

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

-SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE-

Direttore Prof. Eusebio Tolu

Indirizzo: Epidemiologia molecolare dei tumori

Dipartimento di Medicina Clinica, Sperimentale e di Oncologia

Sezione di Patologia Sperimentale e Oncologia

(Responsabile Prof.ssa Rosa Maria Pascale)

**RUOLO DEL GENE YAP E DELLA VIA YAP/CTGF NEL CORSO DELLA
CANCEROGENESI EPATICA NEL RATTO E NELL'UOMO**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Rosa Maria Pascale

Tesi di dottorato:

Dott. Pier Luigi Tilocca

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

INDICE SOMMARIO

IL CARCINOMA EPATOCELLULARE

- Il carcinoma epatocellulare:
 - epidemiologia e meccanismi molecolari pag 2
- Modelli di ratto nello studio della cancerogenesi epatica pag 15

LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE YAP/CTGF

- La via Hippo nella drosophila pag 23
- Le controparti della via Hippo nei mammiferi pag 27
- Funzioni e sviluppo del fegato pag 31
- Le neoplasie maligne del fegato pag 34
- Controllo della dimensione degli organi pag 36
- CTGF, Connective Tissue Growth Factor pag 37
- Biologia cellulare del CTGF pag 41
- Aspetti funzionali del CTGF pag 43
- Connessioni tra la via di trasduzione del segnale YAP-Hippo e CTGF pag 45

SEZIONE SPERIMENTALE

- Scopo della ricerca pag 48

MATERIALI e METODI

- Animali e trattamenti pag 48
- Isolamento di RNA e sintesi di cDNA pag 50
- RT – PCR quantitativa pag 51
- Western Blot pag 52

RISULTATI

- Sviluppo delle lesioni epatiche nei ratti pag 53
- Espressione di YAP e CTGF pag 54
- Sintesi proteica di CTGF pag 56

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

IL CARCINOMA EPATOCELLULARE

Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari

Il carcinoma epatocellulare (CE) è uno dei più diffusi tumori maligni al mondo e rappresenta la terza causa di morte per cancro. La sua incidenza è di oltre 500.000 nuovi casi l'anno (1).

La sua distribuzione mondiale risulta variabile, ed è dovuta a fattori ambientali, fattori alimentari ed, in misura minore, anche a fattori genetici e razziali (2, 3). Le aree ad alta incidenza sono rappresentate dall'Africa Subsahariana, l'Est e il Sud-Est asiatico, dove la sola Cina presenta più del 50% dei casi. Le aree a bassa incidenza comprendono l'Europa Settentrionale e Occidentale, il Nord America e l'Australia. Negli ultimi anni si è rilevato comunque un aumento di casi di CE anche in Europa Occidentale e Stati Uniti, presumibilmente in seguito all'incremento dell'incidenza di epatite cronica da virus C.

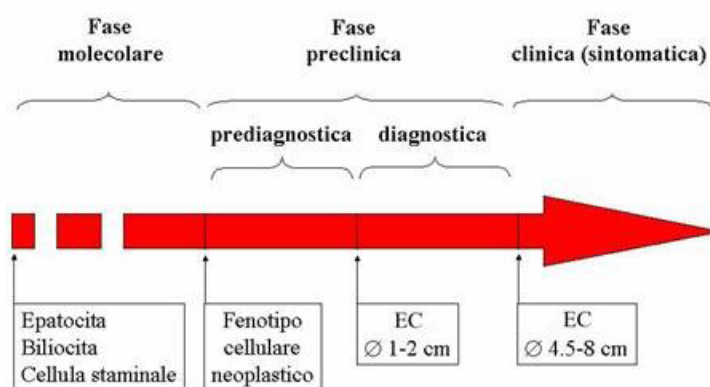
I principali fattori di rischio che portano all'insorgenza dell'epatocarcinoma, sono molteplici e includono infezioni croniche da virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV), cirrosi epatica di varia origine, intossicazioni dovute alla tossina epatotossica aflatossina B1 prodotta dal fungo *Aspergillus Flavus* (contaminante alimentare), (4, 5) e assunzione di androgeni ad alte dosi. L'abuso di alcool può, a sua volta, essere un fattore promotore in quanto può condurre alla cirrosi, che può frequentemente evolvere a CE. Un altro fattore di rischio è rappresentato da malattie metaboliche ereditarie,

come l'emocromatosi, la deficienza di antitripsina α -1, il morbo di Wilson e alcune porfirie, anch'esse in grado di evolvere a cirrosi ed eventualmente a CE. L'obesità e il diabete possono portare ad una condizione di steatoepatite non alcolica, processo morboso considerato un ulteriore fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare (3).

Considerata la maggiore incidenza riscontrata nella popolazione maschile, anche l'attività ormonale potrebbe essere considerata un fattore di rischio (3).

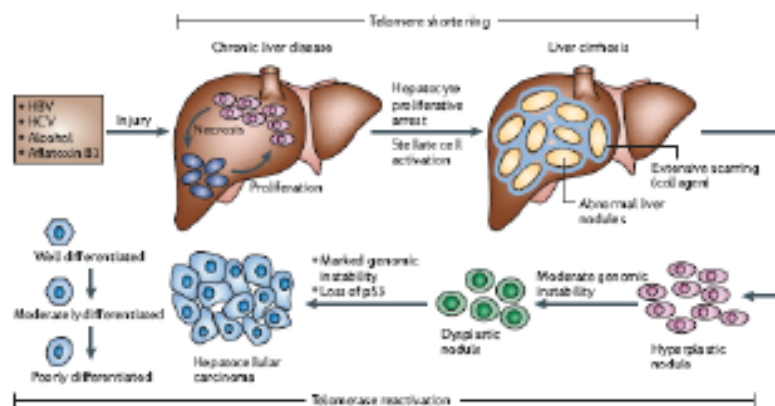
Da studi epidemiologici è noto che il tumore epatico umano, nella maggior parte dei casi, viene diagnosticato in uno stadio ormai avanzato, quando il decorso della malattia è quasi sempre caratterizzato da un rapida e fatale conclusione. Le nuove tecniche di indagine diagnostica attualmente rappresentano un vantaggio nel determinare un intervento sempre più tempestivo ed efficace. Lo studio dei fegati rimossi dai pazienti che hanno subito il trapianto ha dato l'opportunità di identificare e analizzare lesioni precancerose e piccoli tumori, consentendo l'individuazione di alterazioni molecolari sempre più caratteristiche e precoci. I notevoli progressi nella biologia molecolare del carcinoma epatocellulare hanno definito alcuni eventi implicati nella trasformazione maligna del fegato e reso possibile l'identificazione di varie alterazioni molecolari che possono determinare lo sviluppo e la progressione di questa neoplasia. L'epatocancerogenesi è un processo multifasico lento, meno definito rispetto ai processi evolutivi di altri tipi di tumore, esso è caratterizzato da modificazioni genetiche ed epigenetiche che inducono gli

epatociti a sviluppare un fenotipo maligno. Le principali fasi temporali che intercorrono nell'epatocancerogenesi sperimentale sono tre: (I) fase d'inizio, (II) fase preneoplastica (preclinica), (III) fase sintomatica (clinica), caratterizzate ciascuna dalla progressiva comparsa di alterazioni molecolari. Una tale successione temporale è confermata da indagini epidemiologiche anche nel carcinoma epatico umano.



Durante la fase iniziale, i diversi agenti eziologici causano danni al DNA delle cellule epatiche, stimolandone morte e rigenerazione. Il continuo alternarsi di processi distruttivo-rigenerativi potrebbe portare a una crescita cellulare incontrollata e veloce che a sua volta aumenta notevolmente le probabilità di danni a livello genetico e diminuisce l'efficienza della riparazione di eventuali danni al DNA. Questi fenomeni aumentano le possibilità che alcune anomalie non riparate vengano fissate e quindi trasmesse alla progenie cellulare, dando origine a linee di cellule alterate e all'insorgenza di lesioni permanenti che nel tempo possono evolvere in neoplasia. Durante lo stadio preneoplastico, il fegato diventa la sede di epatiti croniche o di cirrosi, o di entrambe, e la

proliferazione degli epatociti, ormai modificati, è accelerata dall'elevata induzione delle vie fitogeniche (6, 7). Tali lesioni epatiche, sono caratterizzate dalla formazione di noduli iperplastici con normali caratteristiche istologiche ma circondati da estesi depositi di collagene. Tali lesioni possono andare incontro a reversione fenotipica o evolvere in noduli displastici. Nei noduli displastici, gli epatociti sono caratterizzati da accumulo di lipidi e glicogeno nel citoplasma (cellule chiare), da alterazioni del numero di nuclei per unità d'area e da una marcata e crescente instabilità genomica. I noduli displastici possono evolvere in epatocarcinoma e acquisire eventualmente la capacità di invadere lo stroma fibroso circostante ed i vasi, estrinsecando il loro elevato potenziale metastatico (6).



Alcuni studi eseguiti su pazienti positivi per il virus dell'epatite C (HCV) hanno dimostrato che lo sviluppo del CE richiede circa 10 anni dalla diagnosi di cirrosi e circa 30 anni dall'esposizione al virus (8). La sequenza temporale delle alterazioni non è stata ben definita per gli altri fattori di rischio,

ma una simile cronologia di eventi potrebbe essere applicabile ai processi degenerativo-tossici provocati dall'alcool.

L'epatocancerogenesi può quindi essere legata all'accumulo di alterazioni genomiche di origine genetica ed epigenetica, che possono poi causare alterazioni delle vie di trasmissione e quindi la sregolazione di importanti vie metabolico-funzionali degli epatociti.

Mediante analisi effettuate con la tecnica del microarray si è osservato che molti geni, compresi quelli espressi in maniera specifica negli epatociti differenziati, sono espressi a bassi livelli nei CE umani rispetto a campioni di fegato non tumorale. La riduzione dell'espressione di geni epato-specifici è associata ad una perdita della capacità di differenziare delle cellule cancerose durante la progressione tumorale (9, 10). Ciò suggerisce che un'elevata capacità di proliferazione è favorita da una iper-regolazione dei geni responsabili del controllo della crescita cellulare.

Mediante analisi del cariotipo e della perdita di eterozigosi (LOH) si sono osservate amplificazioni del DNA nelle braccia dei cromosomi 1q, 8q e 20q, e perdita di DNA alle braccia 1p, 4q, 8p, 16q e 17p (10)

Le aberrazioni cromosomiche identificate nel CE hanno una diversa componente eziologica e sono più frequenti nei tumori associati a virus dell'epatite B che non a quelli associati a virus dell'epatite C (11), essi comunque rappresentano sempre un evento tardivo.

L'analisi molecolare del CE ha portato all'individuazione di numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico di

oncogeni e di soppressori tumorali (13) quali p53, p16INK4A, β -catenina e Rb (6). E' stato dimostrato che i geni c-myc e Cyclina D1 sono frequentemente iper-espressi nei CE umani (14, 15, 16) e ricerche eseguite su topi transgenici "c-myc" e topi doppi transgenici "c-myc/TGF- α " confermano il ruolo svolto da questi geni nel promuovere la proliferazione cellulare e lo sviluppo neoplastico (14).

Per quanto riguarda le alterazioni genetiche, l'analisi di epatocarcinomi correlati con HBV ha mostrato un'elevata frequenza di mutazioni a carico dell'oncosoppressore p53 in soggetti caratterizzati da uno stadio avanzato della malattia rispetto a coloro che presentano lesioni negli stadi iniziali. Nei CE associati ad infezione cronica da HBV è stato osservato che la proteina HBx, prodotta dal virus, lega direttamente p53 inibendo la sua attività pro-apoptotica (17, 4). Il potenziale epatocancerogeno di tale proteina è stato dimostrato in topi transgenici HBx, il 90% dei quali sviluppava CE. Nel caso di epatocarcinomi correlati ad HCV è stato dimostrato che una proteina non strutturale del virus, NS5A, è in grado di legare p53, impedendo il suo accesso all'interno del nucleo (18). Negli abitanti delle regioni dove la causa principale dell'insorgenza della neoplasia è rappresentata dalla contaminazione del cibo da parte dell'aflatossina B1, l'inibizione di p53 si manifesta invece negli stadi iniziali della malattia. Ciò sta ad indicare l'importanza della soppressione di p53 nello sviluppo del CE in quanto questo meccanismo faciliterebbe il potenziale proliferativo in un contesto più ampio di danno al DNA, contribuendo all'instabilità genomica.

Le alterazioni epigenetiche, possono indurre cambiamenti ereditabili o no nella metilazione del DNA e modificazioni degli istoni che modulano l'espressione dei geni ma che non implicano cambiamenti nella sequenza primaria del DNA (19). E' stato dimostrato che gli epatocarcinomi umani sono caratterizzati da aberranti patterns di metilazione del DNA. Metilazione aberrante è stata osservata sia negli stadi iniziali sia in quelli tardivi del processo di tumorigenesi. Per esempio, è stata osservata ipermetilazione del DNA nell'epatite cronica e nella cirrosi (20). Si osserva ipermetilazione a carico di vari geni tra i quali COX-2 (cicloossigenasi 2), E-caderina e p16INK4A. L'inattivazione di p16INK4A, in seguito a ipermetilazione del suo promotore ad esempio, impedisce l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 favorendone un'incontrollata progressione.

Inoltre è stato dimostrato che durante il processo di epatocancerogenesi, numerose vie di segnale risultano alterate. Una delle vie maggiormente studiate e caratterizzate è la via di trasduzione di RAS, implicata nel controllo dell'apoptosi, della crescita cellulare e della differenziazione. L'induzione di Ras determina l'attivazione di una serie di effettori a valle (Raf, Mek 1/2, Erk 1/2) con conseguente attivazione trascrizionale di bersagli nucleari quali c-Fos, c-Jun e c-Myc. Negli epatocarcinomi umani si è osservata iperespressione di Ras associata all'inattivazione degli inibitori dei suoi effettori. E' stata dimostrata ad esempio l'inattivazione di RKIP (Raf kinase inhibitory protein), gene che inibisce la fosforilazione e quindi l'attivazione di Mek 1/2, e DUSP1 (Dual specificity

phosphatase 1), inibitore di Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase). Altri importanti effettori di Ras sono RASSF1A (Ras associated factor1) e NORE1A (Novel Ras effector1). Tali proteine possono contrastare l'attività di Ras inducendo effetti proapoptotici. Negli epatocarcinomi umani, come nel tumore al polmone, al pancreas e al colon-retto, è stata dimostrata ipermetilazione e perdita di eterozigosi a carico dei promotori dei geni di RASSF1A e NORE1A (21). La perdita dell'espressione degli inibitori di Ras nei CE umani fa sì che venga promossa un'incontrollata crescita cellulare.

