociti apparentemente regolari ma con alterazioni della vascolarizzazione, incremento dell'indice mitotico e focolai di formazioni microacinari.

Grado II: tumori a prevalente struttura microacinare e solida.

Grado III: tumori a prevalente struttura solida e trabecolare ad alto indice mitotico.

Grado IV: carcinomi ad alto grado, indifferenziati a struttura solida e alto indice mitotico.

L'indagine ecografica e il dosaggio dell'AFP sono di utilità anche nel follow-up dei pazienti e nello screening dei gruppi ad alto rischio, cioè dei soggetti con cirrosi o epatite B, per la diagnosi precoce del tumore. L'AFP è anche un marcatore prognostico, infatti, pazienti con livelli più alti tendono ad avere forme tumorali massive o diffuse e di maggiore dimensione, coinvolgimento di più lobi e trombosi della vena porta (13). Di recente è stata presa in considerazione anche la glicofoma L-3 dell'AFP, che sembrerebbe essere più specifica di quest'ultima nell'identificazione di forme tumorali in fase iniziale (14). Gli esami ematochimici mostrano l'aumento anche della fosfatasi alcalina e della des-gamma

carbossiprotrombina nei pazienti con HCC, e si sta valutando il significato diagnostico degli acidi nucleici circolanti.

Tra i metodi di indagine per immagine, oltre all'ecografia, risultano valide anche la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM), che evidenziano soprattutto l'alterazione della vascolarizzazione.

Caratteristiche anatomopatologiche e stadiazione dell'HCC

Sulla base delle caratteristiche anatomopatologiche macroscopiche si possono distinguere tre principali forme di HCC.

La forma più frequente è quella nodulare che insorge solitamente su fegato cirrotico ed è caratterizzata da noduli di dimensioni variabili a volte confluenti.

La forma massiva è rappresentata da una massa voluminosa unica ed è più comune in pazienti giovani non cirrotici.

La forma diffusa è la più rara ed è caratterizzata da piccoli noduli diffusi in tutto il parenchima epatico.

Microscopicamente, in base alle caratteristiche cellulari e al grado di differenziamento del tessuto, si distinguono:

forme ben differenziate che in genere si accrescono lentamente;

forme moderatamente differenziate;

forme indifferenziate o scarsamente differenziate, che corrispondono al terzo-quarto grado di Edmonson, e che, generalmente, sono più aggressive e crescono rapidamente per cui possono presentare aree di necrosi o emorragia.

L'HCC è un tumore a lento accrescimento; può trattarsi di un nodulo unico o di più noduli. Il nodulo primitivo tende ad accrescersi indefinitamente ed è in grado di dare luogo ad una germinazione neoplastica extra-capsulare, definita satellitosi; è anche in grado di dare metastasi in altri distretti epatici per diffusione venosa.

L'accrescimento per contiguità può coinvolgere il diaframma; nella progressione neoplastica possono comparire anche metastasi, sia nei linfonodi del peduncolo epatico, sia a distanza, soprattutto nel polmone; meno frequenti sono le localizzazioni ossee, cerebrali e surrenaliche. La causa più frequente di morte è rappresentata dall'insufficienza epatica (nel 35% dei casi), dalle metastasi polmonari (nel 21%), da emorragie conseguenti a varici esofagee (nel 16%) e da emoperitoneo (nel 9%).

Il pattern multifocale è più frequente nei pazienti il cui tumore è riconducibile a fattori eziologici multipli; ad esempio, nella gran parte dei pazienti asiatici ed europei con HCC correlato ad HCV, il tumore si presenta ben differenziato e pseudo-capsulato, mentre nei pazienti sudafricani con infezione HBV, prevalgono i tumori più difficili, a carattere infiltrativo e multinodulare, e spesso ricorrenti dopo resezione. In generale, numerosi studi indicano che gli HCC correlati all'infezione da HBV sono più aggressivi e con prognosi ancora più infausta rispetto a quelli HCV-correlati (15).

Per la stadiazione oggi vengono utilizzati, oltre al classico TNM, (Tabella 2), diversi sistemi: il CLIP score (Cancer of the Liver Italian Program, 1998), il CUPI (Chinese University Prognostic Index, 2002), il GRETCH (Group d'Etude et de Traitement du Carcinoma Hepatocellulaire), il JIS (Japan Integrated Staging score), il BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer).

Tabella 2. Sistema TNM

T1	Singola lesione senza invasione vascolare
T2	Singola lesione con invasione vascolare o noduli multipli minori di 5 cm
T3	Noduli multipli maggiori di 5 cm o con interessamento tumorale della maggior parte della vena porta o delle vene epatiche
T4	Lesione singola o multipla con invasione diretta degli organi adiacenti e della cistifellea con perforazione del peritoneo viscerale
N0	Assenza di metastasi regionali ai linfonodi
N1	Metastasi regionali ai linfonodi
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza

STADIO	TUMORE	LINFONODI	METASTASI
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III A	T3	N0	M0
III B	T4	N0	M0
III C	Qualsiasi T	N1	M0
IV	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

Il sistema TNM prende in considerazione le caratteristiche del tumore primario (T), la presenza di metastasi linfonodali (N) e la presenza di metastasi a distanza (M). Divide i pazienti in 4 gruppi.

Il CLIP score prende in considerazione la funzionalità epatica secondo i parametri del Child-Pugh scoring system, la presenza di trombosi portale, i livelli di alfa-fetoproteina (AFP), la morfologia macroscopica del tumore e l'estensione nel fegato; la combinazione delle diverse variabili divide i pazienti in 6 categorie. Nella popolazione di riferimento su cui sono stabiliti i criteri del CLIP score predomina l'epatite C (Tabella 3).

Tabella 3. CLIP Scoring System

	Classe di Child-Pugh	A	B	C
Parametri	Morfologia tumore	Uninodulare e estensione ≤ 50%	Multiinodulare e estensione ≤ 50%	Massivo o estensione > 50%
	Trombosi vena porta	no	si	
	AFP (ng/dl)	< 400	≥ 400	
	Punteggio	0	1	2

Il CUPI ha come riferimento una popolazione in cui predomina l'epatite B ed identifica alcuni potenziali fattori prognostici tra cui i livelli sierici di bilirubina e alfa-fetoproteina, la presenza o meno di ascite, l'estensione del tumore secondo il sistema TNM e la presenza di sintomi clinici. Poiché i parametri dei diversi sistemi sono stati stabiliti prendendo in considerazione popolazioni diverse, andrebbero applicati a specifiche popolazioni di pazienti (16).

Epatocarcinogenesi

La carcinogenesi è un processo multistep caratterizzato dal progressivo accumulo di anomalie cromosomali, genetiche ed epigenetiche che si manifestano con cambiamenti del fenotipo cellulare wild-type e che possono risultare in una disfunzione cellulare.

L'epatocarcinogenesi molecolare è strettamente collegata alle caratteristiche epidemiologiche, eziologiche e morfologiche di questa neoplasia.

Il carcinoma epatocellulare si sviluppa, infatti, nella gran parte dei casi in fegati affetti da epatopatia cronica di diversa eziologia, in fase più o meno avanzata, e solo raramente ha luogo in fegati apparentemente sani (1).

Anche la carcinogenesi epatica è un processo tipicamente multifasico; nell'HCC, infatti, l'instabilità cromosomica emerge già negli stadi precoci del tumore e si accumula durante il processo di epatocarcinogenesi determinando un fenotipo cellulare maligno.

Gli epatociti maligni, dunque, sono il risultato di cambiamenti sequenziali accumulati negli epatociti maturi o, in alternativa, possono derivare da cellule staminali.

L'ipotesi più accettata descrive un processo a tappe nel quale stimoli esterni inducono alterazioni genetiche negli epatociti maturi determinando morte cellulare, proliferazione cellulare e la produzione di popolazioni monoclonali. Queste popolazioni generano epatociti displastici che evolvono in noduli displastici.

I noduli ad elevato grado di displasia sono considerati a tutti gli effetti lesioni pre-neoplastiche e possono evolvere in tumori maligni nel 30% dei casi nell'arco di 1-5 anni.

Inizialmente, i noduli non esibiscono una neovascolarizzazione ma in uno stadio più avanzato, gli epatociti esprimono un fenotipo maligno associato a neoformazioni vascolari che originano dall'arteria epatica.

Questi tumori precoci ben differenziati diventano meno differenziati quando raggiungono dimensioni di 1-1,5 cm.

Successivamente, le cellule neoplastiche diventano indifferenziate e sono capaci di invadere i vasi e colonizzare altri tessuti determinando metastasi che sono caratteristiche dello stadio terminale di malattia (4).

Le differenti anomalie genetiche e cromosomali che determinano la progressione anatomopatologica del tumore, sono diventati oggetto di numerosi studi, che hanno l'obiettivo di riuscire ad identificare nuovi biomarcatori di HCC e nuovi targets molecolari di terapia anti-tumorale.

L'eterogeneità dei fattori eziologici rende conto della relativa complessità dei meccanismi molecolari dell'epatocarcinogenesi, inoltre, l'assenza di un'ereditarietà evidente nell'HCC, riscontrata invece in altre forme di cancro, ha reso difficoltosa l'identificazione dei geni chiave per lo sviluppo di questo tipo di tumore e ha impedito la definizione di una gerarchia di eventi genetici coinvolti nei vari stadi della carcinogenesi epatica.

Il notevole progresso delle conoscenze ha consentito di verificare che numerose alterazioni cromosomiche intervengono nelle diverse fasi di sviluppo dell'HCC, inclusi i riarrangiamenti cromosomici legati all'integrazione dell'HBV-DNA, la perdita di eterozigotità (Loss of Heterozygosity, LOH) e il fenomeno di amplificazione genica a carico di alcuni geni.

La perdita e l'acquisizione di specifici segmenti cromosomici vengono indicate complessivamente come instabilità cromosomica. Diversi studi hanno evidenziato, in molti casi di HCC, la perdita degli specifici siti cromosomici 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 10q, 11p, 16p, 16q, 17p e 22q.

In particolare un vasto studio condotto da Kuroki *et al.* ha dimostrato che l'instabilità cromosomica a livello del sito 1p è tipica degli HCC ben differenziati, mentre l'instabilità cromosomica a livello degli altri siti si riscontra negli stadi più avanzati del tumore e negli istotipi tumorali poco differenziati (18).

D'altra parte, l'acquisizione dei tratti cromosomici 1q21-23 e 8q22-24 è tra gli eventi genomici associati allo sviluppo precoce dell'HCC identificati in un vasto studio genomico condotto su 158 pazienti affetti da HCC HCV-correlato (19).

In aggiunta agli eventi di instabilità cromosomica, anche le alterazioni epigenetiche sembrano giocare un ruolo importante nel processo di epatocarcinogenesi.

Il termine "epigenetico" fa riferimento a cambiamenti dello stato di metilazione del DNA e a modifiche istoniche, che determinano variazioni nel processo di trascrizione genica pur non implicando cambiamenti nella sequenza del DNA. La metilazione del DNA che consiste nell'aggiunta covalente di un gruppo metile alla posizione '5 della citosina è l'evento epigenetico più conosciuto e meglio caratterizzato.

In genere, la metilazione del DNA si ritrova principalmente nei residui di citosina presenti nei di nucleotidi CpG all'interno di sequenza ripetute o nelle isole CpG correlate ai promotori.

I promotori ipermetilati sono sempre trascrizionalmente silenti per cui, anche se l'ipermetilazione è essenziale per il normale sviluppo cellulare, la metilazione aberrante delle isole CpG presenti all'interno di specifici promotori può essere causa della down-regolazione di geni oncosoppressori.

Il gene RB1, ad esempio, è stato il primo oncosoppressore che si è dimostrato essere inattivato mediante l'ipermetilazione del suo promotore in diversi tipi di tumori umani.

Tuttavia non ci sono chiare evidenze che dimostrino che la metilazione del promotore di RB1 abbia un ruolo anche nel processo di epatocarcinogenesi (1). Al contrario, la perdita di eterozigotà (LOH) in corrispondenza del locus di RB1 è stata riscontrata nel 25-48% dei casi e una forte down-regulation del suo pathway è stata osservata nel 50% dei casi (20).

D'altra parte, un altro gene oncosoppressore il cui prodotto fa parte del pathway di RB1, noto come p16/INK4A, è stato ritrovato frequentemente inattivato per metilazione del suo promotore. Fisiologicamente p16 funziona da inibitore della chinasi ciclina-dipendenti regolando lo stato di fosforilazione del prodotto genico RB1. La perdita di funzione di p16 limiterebbe dunque la funzione di RB1 wild-type determinando una proliferazione cellulare disregolata (1).

In aggiunta a ciò, l'ipermetilazione del DNA è stata ritrovata anche in corrispondenza di altri geni oncosoppressori che regolano vari pathways cellulari e che risultano essere coinvolti nell'insorgenza dell'HCC umano come l'E-caderina, RASSF1, GTSP1, SOCS-1, SFRP1 e PTEN (1).

Analogamente all'instabilità cromosomica, anche la metilazione aberrante del DNA nell'HCC umano presenta un trend crescente nel processo multistep dell'epatocarcinogenesi, infatti, diversi studi hanno rivelato, come la metilazione del DNA in corrispondenza dei promotori di specifici geni con funzione di soppressori tumorali sia un evento precoce, che si può riscontrare anche nel tessuto epatico non tumorale, ma la frequenza di ipermetilazione aumenta significativamente negli stadi successivi dai noduli cirrotici ai noduli displastici predisponendo il soggetto allo sviluppo dell'HCC (1).

E' stato osservato recentemente che, proprio come l'ipermetilazione, anche lo stato di ipometilazione del DNA potrebbe giocare un ruolo importante nella carcinogenesi epatica.

In alcuni tipi di tumori umani, infatti, è stata evidenziata una condizione di ipometilazione in corrispondenza dei geni specifici per la globina e per l'ormone della crescita rispetto al tessuto sano circostante, suggerendo che la demetilazione potrebbe essere coinvolta nell'amplificazione dell'attività trascrizionale di alcuni oncogeni. La definizione del ruolo della demetilazione nel processo di epatocarcinogenesi necessita, comunque, di ulteriori studi (18).

Alterazioni delle vie di segnalazione

Il pathway Wnt/ β -catenina, coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi, nella proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi risulta essere deregolato in diversi tipi di tumore, incluso l'HCC.

Fisiologicamente, in assenza del segnale di Wnt, la β -catenina viene legata dal complesso APC-Axin-GSK-3 β che ne determina la fosforilazione in corrispondenza di specifici residui di serina e treonina. La β -catenina iperfosforilata viene, dunque, avviata alla degradazione mediata dal sistema ubiquitina-proteosoma, responsabile del mantenimento dei bassi livelli di β -catenina nel citoplasma cellulare. Quando, invece, il ligando Wnt si lega al suo recettore Frizzled transmembrana, viene attivata la via di segnalazione Wnt/ β -catenina ed il segnale di attivazione viene trasferito al citoplasma attraverso la fosforilazione della proteina dishevelled (Dvl).

Questa proteina attivata dalla fosforilazione lega e sopprime l'attività della GSK-3 β che, quindi, non può più fosforilare la β -catenina e avviarla alla degradazione.

La β -catenina ipofosforilata si trasferisce al nucleo dove, in associazione con i fattori di trascrizione TCF/Lef, può regolare positivamente la trascrizione genica di alcuni geni target, inclusi i proto-oncogeni come c-myc e ciclina D1 e favorire, in questo modo, la proliferazione cellulare (1).

Alterazioni di diversi fattori coinvolti nella regolazione di questa via di trasduzione del segnale sono coinvolte nell'insorgenza dell'HCC a partire da infezioni croniche virali e da cirrosi epatica alcolica.

In particolare, tutte le mutazioni della β -catenina ritrovate all'interno dell'esone 3 del gene proteggono la proteina dalla degradazione, favorendone l'accumulo a livello nucleare con conseguente attivazione dei proto-oncogeni target e iperproliferazione cellulare. Queste mutazioni a carico del gene per la β -catenina sono state frequentemente ritrovate negli HCC HCV/HBV- correlati (1).

In aggiunta a ciò, nel 5-10% dei casi di HCC sono state ritrovate mutazioni a carico di Axin1 che hanno sempre un effetto di stabilizzazione della β -catenina, in quanto inibiscono la formazione del complesso Axin/APC/GSK-3 β / β -catenina.

Altre alterazioni sono state ritrovate nei mediatori che si ritrovano a monte di questa via di segnalazione: l'overespressione di Wnt e del suo recettore transmembrana Frz, il silenziamento epigenetico dell'antagonista di Wnt, sFRP1, l'overespressione di Dvl e la downregulation dei suoi due inibitori, HDPR1 e Prickle1 (1).

La scoperta del coinvolgimento di tutti questi fattori nell'insorgenza dell'HCC sottolinea il ruolo centrale della via di segnalazione Wnt/ β -catenina nel processo di

epatocarcinogenesi e, soprattutto, nella possibile identificazione di nuovi targets molecolari di terapia.

Tuttavia accanto alle alterazioni del pathway Wnt/ β -catenina, numerosi altri fattori di disregolazione contribuiscono ad incrementare lo sbilanciamento del processo di regolazione dell'apoptosi a favore della sopravvivenza cellulare, facilitando così il processo di epatocarcinogenesi.

Tra questi un ruolo importante è svolto da NF- κ B, un fattore trascrizionale che rappresenta il regolatore chiave delle risposte immuni, innate e adattative, dell'infiammazione e della sopravvivenza cellulare, suggerendo un suo possibile ruolo nella tumorigenesi in condizioni di infiammazione cronica.

Molti stimoli pro-infiammatori attivano NF- κ B principalmente attraverso la via della fosforilazione IKK-mediata e la degradazione delle proteine inibitrici IKK- β .

Il ruolo dell'attivazione di NF- κ B negli stadi di promozione e progressione tumorale è divenuto chiaro solo recentemente quando è stata evidenziata in diversi tipi cellulari, la forte implicazione di questo fattore trascrizionale nella regolazione dell'espressione di alcuni fattori di crescita, come le cicline, e di diversi fattori antiapoptotici e di multifarmacoresistenza.

NF- κ B, infatti, svolge un ruolo importante anche nella regolazione di fattori anti-apoptotici come c-IAPs, c-FLIP e Bcl-XL coinvolti nella sopravvivenza delle cellule tumorali.

E' stato osservato che l'attivazione costitutiva di NF- κ B rende le cellule tumorali altamente resistenti ai farmaci antitumorali mentre l'inibizione della sua attività aumenta la sensibilità di queste cellule alle stesse terapie.

Infine, NF- κ B influenza anche i processi di invasione e metastatizzazione tumorali attraverso la regolazione dell'espressione delle metalloproteinasi MMP-2 ed MMP-9 che giocano un ruolo importante nella degradazione della matrice extracellulare e della membrana basale favorendo l'invasività tumorale.

Sulla base di queste evidenze è stato mostrato che diversi casi di HCC sono caratterizzati dall'attivazione costitutiva di NF- κ B nel tessuto tumorale rispetto ai tessuti non tumorali. Questa condizione di attivazione costitutiva è determinata dall'elevata espressione di IKK- α e IKK- β , responsabili dell'attivazione di NF- κ B, la cui attività è fondamentale per produrre le caratteristiche maligne del tumore epatico (17).

Nel processo dell'epatocarcinogenesi, accanto al ruolo del fattore trascrizionale NF- κ B, numerosi altri processi contribuiscono allo sbilanciamento dell'equilibrio omeostatico che si crea, in condizioni fisiologiche, tra apoptosi e proliferazione cellulare, a favore di quest'ultima.

In particolare, è stato dimostrato che alcune proteine, come SOCS1 e 3, che agiscono da soppressori del segnale delle citochine e che sono dei regolatori negativi della via di segnalazione JAK/STAT, risultano silenziate per metilazione sia in linee cellulari di epatoma umano sia in tessuti di epatocarcinoma, determinando l'attivazione costitutiva del pathway JAK/STAT e del fattore STAT3, in queste cellule. La delezione di SOCS3 negli epatociti promuove dunque l'attivazione di STAT3, la resistenza cellulare all'apoptosi e l'accelerata proliferazione, risultando in un incrementato processo di epatocarcinogenesi (21).

