



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana

CURRICULUM IN ONCOLOGIA MOLECOLARE

Responsabile di Curriculum: Prof.ssa Rosa Maria Pascale

XXX CICLO

MECCANISMI DI REGOLAZIONE POST-TRADUZIONALE DEL

GENE YAP NEL CORSO DELL'EPATOCANCEROGENESI

Coordinatore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof.ssa Rosa Maria Pascale

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Antonella Maria Morette

Co-tutor:

Prof.ssa Maria Maddalena Simile

Anno Accademico 2016 – 2017

INDICE

1	INTRODUZIONE	
1.1	Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e fattori di rischio.....	1
2	Meccanismi molecolari dell'epatocancerogenesi.....	6
3	Principali vie di segnale alterate nel corso dell'epatocancerogenesi.....	8
3.1	Via di segnale Wnt/ β -Catenina.....	9
3.2	La via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).....	10
3.3	La via JAK/STAT.....	11
3.4	La via PI3K/AKT/mTOR.....	12
3.5	La via di segnale Notch.....	13
4	La via Hippo/YAP.....	14
4.1	Regolatori della via Hippo.....	16
4.2	Yes Associated Protein(YAP).....	18
4.3	La via Hippo nell'HCC.....	21
4.4	Yap oncogene o oncosoppressore.....	22
5	SCOPO DELLA RICERCA	24
6	MATERIALI E METODI.....	25
6.1	Animali e trattamenti.....	25
6.2	Campioni di tessuto umano.....	26
6.3	Linee cellulari e trattamenti.....	27
6.4	Valutazione della crescita cellulare nelle Huh7, Hep3B, HepG2.....	28
6.5	Valutazione della migrazione e dell'invasività cellulare nelle Huh7.....	29
6.6	Estrazione di proteine da tessuti umani e di ratto.....	29
6.7	Estrazione di RNA e proteine da campioni di cellule, di ratto e umani.....	30
6.8	Sintesi di cDNA e PCR RealTime.....	31
6.9	Western Blotting	32
7	RISULTATI.....	34
8	DISCUSSIONE.....	49
9	BIBLIOGRAFIA.....	51

INTRODUZIONE

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e fattori di rischio

Il Carcinoma epatocellulare (HCC) è un tumore maligno primitivo del fegato, rappresenta l'85-90% dei tumori primari del fegato (1). E' il sesto cancro più comune e la terza causa di morte per tumore al mondo (2). Con un'incidenza di 782.000 nuovi casi e con circa 600.000 morti l'anno, la sua estrema aggressività clinica (risultante in un'aspettativa di vita media di circa sei mesi dal momento della diagnosi) scaturisce in parte dalla sua resistenza agli agenti antitumorali esistenti, in parte dalla mancanza di marcatori che rivelino la presenza della patologia nei suoi primi stadi di sviluppo (1). La distribuzione dell'HCC nel mondo non è geograficamente omogenea, l'incidenza più elevata è stata riscontrata nell'Africa sub-Sahariana dove le infezioni da virus dell'epatite B e C sono endemiche. Nel sud-est asiatico, l'aumento dei casi di HCC è attribuibile al consumo di cibi contaminati dall'Aflatossina B1 (3). L'HCC sembra avere una differenza significativa tra sessi, è da due a otto volte più frequente nell'uomo rispetto alle donne, in relazione all'area geografica, sia nelle aree ad alta che in quelle a bassa incidenza. La sua incidenza aumenta inoltre con l'età, l'HCC raramente compare prima dei 40 anni, ad eccezione delle popolazioni in cui l'infezione da HBV è endemica (2,4). In figura 1 è riportata la distribuzione geografica di HCC nel mondo.

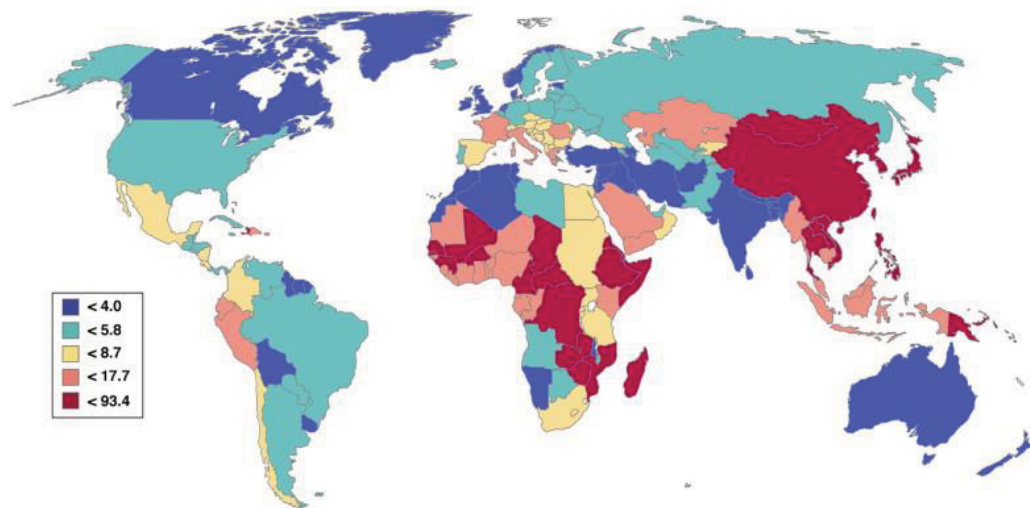


Figura 1. Rappresentazione della distribuzione dell'HCC nel mondo

L'HCC non si sviluppa in tutti gli individui a rischio, suggerendo la presenza contemporanea di vari fattori eziologici, compresa la componente genetica. Si potrebbe quindi ipotizzare nell'uomo l'esistenza di diversi alleli di suscettibilità e di resistenza, che possono determinare un rischio elevato o basso a seconda della loro associazione (5) I fattori di rischio più rilevanti associati all'insorgenza dell'HCC, includono le infezioni virali croniche del fegato dovute al virus dell'epatite B e C, che sono i più comuni virus epatocancerogeni nell'uomo (6). Per quanto riguarda il virus dell'epatite C, allo stato attuale si stima che il numero di persone al mondo che presentano l'infezione sia approssimativamente di 170 milioni (7), nel 60-80% dei casi di HCV cronica, i pazienti sviluppano cirrosi epatica, ma solo il 2,5% sviluppano epatocarcinoma. La cirrosi epatica è un altro fattore di rischio dello sviluppo dell'HCC; è dimostrato che dal 70 al 90% degli HCC hanno origine in un fegato con cirrosi (8) (9). L'HBV e l'HCV contribuiscono all'oncogenesi epatica, giocando un ruolo diretto nella trasformazione maligna attraverso interazioni dirette tra virus e i

componenti cellulari (10). Si è osservato, infatti, che diverse proteine virali interagiscono con cascate di segnale attivanti fattori di crescita, che influenzano processi cellulari come proliferazione, migrazione e apoptosi; tali interazioni hanno come risultato finale la trasformazione maligna del fegato. L'infezione da HBV può promuovere la cancerogenesi attraverso diversi meccanismi. In primo luogo, l'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite può indurre instabilità genomica e la replicazione continua degli epatociti fornisce uno stimolo per la progressione delle lesioni neoplastiche (4,11). In secondo luogo, l'HBV codifica proteine che sono essenziali per il suo ciclo vitale, e altre, la cui funzione non è ancora del tutto chiara, tra queste c'è la proteina HBx che modula la proliferazione cellulare (12). Questa proteina può regolare l'attività di fattori di trascrizione delle cellule ospiti, interferendo nella fase S del ciclo cellulare e causando instabilità genomica e trasformazione. Essa è in grado di legarsi alla proteina p53 (un soppressore tumorale che agisce promuovendo l'apoptosi e inducendo l'arresto del ciclo cellulare in presenza di un danno del DNA o dell'attivazione di un oncogene) e blocca le attività p-53-dipendenti, inclusa l'apoptosi p53-mediata (13). L'attivazione trascrizionale mediata dalla proteina HBx può inoltre alterare l'espressione di geni che controllano la crescita, come le tirosinchinasi MAPK, ERK, JNK e altri geni. Al fine di combattere l'infezione virale, l'organismo agisce con una forte risposta immunitaria da parte di Linfociti T, evento che favorisce a sua volta la cancerogenesi, in quanto contribuisce alla necrosi, all'infiammazione e alla conseguente rigenerazione degli epatociti. (14,15). L'infezione cronica da parte del virus dell'epatite B è stata riportata

da vari autori come il maggiore fattore di rischio di HCC in tutto il mondo. Tuttavia, popolazioni con prevalenza simile di HBV, hanno una diversa incidenza di HCC. Questa osservazione epidemiologica suggerisce la presenza di altri importanti fattori di rischio. L'assunzione di più di 50-70 grammi di alcool al giorno per un periodo prolungato, è un fattore di rischio noto (16). Il meccanismo col quale l'alcool induce danno epatico è complesso e multifattoriale (17). L'esposizione cronica all'etanolo induce danno, in quanto nel fegato l'alcool viene ossidato ad acetaldeide, un metabolita tossico, che alimenta cicli di distruzione e rigenerazione, attivazione delle cellule stellate, cirrosi e infine HCC. La perossidazione lipidica indotta dall'acetaldeide può generare autoantigeni, che diventano bersaglio dei linfociti T, i quali possono dar luogo a danno cronico del fegato fino ad arrivare alla cirrosi (18). L'ingestione prolungata di alimenti contaminati dall'Aflatossina B1 è un altro fattore di rischio. L'Aflatossina B1 (AFB1) è il maggior metabolita prodotta dal fungo *Aspergillus Flavus*, che cresce in una varietà di alimenti conservati in ambienti umidi (12). L'AFB1 induce una specifica mutazione di p53, che consiste nella sostituzione di un nucleotide nel codone 249 del gene di p53. Questa mutazione è presente in più del 50% dei pazienti con HCC che provengono da zone dove si fa continuo uso di cibi contaminati da AFB1, per contro, questa mutazione è assente nei paesi che provengono da regioni con una bassa esposizione a tale tossina (19). Tuttavia, anche altri importanti fattori contribuiscono all'aumento dell'insorgenza dell'HCC, tra questi vi è l'obesità, il diabete e la steatopatie non alcolica (NASH). Nei pazienti obesi le citochine prodotte dagli adipociti possono portare a un profilo lipidico

anomalo, e un indice di massa corporea superiore a $30\text{kg}/\text{m}^2$ potrebbe aumentare il rischio di HCC. Nel diabete mellito di tipo 2, l'iperinsulinemia e la produzione del fattore di crescita insulino-simile (IGF-1), in concomitanza con altri fattori, come l'epatite o il consumo di alcool, possono contribuire allo sviluppo dell'HCC. Inoltre, l'insulino-resistenza fa sì che l'insulina non sia capace di sopprimere la produzione di glucosio e ciò accelera l'epatocancerogenesi promuovendo la proliferazione cellulare, inibendo l'apoptosi e stimolando la neo-vascolarizzazione epatica (20). Oltre ai più comuni fattori eziologici, ne sono stati individuati altri che comprendono malattie metaboliche ereditarie come l'emocromatosi, la carenza di antitripsina α -1, il morbo di Wilson, che possono evolvere a cirrosi ed eventualmente ad HCC (12). Nonostante l'ampia diffusione dell'HCC, il suo trattamento rappresenta ancora una dura sfida (21). In caso di malattia ai suoi primi stadi di sviluppo, la resezione chirurgica rappresenta un effettivo approccio terapeutico, così come trattamenti di radiofrequenza. Un'opzione alternativa è fornita dal trapianto di fegato, ma solo nei pazienti che presentano particolari requisiti (22). Se la malattia viene diagnosticata ad uno stadio avanzato, come avviene perlopiù, le opzioni di trattamento sono molto limitate, inoltre non hanno effetto significativo sulla prognosi, ma sono solo in grado di aumentare la sopravvivenza media dei pazienti di pochi mesi. Il Sorafenib, un inibitore multichinasi, è l'unico farmaco approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento sistemico dell'HCC in stadio avanzato, ed è in grado di incrementare la sopravvivenza media da 7,9 a 10,7 mesi in pazienti con HCC non resecabile (23,24). Questo composto inibisce la proliferazione delle cellule

neoplastiche e l'angiogenesi tumorale (25). L'attività antineoplastica relativamente scarsa del Sorafenib, è probabilmente dovuta all'attivazione di vie alternative, coinvolte nella sopravvivenza, da parte delle cellule tumorali. In base a queste evidenze cliniche, è pertanto necessario l'individuazione di nuove strategie terapeutiche per il trattamento di questa patologia. Per raggiungere questo obiettivo, è necessaria una migliore caratterizzazione delle vie di segnale coinvolte nell'epatocancerogenesi e l'identificazione di nuovi marcatori prognostici e diagnostici (26).

2. Meccanismi molecolari dell'epatocancerogenesi

La trasformazione neoplastica è un complesso processo multifattoriale dove molte vie di segnale sono alterate (16). Ha origine a partire da cellule staminali epatiche o da epatociti maturi ed evolve da malattie epatiche croniche, causate da agenti quali HBV, HCV, consumo di alcool, ecc (27) Questi cancerogeni, in maniera diretta o indiretta (attraverso lo stress ossidativo che accompagna l'infiammazione epatica), possono determinare danni al DNA delle cellule, compromettere la riparazione e attraverso il persistere di stadi di necro-infiammazione portano a un'intensa rigenerazione, fibrogenesi e cirrosi (Figura 2). Gli HCC sono associati e preceduti da un certo numero di lesioni morfologicamente distinte, che prendono il nome di "lesioni preneoplastiche" le quali includono i foci displastici e i noduli displastici (6). I foci displastici sono lesioni microscopiche, minori di 1mm, e si suddividono in

piccoli foci displastici e in grandi foci displastici. I piccoli foci displastici, sono caratterizzati da epatociti con un volume citoplasmatico diminuito, polimorfismo nucleare e aumentato rapporto nucleo-citoplasma. Si tratta di lesioni altamente proliferanti che vanno incontro a progressive modificazioni del quadro istologico e presentano caratteristiche morfologiche spesso comuni l'epatocarcinoma (28). Altre evidenze che indicano che i piccoli foci displastici sono lesioni precoci dell'HCC, sono il guadagno o la perdita di cromosomi, che sono presenti anche nel tumore ma non nel parenchima circostante (surrounding). I grandi foci displastici presentano un incremento del contenuto di DNA negli epatociti, il che suggerisce che possono essere considerati precursori dell'HCC, ma presentano alcune caratteristiche, come un normale rapporto nucleo-citoplasma, un basso indice proliferativo, un'elevata attività apoptotica, mancanza di aberrazioni genetiche e assenza di un continuum istologico con l'HCC, che mettono in discussione questa ipotesi (29). Lo sviluppo di HCC in un fegato cirrotico è spesso preceduto e accompagnato da lesioni nodulari, i noduli displastici (DN), macroscopicamente riconoscibili. I noduli displastici, sono classificati sulla base di criteri morfologici: di basso grado (LGD) o di alto grado (HGD), hanno caratteristiche istologiche deviate, come l'accumulo di glicogeno e di lipidi e possono evolvere in un periodo di tre-cinque-dieci anni o più, in lesioni maligne sino all'epatocarcinoma. Quest'ultimo acquisisce la capacità di invadere il tessuto circostante ed i vasi, esplicando le proprie potenzialità metastatiche.

