

A.D. MDLXII

## **Università degli Studi Di Sassari**

**Dottorato Di Ricerca in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche**

**Indirizzo di Biochimica e Biologia Molecolare**

**XXIII Ciclo**

(Coordinatore: Prof Bruno Masala)

**L'ATTIVAZIONE DEL FENOTIPO LIPOGENICO È MEDIATA DALLA  
VIA DI SEGNALE AKT/MTOR ED ASSOCIATA ALLA PROGNOSE  
DEL CARCINOMA EPATOCELLULARE UMANO**

***Tutor:***

Prof. Gianfranco Pintus

***Cotutor:***

Dott. Diego Francesco Calvisi

***Tesi di Dottorato di:***  
Dott. Salvatore Delogu

***Anno accademico 2009-2010***

# INDICE

## 1. SEZIONE COMPILATIVA

|  |        |
|--|--------|
| 1.1. Carcinoma epatocellulare (HCC): epidemiologia ed eziopatogenesi ..... | pag.4  |
| 1.2. Meccanismi molecolari coinvolti nell'epatocancerogenesi .....         | pag.6  |
| 1.3. Via di segnale AKT/mTOR .....   | pag.12 |
| 1.3.1. PI3K .....  | pag.12 |
| 1.3.2. AKT .....   | pag.13 |
| 1.3.3. mTOR .....  | pag.14 |
| 1.3.4. PI3K/AKT/mTOR e HCC .....   | pag.18 |
| 1.4. Il fenotipo lipogenico .....  | pag.19 |
| 1.5. Metodica di "Hydrodynamic Gene Delivery" nel fegato di roditori ..... | pag.23 |

## 2. SEZIONE SPERIMENTALE

|  |        |
|--|--------|
| 1. Introduzione .....  | pag.27 |
| 2. Materiali e metodi .....                                    | pag.30 |
| 2.1. Campioni di tessuto umani .....                           | pag.30 |
| 2.2. Linee cellulari e trattamenti .....                       | pag.30 |
| 2.3. Hydrodynamic Gene Delivery e analisi istopatologica ..... | pag.32 |
| 2.4. RT-PCR quantitativa (QRT-PCR) .....                       | pag.33 |
| 2.5. Immunoblotting e Immunoprecipitazione .....               | pag.34 |
| 2.6. Immunoistochimica .....                                   | pag.36 |
| 2.7. Valutazione della lipogenesi .....                        | pag.37 |

|  |        |
|--|--------|
| 2.8. Analisi statistica .....  | pag.37 |
| <b>3. Risultati</b> .....  | pag.38 |
| 3.1. Attivazione coordinata delle proteine lipogeniche nel carcinoma epatocellulare<br>.....                             | pag.38 |
| 3.2. L'attivazione della lipogenesi de novo è mediata da AKT/mTOR/PR56 nel tumore<br>epatocellulare umano .....          | pag.40 |
| 3.3. L'iperespressione di AKT induce il fenotipo lipogenico e promuove lo sviluppo di<br>tumori nel fegato di topo ..... | pag.43 |
| 3.4. Induzione delle proteine lipogeniche nelle lesioni epatiche indotte da AKT .....                                    | pag.46 |
| <b>4. Discussione</b> .....  | pag.48 |
| <b>5. Figure e tabelle</b> .....   | pag.52 |
| <b>6. Bibliografia</b> .....   | pag.73 |

## SEZIONE COMPILATIVA

### 1.1. Carcinoma epatocellulare (HCC): epidemiologia ed eziopatogenesi

Il carcinoma epatocellulare umano (HCC) è un tumore solido tra i più frequenti al mondo (quinto tra gli uomini e nono tra le donne) per incidenza e mortalità. Rappresenta il 6% di tutte le neoplasie e l'80% circa dei tumori primitivi del fegato, contando mezzo milione di nuovi casi all'anno.<sup>1</sup>

L'HCC è principalmente diffuso in aree in via di sviluppo, con un'incidenza di 20-28 casi/100.000 abitanti in Asia e Africa, mentre è relativamente raro nei paesi sviluppati (circa 5 casi/100.000 abitanti in Nord America, Europa e Australia).<sup>1</sup>

L'HCC presenta molteplici fattori di rischio (genetici, ambientali e infettivi) e la diagnosi spesso tardiva ne rende il trattamento difficile e la mortalità prossima all'incidenza.<sup>2</sup>

Il principale fattore di rischio coinvolto nello sviluppo di questo tipo di tumore è la cirrosi epatica, in particolare quando questa è secondaria all'infezione cronica da virus dell'epatite B o HBV (circa il 52% dei casi di HCC nel mondo) e da virus dell'epatite C o HCV (circa il 20% dei casi).<sup>3</sup> Il 70- 90% dei casi di HCC correlati con infezione da HBV<sup>4</sup> e la quasi totalità dei casi correlati ad infezione da HCV<sup>2</sup> sono riscontrati in soggetti che hanno già raggiunto stadi progrediti di cirrosi epatica. L'intossicazione da aflatossina B1 (una micotossina epatocancerogena prodotta dal fungo *Aspergillus flavus*) o un elevato consumo

di bevande alcoliche (con assunzione di alcol superiore ai 50 g/die) sono i principali agenti eziologici di HCC legati a fattori alimentari.<sup>5</sup> Inoltre, a causa dell'obesità, dell'aumentata incidenza del diabete di tipo II e della resistenza all'insulina, la steatoepatite non alcolica (NASH) sta assumendo un ruolo sempre più ampio nella patogenesi dell'HCC, in quanto predispone allo sviluppo della cirrosi, uno dei maggiori fattori di rischio dell'HCC.

Altri fattori di rischio meno frequenti sono rappresentati da malattie ereditarie o autoimmuni (pofiria, tirosinemia, emocromatosi, cirrosi sclerosante, steatoepatite non alcolica) o da assunzione di ormoni androgeni (a scopo terapeutico o dopante nella pratica sportiva).

Il numero di casi attribuibili all'epatite B o C varia comunque in base all'area geografica considerata, secondo il grado di diffusione dei virus: in Nord America, Giappone e in Europa l'HCV rappresenta il fattore di rischio principale, mentre in Africa e Asia meridionale le cause predominanti sono l'HBV e la contaminazione da aflatoxina B1.<sup>6</sup> L'incidenza dell'HCC varia anche a seconda del sesso (maggiore negli individui maschi, con un rapporto M/F che va da 1.3 a 12.9, in relazione all'area geografica) e dell'età (maggiore negli individui più anziani, il picco di incidenza varia a seconda della regione considerata). L'HCC non si sviluppa in tutti gli individui a rischio, il che suggerisce la presenza contemporanea di vari fattori eziologici, compresa la componente genetica. Tuttavia gruppi familiari con HCC sono stati raramente

osservati, osservazione che suggerisce un ruolo minore della predisposizione genetica o, in alternativa, una predisposizione genetica complessa per lo sviluppo di questa neoplasia.

### ***1.2. Meccanismi molecolari coinvolti nell'epatocancerogenesi***

L'epatocarcinogenesi è un processo polifasico in cui stimoli esterni inducono modificazioni genetiche ed epigenetiche negli epatociti, che portano a proliferazione cellulare e produzione di cloni di epatociti alterati.<sup>7</sup>

Nel fegato affetto da cirrosi, la condizione generalmente precorritrice dell'HCC, sono identificabili tre diverse tipologie nodulari: noduli rigenerativi, noduli displastici e noduli neoplastici. I noduli displastici sono a loro volta divisi in nodularità di alto e basso grado sulla base del grado di atipia cellulare che presentano nel loro contesto.

Studi ed evidenze sperimentali recenti ipotizzano che molti HCC originino da noduli displastici di alto grado,<sup>8</sup> e la presenza di marcatori di cellule staminali epatiche avvalora l'ipotesi che queste siano all'origine dell'epatocarcinoma.<sup>9</sup>

Il modello delle cellule staminali tumorali (cancer stem cells, CSC) ipotizza che coesistano due diverse popolazioni cellulari nei tumori: una di origine staminale, che comprende cellule staminali maligne con capacità di divisione asimmetrica (delle due cellule figlie, una mantiene caratteristiche staminali e la seconda è capace di proliferare solo in cellule differenziate) responsabile della

tumorigenesi e della disseminazione metastatica, e una seconda più ampia popolazione di cellule tumorali parzialmente differenziate derivanti dalle CSC,<sup>10</sup> in contrasto con il modello classico che vede all'origine del fenotipo maligno l'alterazione della fisiologia cellulare in seguito a eventi genetici, risultanti nell'acquisizione di caratteristiche di resistenza all'apoptosi, iperproliferazione, migrazione e infiltrazione.<sup>11</sup>

L'eterogeneità degli agenti eziologici alla base dello sviluppo e della progressione dell'HCC si riflettono in un'altrettanto eterogenea gamma di pattern di alterazioni genetiche. Per esempio, l'azione mutagena dei metaboliti attivi dell'aflatossina B1 è spesso responsabile di mutazioni a carico del gene p53, un noto oncosoppressore coinvolto in processi di controllo del ciclo cellulare, riparazione del DNA, apoptosi e differenziamento. Più complessa appare invece l'eziopatogenesi virale del carcinoma epatocellulare. Nel caso d'infezione cronica da HBV, questa da una parte può alterare l'espressione di geni chiave o indurre instabilità cromosomica attraverso inserzione di DNA virale nel genoma dell'ospite, dall'altra può modulare la proliferazione cellulare incontrollata attraverso l'espressione di proteine virali come la proteina X (HBX).<sup>7,12</sup>

Il meccanismo di oncogenesi epatica legato all'HCV è meno chiaro, essendo L'HCV un virus a RNA che manca di stadi a DNA e non potendo quindi integrarsi nel DNA dell'ospite. Tuttavia, in diversi studi sono state identificate

interazioni tra proteine virali di HCV ed i geni p53 e Wnt-1, che suggeriscono un effetto oncogeno diretto dell'HCV sull'epatocita.<sup>7</sup> L'effetto trasformante maligno indotto dal virus dell'epatite C potrebbe però essere indiretto, come conseguenza dello stato infiammatorio cronico conseguente alla cirrosi indotta dall'infezione virale stessa. Tale condizione infiammatoria è, infatti, in grado di indurre l'attivazione di una serie di citochine, fattori di crescita e fenomeni biochimici con attività mitogenica ed anti-apoptotica sugli epatociti. Tra i principali fattori stimolanti la proliferazione e la sopravvivenza degli epatociti devono essere ricordati: il fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), i mitogeni come i fattori trasformanti alfa e beta 1 (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1), lo stress ossidativo, ed alterazioni immunologiche di vario tipo.<sup>13</sup>

Negli HCC, seppure riconducibili a differenti agenti eziologici, rimane costante l'alterazione di una o più vie di segnale cruciali per le funzioni di differenziamento, proliferazione e sopravvivenza cellulare.