Anche il pathway PI3K/Akt risulta essere alterato nell'epatocarcinoma. Fisiologicamente questa via di segnalazione è implicata in una rete di trasduzione di segnali di

sopravvivenza e proliferazione cellulari; alterazioni genetiche dei fattori coinvolti in questa via sono presenti in numerose neoplasie. Questo accade perché il bersaglio di PTEN, PI3K, regola diversi targets intracellulari (come Akt) che controllano la sopravvivenza cellulare, la mitogenesi e la neoangiogenesi.

L'espressione del prodotto genico PTEN è ridotta o assente in circa la metà degli epatocarcinomi e l'eliminazione epatocita-specifica dell'espressione di PTEN nei topi dà come risultato lo sviluppo di HCC. D'altra parte, l'overespressione epatica di questo fattore regola negativamente l'attività di PI3K nel tessuto e sopprime lo sviluppo di HCC (21).

Allo stesso modo, anche l'overespressione di Ras è stata frequentemente riscontrata in molti casi di HCC e determinata in parte dal silenziamento epigenetico di specifici inibitori del pathway di Ras. Fisiologicamente, in questa via di segnalazione, Ras attivata da segnali di crescita determina l'attivazione di Raf-1 che fosforila e attiva MEK, il quale a sua volta attiva ERK mediante fosforilazione e questo, attraverso l'attivazione di diversi fattori trascrizionali, causa una maggiore crescita e proliferazione cellulare (22). Numerose evidenze hanno mostrato una marcata disregolazione di diversi inibitori di Ras ed ERK nell'epatocarcinoma con una conseguente overattivazione dell'oncogene Ras che favorirà il processo di epatocarcinogenesi (22).

Accanto a queste alterazioni genetiche che determinano l'overattivazione dei pathways oncogenici, nel processo molecolare di epatocarcinogenesi si riscontrano frequentemente anche mutazioni genetiche che determinano difetti nell'espressione e/o nello stato di attivazione di prodotti genici che agiscono da soppressori tumorali.

L'inattivazione di p53 e la presenza di difetti a valle del suo pathway di segnalazione sono stati ritrovati in tutti i tipi di tumori umani. In particolare, la perdita di funzione di p53 è stata osservata nel 25-60% dei tumori e principalmente è correlata a delezioni alleliche a livello del cromosoma 17q13 e a mutazioni missenso nel dominio specifico di legame al DNA. In ogni caso, pare che la mutazione di p53 sia un evento tardivo nel processo di oncogenesi e che sia associato con la progressione dell'HCC dagli stadi precoci a quelli più avanzati.

Poiché è noto che numerosi agenti chemioterapici necessitano di p53 per indurre l'apoptosi, appare evidente che la perdita di funzione di questa proteina o la disregolazione del suo pathway a valle contribuiscano a determinare uno stato di chemioresistenza del tumore (22).

In genere, comunque, le mutazioni di p53 si verificano in contesti di attivazione di processi carcinogeni endogeni come le infezioni croniche da virus epatotropi e condizioni di stress ossidativo che possono indurre danno al DNA e mutazioni di geni correlati, incluso p53.

Numerose alterazioni si riscontrano anche nei pathways apoptotici estrinseci, che partono dai recettori di morte con una conseguente resistenza delle cellule epatiche tumorali ai segnali di induzione dell'apoptosi.

In particolare, la perdita di risposta a Fas nelle cellule di HCC viene determinata sia attraverso la downregolazione dell'espressione dello stesso recettore, concomitante alla riduzione dell'espressione delle molecole a valle del suo pathway, sia attraverso la sovraregolazione di molecole che contrastano il suo effetto pro-apoptotico, come NF- κ B, Bcl-2 e Bcl-XL (22).

Ciò determina, come conseguenza, una resistenza all'apoptosi delle cellule di HCC in cui la ridotta espressione di fattori oncosoppressori insieme al marcato aumento dell'espressione di fattori oncogenici favorisce il processo di tumorigenesi attraverso le fasi di iniziazione, promozione e progressione tumorale.

La scoperta di tutte queste alterazioni genetiche specifiche negli epatociti maligni ha un ruolo fondamentale nella possibile futura identificazione di targets molecolari di terapie anti-tumorali efficaci a contrastare lo sviluppo dell'HCC.

Fattori diagnostici e prognostici dell' HCC

A differenza di altri tumori maligni, l'epatocarcinoma ha un decorso lento e difficilmente determina localizzazioni secondarie (metastasi) in altri organi ma si diffonde, per lo più, invadendo il fegato o crescendo all'interno della vena porta fino a provocarne l'occlusione (trombosi neoplastica).

La sopravvivenza dei pazienti affetti da HCC è, come per molti altri tipi di tumore, dipendente da una diagnosi che sia la più precoce possibile proprio perché i pazienti con tumore di piccole dimensioni (< 3 cm di diametro) sono quelli più suscettibili di una terapia potenzialmente radicale. Pertanto è indispensabile che tutti i pazienti affetti da malattia epatica cronica ed, in particolare, quelli ammalati di cirrosi, siano sottoposti a controllo almeno ogni 6 mesi dei livelli di α -fetoproteina (AFP) e a controllo ecografico al fine di evidenziare il più precocemente possibile l'eventuale progressione in epatocarcinoma.

La diagnosi precoce di HCC in pazienti ad alto rischio di sviluppare questo tipo di tumore si avvale inizialmente della valutazione di markers sierologici correlati all'identificazione dell'HCC.

In particolare, l'AFP sierica è il marker più largamente studiato per la diagnosi dell'epatocarcinoma.

L'AFP è una glicoproteina specifica prodotta principalmente dal fegato fetale. Normalmente i suoi livelli sierici si abbassano rapidamente subito dopo la nascita e la sua sintesi viene repressa nella vita adulta.

Tuttavia, più del 70% di pazienti con HCC mostra un'elevata concentrazione sierica di AFP determinata dalla secrezione di questa glicoproteina da parte della massa tumorale ed, ancora oggi, l'AFP rappresenta il più utile marcatore tumorale nello screening di pazienti con HCC.

In genere, la concentrazione sierica di AFP pari a 20 ng/ml è il valore di cut-off più largamente usato per differenziare i pazienti affetti da HCC dagli adulti sani, anche se questo valore varia ampiamente nei diversi gruppi etnici a causa delle diverse condizioni di vita degli individui che influenzano enormemente l'epidemiologia del tumore.

Accanto al suo ruolo nello screening dell'HCC, l'AFP sierica può essere utilizzata come fattore prognostico per HCC.

Pazienti affetti da epatocarcinoma che mostrano livelli sierici elevati di AFP (≥ 400 ng/ml) tendono a sviluppare grandi masse tumorali con il coinvolgimento bilobare del fegato, la trombosi della vena portale e un basso livello di sopravvivenza media (23).

Quindi, generalmente livelli sierici elevati di AFP depongono per una prognosi infausta di HCC, ma questa glicoproteina svolge un ruolo importante anche come fattore prognostico

nelle recidive di HCC che si possono manifestare dopo la resezione chirurgica del tumore primitivo.

Ciò è stato dimostrato da un recente studio in cui sono stati selezionati pazienti affetti da HCC che mostravano livelli elevati di AFP al momento dell'iniziale diagnosi. È stato osservato che, dopo la resezione chirurgica del tumore epatico, il 23% dei soggetti presi in esame mostrava livelli sierici normali di AFP nel momento in cui si manifestava la recidiva. Rispetto agli altri che, invece, continuavano a mostrare elevati livelli sierici di AFP, questi soggetti avevano un intervallo più lungo di ricorrenza dell'HCC. Ciò ha suggerito che livelli sierici bassi di AFP, dopo la resezione chirurgica del tumore primitivo rappresentano un fattore prognostico positivo per la ricorrenza a lungo termine dell'HCC (23).

Tuttavia bisogna tenere presente che i livelli sierici di AFP sono elevati solo nel 70% dei casi di HCC, per cui l'AFP non può essere usata come unico marker sierologico per l'identificazione dell'HCC.

In generale, dunque, per fare diagnosi certa di HCC si devono ricercare anche altri markers specifici per questo tipo di tumore.

Uno di questi è il glicoproteina-3 (GPC3), un proteoglicano eparansolfato ancorato alla membrana plasmatica degli epatociti che interagisce con i fattori di crescita e ne modula le attività.

L'espressione del GPC3, sia a livello trascrizionale sia a livello proteico, è elevata nel siero di pazienti affetti da HCC rispetto ai soggetti sani e/o con epatopatia non maligna, e può essere rilevata nel 40-53% di pazienti con HCC.

Numerose evidenze hanno, inoltre, dimostrato che la rilevazione simultanea dell'AFP e del GPC3 potrebbe aumentare significativamente la sensibilità per la diagnosi di HCC (23).

Nella categoria dei marcatori enzimatici di HCC rientrano anche la γ -Glutamyltransferasi (γ -GT), l' α -1-fucosidasi e la Des- γ -carbossi-protrombina (DCP).

In particolare, la γ -GT sierica negli adulti sani è secreta dalle cellule epatiche di Kupffer e dalle cellule endoteliali dei dotti biliari e la sua attività aumenta notevolmente nei tessuti di epatocarcinoma e nel fegato fetale. Più specificatamente, l'aumento della frazione II della γ -GT unito agli incrementati livelli sierici di DCP e AFP può aumentare significativamente la sensibilità della diagnosi di HCC.

L' α -1-fucosidasi (AFU), un enzima che idrolizza i legami glicosidici del fucosio nelle glicoproteine e nei glicolipidi, aumenta notevolmente la sua attività sierica nei pazienti con HCC rispetto ai soggetti sani e ai pazienti con cirrosi ed epatite cronica.

Inoltre, è stato dimostrato che lo sviluppo dell'HCC è rapido nei pazienti affetti da cirrosi epatica che mostrano livelli sierici di AFU maggiori di 700 nmol/ml/ore e un'attività dell'AFU elevata già sei mesi prima della rilevazione di HCC all'ultrasonografia.

Dunque, l'AFU potrebbe essere un importante marker tumorale per l'identificazione dell'HCC nelle fasi precoci.

La des- γ -carbossiprotrombina (DCP) è un prodotto anormale, derivato dalla carbossilazione epatica durante la formazione dei trombogeni e agisce come un fattore endogeno di mitogenesi per le linee cellulari di HCC. Di conseguenza, spesso i livelli sierici di questo fattore risultano elevati nei pazienti con HCC. Oltre ad avere un ruolo diagnostico, la DCP sierica può essere usata come un indicatore prognostico o clinico patologico dei pazienti con HCC e sembrerebbe più utile dell'AFP nel riflettere le caratteristiche di invasività del tumore. È stato, infatti, riportato che pazienti DCP

sieropositivi e AFP sieronegativi hanno una più alta frequenza di HCC con margini distinti, noduli grandi più di 3 cm e pochi noduli moderatamente o scarsamente differenziati (23). Accanto a questi, numerosi altri fattori sono ancora oggetto di studio come promettenti marcatori molecolari utili per accertare la diagnosi e la prognosi dell'epatocarcinoma: tra questi, numerose evidenze hanno suggerito un possibile ruolo, come fattore di diagnosi e di prognosi, di una proteina nota come RKIP, la cui espressione risulta downregolata nella maggior parte dei casi di HCC studiati.

YY1

Negli ultimi dieci anni è stato caratterizzato un nuovo fattore di trascrizione, Yin Yang 1, che è divenuto progressivamente un punto focale di studio per gli aspetti che lo caratterizzano. YY1 ha, infatti, una natura ubiquitaria, una sequenza molecolare altamente conservata e un ruolo centrale nella regolazione dell'embriogenesi e del differenziamento, così come di processi cellulari quali la replicazione, la proliferazione, la senescenza e la risposta a stimoli genotossici.

YY1 è stato inizialmente clonato e caratterizzato simultaneamente da due gruppi indipendenti. Entrambi, infatti, mediante analisi di delezione nella regione controllo della trascrizione del promotore P5 dell'adenovirus associato (AAV), avevano identificato due elementi che mediavano l'attività trascrizionale della stessa. Il primo era un sito di legame per un fattore di trascrizione adenovirale tardivo (MLTF); il secondo era una sequenza di 10 bp ripetuta in tandem all'interno del sito P5-60 (regione R₁-R₂). È stata ipotizzata un'azione concertata dei due trans-attivatori che riducevano l'attività basale del promotore P₅ e aumentavano quella indotta dalla proteina adenovirale E1A. La delezione

simultanea di entrambi gli elementi riduceva l'attività del promotore di circa 25 volte, confermando la possibile presenza di un fattore trascrizionale agente in modo duplice (24).

In seguito è stato identificato un complesso proteico cellulare interagente con la regione R₁-R₂. La maggiore componente proteica di tale complesso era responsabile di una repressione trascrizionale in assenza di E1A mentre la stessa proteina E1A annullava la repressione e attivava la trascrizione attraverso il suo sito di legame, da qui il nome di Yin Yang 1.

E' stato isolato il cDNA di YY1 e la sua sequenza ha rivelato l'appartenenza alla famiglia di fattori di trascrizione zinc-finger del Polycomb Group, un gruppo di geni recettori omeobox con un importante ruolo nei processi di ematopoiesi e di controllo del ciclo cellulare (25).

Contemporaneamente un altro gruppo ha isolato una proteina con caratteristiche sia di attivatore sia di repressore della trascrizione del gene dell'immunoglobulina k; tale fattore trascrizionale è stato chiamato NF-E1 ed è codificato dallo stesso gene che codifica per YY1 (26).

Successivamente altri gruppi hanno isolato proteine uguali ad YY1 chiamandole in modo differente:

UCRBP (27), CF1 (34), NMP-1 (28). Quest'ultimo è stato scoperto come fattore di legame al DNA; esso riconosce e lega il sito IV dell'elemento di regolazione del gene dell'istone H4 ed è, inoltre, associato alla matrice nucleare. Questo ha portato alla dimostrazione che YY1 media l'associazione gene-matrice tramite interazione diretta con gli elementi consensus dei promotori di alcuni geni (Numatrina/B23, c-myc, E1A, Sp1, TFIIB) oppure

mediante interazione indiretta tramite legame proteina-proteina con altri fattori trascrizionali associati alla matrice cellulare. YY1 ha, quindi, una localizzazione subnucleare; modifiche post-traslazionali possono agire sulla distribuzione subnucleare e, di conseguenza, sulle funzioni di tale fattore.

Il gene che codifica per YY1 è localizzato nella regione telomerica del cromosoma umano 14 nel segmento q32.2 (29). Il gene consiste di 5 esoni altamente conservati codificanti per una proteina di 414 amminoacidi e di peso molecolare di 68 kDa (30). Il gene umano produce 8 trascritti differenti generati da uno splicing alternativo, codificanti per 8 isoforme proteiche (3 complete, 3 COOH-complete, 2 parziali). Il gene ha 2 promotori alternativi, quello prossimale contiene siti di legame multipli per il fattore di trascrizione Sp1, ma manca della consensus TATA o CCAAT. Il maggiore sito di inizio della trascrizione è stato localizzato a 478 bp a monte del sito di inizio della traslazione ATG.

La proteina YY1 contiene 4 motivi zinc-finger con 2 motivi specifici fondamentali per il suo ruolo di attivatore e repressore trascrizionale. Il dominio C-terminale (aa 298-397) è il principale responsabile della repressione della trascrizione, tuttavia altri due domini contribuiscono a tale funzione: le sequenze all'interno dei motivi zinc-finger e un residuo ricco in glicina tra gli amminoacidi 157 e 201. La regione N-terminale (aa 43-53) agisce, invece, da potente attivatore della trascrizione (30, 31); tale regione è seguita da un dominio ricco in glicina e 11 residui consecutivi di istidina (aa 70-80).

YY1 regola un'ampia varietà di geni virali e cellulari. È stato dimostrato come più del 7% di tutti i promotori di geni di vertebrati contengono almeno una consensus di legame per YY1, CG (A/C) CATNTT (32). L'elenco dei più importanti prevede β -actina, CAT, CREB, Sp1, CXCR4, GCM-CSF, IFN- β e γ , c-fos, c-myc, istone H4, p53, PARP-1. YY1 regola anche la

trascrizione di molti retrovirus e virus a DNA come poxvirus, herpesvirus, papillomavirus, adenovirus e parvovirus.

Il fondamentale ruolo di YY1 nei processi di embriogenesi e proliferazione cellulare è confermato dall'alta omologia di sequenza che si è conservata nel tempo. L'omologia di sequenza del gene YY1 alla proteina Krüppel della *Drosophila* lo ha identificato come membro della famiglia genica GLI- Krüppel (25).

E' stato dimostrato, inoltre, mediante studi su topi nulli per YY1 e/o eterozigoti per lo stesso, che almeno un allele è necessario per la sopravvivenza ed entrambi per lo sviluppo embrionale e per la fase finale dell'organogenesi di alcuni organi come ad esempio il sistema nervoso (33).

YY1 reprime l'attività trascrizionale di Smad 4 e, in misura minore, di Smad 1, 2 e 3, impedendo il loro legame al DNA. In questo modo, YY1 impedisce l'induzione di alcuni geni come PAI-1 e Id-1 fondamentali nella regolazione della crescita e del differenziamento cellulare indotti dai fattori di crescita TGF- β e BMP, dei quali i complessi Smad sono i principali trasduttori del segnale intracellulare (34).

YY1 ha un importante ruolo nel controllo della stabilità cellulare e del normale funzionamento della cellula. YY1, infatti, può regolare l'attività trascrizionale di PARP-1; è stato osservato come in condizioni di danno del DNA, YY1 stimoli la sintesi di poly (ADP-ribosio) e, quindi, il riparo del DNA. In tali condizioni lo stesso YY1 appare ribosilato; esiste un feedback negativo per il quale l'overespressione di PARP-1 decrementa l'affinità di YY1 in seguito a poly-ADP-ribosilazione ai suoi siti di legame, provocando, di conseguenza, il silenziamento dei geni danneggiati in maniera irreversibile (35, 36).

Sono state individuate le sequenze specifiche per la localizzazione del fattore di trascrizione YY1 alla matrice nucleare, stadio fondamentale per il controllo e la regolazione trascrizionale. La presenza di segnali di targeting ad alta e bassa affinità per la matrice nucleare in distinti elementi della sequenza di YY1, suggerisce che l'interazione di YY1 con diversi componenti dell'architettura nucleare faciliti la funzione di modulatore trascrizionale.

L'attività trascrizionale di YY1 è mediata da interazioni proteina-proteina con cofattori come CBP/p300 e l'istone deacetilasi Rpd3p; l'istone acetilasi e l'istone deacetilasi sono associate alla matrice nucleare ed il legame con tali proteine può determinare un rimodellamento nucleosomale e, di conseguenza, una modulazione dell'attività trascrizionale di YY1. Il dominio di legame al DNA e la regione ricca in Gly/Ala mediano le interazioni proteina-proteina con TBP, TFIIB, TAFII55, CBP, mentre l'interazione tra YY1 e B23 avviene nel nucleolo e quest'ultima annulla la repressione trascrizionale operata da YY1 (37).

La localizzazione subcellulare di YY1 subisce l'alternanza fra il citoplasma e il nucleo in maniera dipendente dalla sintesi del DNA e dal ciclo cellulare. Il fattore di trascrizione da citoplasmatico in fase G1 diventa nucleare in fase S (precoce e intermedia) e ritorna al citoplasma in fase S tardiva; è stato, infatti, osservato come nella fase S precoce, aumenti solo l'attività di legame al DNA ma non i livelli di RNA messaggero né di proteina di YY1. L'accumulo nel nucleo coincide anche con l'aumento dell'espressione genica degli istoni dipendenti dalla replicazione. Tali evidenze forniscono un'ulteriore prova di come YY1 possa partecipare alla regolazione del ciclo cellulare controllando numerosi eventi nucleari richiesti per i processi di divisione e di proliferazione cellulare (38).