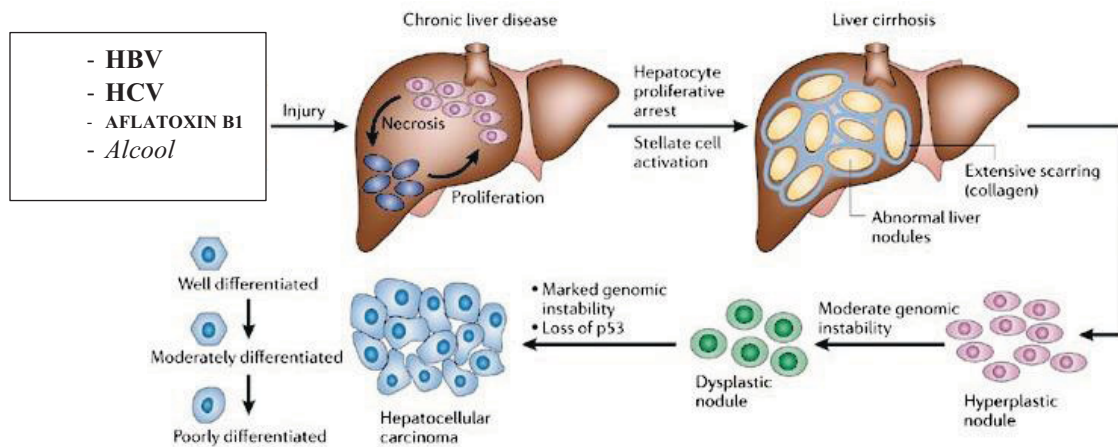


Figura 2. Sequenza cronologica delle alterazioni istopatologiche che conducono ad HCC nell'uomo.

In seguito a lesioni epatiche sostenute da uno o diversi fattori, si ha necrosi, seguita da proliferazione degli epatociti. Cicli continui distruttivo-rigenerativi favoriscono una malattia epatica cronica che culmina nella cirrosi epatica. La cirrosi è caratterizzata da formazioni anomale di noduli epatici circondato da deposizione di collagene e cicatrici del fegato. Successivamente vengono osservati i noduli iperplastici, seguiti da noduli displastici ed infine il carcinoma epatocellulare che può essere ulteriormente classificato in ben differenziato, moderatamente e poco differenziato. I tumori poco differenziati rappresentano la forma più maligna di HCC.

3. Principali vie di segnale alterate nel corso dell'epatocancerogenesi

Gli studi epidemiologici nel corso degli anni, hanno permesso di identificare i principali fattori di rischio associati all'HCC, inoltre, sono stati fatti grandi progressi per capirne la patogenesi (30). Durante l'epatocancerogenesi sono coinvolti due meccanismi patogenetici: cirrosi associata alla rigenerazione epatica in seguito a danni tissutali (causate da infezioni virali, tossine o influenze metaboliche), e mutazioni che si verificano in uno o più oncogeni o geni oncosoppressori. Entrambi i meccanismi, sono collegati ad alterazioni di importanti vie di segnale (31). La comprensione dei meccanismi che alterano queste vie può fornire una potenziale fonte di nuovi bersagli molecolari utili a sviluppare nuove strategie terapeutiche

(32). Di seguito sono riportate le principali vie di segnale alterate nel corso dell'HCC (Figura 3).

3.1. Via di segnale Wnt/ β -Catenina

Circa il 95% dei casi osservati di HCC mostrano una deregolazione della cascata del segnale Wnt/ β -Catenina (33). La via di segnale Wnt/ β -Catenina, gioca un ruolo fondamentale nella proliferazione cellulare, nel differenziamento, nella motilità e nell'apoptosi (30). La "via canonica" Wnt/ β -Catenina descrive una serie di eventi che iniziano con la traslocazione della β -catenina dalla membrana all'interno del nucleo, dove svolge una funzione di co-attivatore della famiglia dei fattori di trascrizione TCF/LEF, i quali a loro volta regolano geni specifici inclusi c-myc, Ciclina D1, COX2 e Survivina (6). Quando la via non è attivata, la β -Catenina è "catturata", fosforilata e ubiquitinata dal "complesso di distruzione" che include il soppressore tumorale "axina", il complesso "Adenomatous polyposis Coli" (APC), GSK3 β , la proteina fosfatasi 2A (PP2A). Quando viene fosforilata, la β -Catenina viene ubiquitinata e va incontro a degradazione proteasomica. Se la proteina Wnt lega i recettori Fz/LRP, il complesso di distruzione è disattivato, la β -catenina si accumula nel citoplasma, trasloca nel nucleo e si lega con TCF/LEF e pertanto la via è attivata (34). Circa l'11-41% delle neoplasie a carico del fegato presentano mutazioni della proteina β -Catenina (26). Le mutazioni della β -Catenina descritte

nell'HCC sono localizzate nell'esone 3 del gene CTNNB1, che è il sito di fosforilazione necessario per l'interazione con GSK3 β , AXINA 1 e 2 (6).

3.2. La via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

La via MAPK gioca un ruolo fondamentale nel controllo di molti processi cellulari come la sopravvivenza e la proliferazione. La cascata inizia con il legame di un ligando (EGFR, IGFR, PDGFR) al recettore di superficie tirosina chinasi (RTK). In seguito a questo legame si ha autofosforilazione del residuo di tirosina sul versante citoplasmatico del recettore RTK, che attiva successivamente Ras. Ras lega BRAF che è responsabile della fosforilazione ed attivazione di MAP2Ks, MEK1 e MEK2, che a loro volta fosforilano e attivano ERK1 e 2. ERK fosforilato va nel nucleo e attiva, tra gli altri, due fattori di trascrizione chiave della famiglia AP-1: c-fos e Jun. Questi due fattori inducono la trascrizione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare e altri processi cellulari (35). Evidenze sperimentali indicano l'importanza della via Ras/Raf/MEK/ERK nella progressione dell'HCC. In più del 50% dei pazienti è stata osservata un'iperespressione di Ras, MEK ed ERK. L'attivazione aberrante della via MAPK/Ras avviene a diversi livelli (36). Una iperegolazione della via porta nell'HCC a un'iperespressione della forma attiva di ERK1/2 (forma fosforilata), con conseguente transattivazione di numerosi geni coinvolti nella proliferazione cellulare (c-JUN, c-FOS, C-MYC, FOXO ed ETS), angiogenesi e glicolisi. E' stato visto che i geni della via MAPK e i suoi bersagli, sono generalmente iperespressi nei foci displastici, nei noduli displastici e

nell'HCC, sia nei roditori che nell'uomo (5). E' stato dimostrato inoltre che RASSF1 e NORE1A membri della famiglia degli inibitori di Ras, sono inattivati nell'HCC (30).

3.3. La via JAK/STAT

La via JAK/STAT è attivata da più di 40 citochine e fattori di crescita ed è coinvolta in molteplici funzioni cellulari come differenziamento, proliferazione e apoptosi. In questa via le citochine inducono la fosforilazione delle Janus tirosin-chinasi (Jak1, 2 e 3, Tyk2) seguita da una fosforilazione delle proteine STAT1-6 (37). Le STAT1-6 entrano nel nucleo e fungono da fattori di trascrizione per geni coinvolti nella proliferazione, differenziamento e apoptosi. Nelle cellule normali, l'attivazione ligando-dipendente delle STAT è transiente, ma nei tumori, queste proteine sono spesso fosforilate in maniera costitutiva e questo è dovuto in parte all'inattivazione di specifici inibitori delle STAT come il soppressore del segnale della citochina (SOCS), il quale normalmente bilancia e "spegne" l'attività delle proteine STAT. E' stato dimostrato che negli HCC la perdita di attivazione degli inibitori delle STAT si traduce in una attivazione costitutiva delle STAT-3 e 5 (aventi attività antiapoptotica e mitogenica) (38).

3.4. La via PI3K/Akt/mTOR

La via PI3K/Akt/mTOR è coinvolta nel controllo della crescita e della proliferazione cellulare ed è stata dimostrata un'attivazione costitutiva di tale via in molti tipi di tumore (39). PI3K (Fosfatidilinositolo-3-chinasi) catalizza la

formazione del fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partire da fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PIP₂). PIP₃ recluta AKT il quale viene fosforilato sulla Thr308 dalla fosfoinositide chinasi dipendente (PDK1). Per la completa attivazione, AKT deve subire un'ulteriore fosforilazione sulla Ser473 da parte di PDK2(40). AKT attivato a sua volta fosforila una serie di proteine citoplasmatiche tra cui, mTOR e BAD. L'attivazione di mTOR si traduce in un aumento della proliferazione cellulare e l'inattivazione di BAD fa diminuire l'apoptosi e aumentare la sopravvivenza. Nei tessuti normali questa via è regolata negativamente dal soppressore tumorale PTEN il quale impedisce la formazione di PIP₃ a partire da PIP₂ e pertanto AKT non può essere fosforilato. La via PI3K/AKT/mTOR può essere iperattivata sotto lo stimolo di recettori tirosin-chinasici in particolare IGF ed EGFR. L'espressione di IGF e del suo recettore è aumentata nell'HCC e nel fegato cirrotico e ciò risulta in un'attivazione della via PI3K/AKT/mTOR (31). Altri meccanismi che attivano questa via di segnalazione nell'HCC sono le mutazioni in PI3K. Una diminuita regolazione di PTEN e aumentata fosforilazione di AKT, sono associati a una prognosi negativa (5).

3.5. La via di segnale Notch

La via di segnalazione Notch è cruciale per lo sviluppo e il differenziamento delle cellule in alcuni organi. Negli esseri umani sono stati identificati quattro recettori Notch (Notch1-4) e due famiglie di ligandi (Jagged (JAG) 1 e 2 e Delta like ligand (Dll) 1,2 e 3). La via Notch consiste nell'attivazione del recettore indotta dal

ligando, taglio proteolitico e successiva traslocazione del dominio Notch intracellulare (NICD) nel nucleo, dove forma un complesso col co-fattore RBP-j e funziona come regolatore trascrizionale di geni bersaglio (41). La via Notch gioca un ruolo cruciale nello sviluppo del fegato e nella formazione del tumore epatico. Questa via di segnale promuove la formazione delle cellule ovali, che sono coinvolte nella patogenesi dell'HCC (42). Nell'HCC la via Notch è attivata. Nel topo, l'espressione costitutiva di NICD nel fegato determina la formazione del tumore (42)

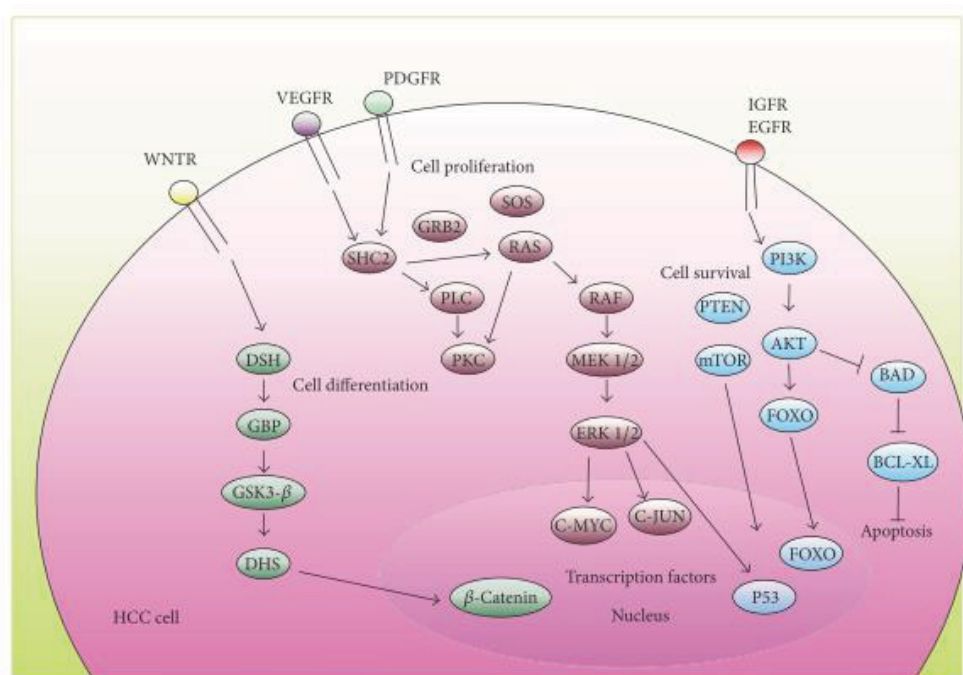


Figura 3. Principali vie di segnale coinvolte nell'HCC

Le vie di trasmissione capaci di attivare la crescita, implicate nel processo di cancerogenesi epatica, sono molto eterogenee se paragonate ad altri tipi tumorali e vengono ampiamente studiate al fine di identificare potenziali biomarcatori, che sono alla base dello sviluppo del tumore. Un'altra via de-

regolata nel corso dell'HCC, è la via di segnalazione Hippo/YAP, che consiste in un'ampia gamma di proteine che controllano la crescita di differenti tessuti durante lo sviluppo e la rigenerazione. I dettagli di questa via, verranno descritti nei prossimi paragrafi.

4. LA VIA HIPPO/YAP

La via di segnale Hippo/YAP regola diversi processi cellulari tra cui sopravvivenza, differenziamento, proliferazione e dimensione degli organi (43). Inizialmente la via Hippo è stata scoperta e studiata in *Drosophila* e traslando questi stessi studi nei mammiferi si è potuto osservare che molti componenti di questa via di segnale sono altamente conservati nel corso dell'evoluzione (44). Nei mammiferi il cuore della via Hippo consiste di chinasi che includono le chinasi Mammalian STE-20 Like (MST1) (MST2) e le Large Tumor Suppressor (LATS1 e LATS2). L'attività di queste chinasi dipende dalla loro interazione con proteine "ponte". La proteina Salvador Homolog 1 (SAV1) forma complessi con MST1 e MST2, mentre le MOB kinase activator 1A (MOB1A) e 1B (MOB1B) interagiscono con LATS1 e LATS2. Quando la via Hippo è attivata MST1/2 attivano LATS1/2 e MOB1A/B mediante fosforilazione. Successivamente, LATS1/2 fosforilano (inattivandoli) YAP e TAZ, i due maggiori effettori di questa via (45) LATS1/2 sono chinasi della famiglia AGC e riconoscono i bersagli con la sequenza consenso HXRXXS. YAP presenta 5 di questi siti, TAZ 4 (46). L'attività di YAP e TAZ è inibita

attraverso due meccanismi che agiscono coordinatamente. In prima istanza, LATS1/2 fosforilano YAP a livello della Ser127 e TAZ nella Ser89. Queste due fosforilazioni creano un sito di legame per la proteina 14-3-3. Quest'ultima sequestra YAP e TAZ nel citoplasma. Successivamente avviene, ad opera della Casein chinasi 1 (CK1), un altro evento di fosforilazione a livello della serina 381 di YAP e della serina 311 di TAZ. Questo evento di fosforilazione addizionale porta alla degradazione della proteina YAP/TAZ (47). Quando la via è inattiva YAP e TAZ non vengono fosforilati e traslocano nel nucleo, si legano col fattore di trascrizione TEAD permettendo la trascrizione di geni associati a segnali proliferativi e di sopravvivenza (48).