Tra le vie di segnale normalmente alterate nelle neoplasie, le più rilevanti nell'ambito degli HCC sono le vie Wnt/ $\beta$ -catenina, Hedgehog, ERK/MAPK e PI3K/AKT/mTOR.

La via Wnt/ $\beta$ -catenina gioca un ruolo fondamentale nell'embriogenesi (determinazione della polarità e del destino cellulare) ed è coinvolta nei processi di differenziazione, proliferazione e apoptosi. Tale via di segnale è alterata nel



30% degli HCC, principalmente in quelli indotti da HCV o associati al consumo cronico di alcol, e nel 70% degli epatoblastomi.<sup>14</sup>

In condizioni normali, la  $\beta$ -catenina si trova associata all'E-caderina, legata al citoscheletro nelle giunzioni aderenti della membrana citoplasmatica<sup>15</sup>. La via di segnale Wnt/ $\beta$ -catenina è attivata quando la concentrazione di ligandi Wnt è superiore a quella dei loro antagonisti, permettendo a questi di attivare il recettore Frizzled (FZD) che induce la  $\beta$ -catenina a interrompere la sua associazione con l'E-caderina.<sup>16, 17</sup>

Quando la via Wnt/ $\beta$ -catenina è attivata attraverso FZD, alcuni suoi effettori a valle (tra cui, il più importante sembrerebbe essere Dishevelled) proteggono la  $\beta$ -catenina dalla fosforilazione da parte di un complesso di degradazione formato dalla serina-threonina chinasi glicogeno sintetasi cinasi 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) e le proteine scaffold AXINA 1, AXINA 2 e adenomatosi poliposis coli (APC). In condizioni fisiologiche, AXINA 1 e APC fosforilano la  $\beta$ -catenina a livello dei suoi siti serinici e troninici dell'esone 3, con conseguente legame della  $\beta$ -catenina stessa al complesso dell'ubiquitina e sua successiva degradazione.

Mutazioni a carico dei geni AXINA 1, AXINA 2 e APC permettono alla  $\beta$ -catenina di migrare indisturbata nel nucleo e promuovere costitutivamente la trascrizione dei suoi geni bersaglio, coinvolti nella proliferazione, nella

sopravvivenza e nella migrazione cellulare, come c-Myc, ciclina D1 (CCND1), survivina (BIRC5), matrilisina, cicloossigenasi 2 (COX-2), ecc...

Sebbene numerosi studi precedenti abbiano individuato mutazioni a carico di vari componenti della via di segnale Wnt/ $\beta$ -catenina, negli HCC le mutazioni sono prevalentemente a carico dei geni AXIN1 e CTNNB1 (quest'ultimo codificante la  $\beta$ -catenina stessa.)<sup>18</sup> Nel caso delle mutazioni a carico di CTNNB1, le mutazioni o delezioni interessano specificamente l'esone 3, che codifica il sito di fosforilazione/inattivazione della  $\beta$ -catenina da parte di GSK-3 $\beta$ .<sup>19</sup>

Il 90% degli HCC presenta iperespressione del recettore FZD-7<sup>20</sup> e alcuni studi hanno riportato l'accumulo nucleare e citoplasmatico di  $\beta$ -catenina nel 17-40% degli HCC, sebbene non sempre sia stata riscontrata una correlazione tra l'accumulo nucleare o citoplasmatico della  $\beta$ -catenina e il livello di espressione dei suoi bersagli trascrizionali nei carcinomi epatocellulari. Quest'ultima osservazione suggerisce l'esistenza di vie di segnale alternative in grado di intervenire nella regolazione dei bersagli molecolari della  $\beta$ -catenina.<sup>11</sup>

La via di segnale Hedgehog è coinvolta nei processi di differenziamento, rigenerazione e omeostasi degli organi del tratto gastrointestinale.<sup>21</sup> Nei mammiferi, la cascata Hedgehog comprende tre possibili ligandi: Indian, Sonic e Desert Hedgehog. Tali ligandi interagiscono con il recettore transmembrana Patched (Ptc). Quando inattivo, Ptc funziona da inibitore per un altro recettore

transmembrana, Smoothened (Smo) che, in associazione con proteine regolatrici come Costal-2 (Cos-2), Fused (Fu) e Suppressor of Fused (Sufu), trattiene sulla sua coda citoplasmatica proteine della famiglia Gli (Glioblastoma transcription factor), favorendone il loro legame al citoscheletro. In seguito al legame di uno dei tre ligandi Hedgehog, Gli viene rilasciato e migra nel nucleo dove attiva la trascrizione dei suoi geni bersaglio, quali HES1 e YAP, coinvolti nella crescita e differenziamento cellulare.

Alterazioni della fisiologia di questa via sono associate a diversi tumori solidi.<sup>22,11</sup> Negli HCC è stata documentata l'espressione di Sonic Hedgehog nel 60% dei campioni esaminati. L'inibizione di Sonic Hedgehog era accompagnata dalla riduzione nell'espressione dei geni bersaglio in linee cellulari di epatocarcinoma umano.<sup>23</sup> Inoltre l'attivazione inappropriata di Smo può portare a overespressione di c-Myc, già noto per il suo ruolo nell'epatocancerogenesi.<sup>24</sup>

In quasi tutti i tumori in stadio avanzato è stata evidenziata l'attivazione della via di segnale Raf/Ras/Erk o delle cinasi attivate dai mitogeni (MAPK). Tale cascata è indotta in risposta a un incremento dei segnali a monte, dovuto ad iperespressione di fattori di crescita come il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), quello insulino-simile (IGF) o epatocitario (HGF), il TGF- $\alpha$  o ad alterazioni nei loro recettori (EGFR, MET, VEGFR e PDGFR). I geni della via di segnale MAPK sono implicati in processi che vanno dalla proliferazione alla sopravvivenza cellulare, alla migrazione, all'angiogenesi. La via MAPK è

attivata costitutivamente negli HCC, sebbene le mutazioni a carico dei geni Ras (Ha-, Ki-, N-Ras) siano estremamente rare in questo tumore solido. In assenza di mutazioni dei geni Ras, è stata riportata in uno studio recente l'iperespressione di c-Raf-1 nel 100% dei campioni di HCC esaminati.<sup>25</sup> Inoltre, è stata evidenziata negli HCC la riduzione dell'espressione degli effettori negativi di questa cascata, tra cui RKIP, SPROUTY e Spred.<sup>26,27</sup> Altri studi hanno evidenziato correlazioni positive tra l'attivazione della via Raf/Ras/Erk e l'aggressività e le dimensioni degli HCC, ma non con lo stadio o il grado di differenziamento di questi.<sup>28,29</sup> Esistono inoltre evidenze sperimentali dell'attivazione della via MAPK in seguito a infezione cronica da HBV, dovute all'espressione di due proteine virali, HBX e PreS2-activator large surface protein, che attivano la cascata rispettivamente attraverso l'interazione con PIN1, che defosforila CRAF, e attraverso un meccanismo PKC-dipendente.<sup>30</sup> La via di segnale PI3K/AKT/mTOR è di particolare interesse per questa tesi e verrà trattata più in dettaglio di seguito.

### ***1.3. Via di segnale AKT/mTOR***

#### ***1.3.1 PI3K***

Fosfatidil-Inositol-3-cinasi (PI3K) è una famiglia di cinasi che fosforila l'inositolo a livello del 3'-OH, e comprende tre classi (I, II e III).

Le PI3K di classe I *in vivo* fosforilano di preferenza il fosfatidil inositolo 4,5 bisfosfato a fosfatidil inositolo 3,4,5 trisfosfato, il quale recluta sulla membrana citoplasmatica proteine contenenti un pleckstrin homology (PH) domain, tra cui AKT e PDK1.<sup>31</sup>

La classe I è a sua volta divisa in due sottoclassi: A (chinasi attivate da TKR, Ras e GPCR) e B (attivate da GPCR). Le PI3K di classe IA sono eterodimeri che comprendono una subunità catalitica (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ ) e una regolatrice (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\alpha$ , p55 $\gamma$ , p50 $\alpha$ ). Le PI3K di classe IB sono invece composte da una subunità regolatrice p101 e una subunità catalitica p110 $\gamma$ .<sup>32</sup>

La classe II comprende tre isoforme di PI3K: PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$  e PI3K-C2 $\gamma$ , che fosforilano preferenzialmente il fosfatidil inositolo a fosfatidil inositolo 3 fosfato. La classe III comprende solamente vps34 (vacuolar protein sorting 34) che si trova associata come eterodimero alla subunità regolatrice vps15.<sup>33</sup>

### **1.3.2 AKT**

V-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT) è una serina-treonina cinasi, che esiste in tre isoforme con alto grado di omologia di sequenza ma differenze funzionali: AKT1/ $\alpha$ , AKT2/ $\beta$  e AKT3/ $\gamma$ .