Per ciò che concerne la regolazione molecolare di YY1, molteplici studi suggeriscono che cofattori (msin3A), corepressori di recettori nucleari (NCOR) e polipeptidi 18/30 Sin3-associati, possono regolare l'attività trascrizionale di YY1 (39). A livello proteico è stato visto che il cambiamento nella struttura chimica di YY1 mediante O-glcNAcilazione induce la dissociazione da Rb e consente al fattore di trascrizione di poter legare il DNA.

Una diretta attivazione di YY1 tramite attivatori trascrizionali è stata osservata solo in pochi modelli di studio. E' stato riportato che l'interleuchina IL-1 β attiva YY1 tramite meccanismi agenti a livello trascrizionale e post-trascrizionale.

Anche il fattore di trascrizione NF-kB sembra regolare positivamente YY1. E', tuttavia, riportato in letteratura un esempio di regolazione dovuta ad un legame diretto tra la subunità Rel-B e YY1 e del complesso a specifiche sequenze nella regione enhancer hs4 del gene Igh in cellule B di linfoma; tale legame comporterebbe l'attivazione trascrizionale del gene, implicato nella risposta antiapoptotica e nel potenziale proliferativo di questi linfociti (40).

Vi sono molteplici evidenze che confermano la presenza di siti di legame per YY1 in promotori di svariati geni; spesso tali siti di legame si sovrappongono a quelli per altri fattori di trascrizione, come ad esempio gli elementi SRE ed MRE, il motivo CarG, ecc. Sono stati descritti diversi modelli per spiegare le azioni di attivazione e di repressione trascrizionale con cui YY1 modula l'espressione genica.

YY1 può indurre repressione trascrizionale competendo per i siti di legame di un attivatore trascrizionale, con conseguente spostamento di quest'ultimo dal promotore (30). Un esempio eclatante del modello dello spostamento riguarda la repressione del gene SAA1, la cui trascrizione aumenta durante la fase acuta di un processo

infiammatorio e di un danno tissutale a livello epatico. Studi condotti in una linea cellulare di epatoma (Hep3B), hanno dimostrato che YY1 lega sequenze CRU nel promotore del gene SAA1, scalzando NF- κ B e inducendo repressione trascrizionale, e regolando, così, non solo l'espressione basale di SAA1 ma anche quella indotta da citochine. Sia NF- κ B che C/EBP sono richiesti per spostare YY1 e attivare la trascrizione; in questo modo, è il rapporto tra YY1 e i transattivatori a determinare la regolazione del gene (41).

YY1 può interferire con la funzione di attivatori trascrizionali attraverso un legame diretto al DNA, ad esempio nel promotore del gene c-fos, dove YY1 lega i siti di legame tra gli elementi CRE e la TATA box e siti che si sovrappongono alle sequenze SRE (30); YY1 può anche, senza legare siti nel DNA, inibire l'attivazione trascrizionale di un gene legando direttamente l'attivatore trascrizionale, ad esempio CREB, solo o in sinergia con un corepressore (25).

YY1 può richiedere l'aiuto di cofattori che interagiscono con i suoi domini di repressione per facilitare la repressione trascrizionale. Tali cofattori includono mRPD3, GATA-1, membri della famiglia Smad, SAP30 (componente del complesso HDAC) (42). Tale meccanismo di repressione è attuato anche nella regolazione dei geni indotti da virus come IFN- β e - γ (43).

YY1 si comporta anche da attivatore della trascrizione mediante un'interazione diretta con fattori di trascrizione, come ad esempio le proteine che legano la TATA box (TBP), fattori associati alle proteine TBP (TAFs) e il fattore di trascrizione TFIIB (31).

YY1 può attivare trascrizione genica inibendo la repressione tramite cofattori che determinano un mascheramento del dominio di repressione C-terminale e uno smascheramento di quello di attivazione N-terminale.

YY1 agisce come attivatore indiretto reclutando cofattori come CBP e p300, aventi attività di istone acetiltransferasi (HAT) (44). Un meccanismo di attivazione coadiuvata prevede che il legame con coattivatori determini cambiamenti nella struttura del DNA che consentano la transattivazione di un promotore o, viceversa, che alcune modificazioni della topologia in prossimità del promotore rendano più facili le interazioni di cofattori (45). E' stato scoperto un coattivatore di YY1, chiamato YY1AP, espresso in modo ubiquitario in diversi tessuti umani e in linee cellulari neoplastiche; YY1AP colocalizza con YY1 nel nucleo e aumenta l'attivazione trascrizionale di promotori responsivi ad YY1. YY1AP contiene due regioni di legame per YY1 (46).

YY1 sviluppa una rete di comunicazione intracellulare che gli permette di indurre molteplici funzioni portando alla regolazione della crescita e sopravvivenza cellulare.

YY1 reprime la trascrizione del gene che codifica per ciclina D1 il cui promotore viene attivato con il rilascio del complesso di repressione YY1-HDAC 1 (47).

YY1 inibisce la trascrizione attivata da p53 a livello dei siti di legame per p53 che contengono la sequenza ACAT. E' stato osservato che YY1 e p53 colocalizzano attorno ai nucleoli; in questo modo YY1 modula la trascrizione di un gruppo di geni dipendente da p53 (ad esempio p21^{Waf 1} e GADD45) e a loro volta importanti nella regolazione del ciclo cellulare, apoptosi, senescenza, riparo del DNA danneggiato e angiogenesi. Il core di legame per YY1, ACAT, è assente in altri geni target di p53 come Bax e ciclina G, regolanti il processo apoptotico (48).

YY1 interagisce con p53 e ne inibisce l'attività trascrizionale distruggendo l'interazione tra p53 e il suo coattivatore p300, bloccando, quindi, l'acetilazione di p53 dipendente da p300 che ne determina la stabilità. L'overespressione di YY1 stimola l'ubiquitinizzazione e la degradazione di p53, inibendone l'accumulo (49).

YY1 induce la degradazione di p53 anche attraverso mdm2, un'oncoproteina overespressa in svariati tipi tumorali (50); la stessa interazione è stata confermata anche per l'analogo umano di mdm2, Hdm2 (49). Tutte queste evidenze confermano l'importante ruolo di YY1 di regolatore negativo del gene soppressore tumorale p53 in risposta a stress genotossici. E' stato osservato un legame tra il complesso formato dal fattore di trascrizione NF1 e YY1, e il promotore di p53; tale legame determina l'attivazione trascrizionale di p53 (51), ma risulta assente nelle cellule tumorali che esprimono il gene proapoptotico Bax (52).

In modelli tumorali murini e umani, YY1 può attivare entrambi i promotori endogeno e esogeno di c-myc (53). Esiste una regolazione a feedback per cui l'overespressione di c-myc appare alterare il ruolo di repressore di YY1 interferendo con l'associazione tra YY1 e le proteine TAF e TFIIB (54, 55).

In un modello di HCC murino è stato visto che l'attività di legame di YY1 risulta inibita quando il gene c-myc è overespresso, e che, viceversa, l'inibizione dell'espressione di quest'ultimo è associata ad alti livelli costitutivi di YY1. Questo può servire a reprimere in maniera costitutiva i segnali antiapoptotici di risposta a c-myc (56).

In cellule differenziate l'aumento dei livelli nucleari di YY1 favorisce la progressione in fase S e tale attività è mediata dalla sua interazione con Rb, potenziando così la proliferazione cellulare e la tumorigenesi (57).

Come è già stato menzionato, YY1 lega i geni degli istoni causando un rimodellamento cromatinico e un aumento della replicazione attraverso HDAC (39, 54, 58).

Esistono numerose evidenze di interazione tra YY1 e NF- κ B, alcune delle quali sono già state descritte. Il gruppo di Chan ha identificato un elemento SINE (SRF/ NF- κ B-like element) contenente un motivo di legame per YY1 nel promotore del citomegalovirus (59). Vi sono evidenze indirette che suggeriscono come NF- κ B e YY1, quando trascrizionalmente attivi in maniera concomitante, possono agire in concerto per esercitare effetti sinergistici o opposti, in base al contesto cellulare e agli stimoli per la regolazione genica.

YY1 sembra avere un ruolo preponderante nell'induzione dell'immuno-resistenza e della chemio-resistenza.

YY1, in seguito allo stimolo indotto da citochine, modula un pattern di geni tra cui quelli che codificano per alcuni fattori fondamentali nella regolazione della risposta apoptotica. YY1, ad esempio, fa parte del complesso proteico responsabile dell'attivazione trascrizionale del gene per IFN- γ (60).

Il promotore del gene eNOS (NO sintasi endoteliale) possiede una regione di silenziamento genico con siti di legame per YY1 (61). In presenza di ossido nitrico (NO), in linee cellulari di cancro prostatico e di carcinoma ovarico, si descrive un'inibizione dell'attività di legame di YY1 a livello del promotore del gene Fas. YY1 regola negativamente la trascrizione di Fas e, in addizione, la resistenza delle cellule tumorali all'apoptosi indotta da Fas. In cellule PC-3, NO inibisce l'espressione di NF- κ B e di YY1 attraverso s-nitrosilazione (62); sia IFN- γ e reagenti che rilasciano NO, inibiscono l'espressione di YY1 e, quindi, la sua attività di legame al DNA.

IFN- γ induce l'espressione di iNOS e il rilascio di NO. NO inibisce sia l'attività di NF-kB che di YY1 mediante s-nitrosilazione. Inoltre, l'inibizione di NF-kB risulta in una simultanea inibizione di YY1 suggerendo che la trascrizione di YY1 è sotto la regolazione di NF-kB. In cellule B Ramos di linfoma, l'inibizione di YY1 mediante l'anticorpo monoclonale rituximab, determina una sensibilizzazione all'apoptosi mediata da Fas (63, 64).

In generale, il trattamento di cellule tumorali con IFN- γ o con altri farmaci chemioterapici, sensibilizza le cellule all'apoptosi Fas-mediata. Tale sensibilizzazione è accompagnata da un'incrementata espressione di Fas sia a livello citosolico che di membrana. C'è, dunque, una chiara associazione tra l'attività di YY1 e l'espressione sia di alcune citochine sia di recettori di morte, in particolare nei sistemi tumorali, con una potenziale chemio- e immunoresistenza e conseguente sopravvivenza cellulare attraverso queste vie.

Un altro importante meccanismo di resistenza all'apoptosi mediata da YY1 si determina tramite la regolazione negativa esercitata dal fattore sul promotore del gene codificante per DR5, recettore del fattore proapoptotico TRAIL (65). In ogni caso i meccanismi con cui YY1 regola la chemioresistenza rimangono ancora da chiarire.

Vi sono, infine, diverse evidenze che indicano un potenziale pro-metastatico di YY1.

Le informazioni ottenute dagli studi in vitro, sono servite per effettuare studi in modelli preclinici e clinici, incluso i tumori epiteliali (66), il carcinoma epatocellulare (56, 67) e il cancro della mammella (68).

In ultima analisi, YY1 può essere considerato un importante marker prognostico poiché l'espressione del fattore viene correlata con la progressione della malattia; studi effettuati in linee di carcinoma prostatico mostrano che l'espressione di YY1 nelle cellule tumorali è più alta che nei controlli normali.

Uno studio clinico effettuato mediante immunohistochimica in pazienti che sviluppano HCC, ha messo in evidenza come l'espressione di YY1 sia correlabile alla progressione della malattia. Nei tessuti normali c'è, infatti, una bassa espressione di YY1, mentre nei noduli epatici cirrotici (CHN) il fattore appare espresso nel nucleo e nel citoplasma, in HCC c'è un'espressione aumentata soprattutto nel nucleo, se comparata a quella dei CHN; in particolare, nello stadio 3, rispetto agli stadi 1 e 2, dell'HCC, l'espressione è nettamente incrementata (69).

Sulla base di tali conferme, YY1 potrebbe servire come marker prognostico in tessuti neoplastici umani, e da tali dati essere estrapolata una terapia individualizzata.

RKIP

In condizioni fisiologiche, le cellule hanno molti sistemi di controllo che consentono il mantenimento della loro integrità e il loro ritorno alle condizioni di equilibrio omeostatico in seguito a perturbazioni esterne, attraverso l'attivazione di sistemi a feedback positivo o negativo.

La proteina Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) è coinvolta nel mantenimento dello stato di omeostasi cellulare, in quanto è in grado di rispondere a segnali di feedback che modulano il suo ruolo come diretto regolatore negativo di cascate chinasiche di segnalazione.

Questo fattore è stato identificato per la prima volta in uno studio condotto da *Yeung et al.*

Tale studio si proponeva di comprendere il complesso meccanismo di regolazione del pathway Ras/Raf-1/MEK/ERK attraverso l'identificazione delle possibili associazioni dei membri di questa via di segnalazione con proteine scaffold e proteine regolatrici. Tra le

proteine capaci di interagire con Raf-1, in particolare con il dominio BXB, è stata identificata RKIP (69). Il sequenziamento del cDNA di RKIP ha rivelato che si trattava di una proteina identica alle PEBP (proteine leganti la fosfatidiletanolamina) con una massa molecolare di circa 23 kDa e molto conservata da un punto di vista evolutivo. RKIP agisce successivamente al reclutamento di Raf-1 a livello della membrana, previene l'associazione di Raf-1 e PAK (p21-activated kinase) e blocca la fosforilazione del dominio di Raf-1 da parte di PAK e della famiglia di chinasi Src. La mutazione di Raf-1 nei siti di fosforilazione riconosciuti dalle proteine PAK e Src, previene l'associazione di RKIP con Raf-1 e l'inibizione della via (69, 70).

L'iniziale identificazione di RKIP ha aperto la strada a numerosi altri studi che hanno cercato di caratterizzare sempre meglio questa proteina, sia strutturalmente che funzionalmente, e di chiarirne il ruolo non solo nel contesto della via di segnalazione delle MAPK ma anche nell'ambito di processi cellulari complessi quali la crescita, la trasformazione e il differenziamento (71).

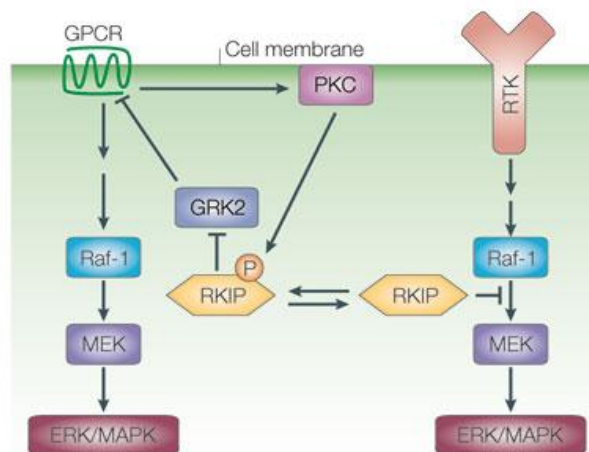
Da un punto di vista strutturale, RKIP è una proteina di 187 aa con una massa molecolare di 21/23 kDa, costituita da un dominio β , formato a sua volta, da due foglietti β anti-paralleli e una cavità in grado di contenere piccoli anioni come il gruppo fosforile. Gli aa che formano questa cavità sono altamente conservati fra tutti i membri della famiglia PEBP e costituiscono il dominio PEB.

Il coinvolgimento di RKIP nei processi di crescita e differenziamento cellulari è strettamente correlato anche alla sua interazione con la proteina chinasi-C (PKC) che è in grado di fosforilare RKIP sulla serina 153 ostacolandone la funzione inibitoria su Raf-1 (71).

In particolare, è stato osservato che la PKC, attivata da parte del fattore di crescita epidermico (EGF) o dell'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA), fosforila RKIP sulla serina 153 determinando la dissociazione del complesso RKIP-Raf-1 e l'inattivazione della funzione di RKIP come inibitore di Raf-1.

La fosforilazione di RKIP in corrispondenza della serina 153 determina il legame a GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2) e, conseguentemente, l'inibizione di tale proteina; GRK2 è una chinasi responsabile della regolazione negativa di diversi recettori accoppiati a proteine G, incluso il recettore β -adrenergico.

Dunque, RKIP agisce da sensore ambientale ed è in grado di mantenere il sistema cellulare in uno stato di equilibrio regolando negativamente la cascata delle MAPK o potenziando la segnalazione dei GPCR (G protein-coupled receptors), a seconda del suo stato di fosforilazione. (Fig.2) (72, 73).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 2: Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione di RKIP

E' stato anche riportato che, indipendentemente dal suo effetto inibitorio sulla cascata delle MAPK, RKIP è in grado di antagonizzare la via di segnalazione che media l'attivazione di NF- κ B, in risposta al segnale del TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), modulando negativamente la fosforilazione di IKK- α e IKK- β da parte delle chinasi a monte per mezzo di un'interazione fisica con NIK e TAK-1 e con le due subunità catalitiche di IKK attraverso un meccanismo simile a quello che determina la mancata attivazione di MEK nel pathway di Raf-1 (74).

Quindi, in condizioni fisiologiche, RKIP è in grado di modulare lo stato di attivazione di diverse vie di segnalazione intracellulari agendo da sensore ambientale ed integrando diversi segnali extracellulari.

L'espressione aberrante di RKIP gioca un ruolo critico in diverse forme di cancro in quanto determina l'alterazione dei meccanismi di regolazione delle diverse vie di trasduzione del segnale in cui RKIP stesso risulta essere coinvolto.

Come osservato in diversi studi, il pathway Ras/Raf/MEK/ERK risulta essere alterato in molti tipi di tumori umani, in particolare l'overespressione di tale via del segnale ha un ruolo fondamentale nella progressione tumorale. La downregolazione di RKIP, osservata in diversi tipi di tumori umani, determina l'attivazione della cascata delle MAPK con conseguente crescita e proliferazione delle cellule tumorali (75, 76).

In particolare, l'espressione di RKIP risulta essere downregolata nel carcinoma prostatico, nel tumore mammario (77), nel tumore ovarico epiteliale (78), nel tumore del colon-retto (79) e in molti altri tipi di tumori umani maligni, incluso l'HCC (80).

In tutte queste neoplasie, la ridotta espressione di RKIP risulta essere direttamente correlata a due caratteristiche che contribuiscono a definire la natura maligna della

malattia: l'aumentata capacità delle cellule tumorali di andare incontro al processo di invasione e metastatizzazione, e l'aumento della resistenza tumorale ai segnali apoptotici indotti dagli agenti chemioterapici antitumorali.

Il primo passo nel processo di formazione di metastasi è rappresentato dalla transizione epitelio-mesenchimale (EMT) durante la quale le cellule epiteliali polarizzate acquisiscono alcune caratteristiche delle cellule mesenchimali e, dunque, sono capaci di penetrare lo strato mesenchimale attraverso la membrana basale e invadere i tessuti circostanti. L'attraversamento dello strato mesenchimale porta all'infiltrazione dei vasi sanguigni e alla migrazione delle cellule tumorali in altri tessuti (81).

Nel carcinoma prostatico, è stata dimostrata la ridotta espressione di RKIP nelle cellule tumorali, ma livelli più bassi di espressione sono stati ritrovati nelle cellule di carcinoma metastatico, suggerendo che l'espressione di RKIP sia inversamente correlata all'invasività di questo tumore (82). D'altra parte, ristabilendo i livelli normali di espressione di questo fattore nelle cellule di tumore prostatico, si riduce l'invasività di tali cellule ma non si ha alcun effetto sulla crescita del tumore primario, suggerendo per RKIP il ruolo di gene soppressore di metastasi, ed escludendo un suo possibile coinvolgimento nel processo di tumorigenesi.

Questo stesso ruolo è stato sottolineato anche nel carcinoma colon rettale in uno studio condotto da Minoo et al. in cui è stato dimostrato, che la perdita di RKIP correla con la formazione di metastasi, l'invasività vascolare e la scarsa sopravvivenza dei pazienti affetti (83).

Anche nel tumore mammario, in uno studio condotto su 103 pazienti, la perdita di RKIP in corrispondenza delle metastasi linfonodali ma non in tumori primari, ha confermato il suo

ruolo di fattore inibitore del processo di metastatizzazione. L'espressione di RKIP, inoltre, non sembra correlare con altre caratteristiche clinico-patologiche, come il grado di differenziamento tumorale, la grandezza o il grado di espressione dei recettori estrogenici (84).