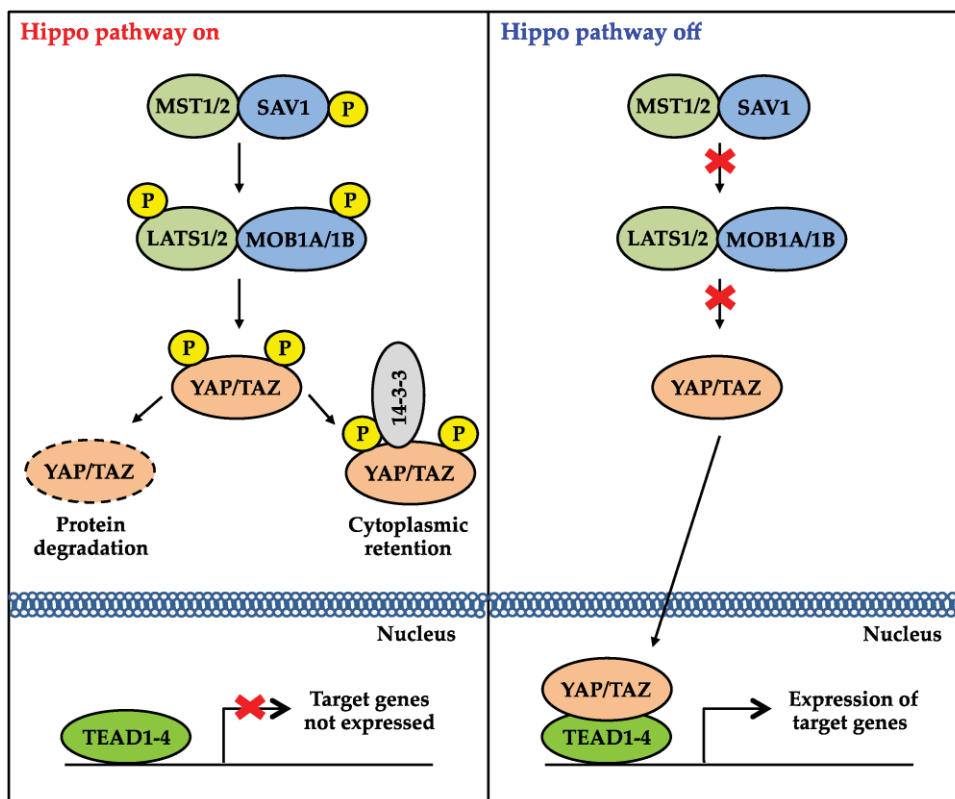


Figura 4. Meccanismo di regolazione della via Hippo

4.1.Regolatori della via Hippo/YAP

Una questione centrale è come YAP/TAZ siano regolati da segnali extracellulari (49). Diversi studi indicano che questa via sembra regolata da una rete di componenti a monte, principalmente coinvolti nella regolazione dell'adesione e della polarità cellulare (Figura 5) (50). Uno dei primi regolatori a monte ad essere stato identificato è stato NF2 (Merlin) (51). Merlin è un importante inibitore della via YAP/TAZ, in un monostrato confluyente di cellule epiteliali di mammifero, *Merlin/NF2*, è localizzato soprattutto in prossimità delle giunzioni strette e delle giunzioni aderenti (49). La proteina Merlin può assumere una conformazione “aperta” o “chiusa” in relazione al suo stato di fosforilazione. Questi cambiamenti conformazionali determinano l'interazione di Merlin con i suoi partner, e sembra che sia la conformazione “chiusa”, ipofosforilata, ad avere l'attività di sopprimere la crescita (52). Merlin interagisce con *Ex* (Expanded), proteina che come Merlin, appartiene alla famiglia delle proteine FERM (famiglia di proteine contenenti domini Ezrina, Radxina, Moesina) e ha attività anch'essa di soppressore tumorale. Un'altra proteina, *Kibra*, interagisce con Merlin ed *Ex* e questa cooperazione risulta in un'attivazione di MST1/2 (46). La normale architettura epiteliale, caratterizzata da giunzioni cellulari e polarità apicobasale è un potente inibitore dell'attività di YAP/TAZ. Meccanicamente, questo è stato collegato alla localizzazione nella membrana di Scribble, un determinante chiave della polarità cellulare. Nella membrana cellulare, Scribble serve come adattatore per le chinasi della

via Hippo, assemblando il complesso MST, LATS,TAZ (49). Un altro regolatore della via è rappresentato dal complesso della famiglia angiomontina (AMOT). Il dominio N-Terminale delle AMOTp130, AMOT-L1, AMOT-L2, interagisce con i domini WW di YAP o TAZ, con conseguente ritenzione di YAP o TAZ nel citoplasma (53). Un'altra proteina che viene considerata come soppressore tumorale, e che svolge un ruolo regolatore della via Hippo è la proteina tirosina fosfatasi PTPN14. PTPN14 esercita la sua funzione attraverso l'interazione con YAP, sequestrandolo nel citoplasma (54). L' α -Catenina regola negativamente YAP formando un complesso con la proteina 14-3-3 che impedisce l'accesso della fosfatasi PP2A per la defosforilazione di YAP a livello delle giunzioni aderenti (55).

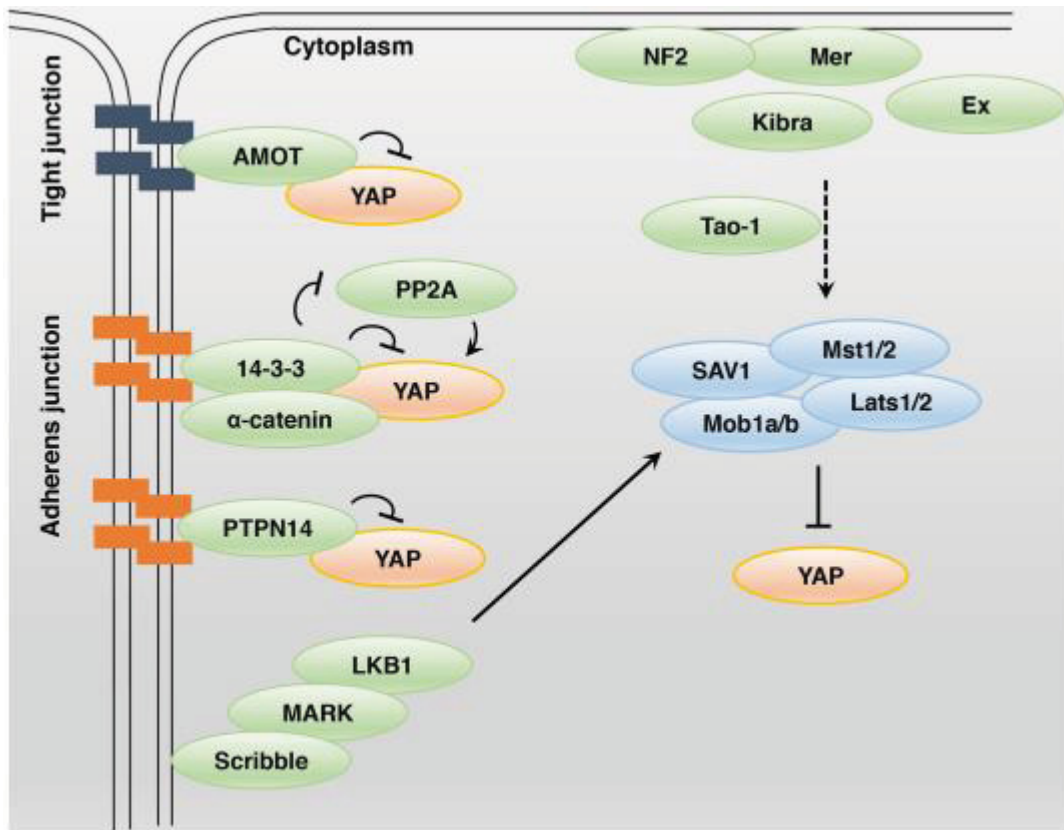


Figura 5. Regolatori della via Hippo/Yap

4.2. Yes Associated Protein (YAP)

La Yes Associated Protein (YAP) è una proteina di 65kD che possiede attività di coattivatore trascrizionale (56). Il gene che codifica YAP1 è localizzato nel cromosoma 11, nella posizione q22 ed è frequentemente amplificato in alcuni tumori umani, tra cui tumori di fegato, mammella, prostata ed esofago. YAP presenta 8 isoforme, derivate da splicing alternativi che sono classificate in due gruppi principali: YAP1-1 (α , β , γ , e δ) e YAP1-2 (α , β , γ , e δ)(57). Il dominio maggiormente distinguibile all'interno di YAP, che conferisce la specificità di

segnale, è il dominio WW, che consiste di due residui di Triptofano, separati da 20-30 aminoacidi. I domini WW all'interno di YAP, riconoscono un motivo PPxY, che si trova in una varietà di proteine, molte delle quali controllano la stabilità e la localizzazione di YAP. YAP possiede anche un motivo C-terminale PDZ-binding, che media le interazioni con i domini PDZ. I domini PDZ sono 80-90 domini di interazione proteica che si trovano in diverse proteine, molte delle quali transmembrana o associate al citoscheletro. Funzionalmente, sembrerebbe che i domini PDZ dirigano la localizzazione di YAP. La regione C-terminale contiene un dominio all'interno del quale si trova un residuo di tirosina conservato (Y407 in YAP) che è fosforilato da SRC e YES (Figura 6) (58).

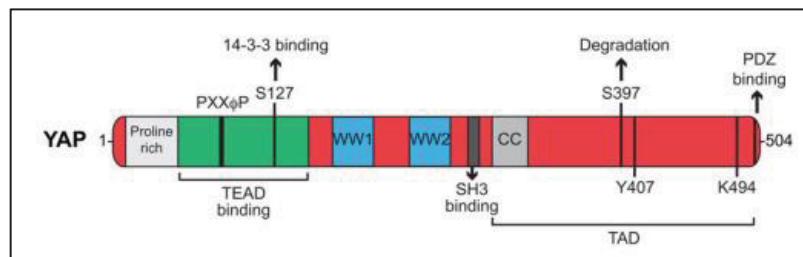


Figura 6. Struttura di YAP

La fosforilazione di YAP, mediata dalla via Hippo, rappresenta la principale strategia di regolazione della sua attivazione. Essendo un coattivatore trascrizionale, l'accumulo nucleare è necessario per svolgere la sua funzione. L'accumulo nel nucleo o la ritenzione nel citoplasma, dipendono dal suo stato di fosforilazione. La fosforilazione della Ser127 mediata dalle chinasi

LATS1/2, determina il sequestro di YAP nel citoplasma, mediato dall'interazione con la proteina 14-3-3 (59). YAP defosforilato entra e si accumula nel nucleo, e si lega al fattore di trascrizione TEAD. Nei mammiferi, ci sono 4 fattori di trascrizione TEAD/TEF (TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4) altamente conservati. Queste proteine sono accomunate dall'aver il dominio di legame al DNA TEA. TEAD, per poter attivare l'espressione dei geni, richiede l'aiuto di coattivatori trascrizionali. Tra i coattivatori di TEAD troviamo: YAP1, TAZ, le proteine vgl, e la famiglia dei recettori nucleari p160. TEAD contiene nella regione N-terminale il dominio di legame TEA, la regione C-terminale contiene il sito di legame di YAP. Il legame tra YAP e TEAD può portare all'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare. CTGF, Cyr61, Myc, AREG, e AXL, sono i bersagli a valle dell'interazione di YAP/TAZ con TEAD. Vgl regola l'espressione di IGFBP-5, VEGFA, e IRF2BP2, attraverso TEAD (60).

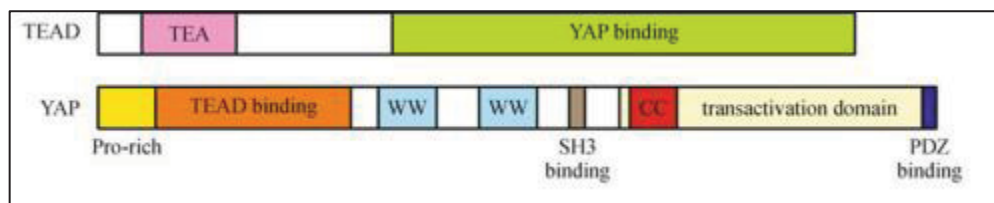


Figura 7. Struttura di YAP e TEAD

4.3. La via Hippo nell'HCC

La via di segnale Hippo è un regolatore cruciale dell'omeostasi e della tumorigenesi del fegato. La via Hippo è necessaria per mantenere gli epatociti in uno stato differenziato. Il carcinoma epatocellulare è associato a delezioni specifiche di Sav1, Nf2 (Merlin), MST1/2, ciò si traduce in un elevato livello di YAP nel nucleo (58). E' stato osservato che in seguito all'ablazione del gene MST1/2 nel fegato di topo, si ha un aumento delle dimensioni del fegato e comparsa di caratteristiche associabili all'HCC. L'inattivazione acuta di MST1/2 nel fegato è associata a una rapida perdita della fosforilazione di YAP (Ser127) con aumento della sua localizzazione nucleare ed espressione proteica. YAP è frequentemente amplificato nell'HCC e questo comporta un aumento della proliferazione cellulare e crescita tumorale. Aumento delle dimensioni del fegato ed epatocarcinoma, sono stati osservati in topi knockout fegato-specifici di Sav1, Nf2, MST1/2. In aggiunta, il topo knockout Nf2 una presenta una diminuzione della tumorigenesi quando viene incrociato con un topo Knock-out fegato-specifico di AMOT, ciò suggerisce come l'interazione YAP-AMOT è importante per capire il meccanismo di tumorigenesi mediato da YAP (61). Fattori di rischio per l'HCC come l'infezione da virus dell'epatite e l'esposizione a xenobiotici sono coinvolti nell'attivazione di YAP. La proteina HBx prodotta dal virus dell'epatite B incrementa l'espressione di YAP in maniera diretta promuovendo la trascrizione del gene YAP (62). Molte delle conoscenze attualmente disponibili sulla regolazione della via Hippo nell'HCC

derivano da studi su modelli genetici di topo. Nell'HCC umano, sono state osservate poche mutazioni o delezioni nei componenti della via Hippo. Anche se il lavoro su modelli animali ha chiarito il ruolo di YAP e della via Hippo nell'HCC, lavori futuri dovrebbero concentrarsi su come questa via è deregolata nell'HCC umano (61).

4.4. YAP oncogene o oncosoppressore

YAP è un potente promotore della crescita ed è diventato un candidato oncogene quando è stato dimostrato amplificato nel cromosoma 11q22. Oltre all'amplificazione, in diversi tipi di tumore, sono stati osservati elevati livelli di espressione e di localizzazione nel nucleo di YAP. L'azione oncogenica di YAP è inoltre avvalorata dal fatto che i suoi regolatori a monte sono soppressori tumorali. Per esempio, è stato osservato che la perdita di LATS1 (che fosforila YAP con conseguente inattivazione) porta allo sviluppo del tumore ovarico. Mutazioni di MOB (che è una subunità che attiva LATS) sono state osservate sia nelle cellule tumorali di uomo che di topo. (63). Inoltre, la migrazione nel nucleo di YAP, seguita dalla formazione del complesso YAP/TEAD, promuove la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi (40). Alcuni studi hanno messo in evidenza una funzione pro-apoptotica di YAP (63). Quando si verificano condizioni quali stress cellulare e grossi danni al DNA, l'oncosoppressore p73 è fosforilato e attivato da c-Abl. YAP1 lega p73 per generare un complesso che recluta p300 per supportare la trascrizione di geni proapoptotici. c-Abl, in

risposta al danno del DNA, fosforila direttamente anche YAP nel residuo Tyr357. YAP1 fosforilato nella Tyr357, è una proteina più stabile che mostra un'elevata affinità con p73 e co-attiva selettivamente i geni pro-apoptotici bersaglio di p73 (Figura 8). (64).