La via di segnale Wnt riveste un ruolo importante nel controllo dello sviluppo embrionale e della proliferazione cellulare; in un contesto patologico essa svolge un ruolo chiave nello sviluppo e nella differenziazione tumorale. In assenza del segnale Wnt, la β -catenina, suo principale effettore, viene catturata dal complesso proteico APC (Adenomatous polyposis coli)/Axina1/GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) che ne favorisce la degradazione proteasomica. Quando Wnt si lega al suo recettore, la trasmissione del segnale a livello citoplasmatico fa sì che venga soppressa l'attività di GSK3 β , stabilizzando la β -catenina. In questo modo la proteina migra nel nucleo dove lega i fattori di trascrizione LEF1/TCF e attiva i geni bersaglio, quali c-myc e ciclina D1. Essa interagisce a livello citoplasmatico con la E-caderina favorendo l'adesione cellula-cellula. Nei CE umani sono state riscontrate numerose mutazioni a carico dell'esone 3 del gene della β -catenina; tali mutazioni proteggono la β -catenina dalla degradazione e ne favoriscono l'accumulo a livello nucleare, alterando le normali

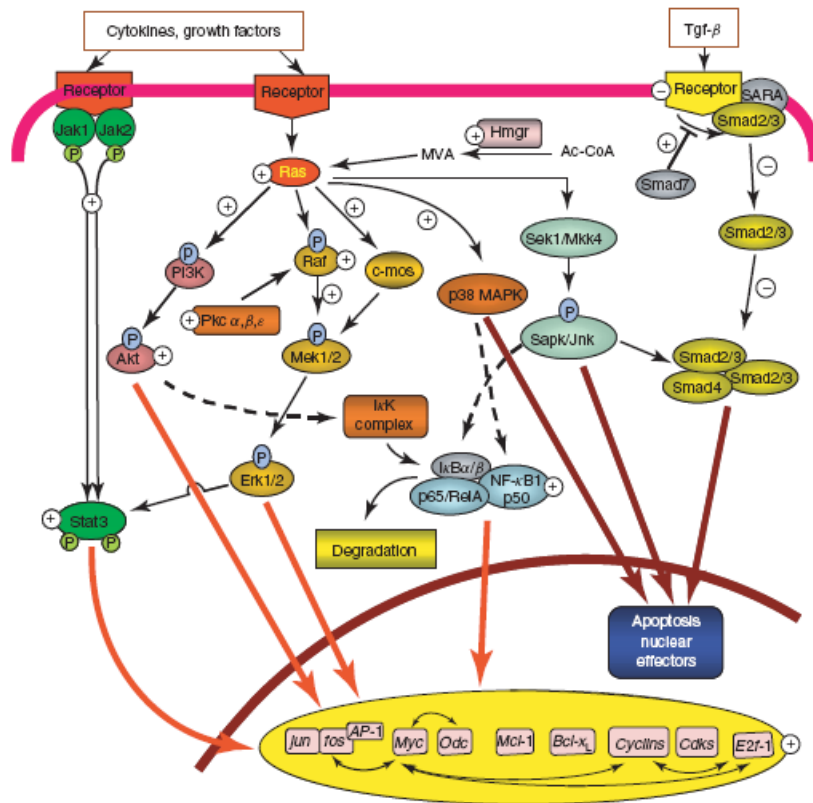
interazioni cellula-cellula e favorendo la proliferazione e lo sviluppo di fibrosi e cirrosi. E' stato inoltre osservato che gli epatocarcinomi umani con elevata instabilità genomica mostrano bassi livelli di mutazioni a carico della β -catenina. Inoltre, nel 5-10% dei CE umani sono state osservate mutazioni a carico di Axina 1 e iperespressione del ligando Wnt e del suo recettore.

La via JAK/STAT partecipa alla regolazione delle risposte cellulari alle citochine ed ai fattori di crescita, e gioca un importante ruolo in alcuni processi cellulari come la differenziazione, la proliferazione e l'apoptosi (22). La trasduzione del segnale generato dall'attività delle citochine e dei fattori di crescita è mediato dalle proteine JAK e STAT, induce una risposta intracellulare, modificando l'espressione genica.

Le proteine STAT 3 e 5, presenti in forma inattiva nel citoplasma, si attivano in seguito alla fosforilazione mediata da JAK o dai recettori ad attività tirosin-chinasica dei fattori di crescita. Una volta attivate, STAT 3 e 5, entrano nel nucleo dove agiscono come fattori di trascrizione. Nelle cellule normali l'attivazione delle proteine STAT è transiente e sotto rigoroso controllo. Nei tumori a causa dell'inattivazione di inibitori specifici di STAT (SOCS 1-3) si ha una mancata modulazione del segnale che, divenendo attivato in modo costitutivo, provoca uno sbilanciamento di fattori antiapoptotici e pro-apoptotici quali Bcl-x, ciclina D1 e D2, Mcl-1 etc (23).

In base a studi su modelli di topi transgenici TGF- α (Transforming growth factor- α , membro della famiglia EGF) è stato dimostrato il coinvolgimento della famiglia dei recettori tirosin-chinasi ErbB (ERBB1-4) nell'epatocancerogenesi. L'iperespressione di ERBB1 è stata osservata nel 68% dei CE, ERBB2 nel 21%, ERBB3 nel 84% e ERBB4 nel 61%. L'iperespressione di ERBB1 e ERBB3 è correlata a un fenotipo tumorale più aggressivo.

Oltre alle vie sopracitate, nel corso dell'epatocancerogenesi risultano alterate altre vie come la via di segnale della 3-fosfoinositolo cinasi (PI3K) e di mTOR (PI3K/AKT/mTOR), del fattore di crescita degli epatociti e del fattore di transizione mesenchimale-epiteliale, la via Hedgehog e del segnale apoptotico.



La classificazione degli epatocarcinomi umani è essenziale per la comparazione tra i differenti studi ed i vari trials terapeutici. Esistono, a questo proposito, vari protocolli di classificazione internazionali:

classificazione di Okuda

classificazione TNM

classificazione CLIP

classificazione BCLC

classificazione Child-Turcotte-Pugh (CTP)

Okuda Staging ^a						
	Negative:		Positive:		Stage:	
Tumor size	<50% of liver		>50% of liver		I: No positive factors	
Ascites	Absent		Present		II: 1–2 positive factors	
Bilirubin	<3 mg/dL		>3 mg/dL		III: 3–4 positive factors	
Serum albumin	>3 g/dL		<3 g/dL			

Child–Turcotte–Pugh (CTP)				
	1 Point:	2 Points:	3 Points:	Class:
Encephalopathy	None	Grade I–II	Grade III–IV	A 5–6 pts
Bilirubin (mg/dL)	<2	2–3	>3	B 7–9 pts
PT/INR	<1.7	1.71–2.20	>2.20	C 10–15 pts
Ascites	None	Controlled	Refractory	
Albumin (g/L)	>35	28–35	<28	

BCLC Staging and correlation with Okuda Staging						
Stage:	PS:	Tumor stage:	Okuda:	pH:	Bilirubin:	Classification:
A1	0	Single	I	No	Normal	Very early
A2	0	Single	I	Yes	Normal	Early
A3	0	Single	I	Yes	Altered	
A4	0	3 × <3 cm	I–II	Yes	Altered	
B	0	>5 cm or multinodular	I–II			Intermediate
C	1–2	Vascular invasion	I–II			Advanced
D	3–4	Any stage	III			Terminal

CLIP Staging ^b				
Points:	CTP:	Tumor morphology:	AFP:	Portal vein thrombosis:
0	A	Uninodular ≤50% of liver	<400 ng/dL	No
1	B	Multinodular ≤50% of liver	≥400 ng/dL	Yes
2	C	Massive >50% of liver		

CLIP, Cancer of the Liver Italian Program; pH, portal hypertension; PS, performance status; PT, prothrombin time; INR, international normalized ratio.

^aMedian survival without therapy: Stage I: 8.3 years, Stage II: 2 years, Stage III: 0.7 years.

^bThe median survival is 36, 22, 9, 7, and 3 months for total CLIP points of 0, 1, 2, 3, and 4 to 6, respectively.

Il protocollo raccomandato per la classificazione del grading istologico è lo schema di Edmonson e Steiner (24), che utilizza quattro gradi:

- G1: ben differenziato
- G2: moderatamente differenziato
- G3: scarsamente differenziato
- G4: indifferenziato

D'altra parte, va evidenziato che per il carcinoma epatocellulare, non è stata stabilita alcuna correlazione definitiva tra prognosi e grado istologico. I diversi tipi di modello di crescita dei carcinomi epatocellulari sono stati

associati a un rischio variabile di diffusione intraepatica ed extraepatica (25).

Modelli di ratto nello studio della cancerogenesi epatica

Le difficoltà nello studiare la sequenza degli eventi precoci che portano allo sviluppo del CE nell'uomo rendono necessario condurre gran parte degli studi su modelli animali. La difficoltà di una diagnosi precoce e la mancanza di terapie efficaci fanno sì che l'epatocarcinoma umano sia una neoplasia a prognosi infausta con breve sopravvivenza media del paziente, spesso ridotta a meno di tre anni dalla diagnosi. Per una diagnosi più precoce di tale neoplasia e per un trattamento più adeguato, è necessario pertanto lo sviluppo di validi modelli sperimentali di tumore epatico, nei quali possono essere indagati i meccanismi molecolari coinvolti nelle fasi precoci e tardive dell'epatocancerogenesi ed, eventualmente, modificati attraverso l'utilizzo di farmaci antineoplastici.

Per studiare le varie fasi del processo di epatocancerogenesi sono stati utilizzati differenti modelli sperimentali di epatocancerogenesi chimica nei roditori. Essi utilizzano uno schema comune di inizio del processo mediante somministrazione di un cancerogeno (fase di inizio), seguito da trattamenti di stimolazione della crescita (fase di promozione) che inducono l'espansione clonale degli epatociti iniziati dal cancerogeno.

La stimolazione della crescita è essenziale per l'espansione clonale delle cellule iniziate, durante la fase di promozione, e la successiva progressione verso il cancro. Tra i vari agenti promovenenti si ha il fenobarbitale, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, idrocarbonio clorinato, proliferatori dei perossisomi, e altri (26). I promotori presentano numerose caratteristiche in comune quali: la reversibilità dei loro effetti, la sensibilità a fattori ormonali o alla dieta, una soglia dose-risposta misurabile, la capacità di espandere la popolazione delle cellule iniziate, etc. (27). Le cellule iniziate evolvono in foci di epatociti ad alterata attività enzimatica (FAH), che possono formare foci e noduli con un diametro inferiore a 0,2 cm. La maggior parte dei FAH sono positivi per l'isoforma placentale del glutatione-S-transferasi 7-7 (GST 7-7) e meno frequentemente per l'enzima γ -glutamyl transpeptidasi. Altre caratteristiche comuni sono un'aumentata espressione di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, una diminuita espressione di glucosio-6-fosfatasi e ATPasi, e una riduzione nel contenuto di ferro.

In seguito alla sospensione del trattamento con i promotori, alcuni FAH e noduli precoci tendono a sparire con un processo chiamato rimodellamento o reversione fenotipica (28). L'apoptosi è in parte responsabile di questo meccanismo, che può anche essere indotto da un ridifferenziamento (presumibilmente non terminale) delle cellule preneoplastiche, con una graduale reversione del loro fenotipo.

La fase successiva: la progressione dell'epatocancerogenesi è irreversibile ed è associata con l'accumulo di danno genomico

e maggiore instabilità. Questo fenomeno può essere favorito dalla somministrazione di un cosiddetto “progressore” (29), un composto genotossico che induce ulteriori danni al DNA. Nel nostro laboratorio per indurre l’epatocancerogenesi nei ratti abbiamo utilizzato il protocollo di Solt e Farber o “modello dell’epatocita resistente” (resistant hepatocyte model, RH), nel quale i fenomeni precedentemente descritti sono ben caratterizzati.

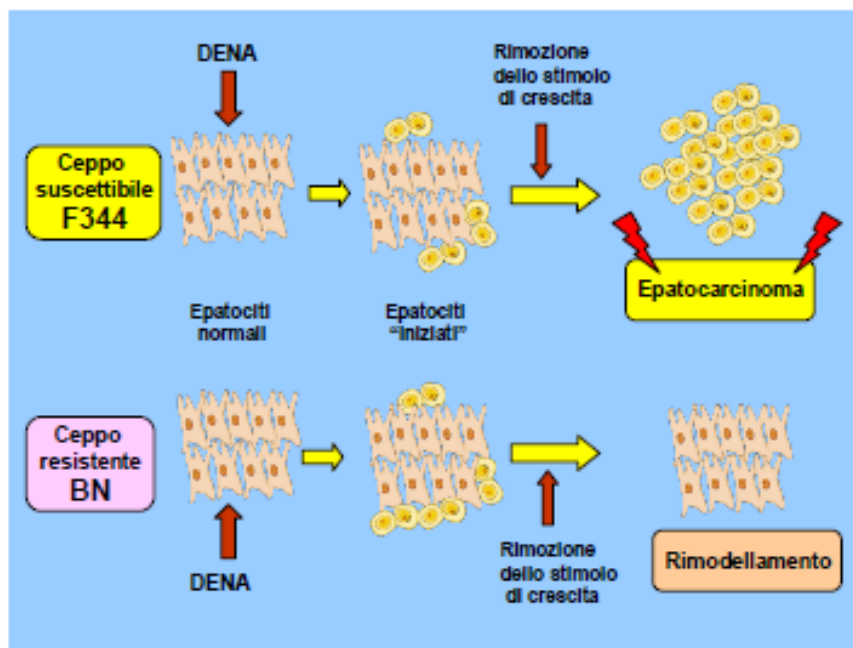
Lo sviluppo del carcinoma epatico nel ratto, indotto col metodo di Solt e Farber, è un processo comprendente 3 fasi principali:

1. *Inizio*, fase indotta dalla somministrazione del cancerogeno e dalla sua interazione con le macromolecole bersaglio.
2. *Promozione*, fase durante la quale si osserva lo sviluppo di numerosi foci preneoplastici e, in seguito, di noduli precoci, grazie all’azione di agenti promuoventi.
3. *Progressione*, fase durante la quale le lesioni preneoplastiche assumono caratteristiche di malignità, come la capacità di crescita autonoma.