AKT interagisce attraverso il suo dominio PH NH2-terminale con il PI(3,4,5)P3. Quest'ultimo la recluta sulla membrana, dove AKT subisce un cambio conformazionale che le permette di essere attivata in seguito alla fosforilazione

da parte di PDK1 sulla Treonina 308 e dal complesso 2 di mTOR (mTORC2), anche se altre cinasi potrebbero essere coinvolte, sulla Serina 473.<sup>34</sup>

La fosforilazione di entrambi i siti sopra menzionati è necessaria alla completa attivazione di AKT, che può quindi spiegare le sue funzioni di cinasi. Al momento sono stati identificati più di 100 substrati di AKT, tutti coinvolti, direttamente o attraverso intermediari, in processi di sopravvivenza o proliferazione cellulare.<sup>32</sup>

### **1.3.3 mTOR**

Il mammalian target of rapamicin (mTOR) è un enzima della famiglia delle PI3K-related kinase, ma nonostante una forte omologia di sequenza del suo dominio catalitico COOH-terminale con PI3K, funziona solo come proteina-cinasi.<sup>35</sup> mTOR si trova come parte di due complessi, denominati mTORC1, composto da mTOR/Raptor/mLST8/PRAS40/FKBP38 e particolarmente sensibile all'antibiotico rapamicina, e mTORC2, composto da mTOR/Rictor/mLST8/SIN1/Proctor e sensibile a rapamicina e rapalogs (analoghi della rapamicina) solo in seguito a trattamento prolungato.

Il complesso mTORC1 fosforila alcuni elementi del macchinario della sintesi proteica come 4EBP1 e p70 S6 K in risposta a fattori di crescita o nutrienti.

La fosforilazione di 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) risulta nel rilascio di eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), che prende parte nella formazione di un complesso iniziatore della traduzione, mentre p70S6

fosforila la proteina ribosomale 40S S6, che partecipa all'attiva traduzione degli mRNA .

mTOR assicura, integrando segnali provenienti da fattori di crescita, mitogeni, ossigeno, glucosio e aminoacidi, che la cellula entri nel ciclo cellulare solo se nutrienti ed energia sono sufficienti alla divisione cellulare.<sup>36</sup>

mTORC1 regola una serie di passaggi coinvolti nella sintesi proteica, ma in particolare controlla l'espressione di proteine come c-Myc, cyclin D1, cinasi ciclina dipendente 2, la proteina del retinoblastoma, hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ , ornitina decarbossilasi, p27Kip1 and VEGF, tutti fattori cruciali nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, oltre che nell'angiogenesi.<sup>37</sup>

AKT regola l'attivazione del complesso mTORC1 attraverso un processo multifasico, fosforilando e inibendo il gene TSC2 (tuberous sclerosis 2 o amartina). Questa è una proteina GAP (GTPase activating protein), che in associazione con TSC1 (tuberous sclerosis 1 o tuberina) inibisce la proteina Rheb (Ras homolog enriched in brain). L'inibizione di TSC2 da parte di AKT permette a Rheb di accumularsi nella sua forma legata a GTP e attivare mTORC1.

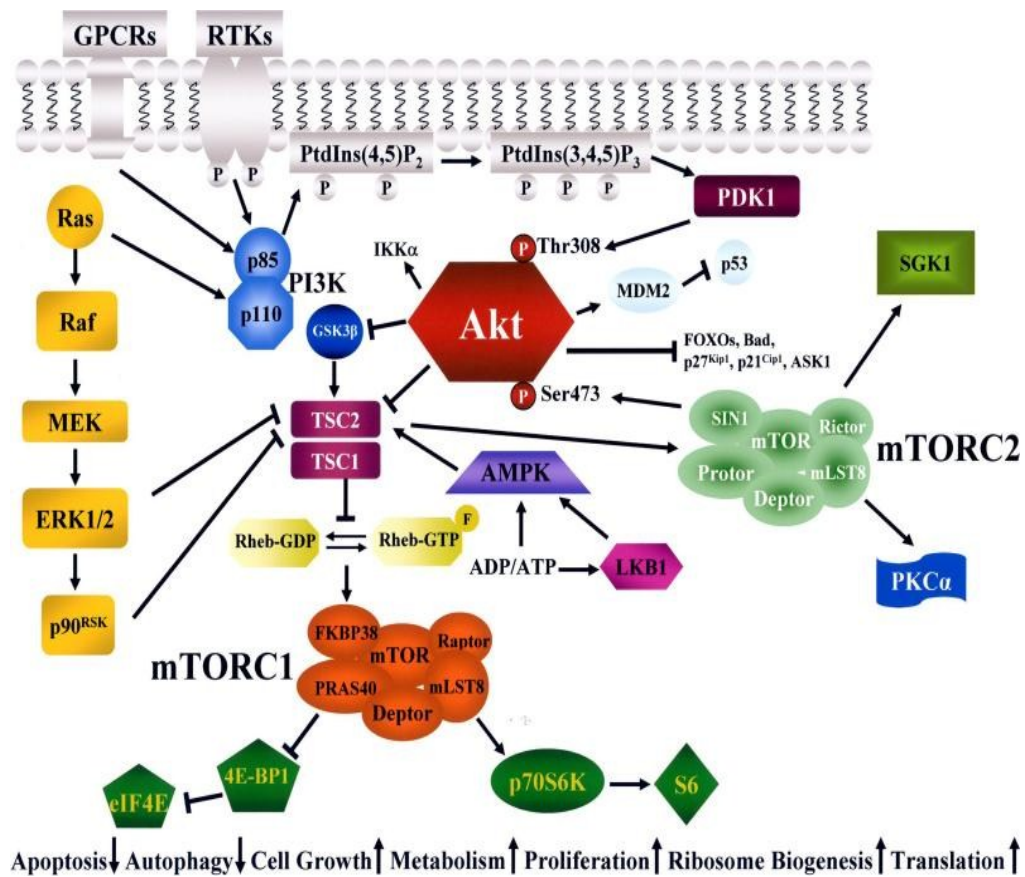
Anche ERK1/2 e p90RSK sono in grado di fosforilare TSC2, sopprimendo in tal modo la sua azione inibitrice su Rheb.

AKT e mTOR sono collegati tra loro da circuiti di regolazione positiva e negativa. Quando AKT attiva mTORC1, infatti, quest'ultimo inibisce AKT

attraverso un meccanismo di feedback negativo.<sup>37</sup> Al contrario, l'inibizione di mTORC1 determina l'iperattivazione di AKT e dei suoi substrati sia *in vitro* sia *in vivo*,<sup>38,39</sup> oltre che l'attivazione delle proteine ERK1 e 2 attraverso la cascata p70S6K/PI3K/Ras/raf/MEK.<sup>40</sup>

La rapamicina, un antibiotico appartenente alla famiglia dei Macrolidi con proprietà antifungine e immunosoppressive, si lega alla proteina citoplasmatica FKBP12 (FK506-binding protein-12) e in complesso con questa inibisce le cinasi della famiglia mTOR. Di conseguenza, la rapamicina e gli altri inibitori di mTOR mostrano una significativa attività contro tumori con attivazione della via di segnale PI3Kinase/AKT/mTOR.<sup>41</sup> La via di segnale PI3K/AKT/mTOR è illustrata nella Figura 1.





**Figura 1.** Rappresentazione schematica della via di segnale PI3K/AKT/mTOR (Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget*. 2010;1:89-103). Per ulteriori dettagli consultare il testo.

#### 1.3.4. PI3K/AKT/mTOR e HCC

L'attivazione costitutiva della via di segnale PI3K/AKT/mTOR è stata indicata come uno dei principali determinanti di crescita e sopravvivenza cellulare in molti tipi di tumore solido.<sup>42</sup> Nel contesto della via di segnale PI3K/AKT, l'attivazione di AKT avviene principalmente attraverso due meccanismi, entrambi convergenti su PIP<sub>3</sub>. Il primo meccanismo prevede l'attivazione di recettori tirosina cinasici, in particolare i già citati IGFR, EGFR, spesso iperespressi negli HCC e nei fegati cirrotici,<sup>43</sup> in seguito a stimolo da parte dei rispettivi ligandi, a loro volta iperespressi negli HCC.<sup>44</sup> Il secondo meccanismo molecolare consiste invece nell'attivazione costitutiva di PI3K o la perdita di efficienza di PTEN, il principale inibitore cellulare della sintesi di PIP<sub>3</sub>.