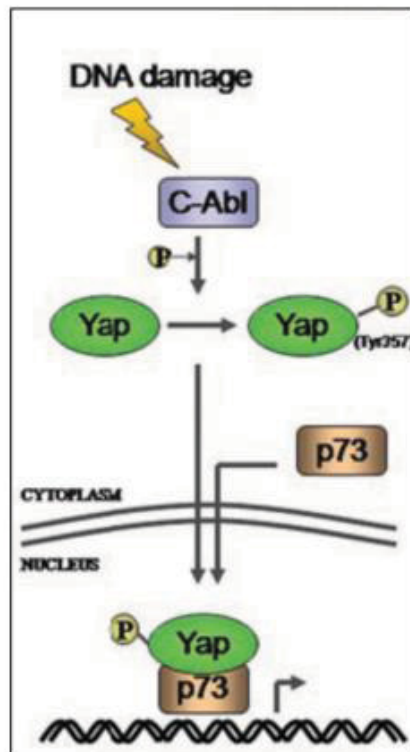


Figura 8. Fosforilazione della Tyr357 di Yap

5. SCOPO DELLA RICERCA

Alcuni studi hanno messo in evidenza che YAP, a seconda del contesto cellulare, può assumere comportamenti differenti. Si è osservato infatti, che può svolgere una funzione di oncogene o di oncosoppressore. Se YAP non è fosforilato, trasloca nel nucleo e interagisce col fattore di trascrizione TEAD. Questo legame, porta all'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, come ad esempio CTGF. La fosforilazione sul residuo tyr357 di YAP invece, fa sì che quest'ultimo interagisca con Pp73 e co-attivino insieme, geni pro-apoptotici. In diversi tipi di tumore, tra questi anche nell'HCC, sono stati osservati elevati livelli di espressione e di localizzazione nucleare di YAP. Sulla base di queste evidenze, lo scopo del presente lavoro è quello di valutare l'importanza della via Hippo e del gene YAP1 nell'epatocancerogenesi e se la deregolazione post-traduzionale di YAP possa avere un ruolo prognostico e diagnostico nel trattamento dell'HCC. Andremo a valutare questo, in lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche di ratti F344 e BN, rispettivamente geneticamente suscettibili e resistenti allo sviluppo dell'epatocarcinoma e in HCC umani suddivisi in base alla prognosi, al differente stadio di crescita e progressione. Eseguiamo inoltre, studi funzionali in vitro, su linee cellulari di epatocarcinoma e di epatoblastoma (Huh7, Hep3B, HepG2).

6. MATERIALI E METODI

6.1 Animali e trattamenti

Per tale studio sono stati utilizzati ceppi di ratti suscettibili Fisher 344 (F344) e resistenti Brown Norway (BN) allo sviluppo di tumori epatici, ai fini di confrontare i diversi meccanismi di controllo indotti dall'espressione dei geni studiati (65,66). I ratti, di sesso maschile, del peso di 120-140 grammi (Charles-River-Italia, Calco, Italia) sono stati alimentati con una dieta standard e con acqua di fonte, sono stati allevati in gabbie singole in un ambiente a temperatura e umidità costanti (rispettivamente 22 °C e 50% di umidità) con un ciclo sonno-veglia di 12 ore. I due ceppi di ratto sono filogeneticamente distanti tra loro e mostrano una diversa suscettibilità all'epatocancerogenesi indotta chimicamente: i ratti F344 sono suscettibili allo sviluppo dell'HCC, mentre i ratti BN esprimono i geni della resistenza allo sviluppo dello stesso tumore. I ratti sono stati trattati secondo il modello di Solt&Farber o dell'"epatocita resistente", che consiste nella somministrazione, per via intraperitoneale, di un agente iniziante: la Dietilnitrosamina (DNA) (150 mg/kg). Dopo 15 giorni di dieta iperproteica seguono altri 15 giorni di dieta iperproteica contenente lo 0,02% del mitoinibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF) con un'epatectomia parziale (PH) a metà di questo trattamento (protocollo inizio/selezione o IS). Tale trattamento, definito promotore, consente la crescita clonale delle sole cellule iniziate. I ratti F344 e BN che non hanno subito i trattamenti sono stati utilizzati come controlli. Gli animali sono stati

sacrificati con dissanguamento dell'aorta toracica, sotto anestesia da medetomidina. Tutti gli animali sono stati trattati "umanamente" e i protocolli di studio sono stati eseguiti nel rispetto delle linee guida delle norme etiche che regolamentano l'utilizzo di animali in laboratorio. Per i nostri studi, sono stati utilizzati fegati che includevano foci di epatociti alterati (6 settimane dall'inizio del trattamento), noduli displastici precoci (15 settimane dall'inizio), noduli displastici tardivi (32 settimane) e i carcinomi epatocellulari (HCC) (57-60 settimane). I fegati appena rimossi, sono stati sezionati in fettine di 0,5 cm di diametro. I noduli displastici a 15 e 32 settimane dall'inizio del trattamento, sono stati identificati macroscopicamente dal loro color grigio chiaro, sono stati espianati dal fegato e liberati dal parenchima circostante (come verificato da controllo istologico). Sono stati prelevati solo noduli displastici (DN) con diametro $\geq 0,03$ cm da entrambi i ceppi di ratto e divisi a metà. Metà di questo materiale è stato utilizzato per gli studi di istologia, istochimica e immunoistochimica, l'altra metà è stata conservata a -80°C per la successiva estrazione di RNA e proteine. Gli studi di istologia, istochimica e immunoistochimica sono stati fatti in accordo con quanto riportato in letteratura (60-62).

6.2 Campioni di tessuti umano

Per gli studi sull'uomo, sono stati utilizzati 6 campioni di tessuto di fegato normale, 20 campioni di HCC con migliore prognosi (HCCB sopravvivenza > 3 anni), 20 campioni di HCC con cattiva prognosi (HCCP sopravvivenza < 3 sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Chirurgia "Pietro Valdoni", Università di

Roma “La Sapienza” e dal Dipartimento di Chirurgia dell’Università degli studi di Sassari. Questi dipartimenti hanno ottenuto il consenso informato dei pazienti e l’approvazione del Comitato Etico.

6.3 Linee cellulari e trattamenti

Per gli studi in vitro, sono state utilizzate linee cellulari certificate di epatocarcinoma Huh7 ed Hep3B, e di epatoblastoma HepG2. Le cellule sono state mantenute in coltura con terreno DMEM contenente il 10% di Siero Bovino Fetale (FBS) a 37 °C e al 5% CO₂. Un totale di 0,8x10⁶ cellule sono state insemenate in piastre da 6 cm Ø e trasfettate con Small Interfering RNA (siRNA) specifico per Yap1 o con un oligonucleotide “scrambled”. Il siRNA e l’oligonucleotide scrambled (concentrazione 50 nmol/L) sono stati trasfettati usando la Lipofectamine RNAiMAX, (Invitrogen kit, Life technology) secondo il protocollo consigliato dalla casa di produzione. Per gli esperimenti di trasfezione transiente le linee cellulari HepG2, Hep3B e Huh7, sono state insemenate e incubate prima della trasfezione per 24h. Le cellule sono state trasfettate con pCMV6_YAP1 (400 ng di YAP1 cDNA), una forma mutata YAPS127AS94A (che ci è stata gentilmente data dal dr. Xin Chen, Università della California, San Francisco) e pCMV6_empty vector (Origene, Rockville, MD, USA). Per la trasfezione di cDNA è stata utilizzata la Lipofecatmine 2000 (Life technologies Corp.) secondo il protocollo consigliato dalla casa di produzione. Per gli esperimenti di induzione dell’apoptosi, 6 h dopo la trasfezione,

con pCMV6_YAP1 o YAPS127AS94A o pCMV6_empty vector, alle colture cellulari è stato aggiunto H₂O₂ alla concentrazione finale di 200 e 400 µM.

6.4 Valutazione della crescita cellulare nelle Huh7, Hep3B, HepG2

Per la valutazione della crescita delle linee cellulari Huh7, HepG2 ed Hep3B, è stato eseguito il saggio MTT (Cell Growth Determination Kit MTT based, Sigma), un saggio colorimetrico quantitativo che permette di stabilire indirettamente il numero di cellule vitali presenti in un campione, grazie alla loro attività metabolica. Il saggio sfrutta la capacità dell'enzima succinato deidrogenasi mitocondriale di trasformare l'MTT in cristalli di formazano. Solo i mitocondri attivi nelle cellule vitali sono in grado di effettuare questa trasformazione. I cristalli vengono ridisciolti in isopropanolo acidificato con HCl 0.1N, formando una soluzione color porpora che viene misurata allo spettrofotometro a 560nm. L'assorbanza di tali composti, è proporzionale alla loro concentrazione, pertanto dalle letture di assorbanza, si può ottenere un'informazione quantitativa riguardo al numero di cellule vitali contenute nel campione. Questo test ci ha permesso di confrontare gli indici di vitalità cellulare ottenuti nelle cellule trattate, rispetto alle cellule di controllo non trattate. Le cellule sono state insemenate in piastre da 96 pozzetti ad una densità iniziale di 7000 cellule/pozzetto. Sono state allestite 4 piastre da 96 pozzetti e sono state bloccate rispettivamente alle 24h, 48h, 72h e 96h.

6.5 Valutazione della migrazione e dell'invasività cellulare nelle Huh7

Per valutare la migrazione nelle cellule Huh7 trasfettate con YAP1 e YAP1 si RNA, le cellule sono state insemenate in piastre da 6 pozzetti e messi in coltura. Una volta raggiunta la confluenza, in ogni pozzetto della piastra è stato creato uno spazio con puntale sterile e successivamente i pozzetti sono stati lavati con PBS. In seguito, sono state scattate delle foto ai tempi indicati, utilizzando un microscopio collegato a una fotocamera. Per valutare l'invasività, è stato utilizzato il kit Cytoselect 24-well cell invasion kit (Cell Biolabs, San Diego, USA).

6.6 Estrazione di proteine da tessuti umani e di ratto

I campioni di tessuti epatici umani, i noduli precoci (15 settimane dopo l'inizio del trattamento), i noduli tardivi e gli HCC dei ratti F344 e BN sono stati omogenati in Lysis buffer (composto da Tris 30 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L, NP40 1%, Na-deossicolato 0,5%, SDS 0,1%, glicerolo 10% e EDTA 2 mmol/L) contenente inibitori di proteasi e fosfatasi e sono stati sonicati. La concentrazione delle proteine è stata determinata con il saggio di Lowry (Sigma, St. Louis, USA) utilizzando l'albumina sierica bovina (BSA) come standard. Le proteine sono state purificate con le γ -binding e le IgG Normal Control (rabbit, goat e mouse). Per la determinazione dei complessi YAP1-14-3-3 e YAP1-TEAD, le proteine sono state immunoprecipitate con un anticorpo YAP (goat). Per l'immunoprecipitazione sono stati usati 500 μ g di proteina totale.

6.7 Estrazione di RNA e proteine da campioni di cellule, di ratto e umani

L'estrazione dell'RNA e delle proteine dalle cellule, e l'estrazione dell'RNA dai campioni di fegato umano e di ratto, è stata eseguita utilizzando 30 mg di fegato sminuzzati e omogenati con "Dounce" in soluzione lisante RLT fornita dal kit "Allprep" completata con β -mercaptoetanolo e inibitori di fosfatasi e proteasi. Questo kit permette l'estrazione simultanea di DNA, RNA e proteine totali da singoli campioni biologici (vedi figura 9). È un sistema basato sull'utilizzo di colonnine e buffer che, attraverso una serie di lavaggi e centrifugazioni, permette di ottenere separatamente le varie componenti cellulari. Il lisato cellulare in soluzione RLT viene posto in colonnina "AllPrep DNA spin column" e si centrifuga. La colonnina trattiene il DNA, mentre sono eluite le proteine e l'RNA. L'eluato viene trasferito su un'altra colonnina "RNeasy spin column" e si centrifuga a 10000 rpm. L'RNA subisce una serie di lavaggi e centrifugazioni con dei buffer forniti dal kit. Infine l'RNA viene eluito con 50 μ l di acqua RNasi free e quantizzato al Nanodrop, al fine di determinare la quantità e la qualità. La qualità dell'RNA è valutata anche attraverso corsa elettroforetica. Dopo l'estrazione, i campioni di RNA sono trattati con Dnase I. Per quanto riguarda le proteine, queste vengono incubate con uno specifico buffer fornito dal kit, che ne permette la precipitazione, formando un pellet. Il pellet viene poi centrifugato e fatto sciogliere in SDS al 2%, completato con inibitori di proteasi e fosfatasi, successivamente le proteine vengono dosate attraverso il metodo di Lowry.

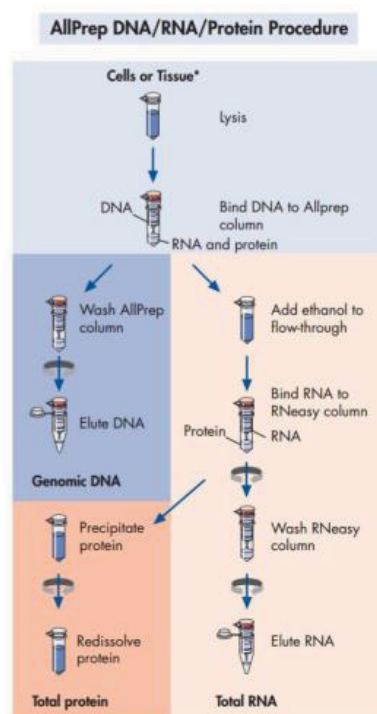


Figura 9. Estrazione RNA e proteine col kit “All Prep”

6.8 Sintesi di cDNA e PCR Real Time

L'RNA totale estratto dal fegato di ratto, umano e dalle colture cellulari è stato convertito in cDNA. La sintesi del cDNA è stata effettuata usando il kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem, CA, USA), secondo il protocollo fornito dalla ditta. Le reazioni di PCR sono state eseguite usando 75-300 ng di cDNA, utilizzando la QuantiTect mix SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA), il Quantitect Primer Assay (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) ed il sistema di determinazione Termociclature 7500 Fast Real Time PCR System. La PCR è stata condotta con un ciclo iniziale di denaturazione a 95°C, per 10 minuti, seguito da 40

cicli a 95°C, per 15 secondi ed uno a 60°C, per 1 minuto. I valori quantitativi sono stati calcolati usando il software PE Biosystems Analysis ed espressi come N° di target (NT), con $NT = 2^{-\Delta Ct}$, dove il valore di ΔCt , per ogni campione, è stato calcolato sottraendo il valore di Ct medio, del gene bersaglio, dal valore di Ct medio del gene RNR-18 di riferimento, per la normalizzazione

6.9 Western Blotting

Aliquote di 40µg di proteina, sono state denaturate a 95°C in TrisGlycine SDS Sample Buffer (Invitrogen) separate mediante SDS-PAGE e trasferite in membrane di nitrocellulosa mediante elettroblotting. Le membrane sono state incubate per 1h in Blocking Buffer Pierce Protein-Free T20 (Thermoscientific) per bloccare i siti aspecifici e successivamente incubate con gli anticorpi primari specifici. Per la determinazione dei complessi YAP1-14-3-3 e YAP1-TEAD, le proteine sono state immunoprecipitate con un anticorpo YAP (goat), gli immunocomplessi sono stati fatti separare mediante SDS-PAGE, e in seguito a Western Blot, le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario 14-3-3 (Rabbit) per quanto riguarda YAP1-14-3-3; con l'anticorpo primario TEAD (Rabbit) per quanto riguarda il complesso YAP1-TEAD. Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con l'anticorpo primario over night. Successivamente, la membrana ha subito dei lavaggi con TBS 1X Tween₂₀, e si è proceduto con il trattamento della membrana con appropriato anticorpo secondario HRP-coniugato. Per ogni campione, sono stati determinati i livelli di proteina in seguito all'emissione di chemiluminescenza indotta dalla

reazione di un reagente (Super Signal West Pico Maximum Chemiluminescence Substrate Kit, ThermoScientific) con il sistema HRP-coniugato dell'anticorpo. Le bande sono state quantificate in unità arbitrarie con il software ImageQuaNT 5.1 (Pierce, Chemical Co., New York, NY) e normalizzate ai livelli di β -actina.