L’utilizzo del protocollo di Solt e Farber ha permesso l’individuazione di due ceppi di ratto filogeneticamente distanti tra loro e diversi nella capacità di attivare o disattivare cancerogeni e di formare addotti con il DNA: i ratti Fisher (F344) suscettibili allo sviluppo di epatocarcinomi indotti chimicamente e i ratti Brown Norway (BN) resistenti alla cancerogenesi indotta utilizzando lo stesso protocollo sperimentale (30) I ratti BN sono portatori di geni della

resistenza, che interferiscono con gli stadi di promozione e di progressione, determinando una scarsa capacità delle lesioni preneoplastiche ad evolvere in adenomi e carcinomi. Da incroci tra i due ceppi di ratto si è osservato che gli alleli resistenti sono trasmessi in maniera dominante alla progenie e modificano l'attività dei loci di suscettibilità (31). Queste osservazioni suggeriscono che i meccanismi che controllano la crescita cellulare sono influenzati in maniera differente nelle lesioni epatiche dei ratti suscettibili e resistenti.

Le lesioni preneoplastiche precoci possono andare incontro a rimodellamento oppure evolvere andando incontro a progressione neoplastica. Durante il rimodellamento si verifica la progressiva scomparsa di almeno alcune anomalie fenotipiche caratteristiche del tessuto preneoplastico e neoplastico, che possono tuttavia riacquistare velocemente capacità di crescita in seguito all'applicazione di un nuovo stimolo promovente. Nei ratti BN, resistenti all'epatocancerogenesi, soltanto alcuni noduli precoci, su centinaia presenti, sono in grado di evolvere lentamente a carcinomi epatocellulari. Questa osservazione sperimentale sottolinea dunque il fatto che una gran parte di noduli va incontro a rimodellamento.



Schema illustrante la differente suscettibilità dei ceppi di ratto BN ed F344 alla cancerogenesi epatica indotta secondo il modello dell'epatocita resistente. La somministrazione del cancerogeno induce la formazione di cellule iniziate in entrambi i ceppi, ed in numero lievemente maggiore nel ceppo resistente BN. Tuttavia, alla sospensione dello stimolo promovente la crescita (rappresentato dall'epatectomia parziale), le cellule iniziate, indotte nel ceppo BN, vanno incontro a rimodellamento, mentre le cellule iniziate del ceppo suscettibile F344 continuano a proliferare e conducono allo sviluppo di lesioni preneoplastiche e neoplastiche.

I noduli epatici che sono in grado di procedere nel loro sviluppo, in assenza di stimolo promovente, vanno invece incontro alla fase di progressione e possono evolvere a CE. Diversi studi hanno evidenziato che i meccanismi molecolari alla base della suscettibilità o della resistenza nei due ceppi di ratto, ripercorrono piuttosto fedelmente le alterazioni evidenziate nei CE umani (32). Pertanto l'analisi dei due modelli di tumore epatico di ratto può rappresentare un valido ed utile sistema per lo studio dell'epatocarcinoma umano, esso

permette l'identificazione dei geni che potrebbero essere bersaglio della terapia genica nei primi stadi dell'epatocancerogenesi, consente di mappare dei geni di suscettibilità, per definire il modello genetico responsabile di un maggior rischio di CE, e può permettere di esaminare i meccanismi effettori dei geni di suscettibilità tumorale.

La mappatura dei diversi geni della suscettibilità e della resistenza all'epatocancerogenesi, in topi e ratti indica dunque che essi controllano la crescita, la progressione e la ridifferenziazione di lesioni preneoplastiche e neoplastiche e indicano una predisposizione ereditaria al CE, come è anche suggerito dall'epidemiologia del CE umano (33). Nei noduli neoplastici e nei CE dei ratti geneticamente suscettibili F344 si ha l'iperespressione dei geni *c-myc*, *Cyclin D1*, *E* ed *A* e di *E2f1* associata all'iper-fosforilazione di pRb, ma questo non si verifica nelle corrispondenti lesioni dei ratti resistenti BN. Inoltre Cdc37, Hsp90 e Crm1 che proteggono le chinasi del ciclo cellulare dall'inibizione da parte di p16INK4A, sono iper-regolati nelle lesioni dei ratti F344, ma non in quelle dei BN. In maniera interessante, sono stati trovati analoghi cambiamenti anche nei CE umani, con un sottotipo di CE a miglior prognosi (HCCB, con periodo di sopravvivenza del paziente dopo parziale resezione chirurgica superiore a 3 anni) somigliante ai CE dei ratti resistenti e un sottotipo a peggior prognosi (HCCP, con periodo di sopravvivenza del paziente dopo parziale resezione chirurgica inferiore a 3 anni) simile alle lesioni dei ratti suscettibili. Inoltre, si è riscontrata una maggior espressione di ERK nei noduli e nel CE dei ratti F344

e dei CE umani a peggior prognosi, mentre ERK risulta solo leggermente indotto nelle corrispondenti lesioni del ceppo BN e nei CE a miglior prognosi (34).

La diminuzione della capacità di crescita e l'aumento della redifferenziazione delle lesioni preneoplastiche caratterizza il ceppo di ratti resistente all'epatocancerogenesi. Conseguentemente, studi sui meccanismi caratterizzanti l'acquisizione di un fenotipo suscettibile o resistente all'epatocancerogenesi nei ceppi di ratto, portando le lesioni preneoplastiche differentemente inclini alla progressione in CE, può condurre alla scoperta di marcatori prognostici e bersagli terapeutici per questa malattia dell'uomo.

***LA VIA DI TRASDUZIONE DEL
SEGNALE YAP/CTGF***

La via Hippo nella drosophila

Le alterazioni genetiche sono alla base di numerose patologie, tra cui difetti dello sviluppo fetale e l'insorgenza di neoplasie nell'adulto. La letteratura scientifica è costellata di studi, punto di arrivo di lunghi percorsi, in cui la determinazione dei più intimi meccanismi alla base di una patologia origina dalla identificazione delle alterazioni genetiche sottostanti. Tali alterazioni riguardano spesso geni che regolano la crescita e l'omeostasi tissutale. Con l'avanzamento delle tecniche di ricerca e la messa a punto di nuovi strumenti ad alta processività per la identificazione di alterazioni geniche sono stati scoperti numerosi geni e vie di segnale cruciali per lo sviluppo dei tessuti, una delle quali è la Hippo pathway o via Hippo.

La via di segnale Hippo venne originariamente identificata nella *Drosophila* mediante screening di geni coinvolti nella crescita e proliferazione cellulare. Dei suoi componenti, fu individuato per primo *Wts*, la cui delezione dava esito a proliferazione cellulare autonoma e over-growth degli epiteli (35, 36). Con la denominazione di *Warts* (o *Wts*, verruca) si indica un fenotipo le cui cellule mutate, nelle larve, proliferano drammaticamente nei dischi imaginali e si riproducono, negli adulti, in agglomerati di cloni mitotici simili a verruche. Successivamente sono stati identificati gli altri componenti della via, anch'essi in dischi imaginali che esprimevano un fenotipo simile. Tali componenti sono:

- *Hpo*, una kinasi del tipo ste20

- *Sav*, una proteina contenente il dominio WW
- *Mats*, una proteina adattatrice

(36 - 43). Successivi studi biochimici hanno evidenziato come queste proteine siano parte di una cascata chinastica (*Hpo/Sav1/Mats//Wts*): *Hpo* fosforila e attiva *Wts* (42), in presenza di *Sav* e *Mats* che agiscono come proteine di ancoraggio facilitando l'interazione tra *Hpo* e *Wts*. *Hpo* e *Wts* sono entrambi Ser/Thr chinasi capaci di attivazione per autofosforilazione (44, 45), benché l'attivazione di *Wts* sia anche regolata dalla fosforilazione di *Hpo*. Inoltre *Hpo* può fosforilare *Sav* e *Mats* (42, 43), che a sua volta facilita l'attivazione e il legame di *Wts*.

La fosforilazione e l'attivazione sequenziali dei componenti della via Hippo spiegano la somiglianza ma anche la progressiva severità dei fenotipi mutanti. La delezione dei componenti a valle - *Wts* - (downstream) dà esito a fenotipi simili ma più severi che se la delezione avvenisse a carico delle proteine a monte - *Hpo* o *Sav* - (upstream).

Hpo/Sav/Mats/Wts è il core della cascata chinastica della via Hippo. La sua funzione è quella di percepire e mediare la traduzione dei segnali extracellulari al nucleo. Benché non sia del tutto conosciuto quali sino tali segnali extracellulari in condizioni fisiologiche, sono stati identificati alcuni regolatori intracellulari a monte della cascata *Hpo/Sav/mats/Wts*, come ad esempio il complesso *Mer-Ex-Kibra* (46 - 49), la proteina di segnalazione *Fat* (50 - 54), e il complesso *Lethal Giant Larvae* (*Lgl*) (55).

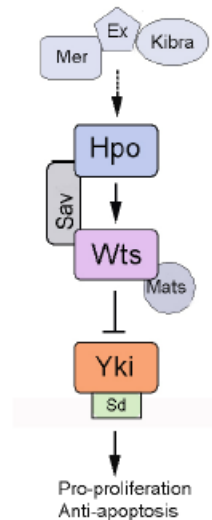
Tra questi regolatori il più importante pare essere *Mer-Ex-Kibra*, dal momento che attiva la via Hippo attraverso la fosforilazione sia di *Hpo* sia di *Wts*. *Mer*, *Ex* e *Kibra* hanno un comportamento ridondante nel regolare la via Hippo e ciascuno di essi può funzionare indipendentemente dall'altro. Ad esempio, nel caso dell'inibizione da contatto intercellulare, la crescita cellulare si arresta quando la via Hippo è attivata da *Ex*, che a sua volta è attivato dal legame con la proteina transmembrana *Crb*, mediante la sua omodimerizzazione tra due cellule adiacenti (56).

Benché i componenti della cascata chinastica *Hpo/Sav/Mats/Wts* abbiano la funzione di sopprimere la crescita tissutale, nessuno di essi è un fattore di trascrizione nucleare. Ricerche sui lieviti hanno consentito di identificare il co-fattore di trascrizione nucleare *Wts*, il quale è una proteina che si lega in maniera dominante a *Wts*. *Wts* attivato può fosforilare *Yki*, e tale fosforilazione consente il legame tra *Yki* e una proteina adattatrice, 14-3-3, a cui segue la ritenzione di *Yki* nel citoplasma e la sua soppressione funzionale (57 - 59). Se la traslocazione dal nucleo al citoplasma è ritenuta essere uno dei principali meccanismi regolatori della funzione di *Yki*, è stato altresì dimostrato che *Wts* può inibire *Yki* per mezzo di un legame fisico (57). Questo riscontro spiega ulteriormente perché la delezione di *Wts* determini un fenotipo più severo rispetto a quanto risulti dalla delezione degli altri componenti della via. L'attività di *Yki* può anche essere soppressa dal legame diretto proteina-proteina tra il suo dominio WW e una sequenza ricca in prolina all'interno del motivo PPXY. Questo

è messo in evidenza dall'associazione tra *Yki* e *Ex*, *Kibra*, *Hpo* o *Warts* i quali hanno tutti un dominio PPXY (60, 61). Benchè siano stati identificati diversi *upstream regulators* della Via Hippo, *Yki* è finora l'unico effettore nucleare della via e funge pertanto da ponte tra la componente citoplasmatica *Hpo/Sav1/Mats/Wts* e la trascrizione dei geni bersaglio. Infatti di per se *Yki* difetta di un sito di legame col DNA: esso deve associarsi a una DNA-binding protein per poter adempiere alle sue funzioni di regolatore della trascrizione genica. Sono stati identificati diversi fattori di trascrizione come *Sd* (Scalloped, che inizia la l'espressione del gene *diap1*) (62, 63, 64) *Hth* (65). Anche *dE2F1* può associarsi a *Yki* e sinergizzare col complesso *Yki/Sd* nel promuovere la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 a S (66). Tutto questo supporta ulteriormente la funzione della via di segnale Hippo nel regolare il ciclo e la proliferazione cellulare controllando così la crescita dei tessuti.

Da quanto esposto finora emerge che la cascata chinastica *Hpo/Sav/Mats/Wts* media la traduzione del segnale tra gli stimoli extracellulari e il cofattore di trascrizione nucleare *Yki*. Le varie capacità di legame di *Yki* ai fattori di trascrizione determina il coinvolgimento della via Hippo in numerosi processi biologici. L'osservazione che sia la delezione di uno dei componenti della sequenza *Hpo/Sav/Mats/Wts* sia la iper-espressione di *Yki* risultino nell'overgrowth tessutale e nell'ingrandimento degli organi suggerisce che la via Hippo giochi un ruolo fondamentale nel controllo della dimensione degli organi e potrebbe e che la sua soppressione sia alla base

della tumorigenesi, che altro non è se non un processo di crescita cellulare incontrollata.