Il ruolo di RKIP come soppressore delle metastasi è associato anche alla sua capacità di promuovere l'apoptosi, probabilmente attraverso l'inibizione dell'attivazione di NF-κB, importante fattore coinvolto nella tumorigenesi di diversi tipi di neoplasie è fondamentale nel conferire alla cellula tumorale resistenza al processo apoptotico. NF-κB, infatti, è responsabile dell'iperespressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-X_L, Bcl-2, IAPs, ecc.

In una linea cellulare di linfoma non Hodgkin non correlato alla sindrome di immunodeficienza acquisita, è stato dimostrato come il rituximab sensibilizzi le cellule all'apoptosi attraverso l'upregolazione di RKIP (85). Nello stesso modello tumorale, l'inibizione farmacologica della via di ERK 1/2, mediante le molecole GW5074, PD098059 e U0126, mima le proprietà antiproliferative e di chemiosensibilizzazione attribuite al rituximab e, dunque, sensibilizza le cellule all'apoptosi indotta dal paclitaxel (86).

Per tali motivi, RKIP è considerato un importante fattore di regolazione dell'apoptosi indotta da farmaci. L'overespressione di RKIP sensibilizza le cellule tumorali all'apoptosi indotta da chemioterapici (74). Inoltre, il cisplatino e l'etoposide, così come anche il 9NC, un farmaco che inibisce l'enzima topoisomerasi I, inducono l'espressione di RKIP (87).

Purtroppo ad oggi poco si sa riguardo al meccanismo che conduce alla ridotta espressione di RKIP nel tumore.

In uno studio condotto su cellule metastatiche di tumore prostatico e mammario, è stata osservata una correlazione tra i livelli di espressione dell'mRNA e i livelli di espressione della proteina di RKIP; tali evidenze hanno condotto all'ipotesi che l'espressione di RKIP fosse regolata negativamente a livello trascrizionale.

Fu ipotizzato, inizialmente, che la downregolazione di RKIP nelle cellule tumorali metastatiche fosse determinata da meccanismi epigenetici che causano silenziamento genico come l'ipermetilazione del promotore o la deacetilazione degli istoni. Per confermare tali ipotesi, cellule di tumore prostatico metastatico sono state trattate con due agenti: l'inibitore della metilazione, 5-Aza-2dC, e l'inibitore dell'istone deacetilasi, Tricostatina A (TSA). Il trattamento di queste cellule con 5-Aza-2dC non ha determinato alcuna variazione dei livelli di espressione di RKIP, escludendo che la causa della sua downregolazione nelle cellule tumorali metastatiche potesse essere rappresentata dall'ipermetilazione del suo promotore.

D'altra parte, il trattamento con TSA ha mostrato un significativo aumento dei livelli di espressione di RKIP, suggerendo che meccanismi di deacetilazione istonica potessero essere responsabili della sua regolazione negativa (88).

E' stato dimostrato che, così come accade per l'E-caderina, una proteina di giunzione intercellulare che agisce da soppressore di metastasi, anche l'espressione di RKIP risulta correlata negativamente con il livello di espressione di Snail, un repressore trascrizionale appartenente alla famiglia delle proteine zinc-finger che rappresenta un modulatore chiave del processo normale e tumorale di transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

Studiando il promotore di RKIP sono stati identificati quattro possibili siti di legame per Snail, le E-box. In particolare, è stato mostrato che Snail reprime l'inizio della trascrizione

di RKIP legandosi all'elemento E-Box 2 presente all'interno del suo promotore, e reclutando il fattore mSin3A, che agisce da rimodellatore della cromatina, e le deacetilasi istoniche che hanno attività di repressione trascrizionale (88).

Diversi studi condotti da *Bonavida et al.* sul modello di carcinoma della prostata, hanno chiarito che RKIP e il suo repressore trascrizionale Snail fanno parte di un loop di regolazione noto come NF- κ B/Snail/YY1/RKIP. I fattori che fanno parte di tale loop si influenzano reciprocamente, infatti, RKIP inibisce l'attivazione di NF- κ B e, a sua volta, NF- κ B regola negativamente l'espressione di RKIP attraverso l'induzione del suo repressore trascrizionale, Snail.

YY1, oltre ad essere coinvolta nel meccanismo di resistenza tumorale agli stimoli apoptotici, sembra avere un ruolo nel processo di EMT in quanto è in grado di favorire l'espressione di Snail. In particolare, YY1 è una proteina multifunzionale capace di attivare o reprimere la trascrizione genica di specifici target a seconda della presenza di co-attivatori o co-repressori. La sua iperespressione viene associata a proliferazione incontrollata, resistenza a stimoli apoptotici, tumorigenesi e potenziale metastatico.

Questo loop sembra, quindi, essere coinvolto sia nella regolazione della transizione epitelio-mesenchimale che rappresenta il primo passo verso la metastatizzazione, sia nella regolazione della sensibilità delle cellule tumorali agli stimoli pro-apoptotici (81).

Inoltre, è stato riportato che l'overespressione di YY1 si associa alla riduzione dei livelli di espressione di RKIP, suggerendo l'esistenza di una reciproca influenza tra questi due fattori. Sulla base di analisi bioinformatiche condotte sulla sequenza del promotore di RKIP, infatti, è stata individuata una possibile sequenza di legame per YY1. Studi successivi condotti su cellule di carcinoma prostatico hanno mostrato che il trattamento con

inibitori di YY1 o di NF- κ B determina l'overespressione di RKIP (40) e, a sua volta, quest'ultimo attraverso i suoi effetti su NF- κ B, può inibire la trascrizione genica di YY1 (71) (Fig. 3).

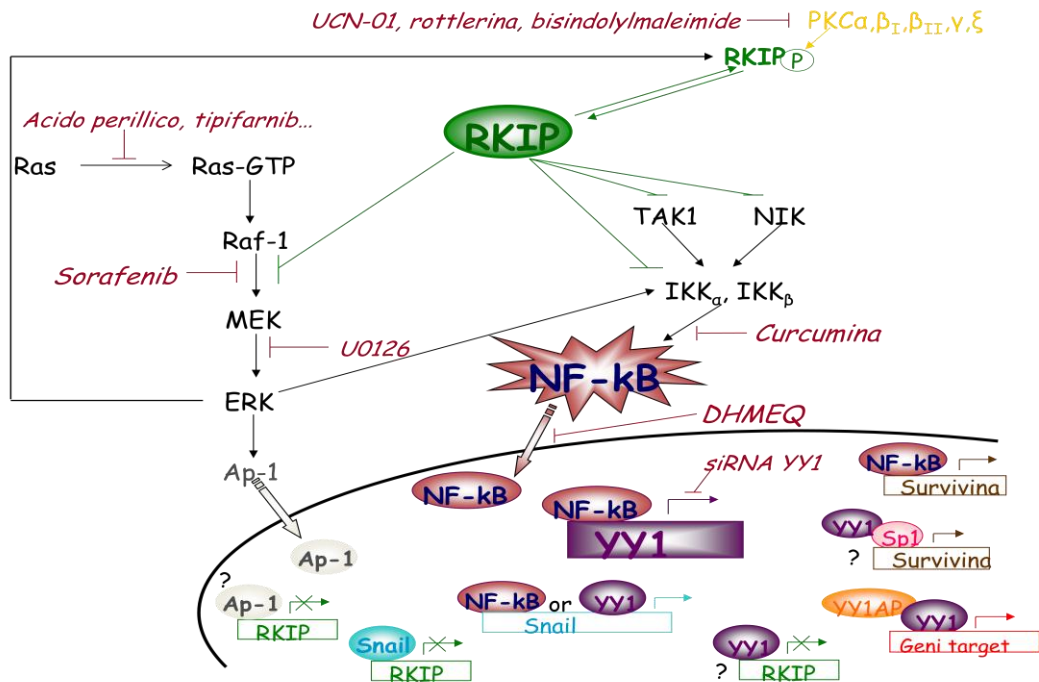


Figura 3: Interrelazioni tra YY1, RKIP e NF- κ B

Il ruolo di RKIP nell'HCC non è stato ancora del tutto chiarito.

Nello studio di *Yong-Feng et al.* è stata valutata, tramite immunohistochimica ed RT-PCR, l'espressione di RKIP in una vasta coorte di pazienti affetti da HCC HBV-correlato.

Dai dati ottenuti, è emerso che RKIP, prevalentemente downregolato nell'HCC, risulta significativamente associato alle caratteristiche di invasività tumorale (come l'invasione vascolare, la perdita di incapsulazione, lo scarso differenziamento, le grandi dimensioni).

Inoltre, è stato osservato che l'espressione di RKIP è correlabile alla ricorrenza tumorale e alla sopravvivenza dei pazienti, conferisce un comportamento tumorale aggressivo e potrebbe essere, quindi, considerata anche un biomarcatore utile per identificare i pazienti ad alto rischio di ricorrenza post-operatoria (76).

In un altro studio, è stato osservato che, sebbene i livelli proteici di RKIP fossero significativamente ridotti nell'HCC umano, i livelli del suo mRNA risultavano diminuiti nel 41% dei casi, mentre nei rimanenti si mostravano aumentati o invariati, suggerendo così che l'espressione di RKIP potesse coinvolgere meccanismi di regolazione post-trascrizionale (75). In linee cellulari di HCC, l'analisi delle regioni genomiche di RKIP e l'analisi del suo mRNA, condotta tramite RT-PCR, ha rivelato in corrispondenza delle regioni codificanti del gene la totale assenza di mutazioni che avrebbero potuto spiegare la downregolazione di questo fattore osservata nelle cellule tumorali.

Come nel carcinoma prostatico e mammario, anche nell'HCC, è stato ipotizzato il coinvolgimento di meccanismi epigenetici, come l'ipermetilazione, alla base della ridotta espressione di RKIP ma, anche in questo caso, il trattamento con l'agente 5-Aza non ha modificato i livelli di espressione della proteina. In aggiunta all'HCC, è stata analizzata l'espressione di RKIP in campioni tissutali di fegato cirrotico tramite immunocolorazione ed è stato dimostrato che, mentre nelle cellule tumorali tale proteina risulta poco espressa, nei tessuti cirrotici si localizza totalmente in corrispondenza della superficie interna della membrana cellulare. Questa localizzazione subcellulare anomala di RKIP è stata correlata alla sua capacità di interagire con Raf il quale viene reclutato a livello della membrana cellulare all'inizio del processo cirrotico (80).

Recentemente, nel laboratorio di ricerca dove ho svolto la tesi, è stata valutata l'espressione del fattore di trascrizione YY1, e di RKIP, in 35 campioni di carcinoma epatocellulare, nei corrispettivi tessuti peritumorali cirrotici e in 6 campioni di tessuto epatico sano.

In accordo con altri autori, è stato osservato che nell'HCC elevati livelli di YY1 e ridotti livelli di RKIP accompagnano frequentemente la progressione da cirrosi a tumore (90).

Nonostante sia stato accertato il ruolo di RKIP nella soppressione della crescita tumorale e delle metastasi, non sono ancora stati chiariti i meccanismi di regolazione negativa di questo fattore nell'epatocarcinoma ed anche in altri tipi di neoplasie.

Trattamenti dell'epatocarcinoma

Nel trattamento di pazienti affetti da HCC, nei quali la funzionalità del fegato può essere preservata e il tumore non sia multifocale e diffuso, il trattamento di scelta è la resezione chirurgica della massa tumorale o di un segmento o di un lobo. Tuttavia, nel caso di epatocarcinoma su fegato cirrotico, la resezione chirurgica non è indicata, in quanto la cirrosi limita la capacità rigenerativa del fegato. In alternativa può essere effettuato su tali pazienti un trapianto di organo seguendo i criteri essenziali quali: un'elevata aspettativa di vita dopo il trattamento, grandezza del tumore e numero di noduli non elevati. In alternativa, possono anche essere effettuate terapie loco regionali, volte ad eliminare il nodulo in caso di lesione monolocale tramite l'uso di calore, raggi X o ultrasuoni o agenti chimici tossici, quali acido acetico o etanolo concentrato. Esempi di tali terapie sono: la chemioembolizzazione transarteriosa (TACE), l'embolizzazione tramite la vena porta (PVE), l'alcolizzazione (PEI, iniezione percutanea di etanolo), la termoablazione di noduli

minori di 4 cm (RFA, ablazione mediante radiofrequenza). A volte tali tecniche possono essere utilizzate prima della resezione chirurgica ai fini di ridurre la massa tumorale da asportare ed indurre l'iperplasia compensatoria dei segmenti restanti (91).

Purtroppo questi tipi di interventi possono essere effettuati solo su pazienti in cui è stata fatta una diagnosi precoce, cosa che avviene in un piccolo numero di casi, in quanto la malattia ha uno sviluppo asintomatico e le metastasi intraepatiche si originano rapidamente. Inoltre, la chirurgia non è risolutiva e le recidive dopo l'intervento chirurgico sono frequenti; il trapianto, invece, è effettuato in un numero di casi veramente esiguo.

Oggi dal punto di vista farmacologico esistono differenti alternative al fine di avere un effetto sistemico, anche se nessuno di quelli in uso è risultato risolutivamente efficace.

Possono essere utilizzati diversi farmaci chemioterapici tradizionali citotossici la cui azione mira a danneggiare il DNA o ad inibire la proliferazione cellulare. Tra questi possiamo citare la Doxorubicina, uno dei farmaci antineoplastici più importanti e largamente usati. La Doxo è impiegata in combinazione con altri farmaci come il GEMOX (composto da gemcitabina e oxaliplatino) e il PIAF (composto da cisplatino, interferone, doxorubicina, 5-fluorouracile), in quanto la monoterapia risulta spesso inefficace. Il PIAF, però, viene utilizzato di rado in quanto mostra diversi effetti avversi quali neutropenia, trombocitopenia e ipocaliemia (92).

Un epimero della Doxorubicina, l'Epirubicina ha mostrato, invece, una minore cardiotossicità e attività mielosoppressiva, però possiede anche una minore attività antitumorale.

Il Nolatrexed è un inibitore dell'enzima timidilato sintetasi di recente scoperta. Esso determina una maggiore sopravvivenza rispetto al trattamento con la Doxo, ma mostra una maggiore tossicità.

La molecola T138067 inibisce la formazione di microtubuli legando irreversibilmente la β -tubulina e può essere impiegata per indurre l'apoptosi delle cellule in seguito all'arresto in fase G2/M del ciclo cellulare. Tale composto non mostra una significativa differenza nella sopravvivenza rispetto al trattamento con la Doxo (93).

In sintesi, i farmaci chemioterapici citotossici, la cui terapia è volta a distruggere le cellule in rapida proliferazione, attaccano anche quelle cellule che mostrano una proliferazione elevata come quelle della mucosa orale, del midollo osseo, della mucosa gastrointestinale e dei bulbi piliferi, contribuendo alle manifestazioni tossiche della chemioterapia. Tra i maggiori effetti avversi possiamo citare la mielosoppressione, le mucositi, l'alopecia, l'astenia, le alterazioni delle funzioni cardiache, neurologiche, renali e gastroenteriche. Questo bagaglio di effetti indesiderati non è sempre accompagnato da una soddisfacente remissione della malattia neoplastica, soprattutto nei casi di tumori in fase avanzata.

Inoltre, bisogna considerare che l'epatocarcinoma mostra spesso resistenza sia alla radioterapia che alla chemioterapia tradizionale, proprio per la capacità intrinseca degli epatociti di metabolizzare e inattivare i farmaci, e anche per la sovraespressione di proteine che conferiscono multifarmacoresistenza. Proprio per questo motivo, oggi la ricerca punta verso lo studio di terapie più mirate basandosi sulle conoscenze dei processi di traduzione del segnale, delle alterazioni a carico di oncogeni e di geni oncosoppressori. Un approccio valido nella terapia potrebbe essere, infatti, quello di intervenire sulle vie di traduzione del segnale la cui regolazione è alterata dalla tumorigenesi e che portano alla

proliferazione incontrollata e all'inibizione dell'apoptosi. Per questo viene applicata la cosiddetta target therapy, che mira a bloccare determinati bersagli molecolari in modo da impedire l'attivazione delle vie che consentono la proliferazione incontrollata, l'angiogenesi, l'invasività ecc.

A tal proposito è stata testata l'efficacia di Erlotinib (Tarceva), inibitore del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGF), in quanto diversi membri della famiglia EGF e i loro recettori sono espressi nel tessuto tumorale, e in quello circostante, nella quasi totalità dei tumori. Sono stati eseguiti diversi trial clinici per studiare la sopravvivenza media ottenuta in seguito al trattamento con Erlotinib, ma gli studi condotti non sono stati sufficienti a raccomandare l'uso di tale farmaco come singolo agente di routine del carcinoma epatocellulare.

Il Cetuximab, un anticorpo monoclonale chimerico, si ritiene che eserciti il suo effetto agendo sul recettore per il fattore di crescita epidermico posto sulla superficiale delle cellule cancerose, interferendo in tal modo con la loro crescita. Esso ha mostrato attività antitumorale in studi preclinici ed è stato testato in due trial clinici di fase II che hanno mostrato una sopravvivenza complessiva di 9 mesi, ma l'efficacia effettiva è ancora da definire.

Il Bevacizumab (Avastatin) è il primo anticorpo monoclonale appartenente ad una nuova classe di farmaci antitumorali chiamati agenti antiangiogenesi. Si lega al fattore di crescita endoteliale (VEGF) bloccando lo stimolo alla formazione di nuovi vasi ematici. In assenza di nuovi vasi ematici, il tumore non riceve ossigeno e nutrienti essenziali per la crescita e la proliferazione. Gli effetti avversi più comuni sono ipertensione, stomatiti e diarrea.

Il Sunitinib è una piccola molecola con effetto antiangiogenico, in quanto inibisce VEGFR-1 e VEGFR-2, ha anche effetto antitumorale diretto attraverso l'inibizione di PDGFR- α e PDGFR- β , c-KIT, FLT 3 e RETK. Gli studi clinici sul Sunitinib finora condotti hanno mostrato che il farmaco causa una maggiore tossicità in pazienti con carcinoma epatocellulare piuttosto che con altri tumori (94).

Un farmaco che ha determinato una svolta nel trattamento del carcinoma epatocellulare è l'inibitore multichinasico orale Sorafenib.

Il Sorafenib è un potente inibitore multichinasi che blocca la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali e l'angiogenesi. I suoi target sono le forme wild type e mutate della chinasi Raf-1 e diversi recettori ad attività tiroxina chinasi quali VEGFR-2 e VEGFR-3, PDGFR- β , FLT-3, RET, c-KIT, coinvolti nella crescita tumorale e nell'angiogenesi. Il meccanismo principale di azione del Sorafenib è l'inibizione competitiva del legame dell'ATP al dominio catalitico delle chinasi.

La possibilità di somministrare il farmaco per via orale è un vantaggio per il paziente in quanto gli consente di effettuare la terapia direttamente a casa con costi non molto elevati (95). Sulla base dei risultati promettenti degli studi preclinici e dei trial di fase II sono stati condotti due importanti trial di fase III randomizzati, a doppio cieco, controllati con placebo. Essi hanno dimostrato che la monoterapia con Sorafenib in pazienti con carcinoma epatocellulare è ben tollerata, prolunga la sopravvivenza e rallenta il tempo di progressione. Si tratta dell'Asia-Pacific trial, condotto su un campione di 226 pazienti, e dello Sharp trial, condotto su 602 pazienti in Europa, America, Australia e Nuova Zelanda i quali hanno stabilito che il Sorafenib è il nuovo standard per il trattamento di prima linea del carcinoma epatocellulare.

Tra gli effetti avversi dovuti alla somministrazione di tale farmaco vi sono diarrea, reazioni dermatologiche rappresentate da rash cutaneo, desquamazione della pelle a livello di mani e piedi, ipercheratosi dei palmi; inoltre, causa, a lungo termine, il rischio di sviluppare ipertensione (94).