7. RISULTATI

Una caratteristica peculiare della resistenza genetica all'epatocancerogenesi nei roditori è la bassa predisposizione delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche a progredire verso stadi più maligni (67). Studi eseguiti precedentemente hanno dimostrato che questo comportamento biologico dipende dall'incapacità delle cellule iniziate dei ratti resistenti a progredire autonomamente, e da una scarsa capacità di progressione verso la completa malignità in seguito all'esaurimento di stimoli proliferativi, contemporaneamente associato con la bassa attivazione di alcuni geni che promuovono la progressione del ciclo cellulare (66). In questo lavoro è stato analizzato l'effetto di geni di suscettibilità/resistenza nelle vie di trasduzione del segnale che controllano la proliferazione/crescita cellulare, come la cascata della via Hippo, la cui deregolazione è implicata nell'epatocancerogenesi (68, 69). L'analisi dei dati ottenuti con la Real Time PCR (QRT-PCR), ha messo in evidenza differenze nei livelli di espressione di Yap1 e CTGF nelle lesioni epatiche preneoplastiche, nei noduli displastici e negli HCC dei ratti F344, rispetto ai ratti BN (Figura 10A). I livelli delle proteine Yap1 e CTGF aumentano notevolmente nelle lesioni dei ratti F344, rispetto al fegato normale, mentre non cambiano o presentano uno scarso aumento nei ratti BN (Figura 10B e 10C). Questi risultati sono associati a bassi livelli di Yap1 fosforilato sulla Ser127 (pYap-ser127) nell'HCC dei ratti F344 e alti livelli di fosforilazione di Yap1 nella Tyr357 (pYap-tyr357) nell'HCC dei ratti BN (Figura 10D e 10E).

In linea con questi dati, gli HCC di entrambi i ceppi, rispetto al fegato normale, mostrano un aumento significativo della Caspasi 3 clivata (espressa come diminuzione del rapporto 36/(19+17) kD) considerata come misura dell'apoptosi, l'attivazione della caspasi è quattro volte superiore nei ratti BN, rispetto agli F344 (Figura 10F,10G).

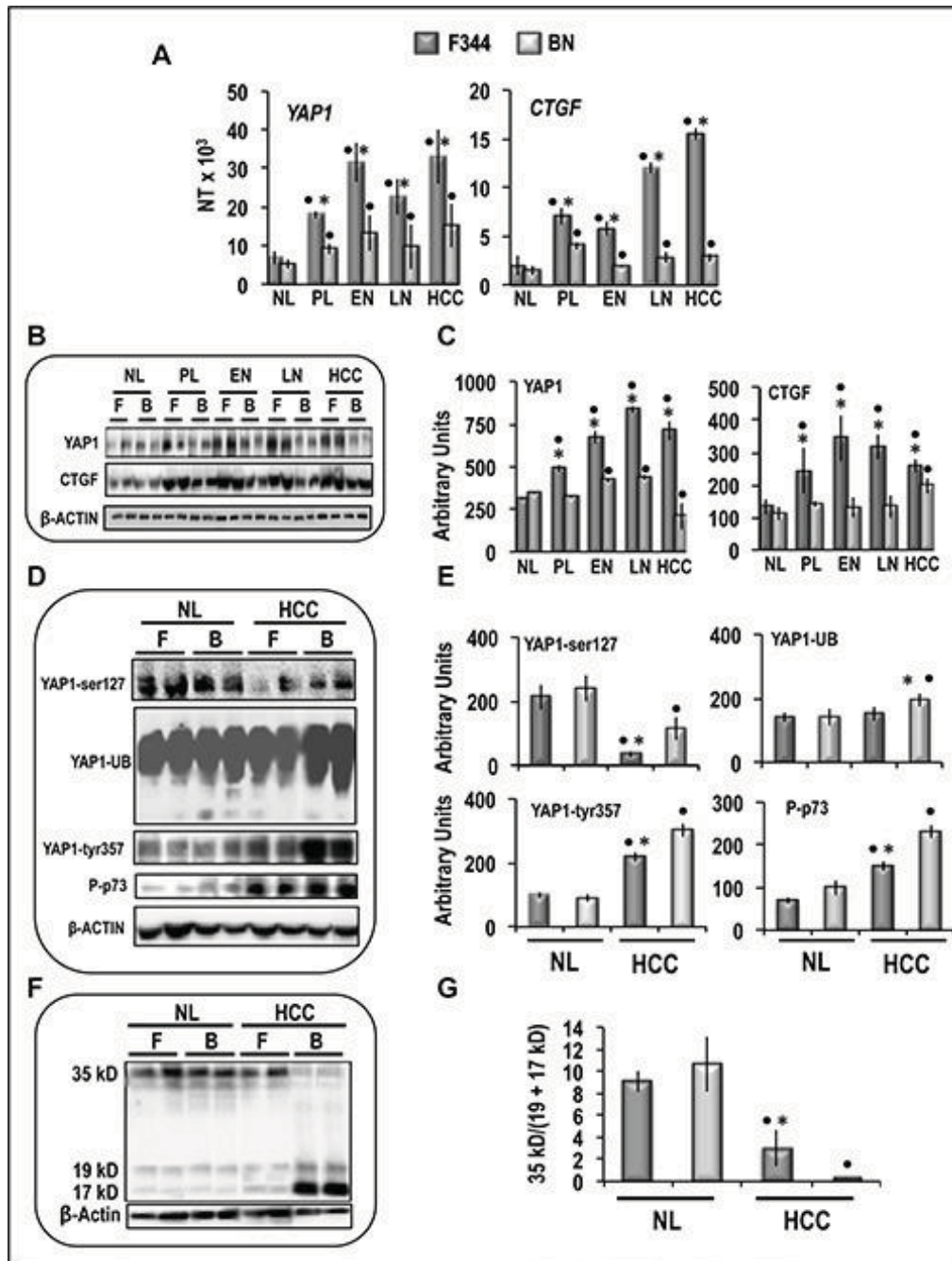


Figura 10. Espressione e modificazioni post-traduzionali di YAP1 nelle lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche, indotte nei ratti secondo il protocollo "dell'epatocita resistente". (A) Livelli di mRNA di *Yap1* e *Ctgf*, determinati tramite qRT-PCR, nel fegato normale (NL), fegato pre-neoplastico (4-6 settimane dopo l'inizio, PL), primi noduli (15 settimane, EN), noduli tardivi (32 settimane, LN) e HCC. (B) Western Blot rappresentativo delle proteine *Yap1* e *Ctgf*. (C) Analisi in chemiluminescenza: le densità ottiche sono state normalizzate con i livelli di β -actina ed espresse in unità arbitrarie. (D) Western blots rappresentativo di pYAP-ser127 e pYAP-tyr357, YAP ubiquitinato e p73 fosforilato. (E) Analisi in chemiluminescenza: le densità ottiche sono state normalizzate con i livelli di β -actina ed espresse in unità arbitrarie. (F) Western blot rappresentativo e (G) analisi in chemiluminescenza mostra le medie(SD) di 5 esperimenti di clivaggio della Caspase 3 in NL e HCC di ratti F344 (F) e BN (B).

I risultati ottenuti, suggeriscono un legame tra predisposizione genetica all'HCC e de-regolazione del segnale di Yap1 e un ruolo di quest'ultimo nell'aggressività dell'HCC. Questi risultati, ci hanno indotto ad analizzare l'espressione di Yap1 e la sua regolazione post-traduzionale in HCC umani con differenti stadi di crescita e propensione alla progressione. Per questi esperimenti, sono stati utilizzati due gruppi di 20 pazienti, i quali sono stati suddivisi sulla base della durata della sopravvivenza in seguito alla resezione chirurgica in: HCC con migliore prognosi (HCCB, sopravvivenza > 3 anni) e HCC con cattiva prognosi (HCCP, sopravvivenza < 3 anni) (tabella 1). Per quanto riguarda le caratteristiche clinico-patologiche, non sono presenti differenze significative tra i due gruppi di pazienti per ciò che concerne il sesso, l'eziologia, la presenza di fegato cirrotico e il grado di Edmondson-Steiner. Negli HCCP sono stati riscontrati invece, tumori più grandi, un'elevata secrezione di alfa-fetoproteina, elevato indice proliferativo (espressione di Ki67), elevati livelli di espressione di Midkine (che è indice di scarso differenziamento) ed alti livelli di Yap1, rispetto ai valori riscontrati negli HCCB.

	HCCB	HCCP
No. of patients		
Male	11	13
Female	9	7
Age (Mean \pm SD)	63.4 \pm 12.8	67.2 \pm 8.9
Etiology		
HBV	14	17
HCV	4	3
Ethanol	2	0
Cirrhosis		
+	18	17
-	2	3
Tumor size ^a		
> 5 cm	7	15
< 5 cm	13	5
Edmondson and Steiner grade		
I	1	0
II	12	8
III	7	10
IV	0	2
Alpha-fetoprotein secretion ^b		
> 300 ng/ml of serum	8	17
< 300 ng/ml of serum	12	3
Proliferation index ($\times 10^3$) ^c	7.2 \pm 1.3	14.9 \pm 2.7
YAP1 expression ($\times 10^3$) ^d	2.8 \pm 0.9	5.8 \pm 1.2
Midkine expression ($\times 10^3$) ^e	1.1 \pm 1.0	47.9 \pm 34.8
Survival after partial liver resection (months). Mean \pm SD ^f	54 \pm 12.2	22 \pm 8.3

Tabella 1. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti HCC

HCCB, HCC con migliore prognosi (sopravvivenza >3 anni)

HCCP: HCC con prognosi peggiore (sopravvivenza <3 anni)

La valutazione dell'espressione di CTGF nei sottogruppi di HCC umani, mostra un incremento dell'espressione dell'mRNA di CTGF, rispetto al fegato normale, e questo incremento aumenta progressivamente dal fegato surrounding (SLB) gli HCCB, agli HCCB, fino agli HCCP dove si osservano livelli più alti (Figura 11). L'analisi Western blot (Figura 12A,12B) mostra aumentati livelli di proteina Yap1 e CTGF nell'HCCP, rispetto agli HCCB. pYap-ser127 diminuisce nel fegato surrounding (SL) e nell'HCC, con i valori più bassi negli HCCP. Tuttavia la proteina 14-3-3 e il complesso YAP-14-3-3 (che trattiene Yap nel citoplasma) aumenta negli SL e HCC, con valori maggiori negli HCCP.

Questo è dovuto al fatto che, poiché si hanno elevati livelli di Yap negli HCCP, parte di questo risulta essere in forma inattiva, Yap1 ubiquitinato decresce progressivamente a partire dagli HCCB, fino agli HCCP dove sono stati osservati livelli minori, mentre il complesso YAP-TEAD mostra un scarso o nullo incremento in SL e un aumento significativo negli HCCP (Figura 12A, 12B). Questi risultati indicano che la regolazione post-traduzionale di Yap1 supporta la progressione dell'HCC attraverso la formazione del complesso YAP-TEAD. La relazione tra i livelli della proteina Yap1, del complesso YAP-TEAD e la progressione dell'HCC è confermata dalla loro significativa correlazione con l'espressione delle proteine CTGF, Ki67 e MDK (Figura 13). Nella figura 12 viene inoltre dimostrato che pYap-tyr357 è aumentato rispetto al fegato normale, nel fegato surrounding e nell'HCC, con valori maggiori in HCCB, che presentano maggiore apoptosi.

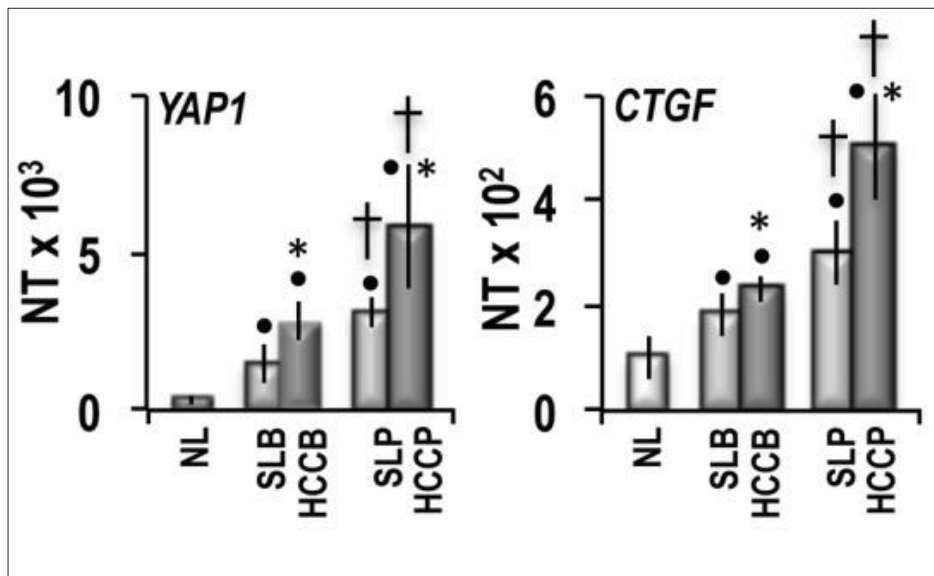


Figura 11. Espressione del segnale YAP1 e CTGF. I livelli di mRNA dei geni YAP1 e CTGF sono stati determinati mediante QRT-PCR. N Target (NT) = $2^{-\Delta ct}$, $\Delta ct = Ct \text{ RNR18} - Ct \text{ target gene}$