Alterazioni nella funzionalità di PTEN possano portare all'attivazione incontrollata della via di segnale PI3K/AKT/mTOR negli HCC. Il gene PTEN è mutato nel 5% degli HCC, subisce spesso delezioni, e la sua espressione è ridotta in quasi metà degli HCC, risultando pertanto nell'attivazione costitutiva della via di segnale PI3K/AKT/mTOR.<sup>45</sup> Inoltre, l'espressione di PTEN può essere ridotta significativamente per via diretta dalla proteina HBX in pazienti infetti da HBV.<sup>46</sup> Esistono anche delle evidenze sperimentali che suggeriscono che la via di segnale PI3K/AKT/mTOR possa essere attivata da mutazioni somatiche nel gene PIK3CA, che codifica la subunità catalitica p110 $\alpha$  di

PI3K.<sup>47</sup> Questa via di segnale è attivata nel 30-50% degli HCC ed è associata a prognosi infausta.<sup>28</sup>

AKT attivata fosforila diversi bersagli tra cui fattori inibenti la crescita come FOXO1 e FOXO3 (mammalian forkhead members of the class O), la cui fosforilazione ne determina l'accumulo citoplasmatico e l'inattivazione.<sup>48</sup> Allo stesso modo, AKT fosforila inattivandole proteine citoplasmatiche con funzione pro-apoptotica come la proteina BAD (BCL-2 associated death promoter) e la caspasi 9. AKT attiva inoltre, sempre attraverso fosforilazione, il mammalian target of rapamycin, (mTOR).<sup>49,50</sup> I complessi formati da mTOR a loro volta regolano la p70 S6 cinasi, una serina-treonina cinasi, e il repressore della traduzione proteica PHAS-1/4E-BP. Queste proteine regolano la traduzione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare e promuovono la progressione del ciclo cellulare stesso.

#### ***1.4. Il fenotipo lipogenico***

In molti tumori epiteliali e nelle lesioni che ne costituiscono lo stadio preliminare, sono osservate alterazioni fisiologiche come l'incremento della glicolisi con produzione di acido lattico (effetto Warburg)<sup>51</sup> e l'aumento di processi ad alto consumo energetico come la sintesi di proteine e DNA.<sup>52,53</sup>

Una caratteristica spesso trascurata ma funzionalmente correlata alla via glicolitica è la sintesi *de novo* di acidi grassi.<sup>54</sup>

Nelle cellule normali, anche in tessuti con alto tasso di proliferazione, gli acidi grassi derivanti dalla dieta sono in genere preferiti a quelli endogeni per la sintesi di lipidi strutturali, mentre al contrario nelle cellule trasformate fino al 93% dei triacilgliceroli ha origine endogena, e la dipendenza delle cellule tumorali dai lipidi di nuova sintesi è dimostrata dall'induzione dell'apoptosi specificatamente in queste cellule dopo inibizione della lipogenesi mediata da FASN.<sup>55,56</sup>

La sintesi *de novo* degli acidi grassi è catalizzata dall'enzima multifunzionale FASN (fatty acid synthase), principalmente attivo negli individui sani durante l'embriogenesi e nelle cellule sensibili agli ormoni o con forte metabolismo degli acidi grassi, oltre ad essere espresso nella fase proliferativa dell'endometrio e durante la lattazione, quando provvede alla sintesi dei componenti lipidici del latte.

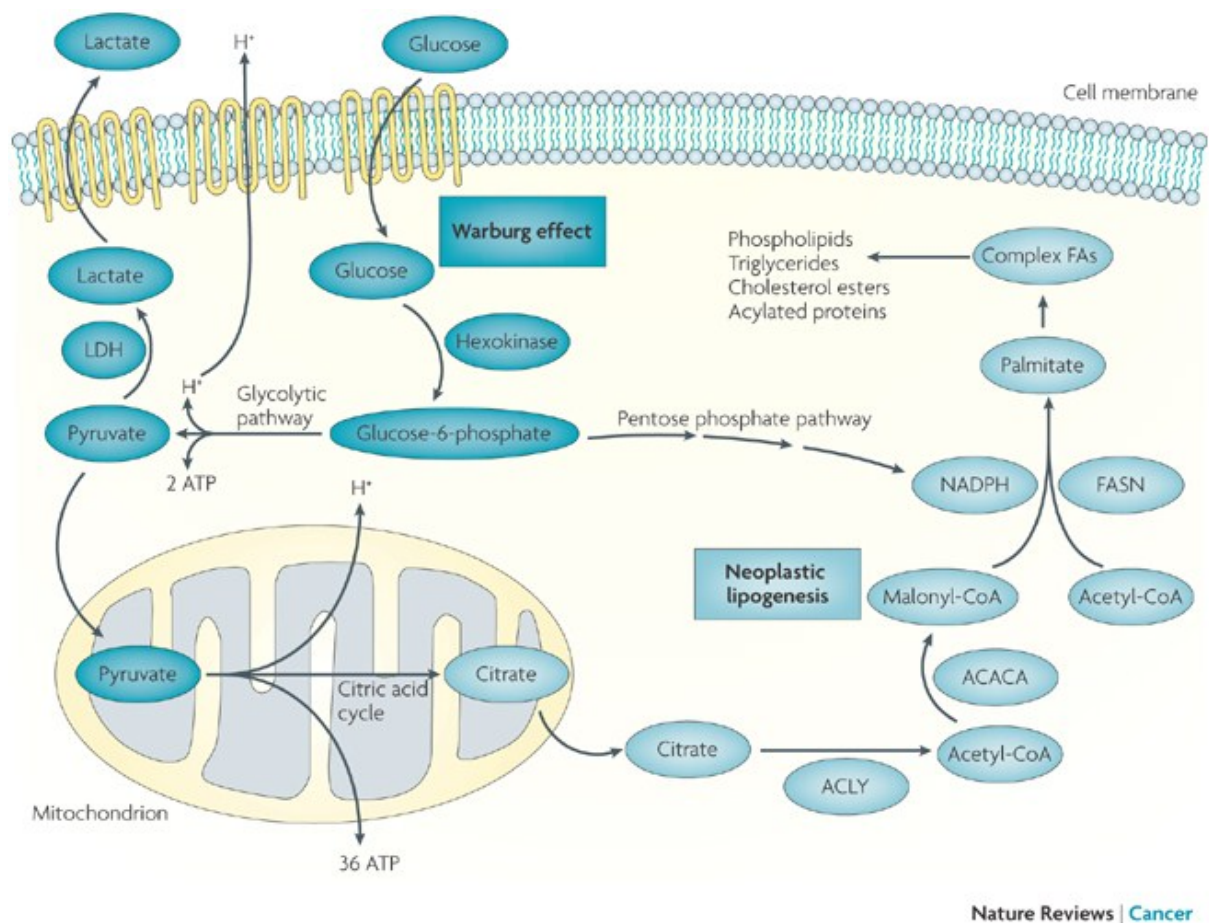
L'espressione di FASN è indotta da fattori di crescita come EGF attraverso interazioni tra vie di segnale come MAPK/ERK e PI3K/AKT, come dimostrato in diversi studi: l'iperespressione di FASN è risultata infatti drasticamente ridotta in seguito ad inibizione di MEK-1 in una linea cellulare dove tale gene era espresso costitutivamente,<sup>57</sup> e in seguito alla trasfezione di PTEN in una linea cellulare PTEN -/-.<sup>58</sup>

La correlazione tra la via di segnale PI3K/AKT/mTOR e l'iperespressione di FASN è inoltre sottolineata da una aumentata attivazione e localizzazione

nucleare di AKT<sup>59</sup> in tessuti tumorali dove FASN è appunto iperespressa e dalla relazione tra mTOR e SREBP1, il principale fattore di trascrizione per FASN.

L'iperpressione di FASN è accompagnata nei tessuti neoplastici da un'accentuata espressione di altri enzimi fondamentali per la sintesi degli acidi grassi, l'ATP-citrato liasi (ACLY), l'acetil CoA carbossilasi (ACAC), e la stearyl CoA desaturasi 1.

L'inibizione farmacologica o mediata da RNAi di ACLY<sup>60,61</sup> e ACAC<sup>62,63</sup> riduce sensibilmente la proliferazione e la sopravvivenza di cellule tumorali che presentano glicolisi aerobica. Uno schema riassuntivo della lipogenesi è illustrato in Figura 2.



Nature Reviews | Cancer

**Figura 2.** Rappresentazione schematica della lipogenesi (Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer 2007;7:763-77). Per ulteriori dettagli consultare il testo.

### ***1.5. Metodica di “Hydrodynamic Gene Delivery” nel fegato di roditori***

L'Hydrodynamic Gene Delivery può essere definita come la tecnica che consente il trasferimento di geni attraverso la rapida iniezione di grandi volumi di DNA “nudo” all'interno di vasi sanguigni.<sup>64,65</sup>

Il termine “idrodinamico” è dovuto alla necessità di utilizzare appunto grandi volumi e tempi ristretti per ottenere nei capillari la pressione necessaria a incrementare la permeabilità delle cellule endoteliali e parenchimatose.

I primi studi sono stati condotti alla fine degli anni '90 su topi e ratti iniettando la soluzione di DNA nelle vene epatica e porta, utilizzando un volume di soluzione ipertonica di 1 ml e tempi di iniezione di circa 30 sec. Si otteneva un trasferimento del DNA iniettato al 5% circa degli epatociti, previa ostruzione meccanica delle vie di deflusso della soluzione iniettata.<sup>64,65</sup> In seguito la metodica è stata modificata utilizzando l'iniezione di semplice soluzione isotonica attraverso la vena caudale, incrementando il volume di soluzione iniettata fino al 10% del peso dell'animale e raggiungendo un tasso di trasferimento uguale o superiore senza la necessità di un blocco meccanico dei vasi sanguigni in uscita.<sup>66-68</sup>

Al giorno d'oggi, numerosi studi sono stati effettuati mettendo a punto metodiche di hydrodynamic gene delivery in diversi tessuti (principalmente fegato, muscolo scheletrico e reni) e diversi modelli animali (tra cui topo, ratto, coniglio, maiale, scimmia).<sup>69</sup>

L'approccio idrodinamico consente il trasferimento di materiale genetico senza l'utilizzo di vettori virali o non virali, rendendo la tecnica vantaggiosa ai fini di un utilizzo clinico, ma un utilizzo a fini terapeutici sull'uomo presenta ancora problemi di carattere pratico.