Le controparti dei componenti della via Hippo nei mammiferi

Durante l'evoluzione la via Hippo si è estremamente conservata. Molti dei suoi componenti sono riportati in numerose specie compresi lieviti, mosche, roditori e l'uomo. Benché la maggior parte delle controparte delle proteine del *core* della via di segnale abbiano nei mammiferi paraloghi funzionalmente ridondanti, le interazioni biochimiche tra esse (42, 57, 67, 68)). In breve, Mst fosforila e attiva Lats che a sua volta fosforila Yap/Taz. Quest'ultimo, una volta fosforilato, si lega alla proteina adattatrice 14-3-3 e viene allontanato dal nucleo (69). YAP può essere fosforilato in diversi siti e non solo da parte di LATS. Inoltre, a diverso sito di fosforilazione corrispondono diverse modifiche strutturali e quindi funzionali

di YAP. Ad esempio la fosforilazione da parte di Lats avviene sulla serina 127 di YAP, conducendo alla ritenzione di quest'ultima nel citosol. Se la fosforilazione avviene invece sulla Tyr 357, processo mediato da C-Abl, YAP viene ubiquitinata (70). La fosforilazione sulla Ser 381 da parte di SCF porta alla stabilizzazione di YAP, alla sua traslocazione nel Nucleo e alla attivazione della trascrizione di p73, gene promuovente l'apoptosi (71). Sav1 e Mob facilitano l'interazione tra Mst e Lats.

Drosophila	Ratto/Uomo
<i>Hpo</i>	<i>Mst1</i>
	<i>Mst2</i>
<i>Sav</i>	<i>WW45/Sav1</i>
<i>Warts</i>	<i>Lats1</i>
	<i>Lats2</i>
<i>Mats</i>	<i>Mobl</i>
<i>Yki</i>	<i>Yap</i>
	<i>Taz/WWTR1</i>

Mst1 e Mst2 sono chinasi del tipo Ste20 ubiquitarie. Il loro dominio C-terminale SARAH media la capacità di Mst1 e 2 di autolegare così come di legarsi con altre proteine contenenti il dominio SARAH quali Sav1 e Nore1 (una proteina del gruppo degli onco - soppressori Rassf). Il complesso Mst/Sav1 rappresenta la via segnale Hippo che nei mammiferi inibisce la crescita cellulare e tissutale, mentre il complesso Mst/Nore1 gioca un ruolo importante nello sviluppo dei linfociti T. La funzione inibente la crescita e la sopravvivenza cellulare di

Mst è rappresentata anche dal suo coinvolgimento nella apoptosi cellulare indotta dallo stress, nella quale è attivata da una scissione caspasi-dipendente in una protein-chinasi da 36 kDa che, traslocata nel citosol, contribuisce alla condensazione della cromatina durante l'apoptosi (72). Da ciò emerge l'effetto negativo di Mst sulla sopravvivenza e crescita cellulare.

Lats appartiene alla famiglia di chinasi Lats/NDR e già prima di essere associata alla via Hippo era nota la sua attività oncosoppressiva. È espressa ubiquitariamente e svolge una funzione importante in diversi eventi della vita cellulare quali la proliferazione, dinamiche del citoscheletro, migrazione cellulare, uscita dalla mitosi, regolazione trascrizionale e stabilità genica (73). Tali numerose funzioni dipendono dalla sua struttura cellulare che contiene un dominio che lega altre proteine (PBD), un dominio catalitico, due domini Lats conservati (LCD) e motivi PPxY. Questo spiega come potenzialmente Lats possa interagire con numerosi regolatori del ciclo cellulare e porta a pensare che sia uno dei principali responsabili dell'omeostasi cellulare. Nonostante ciò gli unici suoi substrati identificati finora sono Yap e Taz.

Sav1 (chiamato anche WW45) e Mob1 sono proteine di ancoraggio che facilitano l'interazione rispettivamente Mst-Lats e Lats-Yap/Taz. Dal punto di vista biochimico Sav1 si lega a Mst1, Mst2 e Rassf1 (74, 75). Essa possiede due domini del tipo WW che legano i motivi PPXY contenuti in altre proteine come Lats e Yap/Taz. È stato dimostrato che NF2 (ortologo di Mer) e la controparte mammifera di Kibra possono attivare e fosforilare Lats legandosi a Sav1 (76). Poco

altro si sa a proposito di Mob1, a parte essere necessario per la escissione del midbody durante la citochinesi.

Yap e Taz sono gli ortologi nei mammiferi di Yki e, tra i due, Yap è quello più strutturalmente simile alla sua controparte della *Drosophila*. Mentre Yap possiede due domini WW, Taz ne possiede uno solo (77), e il dominio SH3 presente in Yap, manca in Taz. Le differenze strutturali suggeriscono che tra i due Yap abbia funzione dominante come effettore della via di segnale. Analogamente a Yki, anche Yap è carente di un dominio capace di legarsi al DNA, e pertanto deve associarsi a fattori di trascrizione per regolare i geni bersaglio. Alcuni fattori sono stati identificati e tra questi sono stati descritti C/EBP e P73, importanti regolatori del ciclo cellulare. Anche TEF/TEAD fanno parte di questa famiglia di fattori trascrizionali che si legano a Yap/Taz (78, 79, 80). Essi, dopo essersi legati a Yap/Taz iniziano l'espressione del gene CTGF (81, 82), il quale è necessario per la proliferazione dei condrociti, l'angiogenesi, e la produzione e il turnover della matrice extracellulare. Entrambe le proteine inoltre agiscono su effettori diversi per regolare distinti geni target: ad esempio Taz interagisce con TBX5 (83) e Smad2/3/4 (84), mentre Yap ha come bersaglio ErbB4 (85) e Smad7 (86). Entrambi possono essere tuttavia fosforilati da Lats, e rappresentano gli unici due effettori identificati della via di segnale Hippo nei mammiferi.

Funzioni e sviluppo del fegato

Il fegato è l'organo solido più voluminoso dell'organismo e riveste un ruolo essenziale nel metabolismo, detossificazione e biosintesi. È situato nel quadrante superiore destro dell'addome, in sede sottodiaframmatica e cranialmente allo stomaco e all'intestino. Le sostanze nutritive (carboidrati, grassi e proteine) assorbite nell'intestino, vengono ulteriormente processate nel fegato e convertite in altre forme di energia (aminoacidi e proteine, glucosio, vitamine, etc etc) che possono essere sia immagazzinate sia riversate nel circolo ematico per far fronte alle richieste dell'organismo. Esso filtra inoltre i prodotti di degradazione (bilirubina, ammonio) e le tossine (alcool, farmaci e altre sostanze chimiche), prelevandoli dal sangue e trasformandoli in sostanze idrosolubili e pertanto capaci di essere escrete con la bile attraverso le feci o le urine. Da questa breve sintesi emerge come il fegato assolva l'importante compito di guardiano della salute dell'organismo.

Gli epatociti sono il tipo cellulare più rappresentato, costituendo circa il 70% dell'intera massa epatica e sono responsabili della maggior parte delle funzioni del fegato (87). Cellule non parenchimali quali colangiociti, cellule stellate e sinusoidali rendono ragione del restante 30%. Epatociti e colangiociti sono di derivazione endodermica mentre le altre derivano dal mesoderma. Lo sviluppo del fegato è conseguenza di interazioni tissutali reciproche tra l'endoderma e il vicino mesoderma. Il fegato origina dal foregut ventrale

intorno all'ottavo giorni di sviluppo embrionale (E8.0) (88, 89). Il diverticolo epatico si forma in E9.0, quando si trova vicino al cuore in sviluppo. A E9.5 gli epatoblasti, progenitori sia degli epatociti che dei colangiociti, si sfaldano dalla porzione anteriore del diverticolo epatico e invadono il mesenchima adiacente per formare il germoglio epatico (90 - 92). I rapporti reciproci tra l'endoderma e il mesoderma promuovono la proliferazione degli epatoblasti e la formazione delle cellule stallate dall'adiacente mesenchima (93 - 96). Tra E10.5 e E15 il germoglio epatico subisce una crescita imponente dovuta alla proliferazione e successivamente alla differenziazione degli epatoblasti. Le cellule epiteliali biliari compaiono in E11.5 (97, 98) intorno alla vena porta e, a causa del contatto con le circostanti cellule epiteliali e mesenchimali, vanno incontro a differenziazione e crescita. In seguito la maggior parte degli epatoblasti si differenziano in epatociti e il fegato raggiunge, nel periodo perinatale, le caratteristiche architetture definitive.

Numerose sono le vie di segnale che presiedono allo sviluppo dei colangiociti e alla formazione dei dotti biliari. Tra queste la via segnale del TGF β , la Wnt e la Notch. La prima di esse determina un gradiente, con una densità minore in regione parenchimale e maggiore in quella portale (98, 99), che è fondamentale per la differenziazione. Infatti al blocco della via di segnale TGF β consegue la soppressione la differenziazione biliare mentre la sua attivazione promuove la differenziazione ectopica. La via di segnale Wnt è attivata temporaneamente durante la differenziazione dei colangiociti, con un picco in

E12.5 ma che appare completamente soppressa dopo E16.5 (100). Notch induce la differenziazione biliare ed è attivato specificatamente nella regione portale dal suo ligando Jagged1, secreto dalle cellule endoteliali portali (101 - 103). Questo aspetto rende ragione del fatto che i dotti biliari si formino lungo i rami portali e la delezione o la mutazione di Jagged1 nell'uomo determina l'insorgenza di una malattia ben definita, la sindrome di Agille, autosomica dominante (104 - 106). Ratti con la delezione di Notch2 e di Jagged1 sviluppano una condizione simile alla sindrome di agille e vengono utilizzati come modello sperimentale per lo studio dello sviluppo dei dotti biliari (107 - 111).

L'architettura caratterizzante il fegato adulto è rappresentata dal lobulo epatico. Nell'uomo e nel suino esso è delimitato da tessuto connettivo che gli conferisce una forma esagonale. Anche nel fegato murino, benché non vi sia una delimitazione così netta del lobulo, è presente una strutturazione simile: la triade portale e la vena centrolobulare. La triade portale è costituita dai rami biliare, della vena porta e della arteria epatica. Gli epatociti si dispongono come cordoni che connettono la vena con la triade portale, con le cellule di Kupffer, i principali attori del sistema immunitario epatico, situate nei sinusoidi, ciascuno dei quali, allineato alle cellule endoteliali, decorre tra due file di epatociti. Lo spazio di Disse, localizzato tra gli epatociti e le cellule endoteliali, contiene le cellule stellate del fegato, le quali, in seguito a danno epatico, vengono attivate e secernono collagene contribuendo alla fibrosi e alla cirrosi epatica (112). L'architettura del fegato

riflette le sue capacità funzionali e omeostatiche. Le sostanze chimiche e nutrienti provenienti dalla digestione entrano nel fegato attraverso la vena porta e da qui, insieme al sangue arterioso, passano lungo i sinusoidi nella vena centrolobulare (tributaria della circolazione venosa sistemica). Per converso gli acidi biliari secreti dagli epatociti e raccolti nei canalicoli biliari vengono riversati nel torrente intestinale. Questi due flussi determinano un efficiente trasporto delle sostanze nutritive e il riciclo dei materiali biologici tra fegato e intestino. In sintesi, diverse condizioni patologiche, in cui l'infiltrato infiammatorio sovverte la struttura del fegato, determinano l'alterazione sia del flusso ematico che di quello biliare fino a raggiungere stadi di fibrosi e cirrosi che costituiscono il substrato dei tumori epatici.

Le neoplasie maligne del fegato

Il tumore epatico è la terza causa di morte per cancro. La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti affetti da cancro del fegato è intorno al 10% e più del 50% dei pazienti trattati chirurgicamente sviluppa la recidiva entro 3 anni (113, 114). L'elevata mortalità è dovuta principalmente a diagnosi tardive all'aggressività della neoplasia (115). Il carcinoma epatocellulare è fortemente associato all'infezione da HBV e HCV che induce infiammazione cronica, rigenerazione parenchimale e quindi cirrosi, lesioni displastiche e infine epatocarcinoma (116). Altre condizioni predisponenti sono

l'etilismo, l'assunzione di tossici e di cibi contaminati (117). Anche l'attivazione di cellule staminali e progenitrici dovuta all'infezione virale può portare alla formazione del tumore. In base alla origine cellulare distinguiamo, oltre al carcinoma epatocellulare (HCC), il colangiocarcinoma. (CC). HCC è caratterizzato da una proliferazione incontrollata di epatociti dal diminuito contenuto citoplasmatico mentre CC si configura per una proliferazione di dotti biliari, e quindi di colangiociti, scarsamente organizzati. Le due linee cellulari talvolta coesistono nello steso tumore, da cui emerge che l'origine possa derivare da cellule progenitrici o staminali che vanno incontro a differenziazione sia in senso epatocitario che epiteliale biliare (118). Tali tumori hanno spesso prognosi peggiore e danno facilmente origine, se resecati, a recidiva (119 - 121). Si pensa che le cellule staminali del fegato risiedano nei dotti biliari o nell'area periportale. Tuttavia, non abbiamo al momento markers specifici che ci consentano la loro identificazione che si basa su criteri morfologici, in particolare sulla loro forma ovale determinata alla microscopia elettronica.(122). Mediante questa tecnica sono state identificate diverse cellule progenitrici a stadi intermedi compresi tra le cellule ovali e gli epatociti maturi, classificate come tipo I, tipo II e tipo III e le rare cellule ovali sono dette Tipo 0. In modelli sperimentali come la necrosi epatica indotta da alcool allilico nei ratti, le cellule suddette costituiscono l'espansione cellulare periportale che viene attivata in tale situazione. Le cellule del tipi 0 e I, meno differenziate, compaiono negli stadi precoci mentre quelle di tipo II e III

sono rilevabili negli stadi più tardivi. Tuttavia non disponiamo ancora di anticorpi specifici per ogni tipo cellulare e quelli disponibili consentono solo di identificare un misto di queste cellule (123)

Controllo della dimensione degli organi

La dimensione degli organi può essere determinata sia dal numero delle cellule che dalla loro dimensione (124). Per esempio il cuore di un elefante è più grande di quello di un ratto perché contiene più cellule (125), mentre le piccole ali di alcune varianti di *Drosophila* è il risultato di cellule dalle dimensioni più piccole(126). La grandezza di un certo organo inoltre è raggiunta nell'ambito del total organ mass mediante la regolazione coordinata del numero e del volume delle cellule. Un esempio è dato dal caso della salamandra tetraploide nella quale nonostante le cellule abbiano dimensione doppia rispetto a quelle dell'esemplare diploide, la grandezza dei singoli organi è simile nei due animali poiché nella salamandra tetraploide vi è la metà delle cellule che costituiscono quella diploide (127). Inoltre, un mutamento nel numero delle cellule a causa della de-regolazione della proliferazione non risulta necessariamente in modificazioni della grandezza dell'organo (128, 129). Questi dati sperimentali suggeriscono che vi sia un meccanismo che induce il rispetto della massa di un organo entro certi limiti

(total mass setting point), che si determina coordinando il numero delle cellule con la loro dimensione.