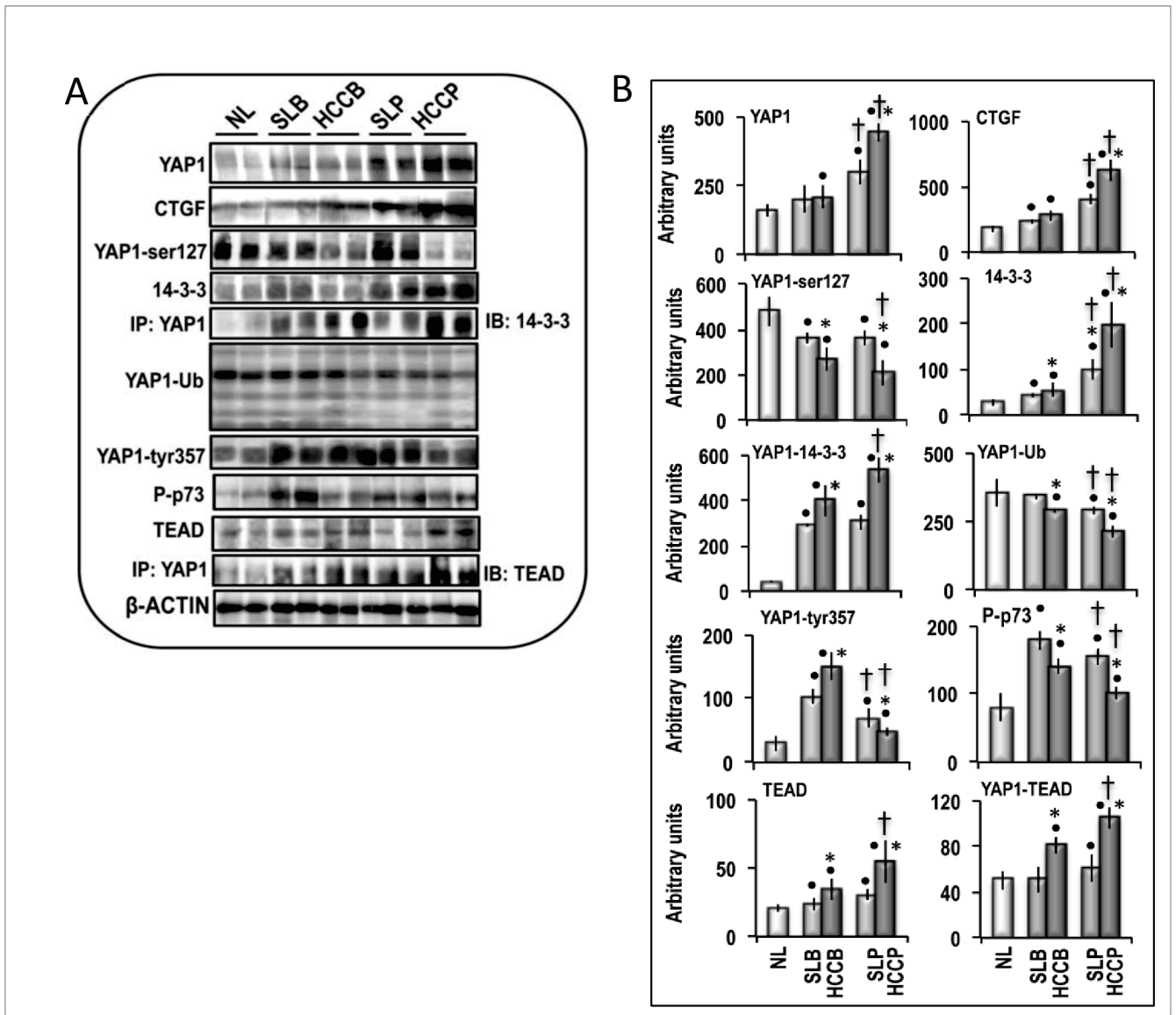


Figura 12. (A) Western Blot rappresentativo di YAP1, CTGF, di pYAP-ser127, 14-3-3, complesso YAP-14-3-3, YAP ubiquitinato, pYAP-tyr357, P-p73, TEAD, complesso YAP-TEAD, in fegato normale (NL), HCCB, HCCP e corrispondente fegato surrounding (SL). (B) Analisi di chemiluminescenza: le densità ottiche sono normalizzate sui livelli di β -Actina ed espressi come unità arbitrarie.

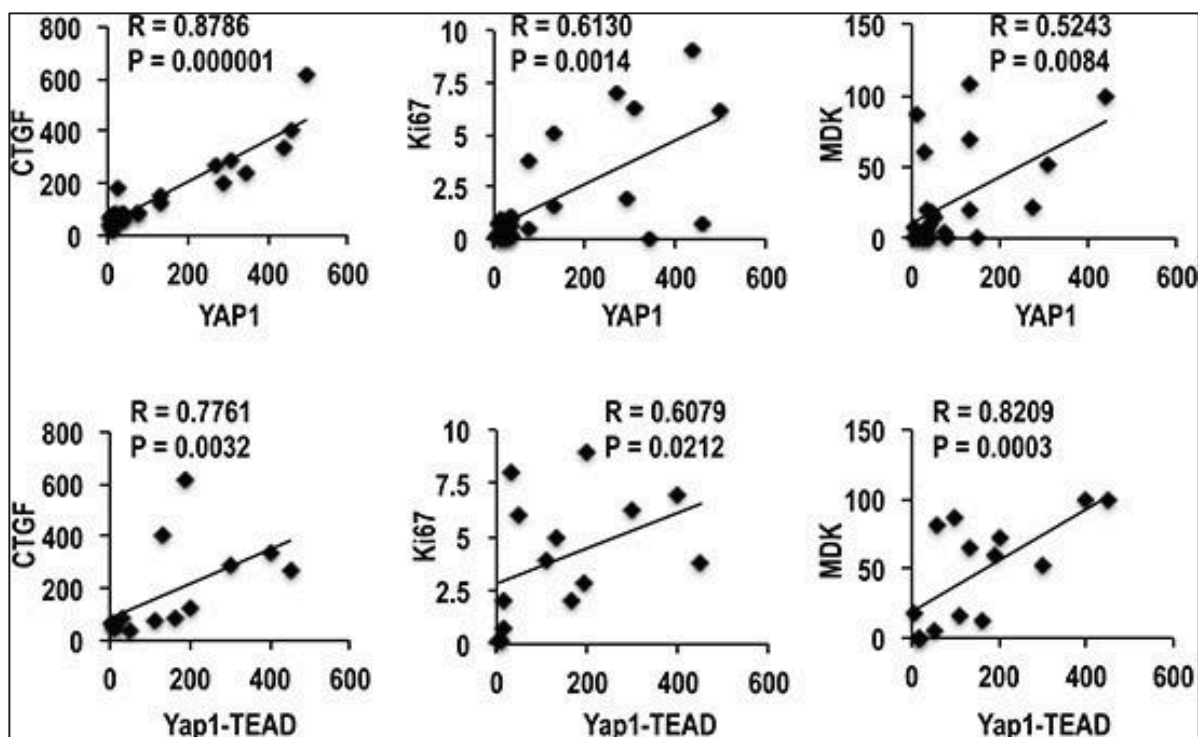


Figura 13. Correlazione di YAP1 e del complesso YAP-TEAD con CTGF, Ki67 e MDK (Midkine) in HCC umani. Sono stati usati un totale di 18 casi (9 HCCB e 9 HCCP) per l'analisi sulla correlazione di Spearman di YAP1, e un totale di 15 casi (7 HCCB e 8 HCCP) sono stati utilizzati per l'analisi di correlazione del complesso YAP1-TEAD.

pYap-tyr357 è una proteina stabile che entra nel nucleo e mostra un'elevata affinità per p73. Queste due proteine insieme, co-attivano selettivamente geni pro-apoptotici. Pertanto, la valutazione della localizzazione nucleare di pYap-tyr357 in differenti sottotipi di HCC e corrispondenti surrounding può fornire ulteriori approfondimenti riguardo l'effetto della de-regolazione post-traduzionale di YAP nell'HCC. Le figure 14A,14B mostrano che la percentuale di cellule che mostrano immuno-reattività per pYap-tyr357 decresce progressivamente da HCCB a HCCP. HCCB inoltre, mostra un'elevata localizzazione nucleare di pYap1-tyr357, mentre questa localizzazione è molto

più bassa negli HCCP ed è scarsa negli SLB e SLP. In accordo con questi dati, è stato osservato che l'apoptosi (espressa come diminuzione nel rapporto 36/19 kDa della Caspasi 3 clivata) è 2 volte più bassa negli HCCP rispetto agli HCCB, mentre negli SLs non si differenzia in maniera significativa rispetto al fegato normale.

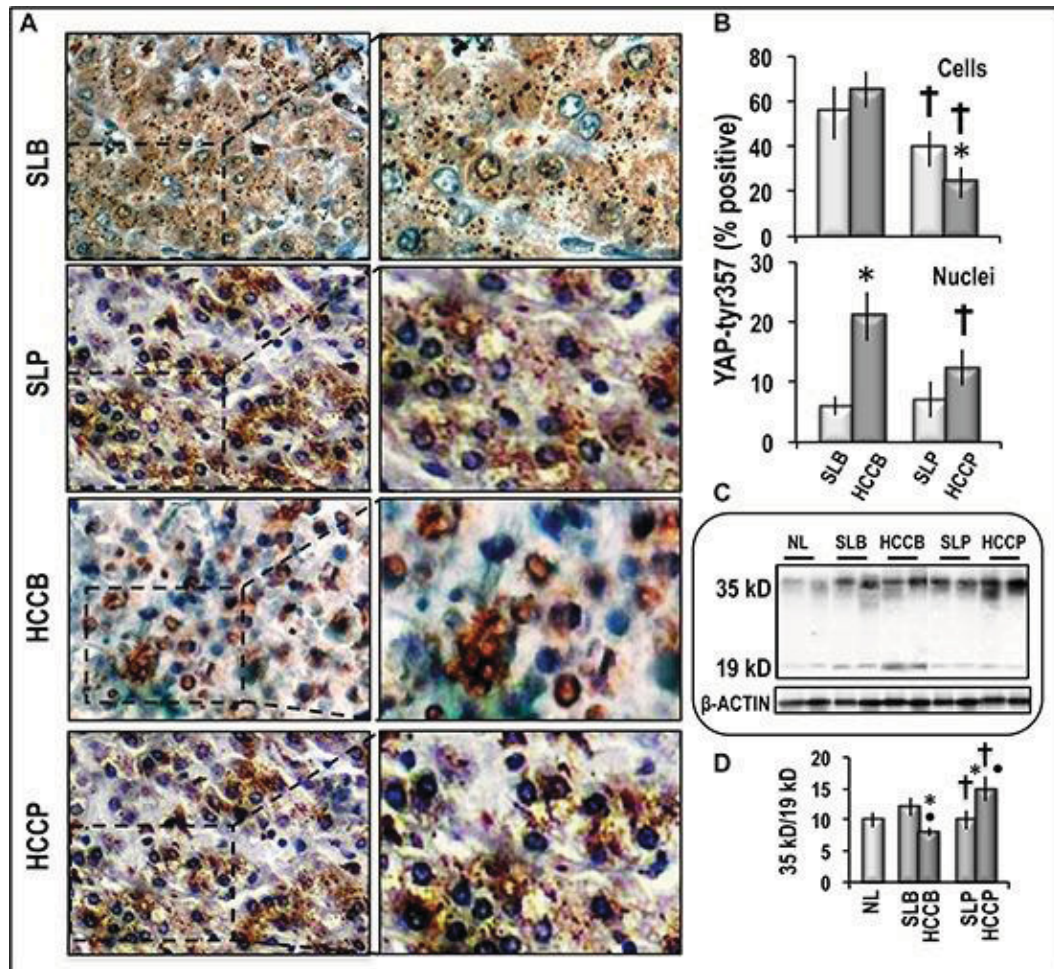


Figura 14. Espressione di pYAP-tyr357 e clivaggio della Caspasi 3 nell'HCC umano e nel corrispondente tessuto epatico circostante. A) Immagine rappresentativa della colorazione IHC di pYAP-tyr357 in HCCB e HCCP e SL (100 × e 400 ×). **(B)** Quantificazione della colorazione IHC di pYAP-tyr357: La quantificazione IHC è stata valutata in base alla percentuale di cellule con citoplasmi e/o nuclei positivi (pannello superiore) o cellule con nuclei positivi (pannello inferiore). I dati sono medie (SD) di 3 diversi tipi di HCC e SL. Test di Mann-Whitney: Asterisco, HCC diverso da SL per almeno $P < 0,05$. Croce, HCCP/SLP diverso da HCCB/SL per $P < 0,001$

Sulla base dei risultati ottenuti su campioni umani e di ratto, sono stati fatti *in vitro* esperimenti funzionali, utilizzando le linee cellulari di epatocarcinoma, Huh7 ed Hep3B, e di epatoblastoma, HepG2. Questi esperimenti hanno messo in evidenza che aumentando l'espressione di Yap1 nelle Huh7 si assiste ad un aumento dell'espressione di CTGF (Figura 15A). Dall'analisi Western Blot, abbiamo visto inoltre che oltre all'aumento dei livelli di proteina CTGF, si associano livelli aumentati del complesso YAP1/TEAD (Figura 15B).

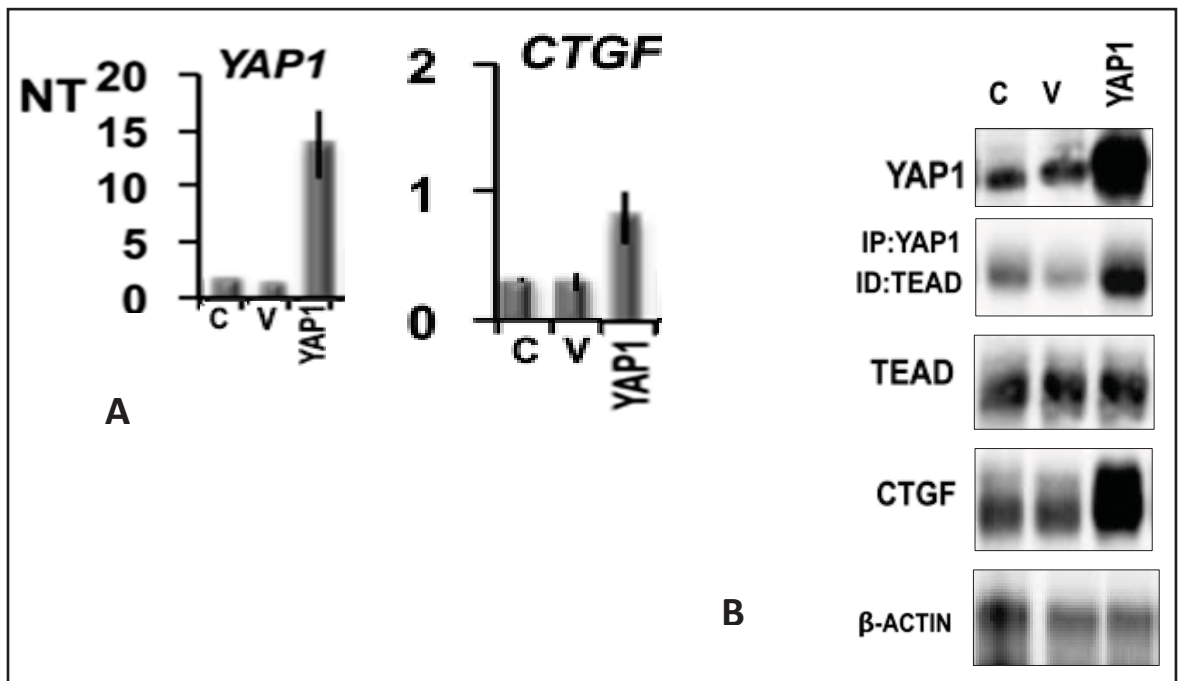


Figura 15. (A) Espressione di Yap1 e CTGF nelle Huh7. (B) Western rappresentativo che mostra i livelli di espressione YAP1, YAP1-TEAD, TEAD e CTGF, in cellule Huh7 nelle quali è stata indotta iper-espressione di YAP. N Target (NT) = $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct \text{ RNR18} - Ct \text{ target gene}$.

Se confrontiamo la vitalità nelle cellule in cui è stata indotta iper-espressione di YAP, rispetto ai controlli, abbiamo osservato un aumento della crescita in tutte e 3 le linee cellulari (Figura 16 A), per contro, laddove l'espressione è stata inibita trasfettando con l'siRNA di YAP, otteniamo l'effetto opposto (Figura 16 B).