Sebbene infatti l'utilizzo di vene periferiche nei modelli di topo e ratto abbia eliminato la necessità di interventi chirurgici al fine di ostruire le vie di deflusso della soluzione iniettata, in studi su esseri umani non si è potuta ottenere una pressione sufficiente a indurre la permeabilizzazione delle membrane di epatociti, parenchima e endotelio dei capillari, né per semplice iniezione via catetere, attraverso la vena giugulare o l'arteria femorale fino alla vena cava inferiore,<sup>70</sup> e neppure in seguito a clampaggio della vena porta.<sup>71</sup>

Infatti, sebbene in principio si sia ipotizzato che il trasferimento del materiale genetico avvenisse attraverso un meccanismo mediato da recettori,<sup>72</sup> risulta più probabile che il passaggio attraverso la membrana citoplasmatica avvenga per idroporazione in seguito alla distensione dei tessuti epatici a seguito dell'aumento della pressione intravascolare.<sup>73</sup>

L'efficienza di trasferimento si è dimostrata molto inferiore in animali di dimensioni superiori rispetto a modelli come topi ratti o conigli, ma non è ancora chiaro se questo dipenda dalle diverse dimensioni del fegato o piuttosto da differenze nella sensibilità dell'organo alla tecnica.<sup>74</sup>



Perchè l'iniezione generi una pressione adeguata, la velocità del flusso non è sufficiente: uguale volume di soluzione iniettata attraverso la vena caudale o la vena porta in un modello di ratto dà luogo a efficienze di trasferimento molto diverse. La differenza è probabilmente dovuta al fatto che nel primo caso le reti capillari ai due lati della vena porta possono offrire una adeguata resistenza elastica, mentre nel secondo caso la soluzione iniettata è facilmente dissipata nel circolo venoso.<sup>70</sup>

Nel topo e nel ratto in seguito a iniezione per vena caudale il massiccio volume di soluzione comporta una distensione delle fibre miocardiche tale da indurre congestione cardiaca e ritorna al fegato per flusso retrogrado.

Gli animali sopravvivono bene nonostante siano documentati effetti temporanei quali disfunzioni cardiache, aumento della pressione intraepatica, espansione e deformazione strutturale del fegato,<sup>74</sup> e il loro tasso di crescita successivo al trattamento rimane paragonabile a quello osservato negli animali di controllo.<sup>75</sup>

La possibilità di ottenere una pressione intravascolare adeguata a un efficiente trasferimento di DNA riducendo il volume di soluzione iniettata permetterebbe di limitare gli effetti collaterali legati ad aritmie cardiache, rendendo la tecnica abbastanza sicura da poter essere utilizzata sull'uomo a fini terapeutici. A questo scopo sarebbe utile una tecnica di hydrodynamic delivery assistita da computer, dove il volume e il flusso di soluzione iniettata sono gestiti da un software che li

regola in maniera da mantenere la pressione indotta all'interno dei vasi costante a un valore ideale.

## SEZIONE SPERIMENTALE

### 1. INTRODUZIONE

Il carcinoma epatocellulare umano (HCC) è uno dei tumori più frequenti e mortali al mondo.<sup>76,77</sup> Anche se sono stati identificati i principali fattori di rischio, gli aspetti molecolari della patogenesi degli HCC non sono ancora del tutto chiari.<sup>76,77</sup> L'HCC è una patologia generalmente letale: la diagnosi spesso tardiva rende possibile l'approccio chirurgico solo per pochi pazienti, e quando il tumore non è operabile i trattamenti alternativi non migliorano sensibilmente la prognosi del paziente.<sup>76,77</sup> Per questo, lo studio dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e progressione dell'HCC si rende necessario per identificare nuovi bersagli per la diagnosi precoce, la chemoprevenzione e il trattamento di questa patologia.

La lipogenesi anormale è stata già in passato collegata ad anomalie metaboliche come diabete obesità, e la sindrome metabolica.<sup>78</sup> Dati sperimentali indicano che anche molte neoplasie epiteliali presentano la lipogenesi *de novo*.<sup>79-82</sup>

La lipogenesi anormale si è dimostrata indispensabile ai tessuti tumorali in quanto assicura il costante rifornimento di lipidi e precursori lipidici necessario per la sintesi delle membrane e per le modificazioni post traduzionali delle proteine nelle cellule in forte proliferazione.<sup>79-82</sup>

A livello molecolare, l'aumentata lipogenesi si riflette nell'incremento dell'attività e dell'espressione di diversi enzimi lipogenici nelle cellule neoplastiche.<sup>79-82</sup>

ATP citrato liasi (ACLY), acetil-CoA carbossilasi (ACAC), acido grasso sintetasi (FASN), enzima malico (ME), e stearoil-CoA desaturasi 1 (SCD1) sono enzimi rate-limiting responsabili del metabolismo del glucosio ad acidi grassi a diversi livelli. In particolare: (a.) ACLY sintetizza acetil-CoA dal citrato fornito dalla glicolisi; (b.) ACAC sintetizza malonil-CoA dall'acetil-CoA; (c.) FASN catalizza la condensazione del malonil-CoA per produrre il palmitato, un acido grasso saturo a 16 atomi di carbonio, e altri acidi grassi saturi a lunga catena, e dipende dal NADPH come equivalente di riduzione; (d.) ME catalizza la produzione di NADPH necessaria alla sintesi degli acidi grassi; (e.) SCD1 catalizza la sintesi di acidi grassi monoinsaturi, utilizzati come substrato per la sintesi di trigliceridi, esteri del colesterolo e fosfolipidi.<sup>79-82</sup> Questi enzimi sono iperespressi in maniera coordinata quando la lipogenesi è richiesta,<sup>79-82</sup> e sono attivati a livello trascrizionale dalla sterol regulatory element-binding protein (SREBP)1, dal liver X Receptor (LXR) alfa e beta, e dalla carbohydrate responsive element binding protein (chREBP).<sup>79-84</sup>

L'importanza della lipogenesi anomala nel cancro è sottolineata da una recente serie di dati che mostrano come la soppressione dei principali enzimi lipogenici sia in grado di ridurre fortemente la crescita di varie linee cellulari tumorali *in*

*vitro* e di ridurre la tumorigenesi *in vivo*.<sup>61,79-81,85</sup> La disponibilità di letteratura riguardo alla lipogenesi *de novo* negli HCC è limitata. È stato descritto l'aumento dei livelli di FASN, ACAC, ACLY e SCD1 in una piccola serie di HCC,<sup>86</sup> e l'espressione di SREBP1 appare inversamente correlata alla prognosi del paziente.<sup>87</sup> Inoltre uno studio *in vitro* suggerisce che la soppressione di FASN rappresenti un forte svantaggio per la crescita degli HCC umani.<sup>88</sup> Tuttavia, lo status delle proteine lipogeniche non è stato completamente esaminato in questa patologia, e gli studi funzionali sul ruolo degli enzimi lipogenici negli HCC sono fino a oggi limitati.

Inoltre, i meccanismi molecolari che portano alla iperregolazione e all'incremento nell'attività delle proteine lipogeniche negli HCC non sono state chiaramente delineate.

In questo studio è stato preso in esame il ruolo della lipogenesi anormale in una serie di HCC umani e linee cellulari, e in un modello *in vivo* di topo. I nostri dati indicano che la lipogenesi *de novo* è un meccanismo essenziale che contribuisce all'oncogenesi epatica e alla prognosi dell'HCC umano. Inoltre i nostri dati indicano che la serina/treonina chinasi AKT è il principale induttore della lipogenesi e la sua attivazione è oncogenica nel fegato.

## **2. MATERIALI E METODI**

### ***2.1. Campioni di tessuto umani***

Sono stati utilizzati otto fegati normali, 68 HCC e i corrispondenti tessuti epatici circostanti non tumorali. I fegati normali (non patologici) sono stati raccolti in autopsie di individui caucasici sani. I tumori sono stati suddivisi in HCC con prognosi peggiore (HCCP; n = 36) e migliore (HCCB; n = 32), caratterizzati rispettivamente da una sopravvivenza dopo resezione parziale del fegato minore e maggiore di tre anni.<sup>89</sup> Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella Tabella 1. Parte dei campioni di fegato utilizzati nello studio sono stati gentilmente forniti dal dott. Snorri S. Thorgeirsson (National Cancer Institute, Bethesda, MD. U.S.A.) e parte raccolti presso il Dipartimento di Chirurgia Pietro Valdoni (Università di Roma La Sapienza, Roma). L'approvazione all'utilizzo dei campioni umani, coperti da anonimato, è stata ottenuta dal Comitato Etico degli Ospedali partecipanti e degli Istituti Nazionali della Salute Americani (NIH).

### ***2.2. Linee cellulari e trattamenti***

Linee cellulari e trattamenti. Le linee cellulari di HCC umano HLE, HuH1, 7703, Focus, Hep40, SNU-182, SNU-423, e SNU-389 sono state fatte crescere in Dulbecco's Modified Eagle Medium con 10% di siero fetale bovino. Le

cellule coltivate *in vitro* sono state trattate con siRNA contro i geni *USP2a*, *AKT*, *FASN*, *ACAC*, *ACLY*, e *SCD1* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), secondo le istruzioni del produttore. Gli esperimenti di trasfezione transiente di linee cellulari HCC sono stati condotti con cDNA per AKT miristilata/attivata in plasmide pUSEamp (Millipore, Billerica, MA), *FASN*, *ACLY*, *ACAC* e *SCD1* in vettore pCMV6-XL4 (OriGene Technologies, Rockville, MD), secondo le istruzioni del produttore e utilizzando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) per le operazioni di trasfezione.