Studi che hanno approfondito questo aspetto, conducendo screening genetici su *Drosophila* sono stati volti a identificare quali geni regolassero l'accoppiamento numero di cellule – grandezza delle cellule e quali siano le mutazioni capaci di alterare questo rapporto. La via di trasduzione del segnale dell'insulina è stata individuata come una via di segnale importante per il controllo delle dimensioni degli organi e il suo effetto si realizza sulla crescita delle cellule ma non sulla loro proliferazione (130). La mutazione di uno o più dei suoi componenti pertanto determina modificazioni nella grandezza dell'organo, non alterando il numero delle cellule ma solo la loro dimensione. È mediata dalla via PI3K/AKT e regola sia la trascrizione del mRNA che la traduzione di proteine. La grandezza della cellula è causata dall'alterazione del rapporto RNA:DNA e della quantità di proteine (131). Questo meccanismo è stato ulteriormente studiato nei mammiferi: nel cuore di ratto la diminuzione o l'aumento della attività della via dell'insulina causa rispettivamente il decremento o l'incremento del volume dei miocardiociti (132). Nel fegato dei ratti l'attivazione temporanea della via mediante l'attivazione dei bersagli di Akt provoca l'aumento delle dimensioni dell'organo di tre – quattro volte nell'arco di pochi giorni basato solamente sull'aumento del volume degli epatociti (133). A ulteriore supporto di questi dati vi è l'osservazione che in caso di rigenerazione del fegato la via induce l'ipertrofia delle cellule nelle situazioni in cui vi sia la

deficienza dei meccanismi di proliferazione cellulare (134, 135). Inoltre l'interruzione della cascata PI3-K/PDK1/Akt, il principale complesso chinasi citoplasmatico della via di trasduzione del segnale dell'insulina, non incide sulla risposta mitotica post-epatectomia degli epatociti, quanto piuttosto bloccando la rigenerazione per l'indotta incapacità di crescita cellulare (135).

Anche la via di segnale Hippo è strettamente connessa ai meccanismi di controllo del volume degli organi. Questo però si compie anziché regolando la crescita cellulare, modulando l'equilibrio tra la proliferazione e l'apoptosi. Nella *Drosophila* la deregolazione della via risulta nell'overgrowth dei dischi imaginali e nell'ingrandimento dei corrispondenti organi una volta maturi senza però interferire con la grandezza cellulare e l'architettura dell'organo.

CTGF, connective tissue growth factor

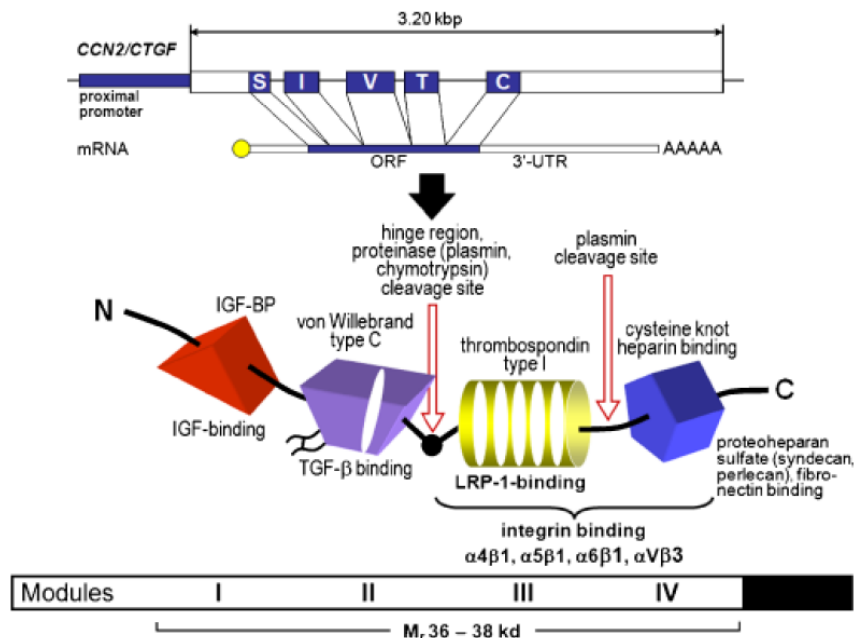
Connective tissue growth factor (CTGF) venne scoperto nel 1991 come un "mitogene correlato al PDGF" secreto in un medium condizionato di cellule endoteliali di vena ombelicale umana e denominato CTGF (136). È una proteina che presenta sequenze omologhe e struttura secondaria simile a quelle di altre cinque proteine, tra le quali la proteina 61 ricca in cisteina (*cyr61*, *CCN1*), CTGF, appunto, (*CCN2*) e la proteina iperespressa nel nefroblastoma (*NOV*, *CCN3*), tutte raggruppate nella famiglia delle CCN (da c*y*r61, CTGF, NOV),

che sono glicoproteine secrete, ricche in cisterna e con architettura modulare(137, 138). Gli altri membri della famiglia sono proteine indotte da Wnt – 1 (WISP): WISP – 1 o CCN4, WISP – 2 o CCN5 e WISP – 3 o CCN6 (139).

CTGF contiene quattro moduli strutturali che seguono una sequenza peptidica leader di 37 aminoacidi: I) un dominio che lega il fattore di crescita simil-insulinico, II) un dominio fattore di von Willebrand tipo C, III) un modulo omologo alla trombospondina tipo I e IV), verso l'estremità carbossi-terminale, un motivo che lega l'eparina (137, 138). I moduli I e II si pensa che comprendano il dominio N – terminale legato mediante la regione cerniera (hinge region) al dominio C – terminale dei moduli II e III. La regione cerniera è un sito di scissione sensibile alle proteasi che dà origine ai frammenti rispettivamente N – e C – terminali (139). Tra le proteasi, hanno un ruolo importante la chimotripsina e il plasminogeno che non solo scindono la regione cerniera ma anche i moduli I e IV. Nei fluidi corporei e nel medium condizionato di alcune colture cellulari possono essere isolati sia il modulo IV, legante l'eparina, di 10 – 12 kD sia i frammenti immuno-reattivi di 10, 16 e 20 kD sia la molecole intera di 38 kD (139). I moduli strutturali adempiono alle funzioni della proteina mediante il legame con il fattore di crescita simile all'insulina (modulo I), il TGF- β (II), alcune integrine e recettori della superficie cellulare (III) e proteoglicani di eparan-solfati quali il sindacano 4 e il perlecano (IV). Il gene che codifica per CTGF si trova nel locus 6q23.1, anche se la regione cromosomica non è stata perfettamente identificata. Sono

emersi polimorfismi dei singoli nucleotidi (SPNs), quattro dei quali sono localizzati nel promotore (141, 142). Recentemente, un SNP specifico è stato associato alla suscettibilità alla sclerosi sistemica (143). Sono stati postulati diversi siti di legame per fattori di trascrizione sul promotore del gene per CTGF come il sito di legame per AP – 1, per Sp1, per il fattore inducibile dall'ipossia (HIF), per TATA box, per Ets – 1, per il fattore nucleare (NF) kB, per il box tipo CArG sensibile all'actina, TGF – beta e Smad (144, 148). Pertanto l'espressione di CTGF è regolata da numerosi meccanismi di traduzione del segnale tra cui le vie del TGF – beta/Smad (149), di Ras/MEK/ERK, della protein-chinasi C (PKC) (150, 151), di NF – kB, JAK/STAT, dell'AMP ciclico (152), della piccola GTPasi RhoA, del fattore di risposta del siero, della fosfatidil-inositol 3 – chinasi e delle specie reattive dell'ossigeno (153). L'effetto finale, ovvero la up – o down – regolazione di CTGF, dipenderà dal tipo cellulare (mesenchimale o epiteliale), l'environment cellulare e l'interazione dei fattori regolatori. Diverse di queste vie di segnale agiscono di concerto nell'induzione di CTGF guidata da TGF – beta ed è verosimile l'esistenza di un esteso crosstalk per gli altri stimoli extracellulari. I fattori esterni che, a seconda del tipo cellulare up-regolano l'espressione di CTGF comprendono, oltre a *TGF-β* che è il maggiore induttore, il fattore di risposta del siero, il fattore di crescita vascolare endoteliale, il fattore di crescita epidermico, il fattore di crescita per i fibroblasti, la trombina, i fattori della coagulazione VIIa, Xa, l'endotelina 1, l'acido lisofosfatidico,

l'ipossia, lo stress meccanico e ossidativi (154, 155). La regolazione negativa dell'espressione di CTGF è sostenuta dal fattore di necrosi tumorale (156), la prostaglandina E2 e l'AMP ciclico (157, 158), e dal recettore attivato dal proliferatore dei perossisomi gamma (159). La via di segnale intracellulare del TGF- β è attivata da Smad3 ed è inibita dall'iperespressione di Smad7.



Biologia cellulare del CTGF

Benché CTGF sia localizzato nel citosol e perfino nel nucleo delle cellule mesangiali (160), la maggior parte di esso è secreto e adempie alle sue funzioni nello spazio extracellulare e nel micro-ambiente circostante le cellule. La proteina è inoltre presente nel siero, nel plasma (161, 162) e nelle urine (163, 164). Una frazione significativa è trattenuta nelle

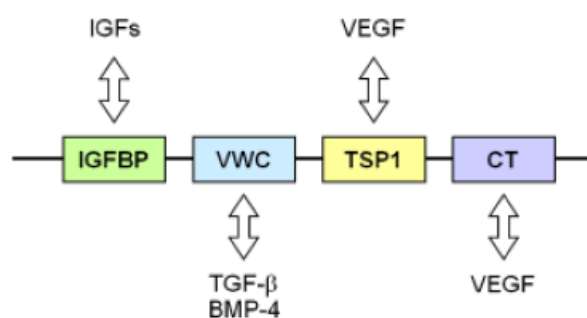
piastrine ma viene rilasciata dopo l'attivazione nel processo di coagulazione (165, 166), e questo è un importante meccanismo che rende ragione dell'aumento della concentrazione di CTGF in lesioni fibrotiche e aterosclerotiche. L'uptake e la clearance di CTGF da recettori multi-ligando ad elevato peso molecolare come il recettore per le lipoproteine a bassa densità correlato al recettore dell'alfa2 macroglobulina (LRP) (167). Gli LRP sono noti per legare diverse molecole come alfa2-macroglobulina e CTGF (168). Gli anticorpi per LRP e le cellule geneticamente carenti di LRP non sono capaci di legare CTGF. Questo, una volta legato, è rapidamente internalizzato e degradato con un meccanismo dipendente da LRP. Tuttavia nelle cellule mesangiali umane è stato visto che CTGF internalizzato è catturato in endosomi e accumulato in orfanelli iuxtannucleari dai quali è poi traslocato nel citosol. Qui è fosforilato da PKC e traslocato nel nucleo dove può agire come fattore di trascrizione. Anche la via di segnale Wnt è influenzata dal legame tra LRP e CTGF: CTGF regola la trasduzione del segnale Wnt/beta – catenina a seconda della sua capacità di legarsi al co-recettore LRP(6) per Wnt (169), sul quale CTGF compete con i membri della famiglia delle Wnt portando alla inibizione del segnale da esse mediato. Da tali dati emerge un ulteriore ruolo di CTGF come coordinatore diverse vie di segnale intracellulare. Riguardo alla clearance è interessante notare come la rimozione della maggior parte del CTGF esterno segue una via simile a quella del TGF – beta circolante per il quale è stata dimostrato un meccanismo dipendente dal recettore per l'alfa -2-macroglobulina (170). Non è ancora

noto se CTGF circolante interagisca con l'alfa - 2 - macroglobulina o altre binding protein coinvolte nei meccanismi di clearance. Il dominio che lega LRP è situato nel modulo III dell'estremità C - terminale, il che potrebbe significare che la porzione N - terminale circolante abbia una emivita più lunga della parte C - terminale e della molecola intera. Questa ipotesi è stata dimostrata mediante misurazione selettiva di CTGF e dei suoi frammenti C- e N- terminali nel plasma dei pazienti affetti da sclerodermia: solo la porzione N - terminale si manteneva elevata, mentre non si notavano cambiamenti significativi per quanto riguarda l'intera molecole e il frammento C - terminale.

Aspetti funzionali del CTGF

Appare ormai accertato che CTGF giochi un ruolo cruciale nella condrogenesi e nella angiogenesi durante la formazione dello scheletro, condizionando fortemente lo sviluppo embrionale (171). Ratti con deficit del gene per CTGF (CTGF -/-) muoiono immediatamente dopo la nascita a causa di multiple malformazioni scheletriche (172). I fibroblasti derivati da ratti CTGF -/- knockout hanno una espressione significativamente ridotta di geni pro-adesivi, pro-infiammatori e pro-angiogenetici, che è in relazione alla ipo-espressione del sottotipo sindacano 4 del protoeparansolfato (173). CTGF è un regolatore centrale della matrice extracellulare nella cartilagine e nelle ossa, ma anche

della vascolarizzazione durante lo sviluppo embrionale con una ampia diffusione nei tessuti e organi adulti (174). CTGF condiziona numerose attività cellulari come l'attività proliferativa (175), la differenziazione cellulare, la sintesi della matrice extracellulare (176) e l'adesione cellulare a essa(177, 178), la migrazione cellulare e la transizione epiteliomesenchimale (179). Molte di queste funzioni non sono attuate dal solo CTGF, ma in combinazione con specifici fattori di crescita o mediante l'interazione diretta con la matrice extracellulare o con molecole di superficie. La sub-specializzazione strutturale e funzionale della proteina determina multiple modalità di interazione con le componenti della matrice extracellulare: i moduli III e IV interagiscono con la trombospondina, la fibronectina e il collagene, il modulo III con molecole di membrana, i moduli I-IV con diversi fattori di crescita (TGF – beta, IGF, VEGF) (180).