E' stato ipotizzato che l'uso concomitante del Sorafenib con altri farmaci possa potenziare la terapia dell'HCC, per esempio, adottando farmaci con diverso meccanismo d'azione oppure che interferiscano con vie di traduzione del segnale complementari implicate nello sviluppo del tumore o a livello di diversi step di una determinata via di segnalazione; questo consentirebbe di ottenere l'inibizione orizzontale e verticale di più pathways tumorigenici (96).

Nonostante gli sforzi fin ora compiuti non esiste, ad oggi, una terapia assoluta per il trattamento dell'HCC e l'obiettivo della ricerca è quello di comprendere meglio i meccanismi che portano alla cancerogenesi, le vie molecolari coinvolte nella progressione e nello sviluppo tumorale al fine di ottenere delle terapie più mirate. Inoltre, un obiettivo importante da raggiungere è rappresentato dalla possibilità di identificare categorie di pazienti che possano rispondere o meno a specifici trattamenti in base al pattern di espressione dei fattori implicati nel processo tumorale.

OBIETTIVI

Gli obiettivi della presente tesi sono stati:

1. Valutare l'espressione a livello di RNA messaggero del fattore di trascrizione YY1, del suo coattivatore YY1AP, del fattore antiapoptotico survivina e, infine, dell'inibitore di Raf-1 chinasi, RKIP, in 35 campioni di carcinoma epatocellulare, nei corrispettivi tessuti peritumorali cirrotici e in 6 campioni di tessuto epatico sano. L'analisi è stata condotta mediante RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction).
2. Studiare la relazione tra i dati ottenuti e alcune caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti (infezione virale, grado di differenziazione, stadio tumorale ed eventuale presenza di metastasi, classe di Child-Pugh, numero di noduli e classificazione BCLC).
3. Analizzare, mediante immunistochemica, sui medesimi campioni, l'espressione delle proteine YY1, survivina e RKIP al fine di valutare un'eventuale correlazione con i dati riguardanti l'espressione degli RNA messaggeri.

Nonostante sia stato accertato il ruolo di RKIP nella soppressione della crescita tumorale e delle metastasi, non sono ancora stati chiariti i meccanismi di regolazione negativa di questo fattore nell'epatocarcinoma ed anche in altri tipi di neoplasie. Ho quindi valutato

sia su campioni clinici che su linee cellulari di carcinoma epatocellulare alcuni possibili meccanismi di regolazione negativa di RKIP, in particolare:

- lo stato di metilazione dello stesso gene.

- abbiamo preso in esame un'eventuale regolazione negativa sul gene codificante per RKIP ad opera di possibili repressori trascrizionali.

MATERIALI E METODI

Pazienti

I campioni di tessuto provengono da pazienti con carcinoma epatocellulare insorto su fegato cirrotico, diagnosticato al Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti dell'Università di Palermo, e che hanno subito la resezione epatica come terapia per l'HCC al Dipartimento di Discipline Chirurgiche ed Oncologiche tra il 2003 e il 2008. La diagnosi di HCC è stata confermata dall'esame istologico del pezzo resecato chirurgicamente. Tutti i campioni del tumore e del tessuto cirrotico circostante sono stati congelati e conservati a -80°C. Campioni del tessuto epatico non neoplastico derivano da siti adiacenti ma separati dal tumore. Il grado di differenziazione del tumore è stato determinato in base ai criteri di Edmonson e Stainer e la stadiazione è stata condotta in base alla classificazione TNM (American Joint Committee on Cancer 6th edition TNM classification). Le caratteristiche clinico-patologiche sono sintetizzate nella Tabella 4.

Colture Cellulari

Le linee cellulari utilizzate sono state quelle di carcinoma epatocellulare HA22T/VGH, HepG2 ed Hep3B. Per entrambe il terreno di coltura utilizzato è stato l'RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (HyClone Europe Ltd., Cramlington, UK) addizionato con 10% di siero fetale bovino inattivato al calore, 2mM di L-glutamina, 1mM di sodio piruvato e 100 µg/ml di una soluzione di Penicillina/Streptomicina (HyClone Europe). Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Farmaci:

- Tricostatina A (Sigma-Aldrich)
- 5-Aza-2-deossicitosina (Sigma-Aldrich).

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale viene isolato dai campioni usando il reagente di lisi, TRIzol (Invitrogen, Milan, Italy). Successivamente si aggiunge al lisato cellulare cloroformio e si centrifuga separando così la soluzione in una fase organica e in una acquosa che viene recuperata per l'estrazione dell'RNA tramite precipitazione con isopropanolo. Il pellet viene lavato con etanolo al 70%. Infine, l'RNA così ottenuto viene risospeso in acqua sterile e denaturato per 10 minuti a 60°C. Tramite spettrofotometro vengono misurati il rapporto tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e quella alla lunghezza d'onda di 280 nm ($A_{260/280}$), che è l'indice di purezza e deve essere inferiore a 1.6, e la quantità di RNA totale del campione.

RT-PCR semiquantitativa

Per l'RT-PCR viene seguito il protocollo del kit "SUPERSCRIP^T One-Step RT-PCR with Platinum Taq" (Invitrogen, Milan, Italy).

I campioni e l'appropriata coppia di primer specifici sono addizionati ad ogni bead dissolta in acqua in un volume finale di 25 µL.

Le sequenze dei primer usati sono le seguenti:

RKIP

5'-ATGCCGGTGGACCTCAGC-3' (senso)

5'-GAGAGGACTGTGCCACTG-3' (antisenso);

β-actina

5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' (senso)

5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3' (antisenso);

Snail

5'-AAGGATCTCCAGGCTCGAAAG-3' (senso)

5'-GCTTCGGATGTGCATCTTGA-3' (antisenso).

YY1AP

5'-CCGCTGAAGAAAAGGAAGCA-3' (senso)

5'-CCAGAATCAGGGTCTGATGA-3' (antisenso);

Survivina

5'-GCATGGGTGCCCCGACGTTG-3' (senso)

5'-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3' (antisenso);

La prima catena di cDNA è ottenuta dopo 30 minuti alla temperatura di 45°C.

Dopo la denaturazione alla temperatura di 94°C per 2 minuti, la reazione di PCR prosegue con un programma specifico: denaturazione per 1 minuto a 94°C, annealing per 1 minuto a 58°C per RKIP e 60°C per Snail, e allungamento per 1 minuto a 72°C, per 15, 20, 25, 30 e 35 cicli di amplificazione.

I prodotti di PCR sono analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.5% (p/v), il quale viene poi fotografato, quantizzando mediante scansione densitometrica.

La quantizzazione viene effettuata usando primer che amplificano β -actina come controllo interno e rapportando le intensità delle bande ottenute dai campioni con quelle del controllo.

Analisi immunoistochimica

Da ogni campione tissutale si ricavano blocchetti fissati in formalina e inclusi in paraffina. Da ogni blocco si tagliano sezioni di tessuto di 3-4 μ m che vengono liberate dalla paraffina ed idratate tramite riscaldamento in forno a microonde (3-4 cicli di 5 minuti ognuno) in buffer citrato 10 mM o Tris-EDTA buffer (pH 9.0). Successivamente esse sono lavate due volte con PBS per 5 minuti. Tutte le sezioni vengono incubate per 5 minuti in perossido di idrogeno al 3% per inibire le perossidasi endogene.

L'immunoistochimica è stata eseguita colorando i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi:

- anticorpo policlonale di coniglio contro RKIP umano (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) diluito 1:10
- anticorpo policlonale di coniglio contro la survivina umana (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) diluito 1:500;
- anticorpo monoclonale di topo contro YY1 umano (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluito 1:200

Le sezioni sono state quindi incubate con il Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Laboratories, benton Lane, UK), controcolorate con ematossilina di Mayer per 3 minuti e sviluppati con il kit Romulin AEC Chromogen (Biocare Medical, Pike lane, CA, USA). La valutazione semiquantitativa è stata effettuata prendendo in considerazione la percentuale delle cellule positive e l'intensità della colorazione e assegnando un punteggio ad ogni condizione come segue:

1, dallo 0% al 25% di cellule positive alla colorazione; 2, dal 26% al 50% di cellule positive; 3, più del 50% di cellule positive; 0, colorazione negativa; 1, intensità della colorazione debole; 2, intensità moderata; 3, intensità forte. Sommando questi punteggi si ottengono 3 classi: N (negativo), somma tra 0 e 2; W (debolmente positivo), somma tra 3 e 4; P (positivo), somma tra 5 e 6.

Analisi statistica

Il test-t di Student per dati appaiati è stato usato per analizzare le differenze tra i livelli di RNA messaggero nel tumore rispetto al tessuto adiacente. Il test-t di Student per dati non appaiati è stato usato, invece, per analizzare le differenze tra i livelli di RNA messaggero nel tumore o nel tessuto adiacente rispetto al tessuto sano, così come tra i livelli di RNA messaggero nei diversi tumori corrispondenti ai differenti gradi di Edmonson.

Sono stati considerati statisticamente significativi i dati con valori di $P < 0.05$.

Per l'analisi statistica riguardante l'immunoistochimica, è stato utilizzato un modello proporzionale di probabilità adattato ai risultati ordinali categoriali (N, W e P) corrispondenti ad RKIP, YY1 e survivina. I valori di $P < 0.05$ sono considerati statisticamente significativi.

L'analisi statistica è stata condotta dal Prof. Vito Rosario Muggeo del Dipartimento di Scienze Statistiche e Matematiche Silvio Vianelli, Università degli Studi di Palermo.

Western Blotting

L'analisi dei livelli di espressione delle proteine RKIP e Snail è stata condotta mediante saggi Western Blotting. In breve, le cellule sono state lavate e lisate in RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology). Dopo 1 ora di incubazione in ghiaccio, gli estratti ottenuti sono stati centrifugati per 15' a 4°C a 14000 g. La concentrazione proteica è stata determinata tramite analisi colorimetrica allo spettrofotometro, leggendo alla lunghezza d'onda di 590 nm i valori di assorbanza di 2µl dei campioni, trattati con il reagente di Bradford. La titolazione proteica si ricava inserendo i valori ottenuti in una curva di standardizzazione che riporta le assorbanze di quantità note di BSA (Bovine Serum Albumin). 15 µg di proteine di ogni campione sono state sottoposte a SDS-PAGE. Le proteine, dopo elettroforesi, sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa. I filtri, dopo saturazione in 5% (p/v) di BSA in TBS-0,1% (v/v) Tween 20, sono stati incubati per una notte a 4°C in agitazione con l'anticorpo, a seconda dell'esperimento, anti-β-actina (1:10000), anti-RKIP (diluizione 1:1000), anti-Snail (diluizione 1:500) (Sigma, Cell Signaling Technology, Danvers e Santa Cruz Biotechnology).

Le membrane sono state lavate tre volte in TBS 0,1% (v/v), Tween 20 ed incubate per 1 ora in anticorpo secondario anti-rabbit o anti-mouse, IgG HRP-coniugato e rivelate tramite il kit ECL (GE-Healthcare).

Estrazione del DNA

Il DNA totale viene isolato da campioni tissutali inclusi in paraffina e dai pellet ottenuti dalle tre linee cellulari HA22T/VGH, HepG2 ed Hep3B, seguendo le istruzioni riportate nel protocollo del Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Dai campioni inclusi in paraffina è stata opportunamente rimossa la paraffina incubando le sezioni in 1 ml di xilene per 10 minuti a 56 °C e centrifugando i campioni a temperatura ambiente a 16000 *g* per 5 minuti, ripetendo questo passaggio una seconda volta. Dopo aver eliminato il supernatante, i campioni vengono trattati con etanolo e centrifugati al fine di rimuovere i residui di xilene. Successivamente, l'etanolo aggiunto viene rimosso e fatto evaporare ponendo i campioni a 56 °C per 5 minuti.

I pellet sono stati, quindi, risospesi aggiungendo il Buffer ATL e la proteinasi K, sono stati agitati al vortex e incubati overnight a 56 °C. Questo passaggio favorisce la lisi dei tessuti.

I campioni vengono trattati con Buffer AL incubati a 70 °C per 10 minuti e, dopo l'aggiunta di etanolo, vengono agitati al vortex e trasferiti in colonnine. Si aggiungono 500 µl di Buffer AW1 e si centrifugare a 6000 *g* per 1 minuto, scartare il tubo che contiene il filtrato e mettere la colonna in un nuovo tubo da 2 ml. Si aggiungono 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare a 20,000 *g* per 3 minuti.

Si scarta il tubo che contiene il filtrato e si mette la colonnina in un tubo nuovo a centrifugare nuovamente per 1 minuto per eliminare eventuali residui del buffer AW2. Si trasferisce la colonnina in un tubo da 1,5 ml e si scarta il tubo che contiene il filtrato. Si aggiungono 200 µl di Buffer AE a temperatura ambiente per 20 minuti e si recupera il DNA per centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto. L'eluato viene conservato a 4°C. Il DNA estratto è stato in seguito quantizzato tramite lettura spettrofotometrica a 260 nm, e

valutato l'indice di purezza calcolando il rapporto tra il valore dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e quello alla lunghezza d'onda di 280 nm ($A_{260/280}$), che deve essere compreso tra 1.7-1.9.

Saggi di Metilazione: conversione DNA con sodio bisolfito ed MSP

(Methylation-specific PCR)

Lo stato di metilazione di una sequenza di DNA può essere determinato usando il sodio bisolfito. L'incubazione del DNA target con questo sale, infatti, determina la conversione dei residui non metilati di citosina in uracile mentre lascia invariati i residui metilati.

Il primo passaggio di questa procedura prevede l'aggiunta di Bisolfito mix a 500ng di DNA precedentemente ottenuto da cellule e tessuti paraffinati , ed una quota di DNA Protect Buffer il quale contiene un indicatore che ci consente di stabilire se il pH della soluzione è idoneo per la reazione con il bisolfito, seguendo il protocollo dell' EpiTect Plus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen) .

A questo punto, per favorire la reazione di conversione del DNA ad opera del bisolfito, i campioni così preparati vengono sottoposti ad uno specifico programma di PCR :

Step	Tempo	Temperatura
Denaturazione	5 min	95 °C
Incubazione	25 min	60 °C
Denaturazione	5 min	95 °C
Incubazione	85 min	60 °C
Denaturazione	5 min	95 °C
Incubazione	175 min	60 °C

Una volta completata la conversione, i campioni vengono centrifugati e trasferiti in tubi puliti da 1,5 ml. Dopo l'aggiunta di Buffer BL ed etanolo, i campioni vengono posti in colonnine e centrifugati a 8000 rpm per 1 min e 30 sec, eliminando il filtrato.

Per la purificazione del DNA, i campioni vengono trattati con differenti buffer e sottoposti a successive centrifugazioni, con l'eliminazione dei filtrati ottenuti.

Questa procedura può essere così schematizzata:

- Aggiunta del Buffer BW e centrifugazione a 8000 rpm per 1 min
- Aggiunta del Buffer BD, incubazione per 15 min a temperatura ambiente e centrifugazione a 8000 rpm per 1 min
- Aggiunta del Buffer BW e centrifugazione a 8000 rpm per 1 min
- Aggiunta del Buffer BW e centrifugazione a 8000 rpm per 1 min
- Aggiunta di etanolo (100%) e centrifugazione a 8000 rpm per 1 min

Per l'eluizione del DNA le colonnine vengono poste in tubi puliti e i campioni vengono trattati con Buffer EB, incubando per 5 min a temperatura ambiente. Infine, si esegue un'ultima centrifugazione a 12000 rpm per 1 min, ottenendo così il DNA di nostro interesse nell'eluato.

Il DNA si conserva a 4°C se la reazione di PCR viene effettuata dopo 24 ore dalla conversione altrimenti viene conservato a -20°C. La reazione di PCR contiene 250ng di DNA in un volume finale di 50µl contenenti 0.2µM di ciascun primer, 200µM di dNTP, 5µl di 10X PCR Buffer, 1.5 µl di MgCl₂ (1.5 mM), 0.2µl di Taq DNA Polymerase (Invitrogen). La reazione consiste in una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguita da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 1 minuto, annealing per 1 minuto a 52°C, estensione a 72°C per 1 minuto. Le sequenze dei primer usati per distinguere il DNA metilato (prodotto di PCR di 204 bp) da quello non metilato (prodotto di PCR di 205 bp), sono le seguenti:

Unmethylated

5'-TTTAGTGATATTTTTGAGATATGA-3'

3'-CACTCCCTAACCTCTAATTAACCAA-5'

Methylated

5'-TTTAGCGATATTTTTGAGATACGA-3'

3'-GCTCCCTAACCTCTAATTAACCG-5'

I prodotti della PCR (10 µl per campione) sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 3% per verificare l'avvenuta amplificazione e per paragonare l'intensità e la presenza delle bande.

RISULTATI

Analisi dei livelli di RNA messaggero di YY1, YY1AP, survivina e RKIP mediante RT-PCR

Abbiamo valutato mediante RT-PCR l'espressione a livello di RNA messaggero del fattore di trascrizione YY1, del suo coattivatore YY1AP, del fattore antiapoptotico survivina e, infine, dell'inibitore di Raf-1 chinasi, RKIP, in 35 campioni di carcinoma epatocellulare, nei corrispettivi tessuti peritumorali cirrotici e in 6 campioni di tessuto epatico sano.

I risultati ottenuti (Figura 4) hanno mostrato che in tutti i 35 tessuti tumorali esaminati, i livelli dell'RNA messaggero di YY1, YY1AP e survivina risultano aumentati rispetto ai corrispettivi tessuti adiacenti non tumorali, mentre quelli di RKIP sono significativamente ridotti (in tutti i gradi, G1, G2 e G3).

Il confronto con i risultati ottenuti da 6 tessuti epatici sani (Figura 4) ha mostrato che i livelli di RNA messaggero di YY1 sono risultati essere significativamente ridotti nei tessuti non tumorali adiacenti al tumore (in tutti i gradi), mentre nel tessuto tumorale di qualsiasi grado non si sono osservate variazioni significative. Inoltre, è stata osservata una riduzione significativa dei livelli di RNA messaggero di RKIP, riscontrata in tutti i gradi di malattia tumorale, e un aumento di quelli di YY1AP (in tutti i gradi; degno di nota il fatto che YY1AP non sia stato riscontrato nei tessuti sani) e di quelli della survivina.

I livelli di espressione di tali fattori sono stati messi in relazione anche con alcune caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, riportate in Tabella 4. Tuttavia non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa, dato presumibilmente imputabile al numero ancora limitato di campioni studiati.