Il plasmide per AKT miristilata con Ha-tag N-terminale, clonato in un vettore pT3-EF1 $\alpha$  è stato gentilmente fornito dal Dr. M. Celeste Simon (University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA). pCMV/SB (il vettore di espressione iperattivo sleeping beauty) è stato gentilmente fornito dal Dr. Mark A. Kay (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA). Per la trasfezione stabile di AKT miristilata, i trasfettanti stabili sono stati selezionati con cilindri di clonaggio dopo 4 settimane in medium contenente Geneticina (600  $\mu$ g/ml).

Per il trattamento con inibitori solubili, le cellule HCC sono state piastrate a una concentrazione di  $2.0 \times 10^3$  cellule/piastra in piastre multiwell da 96 pozzetti e lasciate crescere per 12 ore. Dopo 24 ore di serum starvation, C75 (inibitore di *FASN*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 5-(tetradecyloxy)-2 Furoic Acid (TOFA; Inibitore di *ACAC*; Sigma-Aldrich) e 4-(2-Chlorophenoxy)-N-(3-(3-

methylcarbamoyl)phenyl)piperidine-1-carboxamide (inibitore di SCD1; BioVision Inc., Mountain View, CA) sono stati aggiunti al medium di coltura alla concentrazione di 10 nmol/L e 10 µg/ml, rispettivamente, e le cellule incubate per 24 e 48 ore.

### ***2.3. Hydrodynamic gene delivery e analisi istopatologica delle lesioni***

I topi FVB/N wild type sono stati ottenuti dalla Charles River (Wilmington, MA). Le procedure di Hydrodynamic injection sono state condotte come precedentemente descritto.<sup>90</sup> Brevemente, 10 µg dei costrutti pCMV/SB e pT3-EF1α-HA-myr-AKT nel rapporto di 1:25 sono stati diluiti in 2 mL di soluzione di NaCl allo 0.9%, filtrati, e iniettati nella vena caudale laterale di topi di sette settimane, in 7-9 secondi. I topi iniettati sono stati monitorati a cadenza settimanale, e sacrificati in vari momenti da 3 giorni a 28 settimane dall'iniezione. Le analisi istopatologiche dei fegati sono state condotte su 13 animali sperimentali da due patologi esperti (Frank Dombrowsky e Matthias Evert) su vetrini di tessuto colorati con il metodo dell'ematossilina e eosina e la reazione PAS in accordo con i criteri dettati da Frith et al.<sup>91</sup> Sono stati inoltre analizzati cinque animali di controllo (topi non iniettati) per ogni time point sperimentale.

In contrasto con i tumori epatocellulari che erano generalmente visibili a livello macroscopico come noduli bianchi, le lesioni preneoplastiche non mostravano



crescita espansiva. Le lesioni epatiche sono state diagnosticate come adenomi epatocellulari (HCA) quando: (1) la morfologia degli acini era perduta; (2) le lesioni mostravano un pattern trabecolare normale; (3) le lesioni mostravano leggera o nessuna atipia; (4) le lesioni comprimevano il parenchima adiacente (crescita espansiva). I carcinomi epatocellulari (HCC) erano invece diagnosticati se le lesioni mostravano in aggiunta ai parametri precedenti un pattern pseudoghiandolare o macrotrabecolare con dimensione delle trabecole maggiore di tre strati di cellule in almeno due diverse aree o chiari segni di fenotipo maligno come ampie aree necrotiche associate a grave atipia nucleare, un alto rapporto mitosi/apoptosi, e/o invasione vascolare.

Per valutare il contenuto lipidico, sezioni congelate di fegato sono state sottoposte a colorazione con Oil Red O utilizzando un protocollo standard.

I topi sono stati ospitati, nutriti e trattati in accordo con i protocolli approvati dal committee for animal research della University of California, San Francisco (U.S.A.).

#### **2.4. RT-PCR quantitativa (QRT-PCR)**

I primers per i geni umani e di topo *FASN*, *ACLY*, *ACAC*, *ME*, *SCD1*, *SREBP1*, *USP2a*, *chREBP*, *LXR-β*, e ribonucleic acid ribosomal 18S (*RNR-18*, controllo interno) sono stati acquistati dalla Applied Biosystems (Foster City, CA).

Le reazioni di PCR sono state condotte con 100 ng di DNA, utilizzando un Rotor-Gene®-Q real-time PCR cycler (Qiagen, Valencia, CA) e TaqMan

Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Le condizioni utilizzate erano: 10 min di denaturazione a 95°C e 40 cicli a 95°C per 15 s e a 60°C per 1 min. I valori quantitativi erano calcolati utilizzando il software PE Biosystems Analysis ed erano espressi come Number Target (NT).

$NT = 2^{-\Delta Ct}$ , dove il valore  $\Delta Ct$  di ogni campione era calcolato sottraendo il valore medio Ct del gene target dal valore medio Ct del gene *RNR-18*.

### ***2.5. Immunoblotting e immunoprecipitazione***

Sei fegati normali, 32 HCCB e 36 HCCP e i rispettivi tessuti epatici circostanti non tumorali sono stati omogeneizzati in lysis buffer [30 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 10% glicerolo, e 2 mM EDTA] contenente il Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) e sonicati. Gli estratti nucleari sono stati preparati utilizzando il NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL.) secondo le istruzioni del produttore. Le concentrazioni delle proteine sono state determinate con il Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizzando siero albumina bovina come standard. Per i westwern blotting, aliquote di 100 µg sono state denatureate tramite bollitura in Tris-glycine sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) separate via SDS-PAGE, e trasferite su membrane di nitrocellulosa (Invitrogen) via elettroblotting. Le membrane sono state bloccate in Tris Buffered Saline contenente 5% di nonfat dry milk e 0.1% di Tween 20 per un'ora, e quindi

testate con anticorpi specifici elencati nella Tabella 2. Gli anticorpi che riconoscono i residui di SREBP1 fosforilati da GSK-3 $\beta$  sono stati precedentemente descritti.<sup>92</sup>

L'incubazione con ciascun anticorpo primario è stata seguita da incubazione con un anticorpo secondario coniugato a HRP (horseradish peroxidase) diluito 1:5000 per un'ora e quindi rivelato con il sistema Super Signal West Pico (Pierce Chemical Co., New York, NY). Per ciascuna proteina, la densità è stata calcolata con il software ImageQuaNT 5.1 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), normalizzata alla  $\beta$ -actina (Chemicon International, Temecula, CA; diluizione 1:20000), e livelli e valori medi analizzati per la significatività statistica.

Per gli studi di immunoprecipitazione, un totale di 500  $\mu$ g di lisato di tessuto epatico sono stati immunoprecipitati con 5  $\mu$ g di anticorpi coniugati con agarosio. I complessi di FASN con USP2a sono stati determinati immunoprecipitando FASN con l'anticorpo monoclonale mouse anti-FASN (BD Biosciences, San Diego, CA) e rivelando la membrana con l'anticorpo policlonale rabbit anti USP2a (Abgent, San Diego, CA). I complessi CDC4-SREBP1 sono stati determinati invece immunoprecipitando CDC4 con l'anticorpo policlonale rabbit anti-CDC4 (Invitrogen) e rivelando la membrana con l'anticorpo monoclonale mouse anti SREBP1. come controllo negativo, gli anticorpi usati per la immunoprecipitazione, gli anticorpi sono stati neutralizzati prima dell'immunoprecipitazione preincubandoli per 2 ore a temperatura

ambiente con il corrispondente peptide immunogeno, risultando nell'inibizione dell'immunoprecipitazione.

## **2.6. Immunoistochimica**

La colorazione immunoistochimica sui campioni di tessuto epatico murino è stata condotta su sezioni fissate in formalina al 10% e incorporate in paraffina. Le sezioni deparaffinate sono state incubate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% dissolto in Phosphate Buffered Saline 1X per 30 minuti per disattivare la perossidasi endogena. Per l'esposizione dell'antigene, i vetrini sono stati sottoposti a bollitura in forno a microonde per 12 minuti con tampone di citrato 10mmol/L (pH 6.0) o in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0.001 mol/L (pH 8.0). Sono stati utilizzati gli anticorpi monoclonali mouse anti-FASN (BD Biosciences, San Jose, CA; diluizione 1:1000), anti-HA-Tag (Cell Signaling Technology, Danvers, MA; 1:2000), and anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:5000), gli anticorpi policlonali rabbit anti-phosphorylated AKT, anti-ACLY, anti-ACAC (Cell Signaling Technology,; 1:100), anti-USP2a (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; 1:50), e l'anticorpo policlonale goat anti-SCD1 (Santa Cruz Biotechnology; 1:200). L'immunoreattività è stata visualizzato utilizzando il Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) e 3,3'-diaminobenzidine (DAB) come cromogeno. La colorazione di contrasto sui vetrini è stata effettuata con ematossilina.

## **2.7. Valutazione della lipogenesi**

Come misura della lipogenesi, abbiamo valutato i livelli della sintesi degli acidi grassi *in vitro*. La sintesi degli acidi grassi è stata misurata attraverso l'incorporazione di acetato [U-<sup>14</sup>C] nei lipidi come descritto.<sup>93</sup> Brevemente, le linee cellulari di HCC umano sono state seminate in piastre multiwell a 96 pozzetti alla concentrazione di  $2.0 \times 10^3$  cellule/piastra e incubate overnight. Dopo l'aggiunta di specifici siRNA, cDNA o solo veicolo come indicato, le cellule sono state sottoposte a marcatura a impulso (pulse labelling) con acetato[U-<sup>14</sup>C] 1  $\mu$ Ci/well per un periodo dai 60 ai 360 min. Ogni condizione è stata riprodotta in triplicato. I lipidi sono stati estratti con la metodica di Folch, il <sup>14</sup>C misurato e i dati espressi come percentuale del controllo.