Interazione tra I moduli di CCN2/CTGF e altri fattori di crescita.

(IGF-BP, insulin-like growth factor binding protein module (I); VWC, von Willebrand factor type C module (II); TSP1, thrombospondin type I homology module (III); CT, carboxy-terminal cysteine knot motif, heparin-binding module (IV); IGFs, insulin-like growth factors; VEGF, vascular endothelial growth factor; CTGF, connective tissue growth factor)

Connessioni tra la via di trasduzione del segnale YAP-Hippo e CTGF

È stato già indicato come Yki e YAP promuovano la crescita delle cellule e dei tessuti rispettivamente nella drosophila e nei mammiferi. Tuttavia i geni indotti da questi due co-attivatori della trascrizione non sono identici. Per esempio la Ciclina – E è indotta da Yki nella drosophila ma non dall'iperespressione di YAP nelle cellule dei mammiferi (68). Il gene che codifica per CTGF, invece è un target diretto del complesso YAP – TEAD nei mammiferi (181). Inoltre elevati livelli di CTGF sono stati riscontrati in diversi tumori umani (182) e l'utilizzo di anticorpi anti – CTGF inibiscono la crescita dei tumori e la metastatizzazione (183). Questo conforta l'ipotesi che CTGF possa mediare le proprietà oncogene e stimolanti la crescita di YAP – TEAD. Nonostante CTGF sembri coinvolto nei meccanismi di crescita cellulare indotti da YAP, esso potrebbe non essere necessario per la transizione epitelio-mesenchimale che dipende da YAP. Coerentemente con questo, cellule mutanti in cui è difettiva la capacità di YAP di legarsi a TEAD possono ancora indurre una frazione dei geni regolati da YAP. Inoltre è stato dimostrato che esiste un loop autocrino mediato da CTGF nelle cellule di epatocarcinoma e che contribuisce alla malignità del fenotipo: in tale studio la via di trasduzione del segnale EGFR promuove l'espressione di CTGF mediante un fitto cross-talk con l'oncogene YAP (184).

Ancora più di recente (185) è stata evidenziata una interazione funzionale tra la via Hippo e il TGF – beta nel regolare il

CTGF. L'espressione di quest'ultimo nelle cellule di mesotelioma maligno è indotta dalla formazione del complesso YAP – TEAD 4 – Smad3 – p300 sul promotore per CTGF

SEZIONE SPERIMENTALE

Scopo della ricerca

Sulla base di quanto esposto finora, abbiamo ipotizzato che la via Hippo e CTGF, siano tra loro interconnessi nella genesi nella cancerogenesi epatica.

In particolare il loro ruolo si esplica verosimilmente nella proliferazione delle cellule, nei meccanismi di fibrogenesi e di adesione intercellulare.

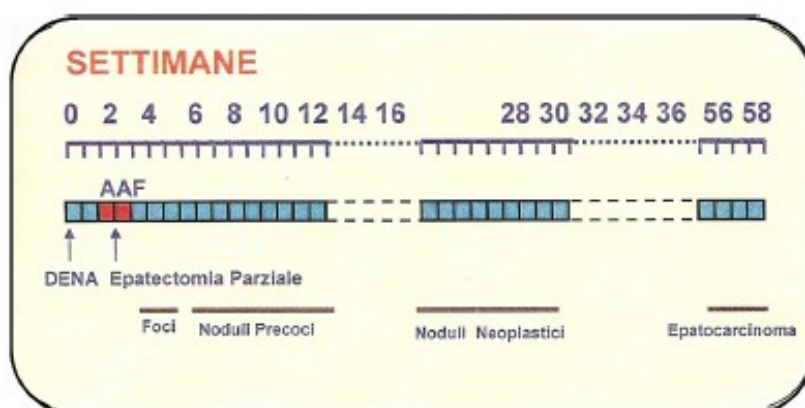
Lo scopo del nostro studio dunque è stato quello di studiare comparativamente, in lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche di ratti F344 e BN, rispettivamente geneticamente suscettibili e resistenti al CE il ruolo della via YAP/CTGF mediante la valutazione del grado di espressione sia a livello proteico che genetico di YAP e CTGF.

MATERIALE E METODI

Animali e trattamenti

Ratti Fisher 344 (F344) e Brown Norway (BN) (Charles-River-Italia, Calco, Italy) sono stati nutriti e trattati in accordo con il protocollo de l'”Epatocita resistente”. Esso comprende un trattamento iniziante con una singola dose necrogenica (150mg/kg per via intraperitoneale) di Dietilnitrosamina (DENa), seguita dopo la riparazione tissutale, dalla somministrazione per 15 giorni di dieta iperproteica contenente il mitoinibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF) allo 0,02%. A metà di tale trattamento si effettua un'epatectomia

parziale (PH) per stimolare la rigenerazione epatica (30). I ratti vengono quindi nutriti fino al sacrificio con una dieta standard (30). La somministrazione del mitoinibitore AAF induce soppressione della crescita degli epatociti normali, mentre le cellule iniziate dal cancerogeno non rispondendo all'azione inibitrice dell'AAF continuano a proliferare in seguito allo stimolo di crescita, producendo prima foci, poi noduli epatici precoci ed, infine, lesioni neoplastiche a diversa progressione. Qualche giorno dopo l'epatectomia parziale, iniziano ad essere evidenziabili centri focali di crescita delle cellule preneoplastiche denominati foci. Durante la fase di espansione clonale delle cellule iniziate dal cancerogeno, le lesioni focali epatiche vanno incontro ad una rapida crescita. Con l'avanzare del processo di epatocancerogenesi, a circa 10-12 settimane dall'inizio, si possono individuare alcuni noduli precoci (displastici) che hanno continuato a crescere anche dopo scomparsa dello stimolo di crescita. Il numero di questi noduli è minore rispetto a quello dei foci preneoplastici formati nelle fasi precoci di promozione successive all'epatectomia parziale.



Modello “dell’epatocita resistente” o di Solt e Farber. Le abbreviazioni utilizzate sono: DENA, dietilnitrosamina; AAF, acetilaminofluorene.

Per i nostri esperimenti sono stati utilizzati fegati preneoplastici, che includevano foci di epatociti alterati di 4-6 settimane dopo inizio dell’epatocancerogenesi, noduli precoci di 12 settimane, noduli displastici di 32 settimane e CE (50-60 settimane). Per l’analisi di espressione sono stati usati fegati preneoplastici, pool di noduli precoci o displastici e CE prelevati da ciascun ratto. Gli animali hanno ricevuto le cure necessarie e i protocolli sono stati applicati in base alle guide del National Institute of Health per l’uso degli animali in laboratorio.

Isolamento di RNA e sintesi di cDNA

L’RNA ad alto peso molecolare è stato estratto da campioni dei fegati di ratto. Con Kit “AllPrep® DNA/RNA/Protein” (Qiagen, Valencia, CA). Sono stati utilizzati campioni del peso di 30 – 50 µg, sminuzzati e omogeneizzati con DOUNCE in soluzione lisante LRT fornita dal Kit AllPrep e completata con beta - mercaptoetanolo e inibitori di fosfatasi e proteasi. Si pone il campione a 37° per 10 minuti e in seguito in colonnine Qiasredder. L’eluato viene quindi trasferito in colonna “AllPrep DNA spin column”. A esso viene aggiunto un volume noto di alcool etilico al 95% e si trasferisce la soluzione così ottenuta nella RNeasy spin column. Si centrifuga a 100 rpm per 15 secondi. La colonnina viene lavata dapprima con soluzione RW1 cui seguono altri due lavaggi

con RPE. Dopo ciò si procede all'eluizione dell'RNA aggiungendo sul fondo della colonnina 50 ml di H₂O RNAsi free. Si centrifuga a 100 rpm per 1 minuto e si quantifica al nanodrop. Segue il caricamento su gel di agarosio al 2% e si procede a elettroforesi per valutare la bontà e l'integrità dell'RNA. Dopo l'estrazione, per escludere possibili contaminazioni di DNA genomico, i campioni sono stati trattati con Dnase I (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La sintesi del cDNA è stata effettuata usando il kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosciences, Foster City, CA), secondo il protocollo fornito dalla ditta.

RT-PCR quantitativa

Sono state usate sonde di geni per YAP e CTGF e RNR-18 (controllo interno), selezionate mediante “QuantiTect primer assay.” (Qiagen, Valencia, CA). Le reazioni di PCR sono state eseguite usando dai 75 ai 300 ng di cDNA, utilizzando il sistema di determinazione ABI Prism 7000 sequence detection System e la polimerasi QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA). 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 (82) ed espressi come N 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

Western Blot

Le proteine sono state estratte dai campioni di tessuti, ovvero i noduli precoci (12 settimane dopo l'inizio dell'epatocancerogenesi), i noduli neoplastici e i CE dai ratti F344 e BNe sono stati omogenati con DOUNCE.

Si pone il campione a 37° per 10 minuti e in seguito in colonnine Qiashredder. L'eluito viene quindi trasferito in colonna "AllPrep DNA spin column". A esso viene aggiunto un volume noto di alcool etilico al 95% e si trasferisce la soluzione così ottenuta nella RNeasy spin column. Si centrifuga a 100 rpm per 15 secondi

L'eluito così ottenuto si pone in eppendorf e vi si aggiunge un volume di APP. Si mescola a temperatura ambiente per 10 minuti. Si centrifuga a 12.000 G per 10 minuti a temperatura ambiente. A questo punto si elimina il sopranatante e si esegue lavaggio con etanolo al 70%. Si centrifuga nuovamente a 12.000 G per 1 minuto e si elimina il sopranatante. Il pellet così ottenuto viene risospeso in SDS 2% completato con inibitori di proteasi e fosfatasi. Aliquote di 40µg sono state denaturate a 95°C in Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen) separate mediante SDS-PAGE e trasferite in membrane di nitrocellulosa mediante elettroblotting. Le membrane sono state incubate per 1h in latte al 5% in TBS+Tween20 0,1% per bloccare i siti aspecifici e successivamente incubate, dapprima con gli anticorpi specifici. (Anti-CTGF, Rabbit polyclonal to CTGF, cod. AB5097, ABCAM) e poi con anticorpo secondario anti-rabbit (cell-signalling) alla diluizione di 1:2000. Le bande sono state

quantificate in unità arbitrarie con il ChemiDoc XRS, usando il programma Quantity One 1D Analysis Software e normalizzate ai livelli di β -actina.

RISULTATI

Sviluppo delle lesioni epatiche nei ratti

Nei ratti trattati secondo il modello di Solt e Farber, quattro settimane dopo la somministrazione di DENA (fase di inizio), è stata osservato lo sviluppo di foci di epatociti alterati, positivi al GST 7-7, sia nel ceppo suscettibile (F344) che nel ceppo resistente (BN). L'ulteriore evoluzione dei foci a noduli precoci, più grandi dei lobuli epatici e comprendenti anche il parenchima circostante è risultata però più pronunciata nei ratti F344 rispetto ai BN. A 50-60 settimane, infine, il CE era presente in tutti i ratti F344 e in una minor quota dei ratti BN. In entrambi i ceppi di ratto si aveva presenza di foci di epatociti alterati e noduli precoci che consistevano prevalentemente in cellule chiare/eosinofile. Con l'evolvere della epatocancerogenesi, le differenze fra i due ceppi si fanno più marcate, ecco dunque che a 32 settimane si riscontra un basso grado di noduli displastici nel fegato dei ratti BN e un alto grado negli F344 e a 50-60 settimane il CE risultava ben o moderatamente differenziato nei ratti BN mentre moderatamente o non differenziato nei ratti F344. Inoltre

mentre il 100% di ratti F344 sviluppa CE, solo una bassa percentuale di BN presenta tumori.

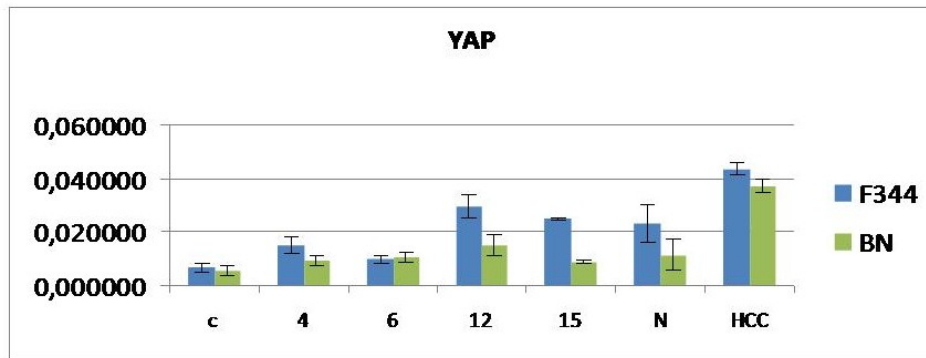
Espressione di YAP e CTGF

I risultati ottenuti con RT-PCR mostrano differenze sostanziali nella espressione dei geni sia per YAP che per CTGF nei due ceppi di ratto e nelle diverse fasi della cancerogenesi.

Per quanto riguarda l'espressione di YAP i risultati mostrano che essa si mantiene su livelli significativamente minori, in entrambi i ceppi, nei controlli rispetto ai ratti sottoposti a protocollo inducente la cancerogenesi epatica. Tale divergenza è maggiore alla 4 e 12 settimana, nei noduli e nei tumori rispetto ai controlli.

L'espressione di YAP è inoltre differente tra i due ceppi di ratto, i BN e gli F-344.