Tabella 4. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti

Età	≤ 67y: 21	> 67y: 14		
Sesso	Maschi: 25	Femmine: 10		
Infezione virale	HCV: 32	HBV: 3		
Stadio tumorale	pT1: 21	pT2: 12	pT3: 2	
Grado di Edmonson-Steiner	I: 12	II: 18	III: 5	
Numero noduli	1: 24	> 1: 11		
Classe di Child-Pugh	A: 30	B: 3	C: 2	
Classificazione BCLC	A: 35	B: 0	C: 0	D: 0

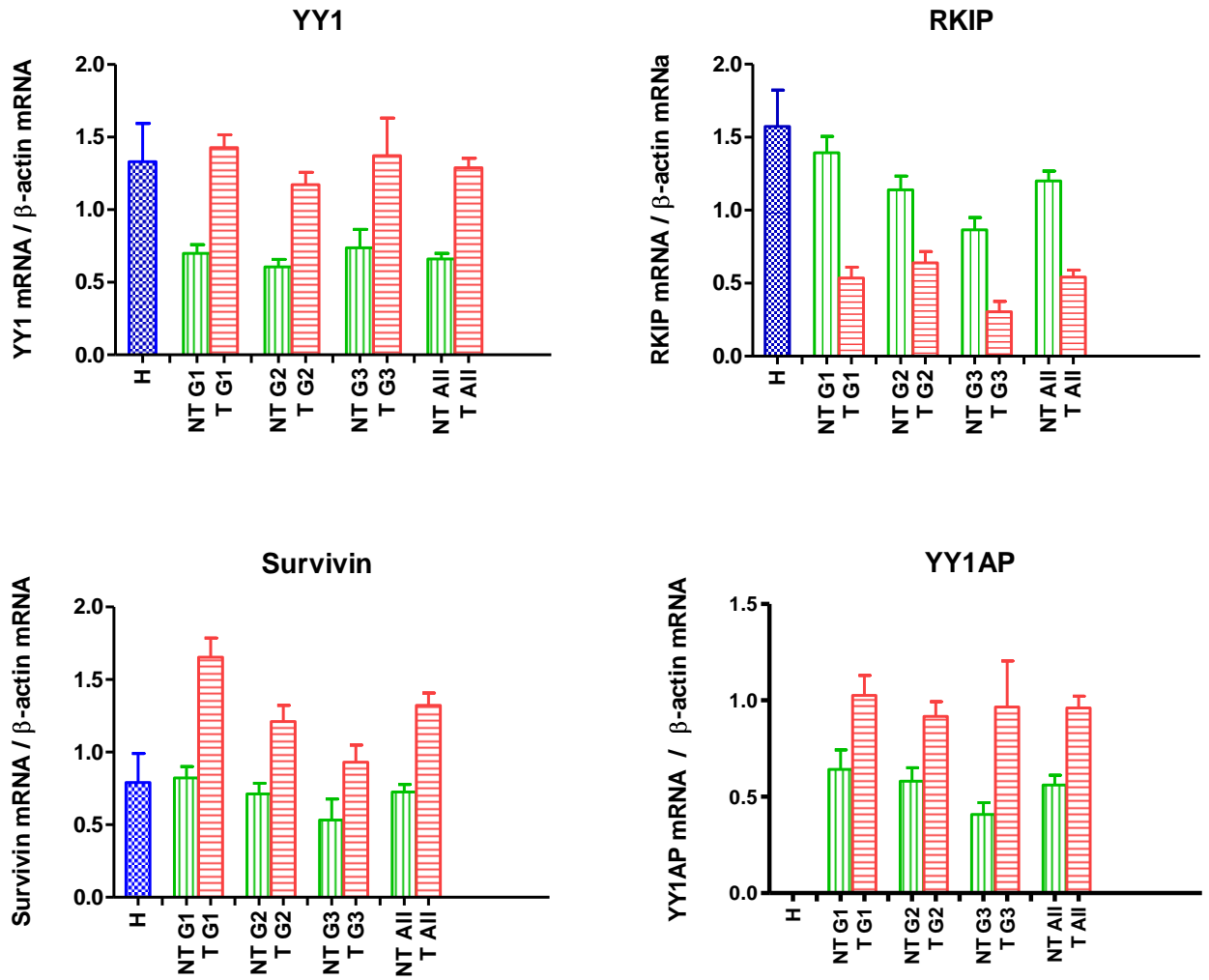


Figura 4. Analisi dell'espressione dell'RNA messaggero di YY1, RKIP, survivina e YY1AP nei tessuti tumorali di HCC (T), nei tessuti adiacenti cirrotici (NT) e nei tessuti epatici (H). I dati sono espressi come unità arbitrarie (mRNA/mRNA β-actina) e sono le medie ± la deviazione standard.

Analisi dei livelli proteici di YY1, survivina e RKIP mediante immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica di RKIP, YY1 e survivina è stata effettuata in 31 dei 35 tumori; i risultati sono presentati in Figura 5.

L'espressione di RKIP è risultata ridotta in 21 (68%) dei tessuti tumorali: in 4 (12.9%) da debolmente positivo (W) a negativo (N), in 2 (6.5%) da positivo (P) a N e in 15 (48.4%) da P a W, aumentata in 1 (3.3%) da W a P e immutata negli altri casi (29%), comparata al corrispettivo tessuto non tumorale.

Per quanto riguarda YY1, la sua espressione è risultata aumentata in 24 (77.5%) dei campioni tumorali: in 6 (19.4%) da N a P, in 8 (25,8%) da N a W e in 10 (32,3%) da W a P, e immutata negli altri casi (22.7%), sempre in comparazione ai corrispettivi tessuti non tumorali.

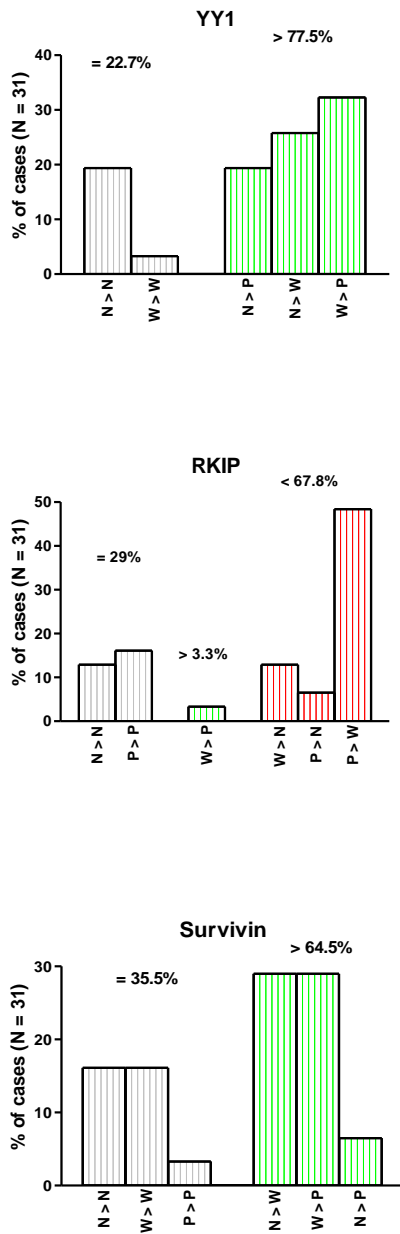
L'espressione di survivina è risultata aumentata in 20 (64.5%) dei campioni tumorali: in 9 (29%) da N a W, in 9 (29%) da W a P e in 2 (6.5%) da N a P, e immutata negli altri casi (35.5%).

In conclusione, i risultati sull'analisi dei livelli di espressione proteica di RKIP, YY1 e survivina, seguono sostanzialmente, anche se non completamente, quelli riguardanti i livelli dell'espressione dell'RNA messaggero.

Riguardo alla localizzazione subcellulare, RKIP è risultato sempre citoplasmatico nei campioni W o P, sia nei campioni tumorali sia nei peritumorali (Figura 5 B). YY1 sembra avere sempre una localizzazione nucleare, accompagnata da un'espressione a livello della membrana cellulare in alcuni campioni tumorali W o P (Figura 5 B). La survivina è risultata

una localizzazione sempre citoplasmatica, associata anche ad un'espressione nucleare in alcuni campioni tumorali W o P (Figura 5 B).

A



B

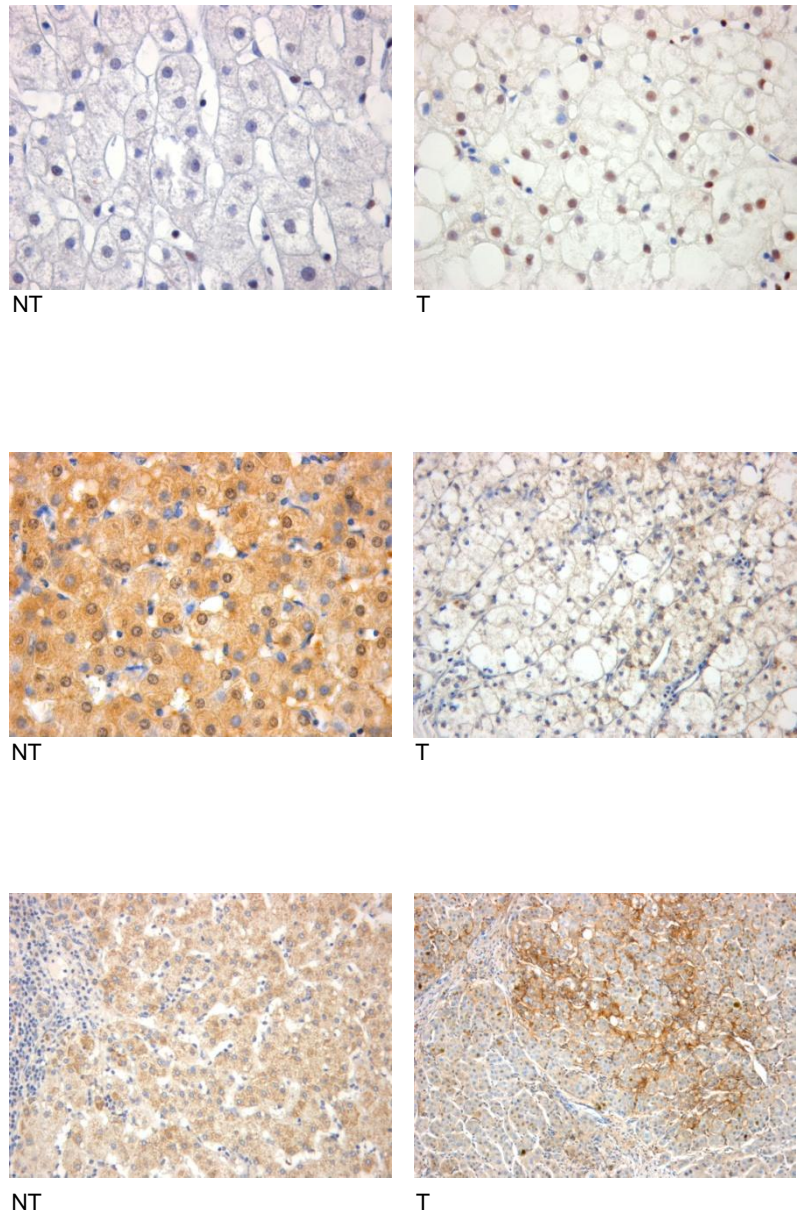


Figura 5. (A) Analisi immunohistochemica dell'espressione di RKIP, YY1 e survivina. La colorazione per le proteine è indicata come negativa (N), debolmente positiva (W) o positiva (P), utilizzando uno score sia per l'area sia per l'intensità della colorazione. **(B)** Esempi rappresentativi di tessuti tumorali e non tumorali immunocolorati con anticorpi specifici (marroni) e controcolorati con ematossilina (blu), (ingrandimento 40X).

Livelli di espressione di RKIP in linee cellulari e campioni clinici di HCC

I risultati precedenti avevano messo in evidenza una significativa riduzione dei livelli di RKIP nei tessuti tumorali rispetto ai cirrotici.

Sulla base di tali evidenze osservate nel modello "ex-vivo", abbiamo valutato i livelli di espressione basale di RKIP anche in vitro in tre diverse linee cellulari di HCC: HA22T/VGH, HepG2 ed Hep3B.

In figura 6B sono mostrati i livelli di espressione della proteina RKIP, saggiati tramite Western Blotting, dove si evidenzia un livello inferiore della proteina nella linea HA22T/VGH rispetto alle altre due linee cellulari (HepG2 1.902 ± 0.17 , Hep3B 0.911 ± 0.11 , HA22T/VGH 0.181 ± 0.07). I livelli di espressione dell'RNA messaggero di RKIP, valutati mediante RT-PCR, sulle tre linee cellulari, non hanno mostrato differenze particolarmente significative, anche se un livello inferiore del 20% circa è stato osservato nella linea HA22T/VGH rispetto alle altre due linee cellulari. (HA22T/VGH 0.831 ± 0.02 , HepG2 1.101 ± 0.02 , Hep3B 1.069 ± 0.04) (Fig.6A). I dati sono espressi come rapporto tra i livelli di espressione di RKIP e quelli della β -actina e costituiscono la media di due esperimenti separati \pm S.E.

Sulla base dei pochi dati esistenti in letteratura in merito alla regolazione negativa di RKIP nell'HCC e delle nostre evidenze sperimentali, abbiamo voluto analizzare alcuni possibili meccanismi di regolazione genica che potrebbero determinare la riduzione di RKIP osservata sia in vitro che nei tessuti tumorali. Pertanto tutti gli esperimenti condotti per studiare tali meccanismi sono stati effettuati nelle tre linee cellulari di HCC suddette, che per la loro differente espressione basale di RKIP sono un ottimo modello di studio, e in

cinque campioni tissutali di HCC e nei relativi tessuti cirrotici circostanti scelti tra i 35 analizzati in precedenza.

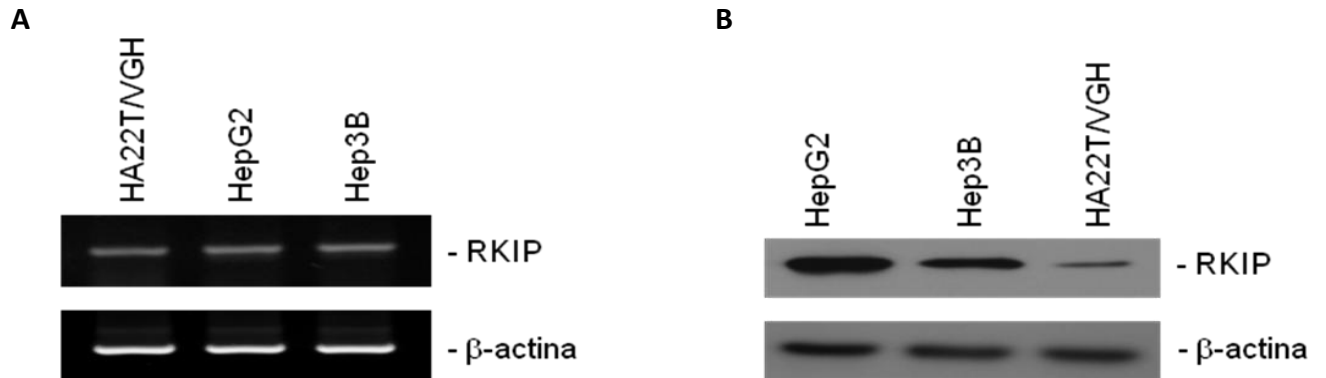


Figura 6: (A) Analisi rappresentativa dei livelli di espressione dell'RNA messaggero di RKIP valutati tramite RT-PCR nelle linee cellulari di HCC indicate; **(B)** Analisi rappresentativa dei livelli di espressione della proteina RKIP valutati tramite Western Blotting nelle stesse linee cellulari. In entrambi i casi l'analisi dei livelli di espressione della β -actina ha consentito la normalizzazione dei dati (vedi testo).

Possibile influenza di meccanismi epigenetici nella regolazione negativa di RKIP

Al fine di valutare se la regolazione negativa del gene codificante per RKIP potesse dipendere da meccanismi di regolazione epigenetici, come la deacetilazione degli istoni o l'ipermetilazione del promotore, abbiamo valutato l'espressione del fattore, sia a livello trascrizionale sia a livello proteico, in seguito a trattamento con un agente che causa inibizione delle deacetilasi istoniche, la tricostatina (TSA). L'analisi, effettuata mediante RT-PCR e Western Blotting, nelle linee cellulari di HCC, HA22T/VGH ed HepG2, non ha mostrato alcun cambiamento significativo dell'espressione, sia del messaggero sia della proteina, di RKIP. Pertanto abbiamo concluso che la downregolazione del gene soppressore di metastasi non sia correlabile ad un processo di deacetilazione istonica.

Abbiamo, quindi, vagliato l'ipotesi che l'ipermetilazione del promotore del gene di RKIP potesse essere responsabile del silenziamento genico. Per testare questa ipotesi, è stato studiato lo stato di metilazione del gene di RKIP sia nelle linee cellulari di HCC sia nei campioni tissutali. Il DNA estratto dalle 3 linee cellulari, HA22T/VGH, HepG2 ed Hep3B, e da 5 campioni di tessuto tumorale e tessuto cirrotico circostante inclusi in paraffina, è stato sottoposto ad una MSP (Methylation Specific PCR), descritta nei Materiali e Metodi. Come si osserva in figura 7, soltanto nella linea cellulare Hep3B si evidenzia una parziale metilazione. Per escludere che l'espressione di RKIP in tale modello cellulare dipendesse dalla ipermetilazione osservata, seppure moderata, le cellule Hep3B sono state esposte a differenti concentrazioni (1, 5, 10 e 20 μ M) dell'agente demetilante 5-AZA-deossicitidina per 72 ore, sostituendo il terreno di coltura con terreno fresco contenente il farmaco ogni 24 ore. Dopo trattamento farmacologico, abbiamo estratto il DNA per valutare il

cambiamento dello stato di metilazione mediante analisi MSP, l'RNA e le proteine per analizzare l'eventuale variazione dei livelli, rispettivamente, di mRNA e proteici di RKIP. Come mostrato in figura 8 A, i livelli della forma non metilata aumentano in maniera dose dipendente (quasi del 50% alla concentrazione di 20 μ M) rispetto al controllo, mentre i livelli della forma metilata diminuiscono in maniera dose dipendente rispetto al controllo (più del 50% alla concentrazione di 20 μ M). In figura 8 B sono mostrati i livelli di espressione dell'mRNA di RKIP, valutati per RT-PCR; l'espressione di RKIP a livello trascrizionale aumenta rispetto al controllo del 36% soltanto alla dose più alta, 20 μ M (Hep3B 0.811 ± 0.01 , Hep3B + 5-AZA 5 μ M 0.878 ± 0.11 , Hep3B + 5-AZA 20 μ M 1.271 ± 0.08); tale risultato suggerisce che probabilmente la parziale metilazione del promotore di RKIP può contribuire alla downregolazione del gene ma certamente non è l'unico fattore responsabile della regolazione negativa di RKIP osservata nell'HCC. D'altronde, come mostra la figura 8 C, i livelli di espressione della proteina RKIP saggiati tramite Western Blotting, dopo medesimo trattamento farmacologico, rimangono invariati (Hep3B 1.217 ± 0.19 , Hep3B + 5-AZA 5 μ M 0.910 ± 0.01 , Hep3B + 5-AZA 20 μ M 0.950 ± 0.14). I dati sono espressi come rapporto tra i livelli di espressione di RKIP e quelli della β -actina e costituiscono la media di due esperimenti separati \pm S.E.

Nei campioni tumorali non si è osservato alcun cambiamento dei livelli di metilazione rispetto ai corrispettivi tessuti cirrotici circostanti; in particolare, il gene risulta essere ipometilato.

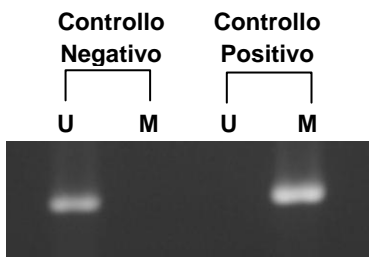
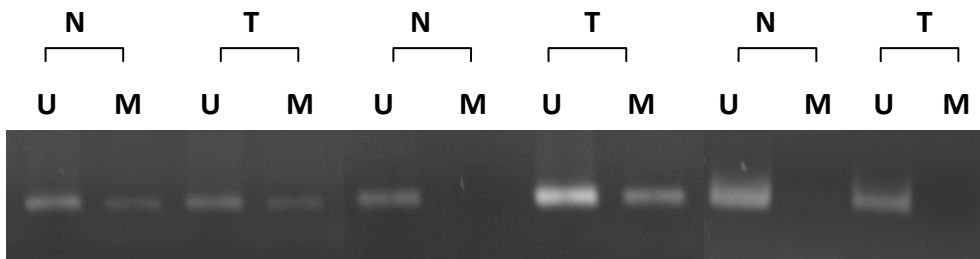
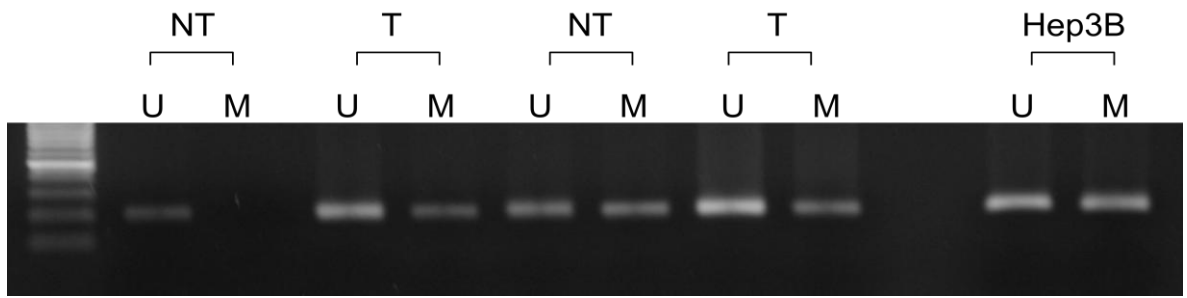


Figura 7: Valutazione dello stato di metilazione del gene RKIP nei tessuti tumorali (T), nei corrispettivi tessuti cirrotici (NT) e nella linea cellulare di epatocarcinoma Hep3B.