## **2.8. Analisi statistica**

I test *t* di Student e Tukey-Kramer sono stati utilizzati per determinare la significatività statistica. Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati significativi. I dati sono espressi come media  $\pm$  DS.

### 3. RISULTATI

#### *3.1. Attivazione coordinata delle proteine lipogeniche nel carcinoma epatocellulare umano*

I livelli dei principali enzimi della via lipogenica, compresi FASN, ACAC, ACLY, ME, e SCD1, e quelli dei loro induttori a monte sono stati indagati tramite immunoblotting (Figura 3A,B; Figura 4). Nessuna induzione di LXR- $\alpha$  è stata trovata nel fegato circostante non neoplastico e negli HCC rispetto ai fegati normali. Si è invece evidenziata una progressiva induzione di FASN, ACLY, ACAC, ME, SCD1, chREBP, LXR-beta, e SREBP1 a livello sia di proteine che di mRNA. Negli HCC si è riscontrato un ulteriore aumento nei livelli proteici di ACLY, ACAC, ME, SCD1, chREBP, e LXR-beta soprattutto negli HCCP (Figura 3A,B; Figura 4). I livelli di proteina e mRNA di FASN erano progressivamente indotti nei fegati cicostanti e negli HCC. Inoltre, un incremento ulteriore di FASN è stato riscontrato a livello proteico quasi esclusivamente negli HCCP (Figura 3A,B; Figura 4). Quest'ultima osservazione suggerisce l'esistenza di un meccanismo post trasduzionale che regola FASN nei tumori più aggressivi.

In precedenza è stato dimostrato che l'ubiquitin-specific protease 2a (USP2a) mantiene l'attività di FASN impedendo la sua degradazione ubiquitina-specifica.<sup>94</sup> Perciò abbiamo determinato i livelli di USP2a nella nostra serie di campioni. I livelli di USP2a (mRNA e proteine) e del complesso USP2a-FASN

sono risultati indotti negli HCC, particolarmente negli HCCP (Figura 3C,D; Figura 4) La successiva soppressione di USP2a attraverso siRNA nelle linee cellulari Hep40 e SNU-182 (che mostravano alti livelli di USP2a) ha portato alla riduzione dell'espressione di FASN, (Figura 3D) indicando che USP2a determina l'aumento di stabilità di FASN negli HCCP.

Allo stesso modo, l'mRNA di SREBP1 mostrava un graduale incremento dal tessuto epatico circostante non tumorale agli HCC, senza grandi differenze tra le sottoclassi prognostiche (Figura 3B). Tuttavia, i livelli di proteina di SREBP1 erano significativamente più elevati negli HCCP (Figura 3A; Figura 4), indicando la presenza di meccanismi che promuovono la sua stabilità in questa sottoclasse di tumori. Un recente studio ha dimostrato che il protooncogene AKT rafforza la stabilità di SREBP1 impedendo la sua degradazione.<sup>97</sup> Nelle cellule normali, la proteolisi di SREBP1 è innescata dalla sua fosforilazione ai residui Treonina 426, Serina 430 e Serina 434 dalla glicogeno sintetasi 3 beta (GSK-3 $\beta$ ), che crea un sito di docking per l'ubiquitina ligasi CDC4, che risulta nella degradazione di SREBP1.<sup>94</sup> I nostri dati indicano che la fosforilazione dei residui di SREBP1 è aumentata progressivamente nei fegati non tumorali circostanti e negli HCCB, indicando la presenza di meccanismi efficaci di degradazione (Figura 3A; Figura 4) Al contrario, la fosforilazione/inattivazione di SREBP1 negli HCCP era quasi ubiquitariamente perduta. Come meccanismo responsabile, abbiamo indagato i livelli di CDC4 e quelli della GSK-3 $\beta$

fosforilata/inattivata. Sorprendentemente, CDC4 e GSK3 $\beta$  erano entrambe inattivate quasi esclusivamente negli HCCP (Figura 3C; Figura 4)

Di conseguenza i livelli dei complessi CDC4-SREBP1 erano inferiori negli HCCP. Inoltre abbiamo valutato i livelli della monoacilglicerolo lipasi (MAGL), l'enzima responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi intracellulari a glicerolo e acidi grassi e che si è dimostrato contribuire alla patogenesi del cancro.<sup>95</sup>

Tuttavia, abbiamo trovato che l'espressione di MAGL era ridotta nel tessuto epatico non tumorale circostante e negli HCC, escludendo un suo ruolo cruciale nell'epatocarcinogenesi (Figura 3A; Figura 4).

### ***3.2. L'attivazione della lipogenesi de novo è mediata da AKT/mTORC1/RPS6 nel tumore epatico umano***

Dati recenti indicano che la via di segnale AKT/mTOR è coinvolta nella regolazione della lipogenesi *de novo*.<sup>79-84</sup> Abbiamo pertanto valutato nella serie di campioni i livelli totali e attivati delle proteine AKT, mTOR e delle cinasi attivate da AMP (AMPK), avendo queste ultime un ruolo di regolatori negativi del fenotipo lipogenico (Figura 5A; Figura 6).<sup>79-82</sup>

Una graduale induzione dell'attivazione di AKT ed mTOR è stata osservata nei tessuti epatici non tumorali circostanti e negli HCC rispetto ai fegati normali. Il più alto livello di espressione di AKT e mTOR è stato osservato negli HCCP. Al contrario, AMPK $\alpha$ 1 era ugualmente espressa nei fegati normali, non neoplastici



e negli HCC. I livelli AMPK $\beta$ 1 e AMPK $\gamma$  erano contemporaneamente ridotti negli HCC, con gli HCCP che mostravano i livelli più bassi, mentre l'espressione di AMPK $\alpha$ 2 era ridotta esclusivamente negli HCCP (Figura 5A; Figura 6)

Per indagare il ruolo della via AKT/mTOR nella regolazione della lipogenesi nelle linee cellulari HCC, abbiamo transfettato stabilmente con AKT miristilato le linee cellulari HCC HLE e SNU-423, che esprimevano entrambe bassi livelli di AKT. AKT miristilata consiste in una forma di AKT legata a una sequenza per la miristilazione, che risulta in un enzima dieci volte più attivo di quello wild-type.<sup>96</sup>

Abbiamo osservato che l'iperespressione di AKT attivata ha portato a un incremento della crescita cellulare e a una riduzione dell'apoptosi, e ha indotto un aumento nella sintesi dei lipidi e induzione delle principali proteine lipogeniche (Figura 5B,D). L'iperespressione di AKT è risultata anche nella marcata riduzione dei livelli delle proteine AMPK $\alpha$ 2 AMPK $\beta$ 1 e AMPK $\gamma$  (Figura 5B; Figura 6).

Un effetto contrario sulla crescita cellulare, lipogenesi, proteine lipogeniche e AMPK si è avuto quando alle linee cellulari HCC HuH1 e SNU-389, che esprimevano elevati livelli di AKT, è stato somministrato uno siRNA contro AKT1/2 (Figura 5C,E).

In seguito, abbiamo determinato la rilevanza di FASN, ACLY, ACAC e SCD1 nella crescita cellulare modulando i loro livelli di linee cellulari HCC. L'iperespressione di queste proteine nelle cellule derivate da HCC umani 7703 e Focus (che mostravano bassi livelli di FASN, ACLY, ACAC e SCD1) ha accelerato la crescita, ridotto l'apoptosi e aumentato la lipogenesi (Figura 7A,C; Figura 8). Questi effetti sono stati accompagnati dall'aumento nei livelli di AKT fosforilata/attivata (Figura 8), implicando la presenza di un meccanismo feedback che rinforza l'attivazione di AKT da parte delle proteine lipogeniche. Al contrario, un forte rallentamento della crescita, alti livelli di apoptosi, marcata riduzione della lipogenesi e diminuzione dei livelli di AKT fosforilata/attivata sono seguiti all'inattivazione di FASN, ACAC, ACLY e SCD1 attraverso siRNA nelle cellule HuH1 e SNU-389 (che presentavano bassi livelli delle due proteine) (Figura 7D-F; Figura 9).

Infine, per valutare più direttamente l'importanza delle proteine lipogeniche nella crescita dipendente da AKT/mTOR, FASN e SCD1 sono state silenziate tramite siRNA nelle cellule HLE trasfettate stabilmente con AKT miristilata/attivata. Sorprendentemente, la crescita cellulare indotta dall'iperespressione di AKT è stata sensibilmente ridotta simultaneamente dalla soppressione di FASN o SCD1. Inoltre, il trattamento con inibitori chimici di FASN, ACAC e SCD1 delle cellule HLE e SNU-423 trasfettate stabilmente con AKT miristilata ha portato una marcata riduzione dell'attivazione di AKT e

rappresentava uno svantaggio per la loro crescita *in vivo*, mentre lo stesso inibitore non ha sortito un effetto importante nelle linee cellulari corrispondenti trasfettate con il vettore vuoto (Figura 10). In sintesi, questi dati indicano che l'asse AKT/mTOR è un importante modulatore della lipogenesi negli HCC umani e che le proteine lipogeniche contribuiscono alla crescita cellulare degli HCC indotta da AKT/mTOR.

### ***3.3. L'iperespressione di AKT induce il fenotipo lipogenico e promuove lo sviluppo di tumori nel fegato di topo***

I nostri dati clinici e *in vitro* suggeriscono che l'attivazione di AKT giochi un ruolo significativo nella lipogenesi *de novo* e nel cancro al fegato. Pertanto, allo scopo di valutare se l'iperespressione di Akt contribuisce alla sintesi *de novo* dei lipidi anche *in vivo*, abbiamo sviluppato un modello di topo. Usando una metodica di trasfezione *in vivo* che combina la Hydrodynamic injection e l'integrazione somatica mediata da sleeping beauty transposasi, abbiamo espresso stabilmente la Ha-tagged Myr-AKT (AKT miristilata) negli epatociti di topi FVB/N wild-type.