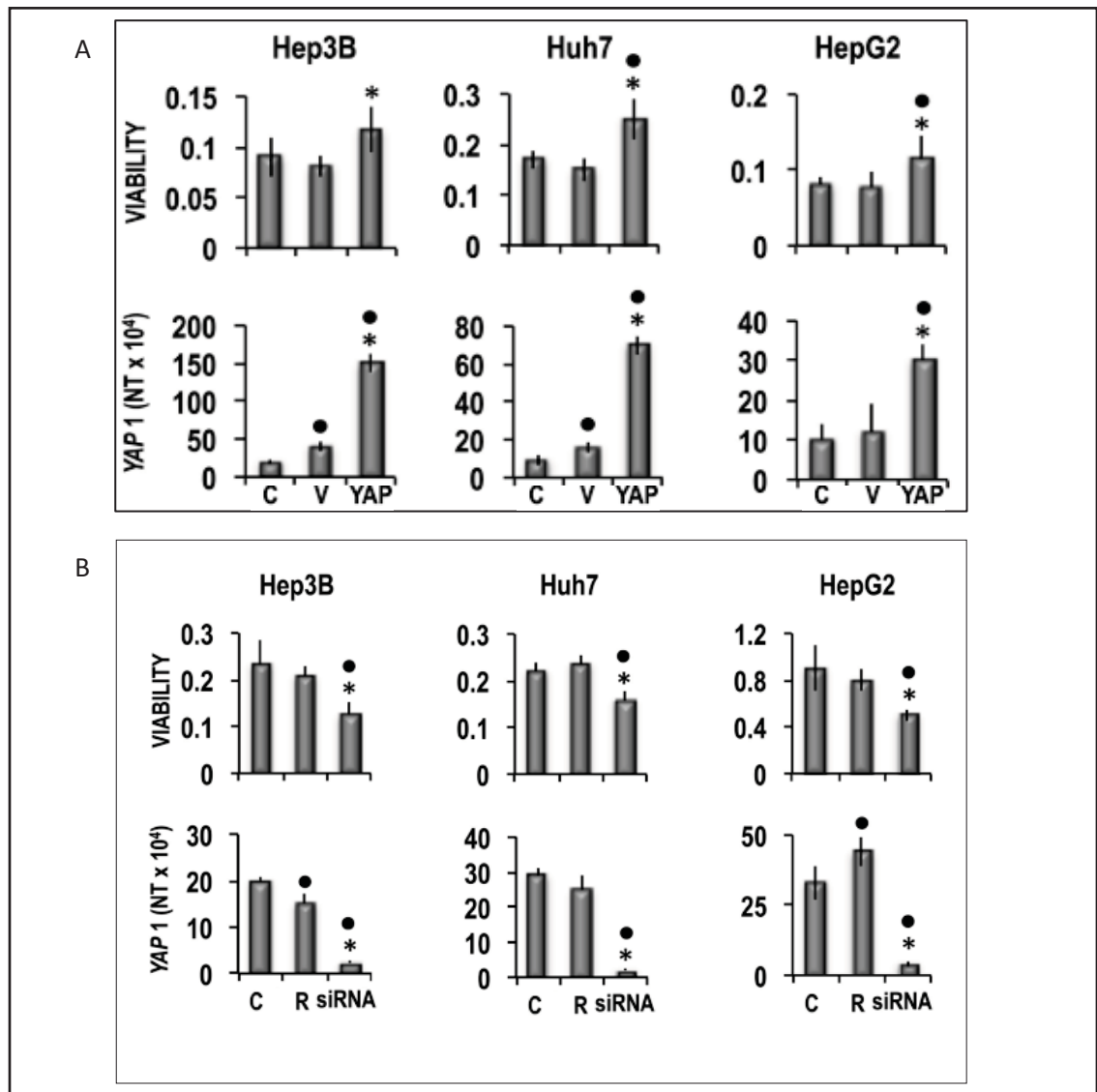


Figura 16. (A) Effetto dell'iper-espressione di YAP1 sulla vitalità cellulare, nelle Huh7, Hep3B, HepG2. Le cellule sono state trasfettate con il cDNA di YAP1 nel vettore pCMV6. La vitalità cellulare è stata determinata nelle cellule non trasfettate e cellule trasfettate con YAP. **(B) Effetto del silenziamento di YAP sulla vitalità cellulare nelle Huh7, Hep3B, HepG2.** Le cellule sono state trasfettate con l'siRNA di YAP, utilizzando l'RNAiMAX (R in figura) come agente trasfettante.

La trasfezione di Yap1, protegge significativamente Huh7 ed HepG2 dall'apoptosi indotta da H₂O₂ 200 e 400 μM, sebbene un'alta concentrazione di H₂O₂ inibisca dal 50-60% l'espressione di Yap1. Nelle cellule trasfettate con una forma mutata di Yap1 non si ha una prevenzione (o comunque è molto bassa) dell'apoptosi indotta dall' H₂O₂ 200 μM (Figura 17). La modulazione di Yap1 influenza fortemente la migrazione e l'invasività in vitro nelle Huh7. Infatti, l'iper-espressione di Yap1 determina un aumento della migrazione cellulare in vitro, che a differenza delle cellule trasfettate col vettore vuoto, porta alla quasi completa ricostituzione del monostrato di cellule a 36h dal momento in cui è stato creato lo spazio nelle cellule confluenti. Per contro, il monostrato non si ricostituisce completamente 48h dopo aver creato lo spazio, nelle cellule trattate con Yap1 siRNA (figura 18). Il test sull'invasività cellulare ha rivelato che l'invasione cellulare attraverso la membrana di policarbonato, aumenta di 2 volte nelle cellule in cui è stata indotta iper-espressione di Yap1, rispetto alle cellule trasfettate col solo vettore vuoto. Nelle cellule in cui è stata inibita l'espressione di YAP, ovvero nelle cellule trasfettate con YAP1 siRNA, si ha una diminuzione di circa 5 volte dell'invasività rispetto alle cellule non trattate (Figura 19)

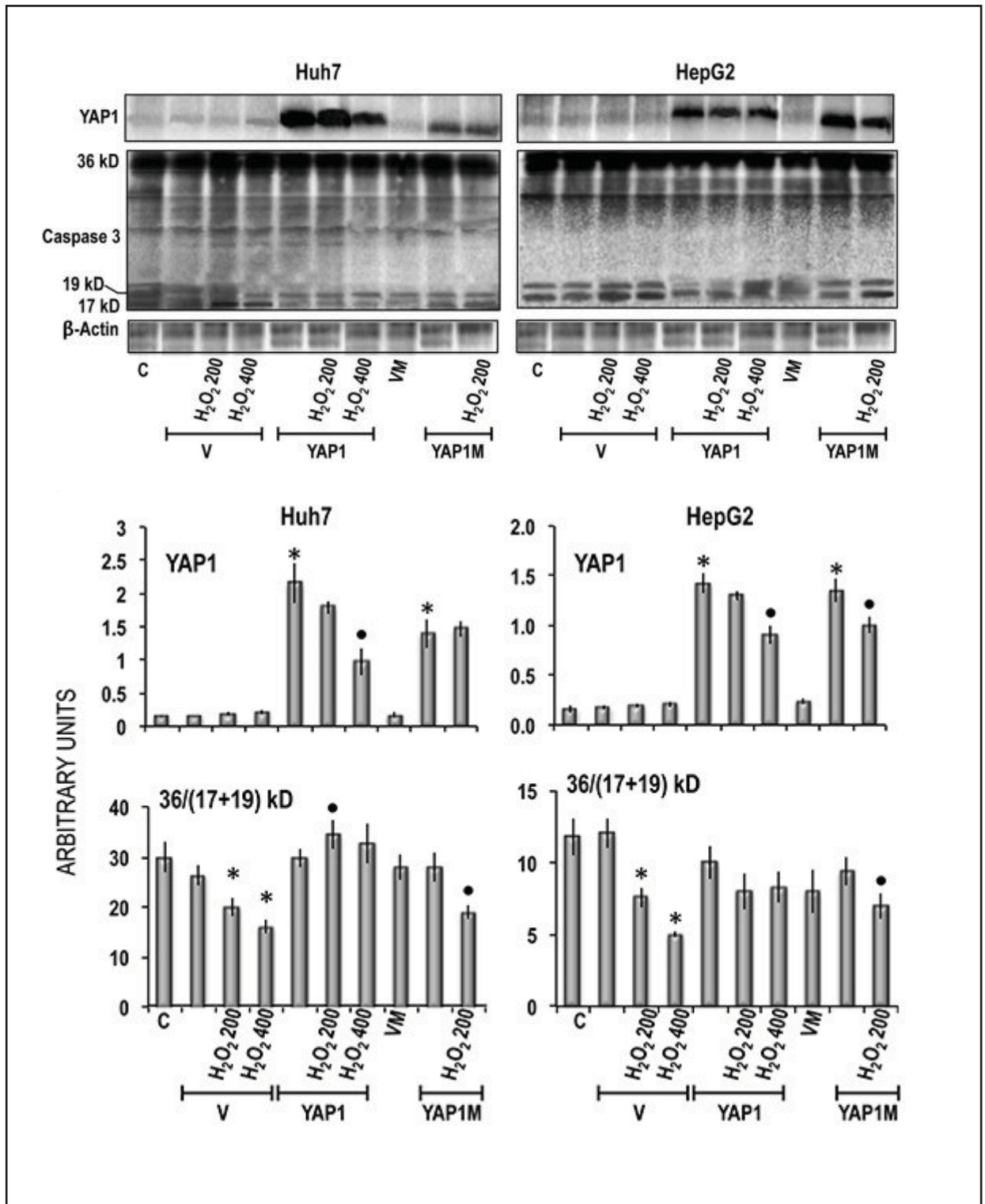


Figura 17. Inibizione da parte di YAP1 dell'apoptosi indotta in cellule Huh7 e HepG2 mediante perossido di idrogeno. L'apoptosi viene espressa come diminuzione del rapporto delle bande 36 / (17 + 19) kD che indica il clivaggio della Caspasi 3. Analisi di chemiluminescenza: le densità ottiche sono state normalizzate con i livelli di β -actina ed espressi in unità arbitrarie. I dati sono medie (SD) di 3 esperimenti. Test di Mann-Whitney. Asterischi: differenza dal vettore appropriato per $P < 0,001$. Punti: differenza da YAP1 / YAP1M per $P < 0,001$. Abbreviazioni: V, pCMV6_empty vector VM, vettore di YAP1 mutato; YAP1M, YAP1 mutato.

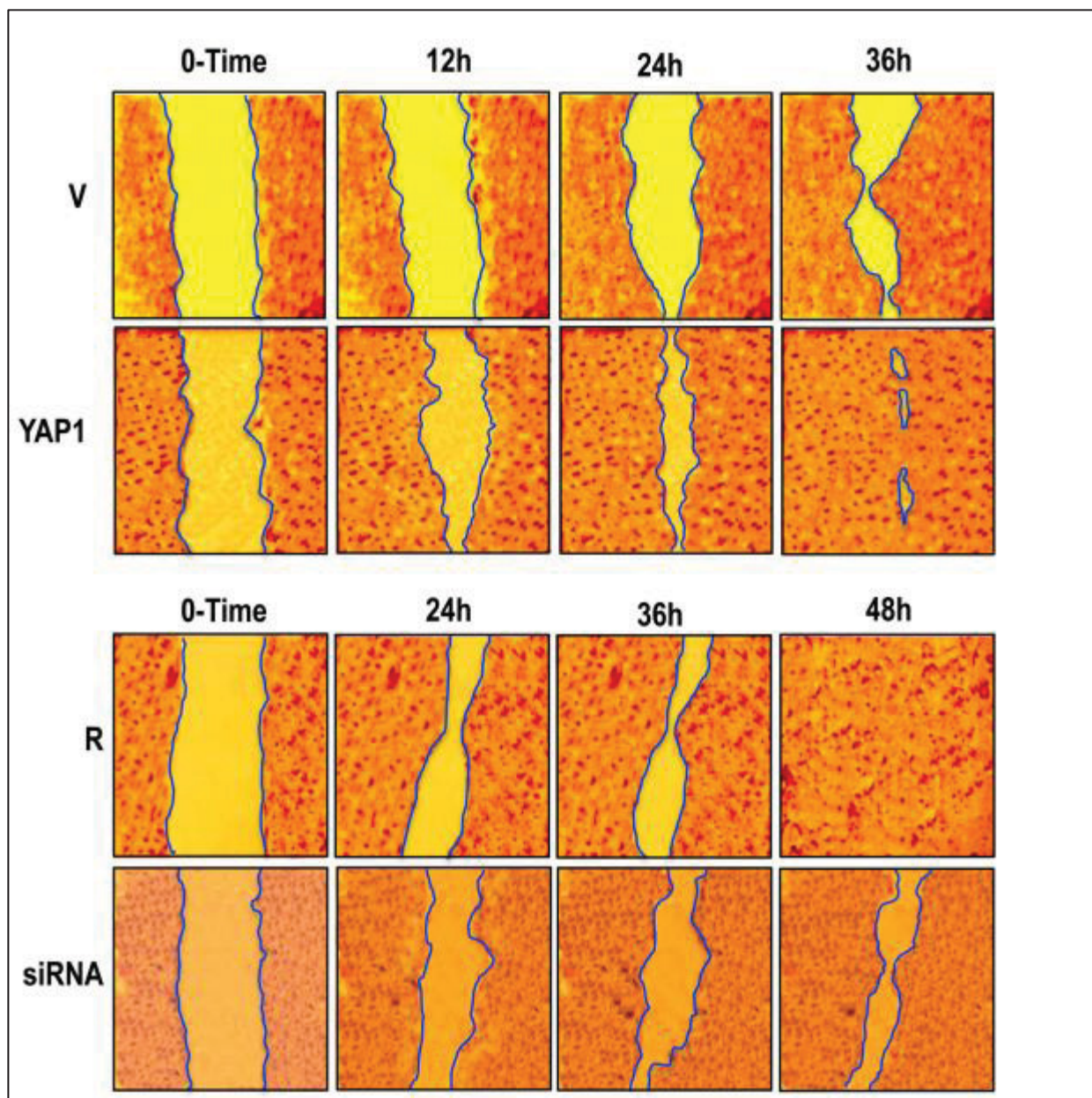


Figura 18. *L'effetto di YAP1 sulla migrazione cellulare delle Huh7 in vitro. Immagini rappresentative della capacità di migrazione delle cellule trasfettate con il cDNA di YAP1 nel vettore pCMV6 e con il vettore vuoto (V), (pannelli superiori) o con il siRNA anti-YAP1 o con l'RNAiMAX (agente trasfettante) (R), (pannelli inferiori) valutati mediante il saggio di migrazione. La restrizione dell'area è stata valutata nei tempi indicati dopo che è stato effettuato lo spazio (tempo-zero). Tre analisi indipendenti della migrazione cellulare in vitro non hanno mostrato variazioni significative della restrizione delle aree in cui era stato eseguito lo spazio nei diversi tempi.*