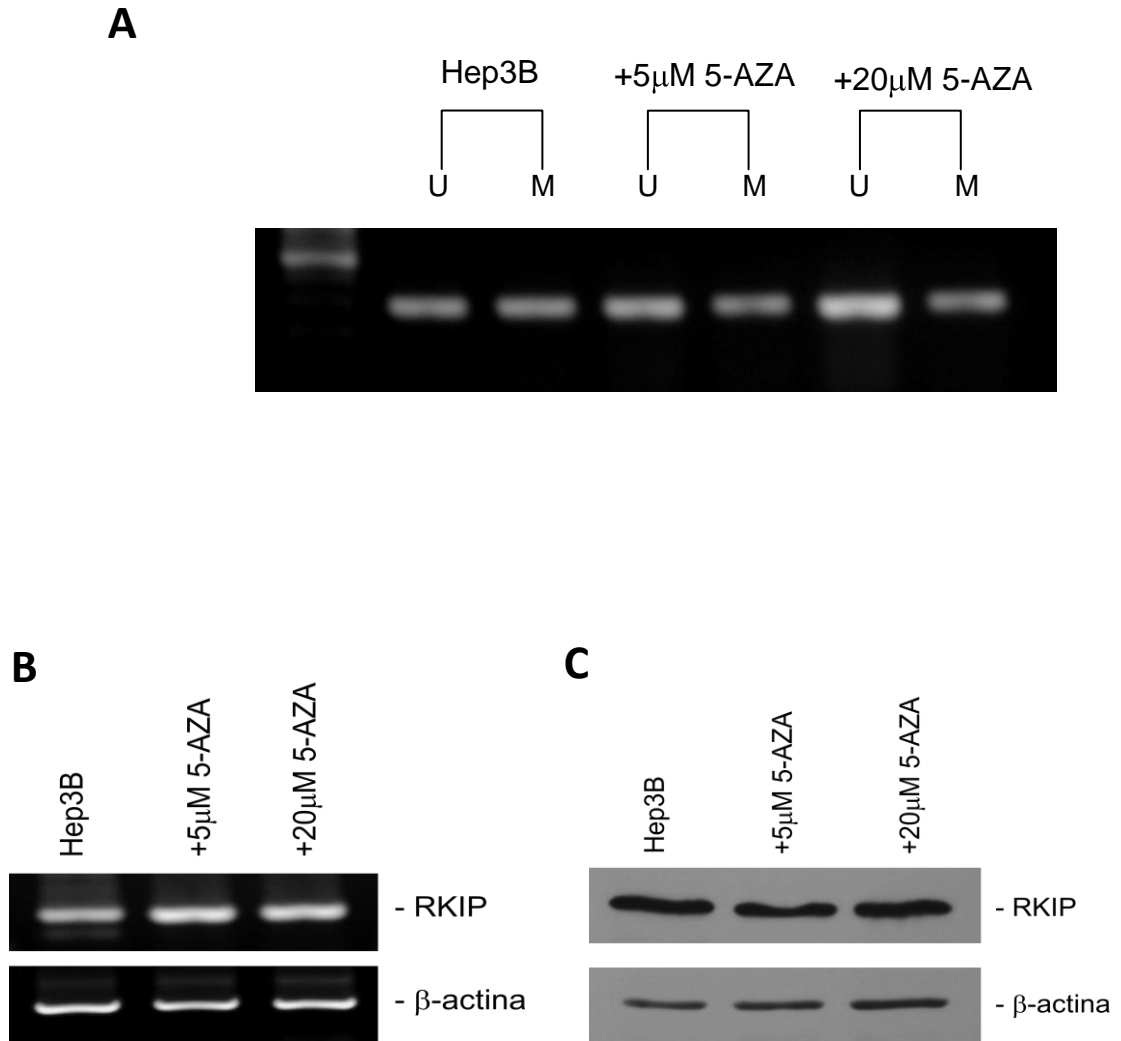


Figura 8: **(A)** Valutazione dello stato di metilazione del gene RKIP nella linea cellulare Hep3B dopo trattamento con l'agente demetilante 5-AZA alla concentrazione di 5 e 20 μ M; **(B)** Analisi rappresentativa dei livelli di espressione dell'RNA messaggero e **(C)** dei livelli di espressione della proteina RKIP valutati, rispettivamente tramite RT-PCR e Western Blotting nella linea cellulare Hep3B esposta a differenti concentrazioni di 5-AZA (5 e 20 μ M). In entrambi i casi l'analisi dei livelli di espressione della β -actina ha consentito la normalizzazione dei dati (vedi testo).

Possibili regolatori negativi della trascrizione di RKIP

Sulla base delle evidenze sperimentali descritte in altri modelli di neoplasia, come quella della prostata, abbiamo voluto studiare se anche nell'HCC la downregolazione di RKIP potesse dipendere dall'esistenza di repressori della trascrizione, come ad esempio Snail.

I livelli di espressione del mRNA del gene codificante per Snail (figura 9A), valutati mediante RT-PCR, non variano nelle 3 linee cellulari HA22T/VGH, HepG2 ed Hep3B (HA22T/VGH 0.920 ± 0.05 , HepG2 1.126 ± 0.07 , Hep3B 0.944 ± 0.11) ; il saggio Western Blotting (figura 9B) ha mostrato una differente espressione della proteina Snail nei 3 modelli analizzati, in particolare sembra essere alta nella linea HepG2 e molto bassa nelle altre due linee cellulari, Hep3B e HA22T/VGH. Tali risultati, ancora preliminari, indicherebbero, comunque, che non c'è una correlazione tra l'espressione di Snail e quella di RKIP nei modelli cellulari utilizzati. Ulteriori indagini sono necessarie per valutare con certezza il ruolo di Snail nell'HCC e indagare su possibili altri fattori di trascrizione negativi responsabili della ridotta espressione di RKIP nel tumore.

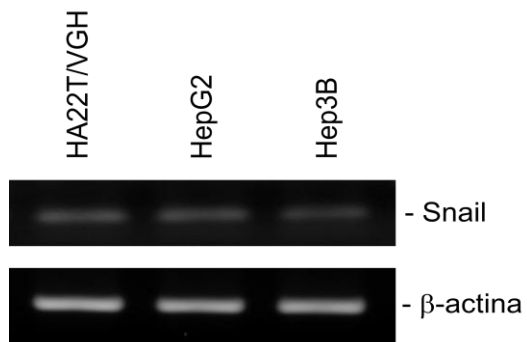
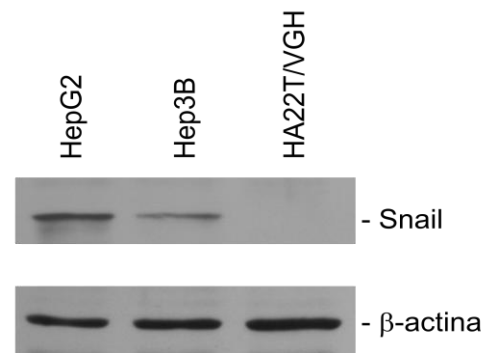
A**B**

Figura 9: (A) Analisi rappresentativa dei livelli di espressione dell'RNA messaggero di Snail valutati tramite RT-PCR nelle linee cellulari di HCC indicate; **(B)** Analisi rappresentativa dei livelli di espressione della proteina Snail valutati tramite Western Blotting nelle stesse linee cellulari. In entrambi i casi l'analisi dei livelli di espressione della β -actina ha consentito la normalizzazione dei dati (vedi testo).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli obiettivi della presente tesi sono stati quelli di indagare sul ruolo che alcuni fattori potrebbero avere nella tumorigenesi del carcinoma epatocellulare. In particolare, si è trattato del fattore di trascrizione YY1 e dell'inibitore di Raf-1 chinasi, RKIP. Infatti, tali proteine sono emerse, di recente, come probabili fattori prognostici in diversi tipi tumorali. Nell'HCC, YY1 e RKIP non sono mai stati analizzati contemporaneamente, mentre sembra ipotizzabile un legame diretto tra i due (71). Evidenze sperimentali, inoltre, indicano un rapporto comune con NF- κ B (44), che, d'altronde, risulta essere frequentemente sovraespresso nell'epatocarcinoma e fortemente implicato nella traiettoria che dall'epatite cronica conduce al carcinoma epatocellulare (99-101), così come già ampiamente discusso.

Appare interessante investigare sulla possibile correlazione tra il pattern di espressione delle molecole miRNA nell'HCC e i livelli di espressione di YY1 e RKIP. È stato riportato, infatti, che nel rhabdomyosarcoma, il microRNA 29b/c, che funziona come soppressore tumorale, è silenziato mediante meccanismi epigenetici, in seguito all'attivazione della via NF- κ B-YY1. Lo stesso miRNA 29c risulta essere frequentemente downregolato nell'epatocarcinoma (102, 103).

I risultati del nostro lavoro hanno mostrato che la riduzione dei livelli di RNA messaggero di RKIP e l'incremento di quelli di YY1 e survivina si riscontrano in tutti i campioni di HCC esaminati, comparati ai corrispettivi tessuti adiacenti cirrotici. L'analisi immunohistochimica ha mostrato, in un'alta percentuale dei campioni esaminati, un andamento simile nell'espressione dei fattori anche a livello proteico. Appaiono, dunque, necessarie ulteriori ricerche per meglio definire le implicazioni funzionali e prognostiche,

nonché i meccanismi responsabili di tali frequenti modificazioni di YY1 e RKIP negli HCC clinici.

In un precedente lavoro, altri autori avevano già osservato una sovraespressione significativa di YY1, valutata mediante immunohistochimica, nei campioni di HCC rispetto ai corrispettivi tessuti cirrotici. Inoltre, la localizzazione nucleare di YY1 nelle cellule tumorali, risultata più alta nei gradi II e III che nel grado I, aveva suggerito la sua attività trascrizionale (69). Nei nostri campioni la localizzazione di YY1 è sempre nucleare e soltanto in un terzo dei campioni tumorali si riscontra anche un'espressione a livello della membrana cellulare. Ulteriori studi sono, quindi, necessari per meglio comprendere se la localizzazione di YY1 a livello della membrana cellulare che osserviamo in alcuni campioni tumorali rappresenti l'alterazione di una funzione del fattore nell'HCC e, dunque, correlabile ai meccanismi di progressione tumorale. D'altra parte, i nostri dati sui tessuti di fegato sani indicano un'evoluzione complessa di YY1 nell'HCC, dal momento che l'espressione del messaggero di YY1 è significativamente aumentata rispetto ai tessuti peritumorali, ma non significativamente differente da quella dei tessuti sani.

Tuttavia, i livelli di espressione tumorale del messaggero di YY1AP, del quale si conosce unicamente una funzione come co-attivatore di YY1 (104, 86), sono risultati significativamente aumentati rispetto sia ai tessuti circostanti sia ai tessuti sani, suggerendo che YY1 possa iperfunzionare, almeno come attivatore trascrizionale, negli HCC. In particolare, l'RNA messaggero di YY1AP non è stato trovato nei tessuti sani.

Appare interessante il fatto che YY1AP sia una variante splicing di HCCA2 (hepatocellular carcinoma associated gene 2), un gene normalmente non espresso nel tessuto epatico

normale, ma abbondantemente presente nei tessuti di HCC (67, 105). Va detto che sui meccanismi di regolazione dell'espressione di YY1AP ancora si conosce poco.

I nostri risultati sulla survivina sono in linea con quelli ottenuti in precedenza, anche da altri gruppi, che hanno mostrato come questa proteina inibitrice dell'apoptosi, sia a livello di RNA messaggero sia a livello di proteina, risulti sovraespressa negli HCC, in comparazione ai corrispettivi tessuti adiacenti non tumorali. Alti livelli di survivina possono essere associati a fenotipi tumorali più aggressivi ed a scarsa prognosi (107, 108, 109, 110). L'espressione di survivina può essere aumentata da diversi fattori molecolari, incluso NF- κ B (111, 112). La survivina potrebbe rappresentare anche un possibile target dell'attivazione trascrizionale mediata da YY1, attraverso l'interazione fisica di YY1 con il fattore di trascrizione Sp1, che regola il promotore del gene codificante per la survivina (113, 114).

Per quanto riguarda RKIP, alcuni lavori precedenti hanno valutato la sua espressione del carcinoma epatocellulare in comparazione ai circostanti tessuti non tumorali, osservando una downregolazione del messaggero di RKIP in 4 dei 6 campioni tumorali analizzati, e della proteina in 12 dei 15 campioni tumorali studiati (80). Sulla base di indagini su linee cellulari di HCC, gli autori hanno escluso che, in contrasto a osservazioni sul carcinoma del colon-retto (83, 79), fenomeni di perdita, mutazione o ipermetilazione del gene codificante per RKIP, possano spiegare la downregolazione del fattore nei tessuti di HCC e suggeriscono che tale processo possa essere dovuto all'alterazione dell'espressione trascrizionale.

Considerando i nostri dati sul messaggero di RKIP, possiamo condividere tale punto di vista. Dal momento che, come già discusso, il gene codificante per RKIP potrebbe essere

sotto il controllo di YY1, si potrebbe ipotizzare che la perdita di RKIP sia direttamente correlata alla sovraregolazione di YY1.

In un altro studio, l'espressione di RKIP, valutata mediante immunohistochimica, è stata osservata in 14 dei 17 tessuti peritumorali, ma soltanto in 2 dei 17 corrispettivi tessuti di HCC; però i livelli del messaggero di RKIP, valutati negli stessi 17 campioni di HCC, sono risultati diminuiti solo in 7, mentre sono risultati aumentati in 8 e immutati in 2. Gli autori hanno suggerito, quindi, che alcune delle differenze osservate nei livelli della proteina RKIP possano dipendere da meccanismi post-trascrizionali ancora da investigare (75). Entrambi gli ultimi studi (80, 75) hanno indicato che nell'HCC la perdita di RKIP è comunque sempre associata all'attivazione della via di ERK/MAPK.

Complessivamente, in base alle nostre osservazioni, si può concludere che l'alterazione dell'equilibrio fra YY1 e RKIP accompagna frequentemente la progressione dalla cirrosi al carcinoma epatocellulare, e, in particolare, si manifesta costantemente a livello di RNA messaggero; appare, quindi, fondamentale approfondire questo nuovo aspetto molecolare dell'HCC al fine di comprendere se YY1 e RKIP e, soprattutto il loro rapporto, possano rappresentare un possibile bersaglio di interventi terapeutici mirati.

Numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo di RKIP nella soppressione della crescita tumorale e delle metastasi sia nell'epatocarcinoma che in altri tipi di neoplasie; tuttavia non sono ancora stati definiti i meccanismi di regolazione negativa di questo fattore. Studi precedenti, condotti presso il laboratorio di ricerca dove ho svolto la mia tesi ed in accordo con altri autori hanno dimostrato che nell'HCC la downregolazione di RKIP è un evento che frequentemente accompagna la progressione da cirrosi a tumore (100).

Infatti, era stata osservata la contemporanea riduzione dei livelli della proteina e dell'mRNA di RKIP nei tessuti tumorali rispetto ai corrispettivi tessuti cirrotici.

Abbiamo, quindi, ritenuto opportuno valutare l'espressione basale di RKIP, sia a livello trascrizionale sia a livello proteico nelle tre diverse linee di HCC (HA22T/VGH, HepG2 ed Hep3B).

La linea HA22T/VGH ha mostrato livelli notevolmente inferiori della proteina rispetto alle altre due linee cellulari, mentre i livelli di espressione dell'RNA messaggero risultano piuttosto simili nelle tre linee cellulari; questa differente espressione basale di RKIP le rende perciò un ottimo modello di studio. Tali dati complessivamente indicherebbero l'esistenza di meccanismi di regolazione negativa di RKIP differenti e possibilmente attuati sia in fase trascrizionale che post-trascrizionale.

Alterazioni della metilazione sono state trovate più spesso in vari tipi di tessuti neoplastici rispetto ai tessuti normali ed una metilazione aberrante è stata implicata nella tumorigenesi; in particolare, una ipermetilazione aberrante del promotore di geni soppressori del tumore può contribuire alla formazione e alla progressione del cancro. Questo inappropriato silenziamento genico interessa virtualmente ogni fase della progressione tumorale, per esempio la metilazione del promotore di RKIP è considerato il meccanismo più importante di silenziamento della sua espressione nel carcinoma del colon-retto (83).

La regolazione negativa di un gene può anche essere causata da altre alterazioni dei meccanismi di regolazione epigenetici; il trattamento delle tre linee cellulari di HCC con Tricostatina, agente che inibisce le deacetilasi istoniche, non ha prodotto alcun aumento nell'espressione di RKIP, che abbiamo valutato a livello trascrizionale e proteico. Abbiamo

studiato, quindi, lo stato di metilazione del promotore del gene RKIP nelle linee cellulari di HCC e nei campioni tissutali; in questi, rispetto ai corrispettivi tessuti cirrotici il gene è risultato ipometilato, e poiché soltanto la linea cellulare Hep3B mostrava una moderata metilazione del promotore, abbiamo analizzato l'effetto di un agente demetilante, 5- Aza-deossicitidina, sull'espressione del messaggero e della proteina di RKIP. In effetti, l'agente, che provocava un aumento della forma non metilata contestualmente ad una diminuzione di quella metilata in maniera dose-dipendente, causava un modesto aumento dell'RNA messaggero di RKIP solo alla dose più alta, e nessun cambiamento significativo dell'espressione proteica. Ne abbiamo dedotto che, se l'ipermetilazione del promotore di RKIP può contribuire alla downregolazione di questo gene, non è certamente l'unico meccanismo coinvolto. D'altronde i nostri risultati sembrano essere parzialmente in linea con quelli ottenuti da altri autori sia in modelli cellulari di HCC che in altri tipi di neoplasie (80, 88).

Infine, abbiamo voluto investigare se anche nell'HCC la downregolazione di RKIP potesse dipendere dall'esistenza di repressori trascrizionali, come ad esempio Snail, appartenente alla famiglia delle proteine zinc-finger e modulatore chiave del processo normale e tumorale di transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Uno dei fattori di regolazione di Snail sembra essere YY1 (98). Beach et al., hanno presentato delle evidenze su come RKIP sia un altro bersaglio di Snail nel tumore prostatico avanzato; hanno osservato una significativa correlazione negativa tra l'espressione di Snail e RKIP in linee cellulari di carcinoma prostatico. Hanno, inoltre, dimostrato che aumentando o riducendo l'espressione di Snail, si poteva modulare l'espressione di RKIP e che Snail poteva reprimere il promotore di RKIP in vitro.

L'analisi dell'espressione di Snail nelle tre linee cellulari di HCC, valutata a livello trascrizionale e proteico, non indicherebbe, una correlazione tra l'espressione di Snail e quella di RKIP nell'epatocarcinoma.

Alla luce di queste evidenze, appare chiaro come ulteriori analisi siano necessarie per investigare possibili altri meccanismi non ancora del tutto definiti e per individuare quali siano effettivamente quelli responsabili della regolazione negativa di RKIP. Tutto ciò condurrebbe non solo al riconoscimento di un importante nuovo fattore di prognosi nell'HCC, ma aprirebbe nuove strade per possibili interventi terapeutici finalizzati all'aumento di RKIP.