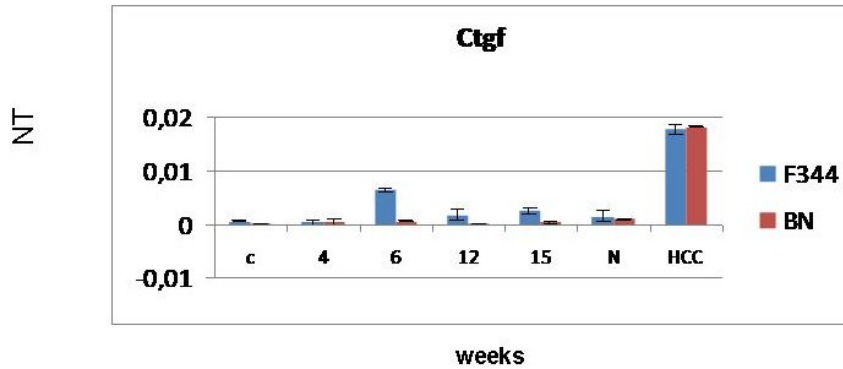
La discrepanza si fa più evidente con l'avanzare del processo di tumorigenesi ed è più marcata alla 12 e 15 settimana e nei noduli, dove l'espressione di YAP è significativamente più alta nel ceppo F-344, mentre diminuisce nei tumori del ceppo BN. Una volta che si ha la formazione dei focolai neoplastici la differenza è meno marcata, a fronte di un grado di espressione relativamente molto elevato in entrambi i ceppi.



Sono evidenti anche per CTGF differenze nella sua espressione sia tra i controlli e gli esemplari che sviluppano il tumore sia tra i due ceppi.

I livelli di espressione di CTGF sono significativamente minori nei controlli e aumentano progressivamente nei ratti sottoposti a cancerogenesi. Nelle fasi intermedie, la differenza maggiore si osserva alla 6 e 15 settimana ed è massima una volta che la neoplasia si è sviluppata completamente, raggiungendo valori di espressione molto elevata rispetto ai controlli.

L'espressione di CTGF, come del resto ci aspettiamo, è anche dissimile nei due ceppi. Nei ceppi F-344 CTGF aumenta a partire dalla 6 settimana e nella 12, 15, 32 e negli HCC rispetto ai controlli. Nei BN non vi è una differenza significativa nella varie fasi se non alla 32 settimana e negli HCC. Nei tumori l'espressione di CTGF raggiunge valori molto elevati anche in senso assoluto.

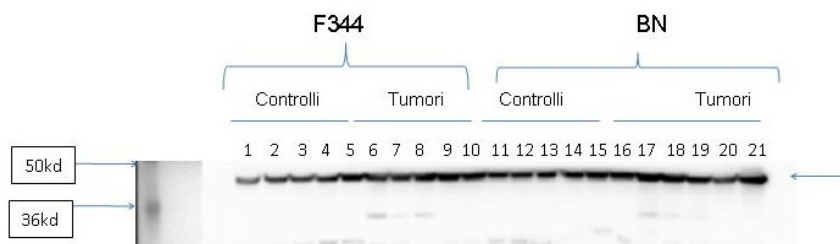


Sintesi proteica di CTGF

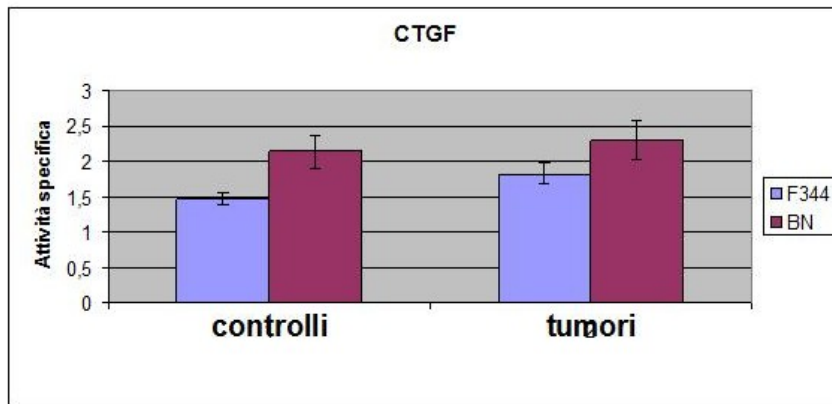
Al livello di sintesi proteica risulta significativo il grado di espressione di CTGF e la sua dinamica, che sono state valutate solo nei controlli e nei tumori, in relazione alla presenza o meno di tumore e nei due ceppi di ratti.

In linea generale confermiamo i dati della PCR-RT.

L'espressione di CTGF è significativamente più elevata nei tumori rispetto ai controlli e questo è valido sia per i ceppi BN che per quelli F-344. Infatti l'espressione di CTGF nei controlli F-344 è significativamente minore rispetto ai tumori dello stesso ceppo. Anche per i ceppi BN, come ci si può aspettare, il livello dell'espressione di CTGF è maggiore nei fegati neoplastici rispetto a quelli sani.



Per quanto riguarda la differenza di espressione tra ceppi BN e F-344 non abbiamo osservato un divario significativo.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai dati esposti emerge l'importanza della via di trasduzione del segnale YAP in connessione con CTGF nella determinazione dell'epatocarcinoma nel ratto.

Entrambe queste vie sono, come già evidenziato nella review bibliografica, coinvolte nella genesi delle neoplasie umane compreso l'epatocarcinoma.

Tuttavia, non è stato ancora messo in evidenza il loro ruolo nelle fasi intermedie della cancerogenesi epatica. Ovviamente questo può essere effettuato solo su modelli sperimentali in laboratorio dal momento che è ben comprensibile la difficoltà (etica e pratica) di eseguire un tale studio sull'uomo.

Sia la via Hippo che CTGF giocano un ruolo predominante nella proliferazione cellulare. Esse sono proteine ubiquitarie e YAP, in particolare, si configura come un regista dello

sviluppo embrionale, momento nel quale anche CTGF riveste una funzione importante.

È noto il rapporto tra stadio di maturazione cellulare e i tumori ed è qui che verosimilmente si inserisce la capacità oncogena di queste due vie che, quando deregolate, portano allo sviluppo abnorme dei tessuti e degli organi.

Nei nostri esperimenti la progressione dell'HCC va di pari passo con l'espressione genica sia di YAP che di CTGF che della sintesi proteica di CTGF.

Questo, anche in accordo con la letteratura, indica e conferma il ruolo delle due vie di segnale nella cancerogenesi.

È chiaro che per svelare i più intimi meccanismi alla base di questo processo saranno necessari ulteriori studi, anche per trasporre i dati laboratoristici in armi sempre più efficaci nella lotta ai tumori.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., Estimating the world cancer burden: globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-6
- 2) Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad. Med. J.* 2000; 76,4-11
- 3) Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. *Seminar Liver Dis.* 2005; 25,143-154
- 4) Feitelson M.A., Sun B., Tufan N.L.S., Liu J., Lian Z. Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21, 2593-2604
- 4) Yu M.C., Yuan J.M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127 (1); s72-8
- 5) Calle E.E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun M.J. Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studies cohort of U.S. adults. *New Engl J Med* 2003; 348: 1625-38
- 6) Teufel A., Staib F., Kanzler S., Weinmann A., Sculze-Bergkamen H., Galle P.. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13(16): 2271-2282
- 7) Farazi P.A., DePinho R.. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Rev. Cancer* 2006; 6(9): 674-687
- 8) Kiyosawa K., Sodeyama T., Tanaka E., Gibo Y., Yoshizawa K., Nakano Y., Furuta S., Akahane Y., Nishioka K., Purcell R.H., et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 12, 671-675
- 9) McGlynn K.A., London W.T. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Prac Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19(1): 3-23
- 10) Chen X., Cheung S.T., So S., Fan S.T., Barry C., Higgins J., Lai K.M., Ji J., Ng I.O.L., Van de Rijn M., Botstein D. and Brown P.O. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002; 13(6): 1929-1939
- 11) Zoondervan P.E., Wink J., Alers J.C. et al. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathhol* 2000; 192: 207-15
- 13) Santoni-Rugiu E., Jensen M.R., Thorgeirsson S.S.. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor α . *Cancer Res* 1998; 58(1): 123-134
- 14) Santoni-Rugiu E., Nagy P., Jensen M.R., Factor V.M. and Thorgeirsson S.S.. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing c-myc and transforming growth factor- α . *Am J Pathol* 1996; 149(2): 407-427
- 15) Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Muroli M.R., Calvisi D.F., Asara G., Casabona D., Frau M., Seddaiu M.A. and Feo F.. Cell cycle deregulation in liver lesions of rats with and without genetic predisposition to hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2002; 35(6): 1341-1350
- 16) Simile M.M., De Miglio M.R., Muroli M.R., Frau M., Asara G., Serra S., Muntoni M.D., Seddaiu M.A., Daino L., Feo F. and Pascale R.M.. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxynucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of Hep G2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25(3): 333-341

- 17) Wong C.M., Ng I.O.L.. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2008; 28(2): 160-174
- 18) Majumder M., Ghosh A.K., Steele R., Ray R. and Ray R.B.. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75(3): 1401-1407
- 19) Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-8
- 20) Kondo Y., Kanai Y., Sakamoto M., Mizokami M., Ueda R., Hirohashi S. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis-A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and cDNA hypermethylation on 8 CpG island in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 32; 979
- 21) Calvisi D.F., Ladu S., Gorden A., Farina M., Conner E.A., Lee J.S., Factor V.M. and Thorgeirsson S.S.. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130(4): 1117-1128
- 22) Bromberg J., Darnell J. E. Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19; 2468-2473
- 23) Browmann T., Garcia R., Turkson J., Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19; 2474-2488
- 24) Edmonson H.A., Steiner P.E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necroscopies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- 25) Yuki K., Hirohashi S., Sakamoto M., Kanai T., Shimosato Y. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer* 1990; 66: 2174-2179
- 26) Feo F., et al. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 2000; 11: 19-62
- 27) Feo F., Pascale R.M., Calvisi D.F. Models for liver cancer. 2007
- 28) Enomoto K., Farber E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 1982; 42: 2330-5
- 29) Dragan Y.P., et al. Focal and non-focal hepatic expression of placental glutathione S-transferase in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 2587-2591
- 30) Solt D.B., Medline A., Farber E. Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis for liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977; 88: 595-618
- 31) Feo F., De Miglio M.R., Simile M.M., Muroli M.R., Calvisi D.F., Frau M., Pascale R.M. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretative analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1765: 126-147
- 32) Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2000; 32: 225-237
- 33) Hemminki K., Li X. Familial risks of cancer as a guide to gene identification and mode of inheritance. *Int J Cancer* 2004; 110: 291-294
- 34) Calvisi D.F., Pinna F., Ladu S., Pellegrino R., Sanna V., Sini M., Daino L., Simile M.M., De Miglio M.R., Frau M., Tomasi M.L., Seddaiu M.A., et al. Ras-driven proliferation and apoptosis signaling during rat liver carcinogenesis is under genetic control. *Int J Cancer*, 2008; 123:2057-64

- 35) Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ (1995) The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev* 9: 534-546
- 36) Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W (1995) Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 121: 1053-1063
- 37) Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Verstreken P, Hiesinger PR, et al. (2002) *Shar-pe* mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* 129: 5719-5730
- 38) Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK (2003) The *Drosophila* *Mst* ortholog, *hippo*, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114: 457-467
- 39) Pantalacci S, Tapon N, Leopold P (2003) The *Salvador* partner *Hippo* promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 5: 921-927
- 40) Jia J, Zhang W, Wang B, Trinko R, Jiang J (2003) The *Drosophila* *Ste20* family kinase *dMST* functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev* 17: 2514-2519
- 41) Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G (2003) *Hippo* promotes proliferation arrest and apoptosis in the *Salvador/Warts* pathway. *Nat Cell Biol* 5: 914-920
- 42) Wu S, Huang J, Dong J, Pan D (2003) *hippo* encodes a *Ste-20* family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with *salvador* and *warts*. *Cell* 114: 445-456
- 43) Wei X, Shimizu T, Lai ZC (2007) *Mob* as tumor suppressor is activated by *Hippo* kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J* 26: 1772-1781
- 44) Glantschnig H, Rodan GA, Reszka AA (2002) Mapping of *MST1* kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation. *J Biol Chem* 277: 42987-42996
- 45) Lee KK, Yonehara S (2002) Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian *STE20*-like kinase (*MST*). *J Biol Chem* 277: 12351-12358.
- 46) Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, et al. (2006) The tumour-suppressor genes *NF2/Merlin* and *Expanded* act through *Hippo* signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 8: 27-36
- 47) Baumgartner R, Poernbacher I, Buser N, Hafen E, Stocker H The *WW* domain protein *Kibra* acts upstream of *Hippo* in *Drosophila*. *Dev Cell* 18: 309-316
- 48) Genevet A, Wehr MC, Brain R, Thompson BJ, Tapon N *Kibra* is a regulator of the *Salvador/Warts/Hippo* signaling network. *Dev Cell* 18: 300-308
- 49) Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, et al. *Kibra* functions as a tumor suppressor protein that regulates *Hippo* signaling in conjunction with *Merlin* and *Expanded*. *Dev Cell* 18: 288-299
- 50) Tyler DM, Baker NE (2007) *Expanded* and *fat* regulate growth and differentiation in the *Drosophila* eye through multiple signaling pathways. *Dev Biol* 305: 187-201
- 51) Willecke M, Hamaratoglu F, Kango-Singh M, Udan R, Chen CL, et al. (2006) The *fat* cadherin acts through the *hippo* tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Curr Biol* 16: 2090-2100