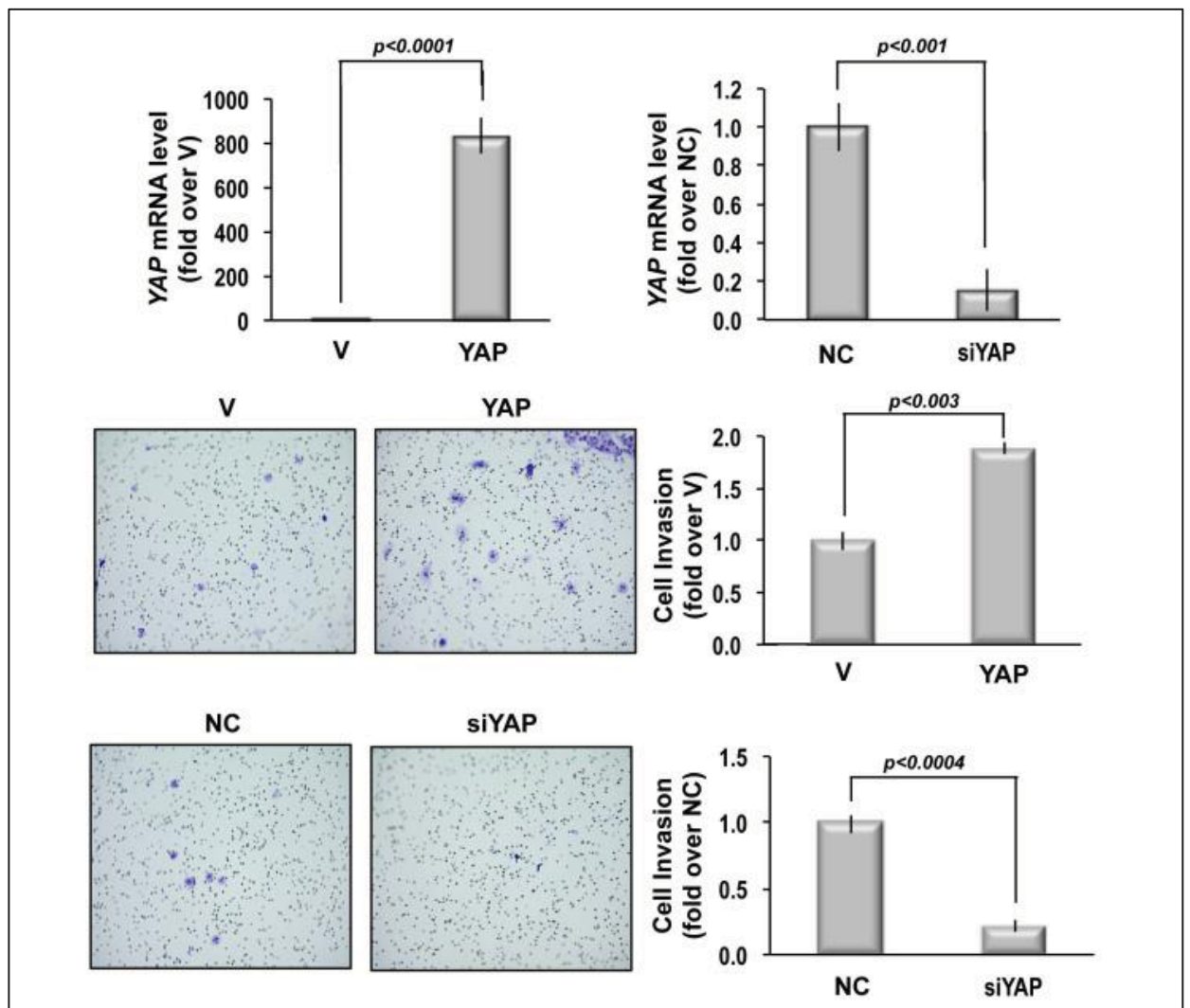


Figura 19. Saggio di invasione cellulare. L'invasività delle cellule Huh7 è stata analizzata mediante il kit di invasività cellulare con 50.000 cellule/pozzetto. I dati sono medie (SD) di 3 esperimenti. Abbreviazioni: NC, controllo negativo/scramble; V, vettore.

8. DISCUSSIONE

In base ai risultati ottenuti, si può sostenere che la suscettibilità genetica dei ratti alla cancerogenesi epatica è chiaramente influenzata dalla via di segnale Hippo, come mostra il differente comportamento dei geni chiave di questa via di segnale nei ratti con suscettibilità o resistenza all'epatocancerogenesi geneticamente trasmessa. I risultati ottenuti mostrano che l'iper-espressione di YAP1 è un evento precoce nella cancerogenesi del fegato di ratto. Abbiamo osservato un'elevata espressione di YAP nelle lesioni neoplastiche e preneoplastiche dei ratti F344, geneticamente suscettibili all'epatocarcinogenesi, comparati con i ratti BN resistenti. Questi risultati inoltre, indicano che la deregolazione post-traduzionale di YAP, favorente la sua ubiquitinazione, l'attivazione di p73, e l'apoptosi, sono significativamente più alte in HCC ben differenziati e poco invasivi dei ratti BN resistenti, mentre la regolazione post-traduzionale sembra favorire HCC più aggressivi nei ratti F344 suscettibili. Questo suggerisce che la deregolazione post-traduzionale di YAP1 è sotto il controllo di geni modificatori dell'HCC, i quali possono contribuire a determinare il relativo aumento di YAP1 innescando la crescita e la progressione tumorale. In linea con queste evidenze, i risultati ottenuti dai campioni di tessuto umano, mostrano che un up-regolazione del segnale YAP1/CTGF è legata alla prognosi dell'HCC. I dati ottenuti indicano che l'effetto dell'iper-espressione di Yap1 nella prognosi dell'HCC, è largamente influenzato dalla differente de-regolazione post-traduzionale di Yap1. Infatti, negli HCCB si ha una maggiore fosforilazione di YAP1 sulla ser127 e una maggiore

ubiquitinazione, rispetto agli HCCP. Inoltre, gli HCCB mostrano principalmente fosforilazione di YAP sulla tyr357 con conseguente sua traslocazione nel nucleo, seguita dall'attivazione di p73 e dell'apoptosi. Questo potrebbe contribuire a una migliore prognosi di questo sottogruppo di HCC. La presenza di elevati livelli del complesso YAP-TEAD nell'HCC, indica una consistente traslocazione nucleare di YAP1 non fosforilato. Il complesso YAP1-TEAD attiva numerosi geni associati alla crescita nell'HCC. In accordo con ciò, abbiamo trovato una correlazione positiva dei livelli di YAP1 e YAP1-TEAD con l'espressione di marcatori della proliferazione (Ki67), e marcatori della progressione tumorale, CTGF e MDK nell'HCC. Le similarità della de-regolazione post-traduzionale di YAP1 nell' HCC umano e del ratto, suggeriscono che la de-regolazione post-traduzionale di YAP1 è sotto il controllo di un analogo meccanismo genetico in entrambe le specie. Gli studi funzionali in vitro, effettuati in linee cellulari di epatocarcinoma, hanno messo in evidenza che si ha un'associazione tra l'aumento dell'espressione di YAP1 e l'aumento della crescita cellulare, della migrazione cellulare e dell'invasività. In conclusione, i dati ottenuti indicano che l'iper-espressione di YAP1 e la de-regolazione post-traduzionale è geneticamente controllata e contribuisce a determinare il fenotipo suscettibile per l'HCC e per la sua prognosi. Sugeriscono inoltre che la up-regolazione nell'HCC mostra un cruciale ruolo oncogenico in un complesso network innescando crescita rapida e invasività. In definitiva, possiamo ipotizzare per YAP e CTGF, un possibile loro utilizzo come marcatori prognostici e diagnostici sin dalle fasi precoci della malattia.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Aysegul Ozakyol. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology). J Gastrointest Canc 2017 DOI 10.1007/s12029-017-9959-0
2. Dimitrios Dimitroulis et al.; From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. World J Gastroenterol 2017 August 7; 23(29): 5282-5294
3. Alvaro Díaz-Gonzalez et al.; Surveillance for hepatocellular carcinoma Best Practice & Research Clinical. Gastroenterology 30 (2016) 1001-1010
4. Ana Filipa Brito et al.; Targeting hepatocellular carcinoma: what did we discover so far? Oncology Reviews 2016; volume 10:302
5. Calvisi DF et al.; Deregulation of signalling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: Novel insights from interspecies comparison. Biochimica et Biophysica Acta 1826 (2012) 215–237
6. Narci C Teoh. Proliferative drive and liver carcinogenesis: Too much of a good thing? Journal of Gastroenterology and Hepatology 24 (2009) 1817–1825
7. Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. Nature 2005;436:930–932
8. Bowen DG et al.; Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature 2005;436:946–952
9. Wands JR et al.; The molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. J Viral Hepat 1994;1(1):17-31
10. Kolke K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;10:S132-135.
11. Dafina Janevska et al.; Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors, Diagnosis and Treatment Journal of Medical Sciences. 2015 Dec 15; 3(4):732-736

12. Paraskevi A et al.; Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews Cancer* (2006) Volume 6 674-687
13. Feiteilson MA et al.; Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117
14. Zhao-Shan Niu et al.; Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol* 2016 November 7; 22(41): 9069-9095
15. Elham Shirvani-Dastgerdi et al.; Hepatocarcinogenesis associated with hepatitis B, delta and C viruses *Curr Opin Virol.* 2016 October; 20: 1–10
16. Hashem B. El-Serag et al.; Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–2576
17. Ayako Iida-Ueno et al.; Hepatitis B virus infection and alcohol consumption. *World J Gastroenterol* 2017 April 21; 23(15): 2651-2659
18. Ralph Dürer Wolfgang H. Caselmann. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbeck's Arch Surg* (2000) 385:154–161
19. Wojciech Blonski et al.; Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010 August 7; 16(29): 3603-3615
20. Ranran Tang et al.; Genetic factors associated with risk of metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 21), pp: 35403-35411
21. Marco Le Grazie et al.; Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. *World J Hepatol* 2017, July 28; 9(21): 907-920
22. Shinu Chacko, Subir Samanta. “Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84 (2016) 1679–1688

23. Dae Won Kim et al.; Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib—chemotherapy. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 2017;8(2):256-265
24. Jasmin Radhika Desai et al.; Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: an update. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 2017;8(2):243-255
25. Berretta M. Rinaldi L. et al.; Angiogenesis Inhibitors for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. (2016) *Front. Pharmacol.* 7:428
26. Frau et al.; Role of Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Methionine Adenosyltransferases in Liver Cancer Progression *HEPATOLOGY*, Vol. 56, No. 1, 2012
27. Gaetano Bertino et al.; Hepatocellular Carcinoma: Novel Molecular Targets in Carcinogenesis for Future Therapies. *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 203693, 15 pages
28. Young Nyun Park. Update on Precursor and Early Lesions of Hepatocellular Carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011 Jun;135(6):704-15
29. Libbrecht L. et al.; Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver International* 2005; 25: 16–27
30. Rajagopal N. Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma. *HEPATOLOGY*, Vol. 48, No. 6, 2008
31. S Whittaker et al.; The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* (2010) 29, 4989–5005
32. Galina Khemlina et al.; The biology of Hepatocellular carcinoma: implications for genomic and immune therapies. *Molecular Cancer* (2017) 16:149
33. Li-Juan Liu et al.; Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016 September 7; 22(33): 7486-7499
34. Valery Vilchez et al.; Targeting Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. *World J Gastroenterol* 2016 January 14; 22(2): 823-832

35. Benedicte Delire and Peter Starkel. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015; 45 (6): 609–623
36. Maryam Tahmasebi Birgani and Vinicio Carloni. Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 405
37. Calvisi DF et al.; Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130(4):1117-1128
38. Bin Gao et al.; STAT proteins - key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. *J Hepatol.* 2012 August ; 57(2): 430–441
39. Nicole Golob-Schwarzl et al.; New liver cancer biomarkers: PI3K/AKT/mTOR pathway members and eukaryotic translation initiation factors. *European Journal of Cancer* 83 (2017) 56-70
40. Jing-song Chen et al.; Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatology Research* 2009; 39: 177–186)
41. Jie Lu et al.; Oncogenic role of the Notch pathway in primary liver cancer (Review). *ONCOLOGY LETTERS* 12: 3-10, 2016
42. Wantae Kim et al.; Interacting network of Hippo, Wnt/ β -catenin and Notch signaling represses liver tumor formation. *BMB Rep.* 2017; 50(1): 1-2
43. Jung-Soon Mo et al.; The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Reports* (2014) 15, 642–656
44. Yimlamai D et al.; Emerging evidence on the role of the Hippo/YAP pathway in liver physiology and cancer. *J Hepatol.* 2015 December ;63(6): 1491–1501

45. Wen Chun Juan and Wanjin Hong. Targeting the Hippo Signaling Pathway for Tissue Regeneration and Cancer Therapy. *Genes* 2016, 7, 55
46. Fa-Xing Yu and Kun-Liang Guan. The Hippo pathway: regulators and regulations. *GENES & DEVELOPMENT* 27:355–371, 2013
47. Wen Chun Juan and Wanjin Hong. Targeting the Hippo Signaling Pathway for Tissue Regeneration and Cancer Therapy. *Genes* 2016, 7, 55
48. Emma Fallahi. The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair. *Genes* 2016, 7, 28)
49. Stefano Piccolo et al.; The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 94: 1287–1312, 2014
50. Minseong Kim e Eek-hoon Jho Cross-talk between Wnt/ β -catenin and Hippo signaling pathways: a brief review 2014; 47(10): 540-545
51. Sachin H. Pate. Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis *Gastroenterology* 2017;152:533–545
52. Bruce A. Edgar. From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path. *Cell* 124, January 27, 2006
53. Hao Zeng. Angiotensin regulates prostate cancer cell proliferation by signaling through the Hippo-YAP pathway. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 6), pp: 10145-10160
54. Kayla E. Wilson et al., The Regulatory Role of KIBRA and PTPN14 in Hippo Signaling and Beyond. *Genes* 2016, 7, 23
55. June Sung Bae. The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 9), pp: 16084-16098
56. Wanjin Hong et al.; The YAP and TAZ transcription coactivators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 September; 23(7): 785–793

57. Christian J Gaffney et al; Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene*. 2012 November 10; 509(2): 215–222
58. Xaralabos Varelas. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* (2014) 141, 1614-1626
59. Quy Nguyen et al.; Yes-associated protein in the liver: Regulation of hepatic development, repair, cell fate determination and tumorigenesis. *Digestive and Liver Disease* 47 (2015) 826–835
60. Yuhang Zhou et al.; The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 138
61. Steven W Plouffe. Disease implications of the Hippo/YAP pathway. *Trends Mol Med.* 2015 April; 21(4): 212–222
62. Yuzhuo Wu et al.; Hepatitis B virus X protein mediates yes-associated protein 1 upregulation in hepatocellular carcinoma. *ONCOLOGY LETTERS* 12: 1971-1974, 2016)
63. Bin Zhao et al.; The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 December ; 20(6): 638–646
64. Levy D et al.; Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage. *Mol Cell* 2008 Feb 15;29(3):350-61

65. Pascale RM et al.; The BN rat strain carries dominant hepatocarcinogen resistance loci. *Carcinogenesis*, 1999, 20:1169-1175
66. De Miglio MR et al.; Polygenic control of hepatocarcinogenesis in Copenhagen × F344 rats. *International Journal of Cancer*, Vol. 111 (1), p. 9-16
67. F. Feo et al.; Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1765 (2006) 126 – 147
68. Calvisi DF et al., Ras-driven proliferation and apoptosis signaling during rat liver carcinogenesis is under genetic control. *Int. J. Cancer*: 123, 2057–2064 (2008)
69. Fabregat I et al.; Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007;27:155–62