BIBLIOGRAFIA

1. Wong CM and Ng IO, Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Liver International* 2008 February; 28 (2): 160-74.
2. El-Seraq HB and Rudolph KL, Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis, *Gastroenterology* 2007 June; 132 (7): 2557-76.
3. Mendez-Sanchez N, Vasquez- Fernandez F, Zamora-Valdes D and Uribe M, Sorafenib, a systemic therapy for hepatocellular carcinoma, *Annals of Hepatology* 2008 Jan-March; 7 (1): 46-51.
4. Bruix J, Boix L, Sala M and Llovet JM, Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell* 2004 Mar; 5 (3): 215-9.
5. Llovet JM, Burrough SA And Bruix J, Hepatocellular carcinoma, *Lancet* 2003; 362: 1907-1917.
6. Manuale di Virologia Medica
7. Ierardi E, Rosania R, Zotti M, Giorgio F, Prencipe S, Della Valle N, De Francesco V and Panella C, From chronic liver disorders to hepatocellular carcinoma: molecular and genetic pathway, *World J Gastrointestinal Oncology* 2010 June 15; 2 (6): 259-261.
8. Blonski W, Kotlyar DS and Forde KA, Non viral causes of hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterology* 2010 August; 16 (29): 3603-3615.
9. Testino G and Borro P, Alcohol and gastrointestinal oncology, *World J Gastrointestinal Oncology* 2010 August; 2 (8): 322-325.
10. Seitz HK, Stickel F and Homann N, Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract in alcoholics, *International J Cancer* 2004 Feb; 108 (4): 483-7.

11. Oyagbem AA, Azeez OI and Saba AB, Hepatocellular carcinoma and Underlying mechanisms, *African Health Sciences* 2010 March; 10 (1): 93-98.
12. Abotel-Hamid NM, Recent insights on risk factors of HCC, *World J Hepatology* 2009 October; 1 (1): 3-7.
13. Herath NI, Leqqett BA and MacDonald GA, Review of genetic and epigenetic alterations of hepatocarcinogenesis, *J Gastroenterology Hepatol* 2006 January; 21 (1 Pt 1): 15-21.
14. Aravalli RN, Clifford JS and Gressman ENK, Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 2008 December; 48 (6): 2047-63.
15. Levrero M. Meccanismi molecolari e patogenesi dell'epatocarcinoma. V Seminario di aggiornamento sull'epatite da virus HCV e nuovi virus potenzialmente epatitici: diagnosi, epidemiologia, prevenzione e terapia. Istituto Superiore di Sanità. 2000, 83-93.
16. G. K. Abou-Alfa, F. D. Huitzil-Mendelez, E. M. O'Reilly, L. B. Saltz. Current management of advanced hepatocellular carcinoma. *Gastrointestinal Cancer Research* 2008, 2: 64-70.
17. Maeda S, NF- κ B, JNK and TLR Signaling Pathways in Hepatocarcinogenesis, *Gastroenterology Research and Practice* 2010; 2010: 367694.
18. Herath NI, Leqqett BA and MacDonald GA, Review of genetic and epigenetic alterations of hepatocarcinogenesis, *J Gastroenterology Hepatol* 2006 January; 21 (1 Pt 1): 15-21.
19. Aravalli RN, Clifford JS and Gressman ENK, Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 2008 December; 48 (6): 2047-63.

20. Jain S, Singhal CS, Lee P and Xu R, Molecular genetics of Hepatocellular neoplasia, *American Journal of Translation Research* 2010 January; 2 (1): 105-18.
21. Fabregat I, Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells — *World J Gastroenterol* 2009 February; 15 (5): 513-520.
22. Chang F, Steelman LS, Shelton JG,Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA and McCubrey JA, Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targetin for therapeutic intervention, *Leukemia* 2003 Jul; 17 (7): 1263-93.
23. C. Augello, L. Caruso, M. Maggioni, M. Donadon, M. Montorsi, R. Santambrogio, G. Torzilli, V. Vaira, C. Pellegrini, M. Roncalli, G. Coggi, S. Bosari. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significante in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2009, 9: 125.
24. Chang LS, Shi Y, Shenk T. Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol* 1989, 63: 3479-3488.
25. Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 1991, 67: 377-388.
26. Park K, Atchinson ML. Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 9804-9808.

27. Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, Gleason SL, Driggers PH, Levi BZ, Appella E, Ozato K. Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol Cell Biol* 1992, 12: 38-44.
28. Guo B, Odgren PR, van Vijnen AJ, Last TJ, Nickerson J, Penman S, Lian JB, Stein JL, Stein GS. The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 10526-10530.
29. Yao YL, Dupont BR, Ghosh S, Fang Y, Leach RJ, Seto E. Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. *Nucleic Acid Res* 1998, 26: 3776-3783.
30. Shi Y, Lee JS, Galvin KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1332: F49-F66.
31. Nguyen N, Zhang X, Olashaw N, Seto E. Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *J Biol Chem* 2004, 279: 25927-25934.
32. Hyde-DeRuyscher, R. P., Jennings, E., and Shenk, T. DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23: 4457-4465.
33. Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E, Shi Y. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol* 1999, 19: 7237-7244.
34. Kurisaki K, Kurisaki A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, Ten Dijke P, Heldin CH, Ericsson J, Moustakas A. Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* 2003, 23: 4494-4510.

35. Oei SL, Shi Y. Poly(ADP-ribosylation) of transcription factor Yin Yang 1 under conditions of DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2001a, 285: 27–31.
36. Oei SL, Shi Y. Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly(ADP-ribosylation) and DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* 2001b, 284: 450–454.
37. McNeil S, Guo B, Stein JL, Lian JB, Bushmeyer S, Seto E, Atchison ML, Penman S, van Wijnen AJ, Stein GS. Targeting of the YY1 transcription factor to the nucleolus and the nuclear matrix in situ: the C-terminus is a principal determinant for nuclear trafficking. *J Cell Biochem* 1998, 68: 500–510.
38. Palko L, Bass HW, Beyrouthy MJ, Hurt MM. The Yin Yang-1 (YY1) protein undergoes a DNA-replication-associated switch in localization from the cytoplasm to the nucleus at the onset of S phase. *J Cell Sci* 2004, 117: 465–476.
39. Thomas MJ, Seto E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 1999, 236: 197-208.
40. Sepulveda MA, Emelyanov AV, Birshtein BK. NF-kappa B and Oct-2 synergize to activate the human 3' Igh hs4 enhancer in B cells. *J Immunol* 2004, 172: 1054–1064.
41. Lu SY, Rodriguez M, Liao WS. YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and is antagonized by NF-kappa B during acute-phase response. *Mol Cell Biol* 1994, 14: 6253–6263.
42. Huang NE, Lin CH, Lin YS, Yu WC. Modulation of YY1 activity by SAP30. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 306: 267–275.
43. Weill L, Shestakova E, Bonnefoy E. Transcription factor YY1 binds to the murine beta interferon promoter and regulates its transcriptional capacity with a dual activator/repressor role. *J Virol* 2003, 77: 2903–2914.

44. Lee HY, Chaudhary J, Walsh GL, Hong WK, Kurie JM. Suppression of c-Fos gene transcription with malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Oncogene* 1998, 16: 3039–3046.
45. Kim J, Shapiro DJ. In simple synthetic promoters YY1-induced DNA bending is important in transcription activation and repression. *Nucleic Acids Res* 1996, 24: 4341–4348.
46. Wang CY, Liang YJ, Lin YS, Shih HM, Jou YS, Yu WC. YY1AP, a novel co-activator of YY1. *J Biol Chem* 2004, 279: 17750–17755.
47. Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 2004, 24: 7260–7274.
48. Yakovleva T, Kolesnikova L, Vukojevic V, Gileva I, Tan-No K, Austen M, Lüscher B, Ekström TJ, Terenius L, Bakalkin G. YY1 binding to a subset of p53 DNA-target sites regulates p53-dependent transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 318: 615–624.
49. Sui G, Affar el B, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR, Shi Y. Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 2004, 117: 859–872.

50. Gronroos E, Terentiev AA, Punga T, Ericsson J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101: 12165–12170.
51. Nayak BK, Das BR. Differential binding of NF1 transcription factor to P53 gene promoter and its depletion in human breast tumours. *Mol Biol Rep* 1999, 26: 223–230.
52. Nayak BK, Das GM. Stabilization of p53 and transactivation of its target genes in response to replication blockade. *Oncogene* 2002, 21: 7226–7229.
53. Riggs KJ, Saleque S, Wong KK, Merrell KT, Lee JS, Shi Y, Calame K. Yin-yang 1 activates the c-myc promoter. *Mol Cell Biol* 1993, 13: 7487–7495.
54. Shrivastava A, Yu J, Artandi S, Calame K. YY1 and c-Myc associate in vivo in a manner that depends on c-Myc levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 10638–10641.
55. Austen M, Cerni C, Luscher-Firzlaff JM, Luscher B. YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation domain nor direct interaction with c-Myc. *Oncogene* 1998, 17: 511–520.
56. Parija T, Das BR. Involvement of YY1 and its correlation with c-myc in NDEA induced hepatocarcinogenesis, its prevention by d-limonene. *Mol Biol Rep* 2003, 30: 41–46.
57. Petkova V, Romanowski MJ, Suljoadikusumo I, Rohne D, Kang P, Shenk T, Usheva A. Interaction between YY1 and the retinoblastoma protein. Regulation of cell cycle progression in differentiated cells. *J Biol Chem* 2001, 276: 7932–7936.

58. Guo B, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. ATF1 and CREB trans-activate a cell cycle regulated histone H4 gene at a distal nuclear matrix associated promoter element. *Biochemistry* 1997, 36: 14447–14455.
59. Chan YJ, Chiou CJ, Huang Q, Hayward GS. Synergistic interactions between overlapping binding sites for the serum response factor and ELK-1 proteins mediate both basal enhancement and phorbol ester responsiveness of primate cytomegalovirus major immediate-early promoters in monocyte and T-lymphocyte cell types. *J Virol* 1996, 70: 8590–8605.
60. Ye J, Ghosh P, Cippitelli M, Subleski J, Hardy KJ, Ortaldo JR, Young HA. Characterization of a silencer regulatory element in the human interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 1994, 269: 25728–25734.
61. Garban HJ, Bonavida B. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 2001, 167: 75–81.
62. Hongo F, Garban H, Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi A, Mizutani Y, Bonavida B. Nitric oxide decreases the transcription repressor activity of Yin-Yang 1 (YY1) via S-nitrosylation: Role in the immunosensitization of tumor cells to apoptosis. *Proceedings of the AACR*. Washington, DC, 2004, Vol. 45.
63. Vega M, Huerta-Yepez S, Jazirehi A, Garban H, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene* 2005, 24: 8114-27.

64. Vega M, Jazirehi A, Huerta-Yepez S, Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol* 2005, 175: 2174–2183.
65. Huerta-Yepez S, Vega M, Escoto-Chavez SE, Murdock B, Garban H, Sakai T, Bonavida B. Regulation of the TRAIL receptor DR5 expression by the transcription repressor Yin Yang 1 (YY1). *Proceedings of the AACR*. Anaheim, CA, 2005, Vol. 46.
66. Sitwala KV, Adams K, Markovitz DM. YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter. *Oncogene* 2002, 21: 8862–8870.
67. Wang ZX, Wang HY, Wu MC. Identification and characterization of a novel hepatocellular carcinoma-associated gene. *Br J Cancer* 2001, 85: 1162–1167.
68. Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia* 2004, 6: 744–750.
69. Huerta-Yepez S, Vega M, Hernandez-Cueto A, Sanchez-Arellano B, Gordon S, Mizutani Y, Seligson D, Bonavida B. Nuclear expression of the transcription factor yin yang 1 (YY1) in hepatocellular carcinoma (HCC): prognostic significance. *Proceedings of the AACR* Washington, DC, 2006, Vol. 47.
70. Yeung K, Seitz T, Li S, Janoschk P, McFerrank B, Kaiser C, Feek F, Katsanakisk KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM and Kolch W, Suppression of Raf-1 Kinase Activity and MAPK signaling By RKIP, *Nature* 1999 Sep; 401 (6749): 173-177.

71. Odabaei G, Chatterjee D, Jazirehi AR, Goodglick L, Yeung K and Bonavida B, Raf-1 Kinase Inhibitor Protein: structure, function, regulation of cell signaling and pivotal role in apoptosis, *Adv Cancer Res.* 2004, 91:169-200.
72. Keller ET, Fu Z and Brennan M, The role of Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) in health and disease - *Biochemical Pharmacology* 2004 Sep; 68 (6): 1049–53.
73. Granovsky AE and Rich Rosner M, Raf Kinase Inhibitor Protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor, *Cell Research* 2008; 18: 452-457.
74. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yarros D, Gustafsson M, Chatterjee D, McFerran B, Wyche J, Kolch W and Sedivy JM, Raf Kinase Inhibitor Protein interacts with NF-KappaB inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-KappaB activation, *Molecular and Cellular Biology* 2001 November; 21 (21): 7207-17.
75. Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR and Kim M, Loss of Raf Kinase Inhibitor Protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells, *Gastroenterology* 2006 October; 131 (4): 1208-17.
76. Xu YF, Yi Y, Qiu SJ, Gao Q, Li YW, Dai CX, Cai MY, Ju MJ, Zhou J, Zhang BH and Fan J, PEBP1 downregulation is associated to poor prognosis in HCC related to Hepatitis B infection, *Journal of Hepatology* 2010 November; 53 (5): 872-879.
77. Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagawa Y, Keller ET, Sedivy JM and Yeung KM, RKIP Sensitizes Prostate and Breast Cancer Cells to Drug-Induced Apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry* 2004 April; 279 (17): 17515-23.

78. Li HZ, Wang Y, Gao Y, Shao J, Zhao XL, Deng WM, Liu YX, Yang J and Yao Z, Effects of Raf Kinase Inhibitor Protein Expression on Metastasis and Progression of Human Epithelial Ovarian Cancer, *Mol Cancer Res* 2008 June; 6: 917-928.
79. Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, Bitar MS, George SS, Going, Garcia JJ, Scott L, Fyfe M, Murray GI and Kolch W, Raf Kinase Inhibitor Protein Expression in a Survival Analysis of Colorectal Cancer Patients, *Journal of Clinical Oncology* 2006 December; 24 (36): 5672:79.
80. Schuierer MM, Bataille F, Weiss TS, Hellerbrand C and Bosserhoff AK, Raf Kinase Inhibitor Protein is downregulated in hepatocellular carcinoma, *Oncology Reports* 2006 September; 16 (3): 451-6.
81. Bonavida B and Baritaki S, Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: downregulation of the NFkb/Snail/ γ Y1/rkip circuitry, *Nitric Oxide* 2011 January; 24 (1): 1-7.
82. Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z and Keller ET, Effects of Raf Kinase Inhibitor Protein expression on suppression of prostate cancer metastasis, *Journal of National Cancer Institute* 2003 June; 95 (12): 878-89.
83. Minoo P, Zlobec I, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR and Lugli A Loss of Raf-1 Kinase inhibitor Protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer, *American J Clin Pathol* 2007 May; 127 (5): 820-7.
84. Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, Oien K and Ferrier R, Reduction of Raf 1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis, *Clin Cancer Res* 2005 October; 11 (20): 7392-97.

85. Jazirehi AR and Bonavida B, Cellular and Molecular Signal Transduction pathways modulated by Rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non Hodgkin's lymphoma: implications in chemiosensitization and therapeutic intervention, *Oncogene* 2005 March; 24 (13): 2121-43.
86. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L and Bonavida B, Inhibition of the Raf-MEK $\frac{1}{2}$ - ERK $\frac{1}{2}$ signaling pathway Bcl-xL downregulation and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab, *Cancer Research* 2004 October; 64 (19): 7117-26.
87. Chatterjee D, Bay Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagawa Y, Keller ET, Sedivy JM and Yeung KC, RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry* 2004 April; 279 (17): 17515-23.
88. Beach S, Tang H, Park S, Dhillon AS, Keller ET, Kolch W and Yeung KC, Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells, *Oncogene* 2008 April; 27 (15): 2243-48.
89. Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi AR, Garban H, Hongo F and Cheng G, Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF- κ B and inhibition of Bcl-xL expression, *Oncogene* 2004 June; 23 (29): 4993-5003.
90. Notarbartolo M, Giannitrapani L, Vivona N, Poma P, Labbozzetta M, Florena AM, Porcasi R, Muggeo VMR, Sandonato L, Cervello M, Montalto G and D'Alessandro N,

- Frequent Alteration of the Yin Yang 1/ Raf 1 Kinase Inhibitory Protein Ratio in Hepatocellular Carcinoma, *OMICS* 2011 May; 15 (5): 267-72.
91. McKillop IH, Moran DM, Jin X and Koniaris LG, Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Journal of Surgical Research* 2006 November; 136 (1): 125-135.
92. Abou-Alfa GK, Hutzil-Melendez FD, O'Reilly EM and Saltz LB, Current management of advanced hepatocellular carcinoma, *Gastrointestinal Cancer Research* 2008 March; 2 (2): 64-70.
93. Zhu AX, Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should will be?, *The Oncologist* 2006 July-August; 11 (7): 790-800.
94. Zhu AX, Development of Sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma– *Cancer* 2008 January; 112 (2): 250-9.
95. Keating GM and Santoro A, Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma, *Drugs* 2009; 69 (2): 223-40.
96. Takimoto CH and Awada A, Safety and anti-tumor activity of Sorafenib (nevarax) in combination with other anti-cancer agents: a review of clinical trials, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2008 April; 61 (4): 535-48.
97. Kenji Okita, Noriyuki Matsukawa, Mina Maki, Hideka Nakazawa, Eiichi Katada, Manabu Hattori, Hiroyasu Akatsu, Cesario V. Borlongan and Kosei Ojika, Analysis of DNA variations in promoter region of HCNP gene with Alzheimer's disease, *Biochemical e biophysical research communications* 2009 February; 379 (2): 272-276.

98. Palmer MB, Majumder P, Cooper JC, Yoon H, Wade PA, Boss JM, Ying Yang 1 regulates the expression of Snail through a distal enhancer, *Mol Cancer Res* 2009;7(2):221–9.
99. Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B, Bernuau D. activation of NF- κ B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2002, 37: 63-71.
100. Chiao PJ, Na R, Niu J, Sclabas GM, Dong Q, Curley SA. Role of Rel/NF- κ B transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer* 2002, 95: 1696-1705.
101. Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, downregulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res.* 2009, 69: 1135-42.
102. Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2008, 14: 369-81.
103. Vainer GW, Pikarsky E, Ban-Neriah Y. Contradictory functions of NF-kB in liver physiology and cancer. *Cancer Lett* 2008, 267: 182-188.
104. T. Ohtomo, T. Horii, M. Nomizu, T. Suga, J. Yamada. Molecular cloning of a structural homolog of YY1AP, a coactivator of the multifunctional transcription factor YY1. *Amino Acids* 2007, 33: 645-652.
105. Li L, Shi Y, Wu H, Wan B, Li P, Zhou L, Shi H, Huo K. Hepatocellular carcinoma-associated gene 2 interacts with MAD2L2. *Mol Cell Biochem* 2007, 304: 297-304.

106. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi N, Treon SP, Anderson KC. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002, 99: 4079-86.
107. A. C. Fields, G. Cotsonis, D. Sexton, R. Santoianni, C. Cohen. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Modern Pathology* 2004, 17: 1378-1385.
108. Notarbartolo M, Cervello M, Giannitrapani L, Meli M, Poma P, Dusonchet L, Montalto G, D'Alessandro N. Expression of the IAPs (Inhibitory of Apoptosis Proteins) and of their alternative splice variants in hepatocellular carcinoma tissues and cells. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 2004, 1028: 289- 293.
109. Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, Santambrogio R, Spinelli A, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007, 54: 2040-4.
110. Chau GY, Lee AF, Tsay SH, Ke YR, Kao HL, Wong FH, Tsou AP, Chau YP. Clinicopathological significance of survivin expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2007, 51: 204-18.
111. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi N, Treon SP, Anderson KC. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002, 99: 4079-86.
112. Kawakami H, Tomita M, Matsuda T, Ohta T, Tanaka Y, Fujii M, Hatano M, Tokuhisa T, Mori N. Transcriptional activation of survivin through the NF- κ B pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer* 2005, 116: 967-74.

113. Lee JS, Galvin KM, Shi Y. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 6145-9.
114. Xu R, Zhang P, Huang J, Ge S, Lu J, Qian G. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 356: 286-92.