- 52) Silva E, Tsatskis Y, Gardano L, Tapon N, McNeill H (2006) The tumorsuppressor gene fat controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway. *Curr Biol* 16: 2081-2089
- 53) Cho E, Feng Y, Rauskolb C, Maitra S, Fehon R, et al. (2006) Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* 38: 1142-1150
- 54) Bennett FC, Harvey KF (2006) Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr Biol* 16: 2101-2110
- 55) Enomoto M, Igaki T Deciphering tumor-suppressor signaling in flies: genetic link between Scribble/Dlg/Lgl and the Hippo pathways. *J Genet Genomics* 38: 461-470
- 56) Grusche FA, Richardson HE, Harvey KF Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Curr Biol* 20: R574-582
- 57) Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D (2005) The Hippo signalling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122: 421-434
- 58) Oh H, Irvine KD (2008) In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development* 135: 1081-1088
- 59) Oh H, Irvine KD (2009) In vivo analysis of Yorkie phosphorylation sites. *Oncogene* 28: 1916-1927
- 60) Badouel C, Gardano L, Amin N, Garg A, Rosenfeld R, et al. (2009) The FERMdomain protein Expanded regulates Hippo pathway activity via direct interactions with the transcriptional activator Yorkie. *Dev Cell* 16: 411-420.
- 61) Oh H, Reddy BV, Irvine KD (2009) Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Dev Biol* 335: 188-197
- 62) Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, et al. (2008) SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol* 18: 435-441
- 63) Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, et al. (2008) The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell* 14: 377-387
- 64) Oh H, Irvine KD Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam. *Dev Cell* 20: 109-122
- 65) Peng HW, Slattery M, Mann RS (2009) Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev* 23: 2307-2319
- 66) Nicolay BN, Bayarmagnai B, Islam AB, Lopez-Bigas N, Frolov MV Cooperation between dE2F1 and Yki/Sd defines a distinct transcriptional program necessary to bypass cell cycle exit. *Genes Dev* 25: 323-335
- 67) Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA, et al. (2005) The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24: 2076-2086
- 68) Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, et al. (2007) Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130: 1120-1133
- 69) Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, et al. (2007) Inactivation of YAP

oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21: 2747-2761

70) Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* 2010 Jan 1;24(1):72-85

71) Tamm C, Böwer N, Annerén C Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J Cell Sci.* 2011 Apr 1;124(Pt 7):1136-44. Epub 2011 Mar 8

72) Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J (2004) Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* 381: 453-462

73) Visser S, Yang X LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. *Cell Cycle* 9: 3892-3903

74) Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL (2006) Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J* 273: 4264- 4276

75) Polesello C, Huelsmann S, Brown NH, Tapon N (2006) The Drosophila RASSF homolog antagonizes the hippo pathway. *Curr Biol* 16: 2459-2465

76) Zhang N, Bai H, David KK, Dong J, Zheng Y, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell* 19: 27-38

77) Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, et al. (2000) TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J* 19: 6778-6791

78) Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, Zhao Y, DePamphilis ML (2001) TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 15: 1229-1241

79) Mahoney WM, Jr., Hong JH, Yaffe MB, Farrance IK (2005) The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem J* 388: 217-225

80) Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D (2008) The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* 14: 388-398

81) Chan SW, Lim CJ, Huang C, Chong YF, Gunaratne HJ, et al. WW domain-mediated interaction with Wbp2 is important for the oncogenic property of TAZ. *Oncogene* 30: 600-610

82) Xu MZ, Chan SW, Liu AM, Wong KF, Fan ST, et al. AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 30: 1229-1240

83) Murakami M, Nakagawa M, Olson EN, Nakagawa O (2005) A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18034- 18039

84) Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, Peerani R, Rao BM, et al. (2008) TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 10: 837-848

85) Komuro A, Nagai M, Navin NE, Sudol M (2003) WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem* 278: 33334-33341

- 86) Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, L'Hoste S, Camonis J, et al. (2002) Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene* 21: 4879-4884
- 87) blouin A BR, Weibel ER. (1977) Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J cell Biol* 72: 5
- 88) Tremblay KD, Zaret KS (2005) Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol* 280: 87-99
- 89) Zaret KS, Grompe M (2008) Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322: 1490-1494.
- 90) Houssaint E (1980) Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ* 9: 269-279
- 91) Tadei A, Geslin P, Delhumeau A, Victor J, Le Douarin L, et al. (1975) [Phentolamine in treatment of acute left ventricular insufficiencies]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 68: 877-885
- 92) Medlock ES, Haar JL (1983) The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat Rec* 207: 31-41
- 93) Giroux S, Charron J (1998) Defective development of the embryonic liver in Nmyc- deficient mice. *Dev Biol* 195: 16-28
- 94) Hentsch B, Lyons I, Li R, Hartley L, Lints TJ, et al. (1996) Hlx homeo box genes essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev* 10: 70-79
- 95) Porter FD, Drago J, Xu Y, Cheema SS, Wassif C, et al. (1997) Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* 124: 2935-2944
- 96) Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman SL, Carlsson L (2004) Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16549-16554
- 97) Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, et al. (2009) Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* 136: 2325-2333
- 98) Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewicz N, Pierreux CE, Van der Smissen P, et al. (2005) Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 19: 1849- 1854
- 99) Clotman F, Lemaigre FP (2006) Control of hepatic differentiation by activin/TGFbeta signaling. *Cell Cycle* 5: 168-171
- 100) Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, et al. (2004) Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 126: 1134-1146
- 101) Tanimizu N, Miyajima A (2004) Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci* 117: 3165-3174
102. Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, et al. (2009) Notch signalling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 136: 1727-1739

- 103) Tchorz JS, Kinter J, Muller M, Tornillo L, Heim MH, et al. (2009) Notch2 signaling promotes biliary epithelial cell fate specification and tubulogenesis during bile duct development in mice. *Hepatology* 50: 871-879
- 104) Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, et al. (1997) Alagille syndrome is caused by mutations in human *Jagged1*, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16: 243-251
- 105) McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, et al. (2006) NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 79: 169-173
- 106) Oda T, Elkahlon AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, et al. (1997) Mutations in the human *Jagged1* gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16: 235-242
- 107) Flynn DM, Nijjar S, Hubscher SG, de Goyet Jde V, Kelly DA, et al. (2004) The role of Notch receptor expression in bile duct development and disease. *J Pathol* 204: 55-64
- 108) Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T (2004) The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* 127: 1775-1786
- 109) Loomes KM, Taichman DB, Glover CL, Williams PT, Markowitz JE, et al. (2002) Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver. *Am J Med Genet* 112: 181-189
- 110) Louis AA, Van Eyken P, Haber BA, Hicks C, Weinmaster G, et al. (1999) Hepatic *jagged1* expression studies. *Hepatology* 30: 1269-1275
- 111) McCright B, Lozier J, Gridley T (2002) A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of *Jag1* haploinsufficiency. *Development* 129:1075-1082
- 112) Moreira RK (2007) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1728-1734
- 113) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94: 153-156
- 114) Befeler AS, Di Bisceglie AM (2002) Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 122: 1609-1619
- 115) Bruix J, Sherman M (2005) Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42: 1208-1236
- 116) Liu JH, Chen PW, Asch SM, Busuttill RW, Ko CY (2004) Surgery for hepatocellular carcinoma: does it improve survival? *Ann Surg Oncol* 11: 298-303
- 117) Beasley RP (1988) Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61: 1942-1956
- 118) Roskams T (2006) Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 25: 3818-3822
- 119) Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21: 283-296
- 120) Sell S, Leffert HL (2008) Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26: 2800-2805
- 121) Dan YY, Yeoh GC (2008) Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 687-698

- 122) Sell S (1997) Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocytes following periportal necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem Cells* 15: 378-385
- 123) Dorrell C, Erker L, Lanxon-Cookson KM, Abraham SL, Victoroff T, et al. (2008) Surface markers for the murine oval cell response. *Hepatology* 48: 1282-1291
- 124) Conlon I, Raff M (1999) Size control in animal development. *Cell* 96: 235-244
- 125) Raff MC (1996) Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 86: 173-175
- 126) Prout T, Barker JS (1989) Ecological aspects of the heritability of body size in *Drosophila buzzatii*. *Genetics* 123: 803-813
- 127) Fankhauser G (1952) Nucleo-cytoplasmic relations in amphibian development. *Int Rev Cytol* 1: 29
- 128) Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA (1998) Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93: 1183-1193.
- 129) Weigmann K, Cohen SM, Lehner CF (1997) Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* 124: 3555-3563
- 130) Weinkove D, Leivers SJ (2000) The genetic control of organ growth: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 10: 75-80
- 131) Schmidt EE, Schibler U (1995) Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *J Cell Biol* 128: 467-483
- 132) Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, et al. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19: 2537-2548
- 133) Mullany LK, Nelsen CJ, Hanse EA, Goggin MM, Anttila CK, et al. (2007) Akt-mediated liver growth promotes induction of cyclin E through a novel translational mechanism and a p21-mediated cell cycle arrest. *J Biol Chem* 282: 21244-21252
- 134) Haga S, Ogawa W, Inoue H, Terui K, Ogino T, et al. (2005) Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice. *J Hepatol* 43: 799-807
- 135) Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y, Ogawa W, et al. (2009) The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49: 204-214.
- 136) Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective-tissue growth-factor – a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial-cells is related to the src-induced immediate early gene-product Cef-10. *J Cell Biol* 1991; 114: 1285–94
- 137) Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 1993; 327: 125–30
- 138) Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci* 2006; 119: 4803–10
- 139) Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* 2005; 70: 69–103

- 140) Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, et al. Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids – Identification as heparin-regulated M-r 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 1997; 272: 20275–82
- 141) Mcknight AJ, Savage DA, Patterson CC, et al. Resequencing of the characterised CTGF gene to identify novel or known variants, and analysis of their association with diabetic nephropathy. *J Hum Genet* 2006; 51: 383–6
- 142) Blom IE, Van Dijk AJ, De Weger RA, et al. Identification of human *ccn2* (connective tissue growth factor) promoter polymorphisms. *J Clin Pathol – Mol Pathol* 2001; 54: 192–6
- 143) Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, et al. A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 1210–20
- 144) Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy. *Matrix Biol* 2002; 21: 473–82
- 145) Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 469–80
- 146) Holmes A, Abraham DJ, Sa S, et al. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001; 276: 10594–601
- 147) Holmes A, Abraham DJ, Chen YJ, et al. Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem* 2003; 278: 41728–33
- 148) Muehlich S, Cicha I, Garlich CD, et al. Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1732–38
- 149) Leivonen SK, Hakkinen L, Liu D, Kahari VM. Smad3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 coordinately mediate transforming growth factor-beta-induced expression of connective tissue growth factor in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 1162–9
- 150) Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation – requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; 278: 13008–15
- 151) Chen YJ, Blom IE, Sa S, et al. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002; 62: 1149–59
- 152) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: downregulation by cAMP. *FASEB J* 1999; 13: 1774–86
- 153) Park S-K, Kim J, Seomun Y, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 966–71
- 154) Chaqour B, Goppelt-Struebe M. Mechanical regulation of the *Cyr61/CCN1* and *CTGF/CCN2* proteins – implications in mechanical stress-associated pathologies. *FEBS J* 2006; 273: 3639–49.
- 155) Schild C, Trueb B. Mechanical stress is required for highlevel expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res* 2002; 274: 83–91
- 156) Abraham DJ, Xu SW, Black CM, et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 15220–5

157. Kothapalli D, Hayashi N, Grotendorst GR. Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage-independent growth by cAMP identifies a CTGFdependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J* 1998;12: 1151–61
158. Stratton R, Xu SW, Martini G, et al. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 2001;108: 241–50
- 159) Sun K, Wang Q, Huang XH. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27: 715–23
- 160) Wahab NA, Brinkman H, Mason RM. Uptake and intracellular transport of the connective tissue growth factor: a potential mode of action. *Biochem J* 2001; 359: 89–97
- 161) Dziadzio M, Usinger W, Leask A, et al. N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma. *Q J Med – Int J Med* 2005; 98:485–92
- 162) Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 149–54
- 163) Roestenberg P, Van Nieuwenhoven FA, Joles JA, et al. Temporal expression profile and distribution pattern indicate a role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2) in diabetic nephropathy in mice. *Am J Physiol-Renal Physiol* 2006; 290: F1344–54
- 164) Riser BL, Cortes P, Denichilo M, et al. Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int* 2003; 64: 451–8
165. Kubota S, Kawata K, Yanagita T, et al. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *J Biochem* 2004; 136: 279–82
- 166) Cicha I, Garlich CD, Daniel WG, Goppelt-Struebe M. Activated human platelets release connective tissue growth factor. *Thromb Haemostasis* 2004; 91: 755–60
167. Segarini PR, Nesbitt JE, Li DX, et al. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha(2)-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 40659–67
- 168) Gliemann J. Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol Chem* 1998; 379: 951–64
- 169) Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, et al. Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with theWNTreceptor complex. *Development* 2004; 131: 2137–47
- 170) Lamarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, et al. An alpha2- macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of TGF-beta1 in mice. *J Clin Invest* 1991; 87:39–44
- 171) Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003; 130: 2779–91
- 172) Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, et al. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 459–65
- 173) Kennedy L, Liu S, Shi-Wen X, et al. CCN2 is necessary for the function of mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res* 2007; 313: 952–64
- 174) Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000; 71: 276–92

- 175) Gao RP, Ball DK, Perbal B, Brigstock DR. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 431–8
- 176) Safadi FF, Popoff SN, Aswald R, et al. Connective tissue growth factor (CTGF) acts as a downstream mediator of TGF-beta1 to induce mesenchymal cell condensation. *J Cell Physiol* 2007; 210: 398–410
- 177) Gao R, Brigstock DR. A novel integrin alpha(5)beta(1) binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut* 2006; 55: 856–62
- 178) Korner T, Kropf J, Kosche B, et al. Improvement of prognostic power of the Child-Pugh classification of liver cirrhosis by hyaluronan. *J Hepatol* 2003; 39: 947–53
- 179) Wahab NA, Mason RM. A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 104: e129–34
- 180) Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, et al. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J* 2002; 16: 219–21.
- 181) Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM, Lai ZC, Guan KL TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control.. *Genes Dev.* 2008 Jul 15;22(14):1962-71. Epub 2008 Jun 25
- 182) Xie, D., Nakachi, K., Wang, H., Elashoff, R., and Koeffler, H.P. 2001. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res.* **61**: 8917–8923
- 183) Dornhofer, N., Spong, S., Bennewith, K., Salim, A., Klaus, S., Kambham, N., Wong, C., Kaper, F., Sutphin, P., Nacamuli, R., et al. 2006. Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **66**: 5816–5827
- 184) Urtasun R, Latasa MU, Demartis MI, Balzani S, Goñi S, Garcia-Irigoyen O, Elizalde M, Azcona M, **Pascale RM**, Feo F, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Muntané J, Prieto J, Berasain C, Avila MA Connective tissue growth factor autocriny in human hepatocellular carcinoma: oncogenic role and regulation by epidermal growth factor receptor/yes-associated protein-mediated activation.. *Hepatology.* 2011 Dec;54(6):2149-58. doi: 10.1002/hep.24587
- 185) Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. TGF-β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med.* 2012 Mar 12;209(3):479-94. Epub 2012 Feb 13