Mentre l'iniezione del solo vettore o di altri oncogeni come Bmi1 o NrasV12 non ha portato a nessun cambiamento a livello istologico nel fegato,<sup>97</sup> l'espressione di myr-AKT ha portato a significative modificazioni della struttura del fegato. Già tre giorni dopo la Hydrodynamic injection, la morfologia del

fegato era significativamente alterata. Infatti, a questo punto erano già visibili lesioni composte da singole cellule o piccoli cluster di meno di dieci cellule, situate soprattutto nella zona 3 (area della vena centrolubulare) degli acini epatici (Figura 11D-F). Queste cellule avevano un citoplasma chiaro fortemente dilatato, a causa di un incremento dei depositi di glicogeno e grassi. La rivelazione immunohistochimica della Ha-tag ha confermato che queste cellule avevano incorporato il costrutto (Figura 11E). Un'indicazione dell'attività proliferativa a questo stadio era l'aumentata espressione di PCNA nei nuclei cellulari rispetto agli epatociti circostanti (Figura 11F). A 12 settimane dall'iniezione, i fegati erano ingrossati e il colore era cambiato, diventando più disomogeneo, chiazzato e pallido rispetto ai controlli normali (Figura 11A,B). Circa il 50% dei tessuti epatici a questo punto era occupato da numerose lesioni preneoplastiche (Figura 11G,I). I foci individuali consistevano generalmente di più di 30 epatociti alterati, e tutti mostravano la stessa morfologia a cellule chiare e forte contenuto lipidico. (figura 11G,I) Tre dei cinque animali esaminati ospitavano ciascuno un piccolo adenoma epatocellulare (HCA), che aveva da 0,7 a 1,8 mm di diametro. Negli HCA (Figura 11K) le cellule chiare superavano di gran lunga in numero le singole cellule eosinofile o basofile. Occasionalmente, erano visibili nelle lesioni e nei tumori figure mitotiche. Dopo 28 settimane, la continua proliferazione delle cellule neoplastiche ha portato a un massiccio ingrossamento e deformazione dei fegati (Figura 11C). Il tessuto

lesionale in ciascuno dei cinque animali esaminati, 28 settimane dopo l'iniezione, occupava più dell'80% del volume del fegato (Figura 11J). Nonostante la maggior parte delle lesioni fossero ancora preneoplastiche, ciascuno degli animali mostrava numerosi tumori epatocellulari.

Nei topi, a questo punto, erano visibili molteplici HCA, il più grande dei quali misurava 13 mm di diametro. Inoltre, tre dei cinque topi mostravano un HCC, che misuravano fino a 12 mm di diametro (Figura 11L,M). Mentre il fenotipo a cellule chiare con deposito lipidico era ancora predominante nei foci preneoplastici e negli HCA, negli HCC le cellule mostravano un incremento della basofilia nel citoplasma e perdita dei lipidi intracitoplasmatici ma conservavano la crescita trabecolare ed erano ben differenziate (Figura 11L,M). Negli HCC, mitosi, corpi apoptotici e aree necrotiche erano facilmente visibili (Figura 11L,M). Anche se il differenziamento epatocellulare era chiaramente predominante durante il processo di cancerogenesi (più del 90% del tessuto lesionale) sono state riscontrate una piccola parte di lesioni tumorali con caratteristiche pseudoghiandolari, adenomi misti epatocellulari e pseudoghiandolari e, molto raramente, tumori con caratteristiche colangiocellulari (Figura 12). Tuttavia, non si è osservato nessun colangiocarcinoma.

### ***3.4. Induzione delle proteine lipogeniche nelle lesioni epatiche indotte da AKT***

In seguito, abbiamo indagato i livelli dei geni/proteine coinvolte nella lipogenesi in topi non trasfettati e trasfettati con Myr-AKT. L'induzione dei livelli di proteine ed mRNA di AKT e mTOR è stata osservata nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei topi Myr-AKT rispetto ai fegati di controllo, come evidenziato da immunoblotting e real time RT-PCR quantitativa (Figura 13A; Figura14; Figura 15) L'induzione di AKT, mTOR e RPS6 era associata con quella dei principali enzimi lipogenici (FASN, ACLY, ACAC, ME, e SCD1), come anche dei fattori di trascrizione e mediatori intracellulari della lipogenesi (chREBP, LXR- $\beta$ , e SREBP-1). Osservazione importante, l'induzione di FASN e SREBP1 era evidente solo a livello delle proteine (Figura 13A; Figura14, Figura 15) presumibilmente a causa di una diminuzione della degradazione. Infatti, la forte espressione di FASN era associata ad induzione di USP2a e livelli maggiori dei complessi FASN-USP2a nei fegati trasfettati con AKT. Inoltre, la ridotta proteolisi di SREBP1 era associata con inattivazione/fosforilazione di GSK-3 $\beta$  e, di conseguenza, livelli ridotti di complessi CDC4-SREBP1 e diminuzione della fosforilazione di SREBP1 a livello dei residui Thr-426, Ser-430, and Ser-434. L'induzione della lipogenesi *de novo* era accompagnata dalla riduzione delle proteine AMPK $\alpha$ 2, AMPK $\beta$ 1, AMPK $\beta$ 2, e AMPK $\gamma$  nei topi trasfettati con AKT (Figura 13A; Figura 14) Quindi, non solo AKT induce le proteine pro-lipogeniche, ma sopprime anche i

segnali anti-lipogenici. L'iperpressione dei quattro principali enzimi lipogenici (FASN, ACLY, ACAC, SCD1), della forma di AKT fosforilata/attivata e USP2a, rivelate tramite immunoblotting, è stata confermata dall'immunoistochimica (Figura 16). L'iperpressione non variava molto durante il processo di cancerogenesi o nelle cellule lesionali di uno stesso animale, anche se i tumori avevano una positività immunoistochimica leggermente più forte. Questi risultati erano già visibili dopo tre giorni dall'iniezione. Riassumendo, i nostri dati indicano che l'iperpressione di AKT porta all'attivazione della lipogenesi e all'epatocarcinogenesi nel topo.

#### 4. DISCUSSIONE

In questo studio, abbiamo mostrato che l'attivazione anomala della lipogenesi è un evento oncogenico dominante negli HCC umani. Il fatto che nessuna differenza significativa sia stata rilevata nell'estensione della lipogenesi *de novo* in base alle diverse eziologie degli HCC, indica che l'aumento della lipogenesi sia un fenomeno molecolare generalizzato nell'epatocarcinogenesi. Infatti, studi precedenti hanno dimostrato che i virus dell'epatite B e C sono entrambi in grado di indurre l'espressione di FASN,<sup>98-100</sup> e che l'iperespressione di FASN è una caratteristica tipica di un'altra condizione che predispone al cancro, la steatoepatite alcolica.<sup>101</sup>

Inoltre, la forte induzione di FASN caratterizza anche un modello di ratto con epatocarcinogenesi indotta dall'insulina,<sup>102</sup> che simula la formazione di HCC in soggetti affetti da diabete mellito di tipo II e/o sindrome metabolica, due condizioni cliniche associate con un rischio incrementato di sviluppare tumori del fegato.<sup>103</sup>

I livelli più alti di proteine lipogeniche sono stati rilevati negli HCC caratterizzati da un fenotipo aggressivo, avvalorando un importante valore prognostico per la lipogenesi *de novo* negli HCC, come osservato in molti altri tipi di tumori epiteliali<sup>79-81</sup> e in accordo con la recente scoperta che i livelli di SREBP1 sono correlati alla proliferazione degli HCC e alla prognosi del paziente.<sup>88</sup>



Studi precedenti indicano che le cascate di segnale dipendenti da AKT/mTOR, MAPK e AMPK regolano la lipogenesi *de novo*.<sup>79-84</sup> Lo studio da noi dimostra chiaramente che l'asse AKT/mTOR è il principale regolatore del fenotipo lipogenico nei tumori del fegato. In particolare, l'iperespressione forzata di AKT attivata è risultata nell'induzione della biosintesi dei lipidi e nella induzione delle proteine lipogeniche *in vivo* e in linee cellulari HCC coltivate *in vitro*, e la soppressione di AKT attraverso siRNA era associata con decremento della lipogenesi e riduzione delle proteine lipogeniche. Abbiamo inoltre osservato che la modulazione della cascata ERK, un'altra candidata a essere la via di segnale responsabile della lipogenesi, non ha avuto effetto né sulla lipogenesi, né sui livelli delle proteine lipogeniche (dati non mostrati).

In particolare, le presenti osservazioni indicano che la via AKT/mTOR induce lipogenesi attraverso meccanismi sia trascrizionali che post trascrizionali. L'attività trascrizionale pro-lipogenica svolta da AKT è in accordo con un precedente studio su linee cellulari dell'epitelio pigmentato retinico e di osteosarcoma.<sup>104</sup> Nondimeno, il presente studio dimostra che AKT promuove la lipogenesi *de novo* anche attraverso meccanismi post trascrizionali, vale a dire impedendo la degradazione da parte del proteasoma di SREBP1 e FASN. Da un lato, l'inibizione dell'ubiquitinazione di SREBP1 è ottenuta da AKT grazie alla sua capacità di inibire GSK-3 $\beta$ , che avvia la proteolisi di SREBP1 con la sua fosforilazione.<sup>92</sup> Dall'altro lato, AKT inibisce la degradazione di FASN

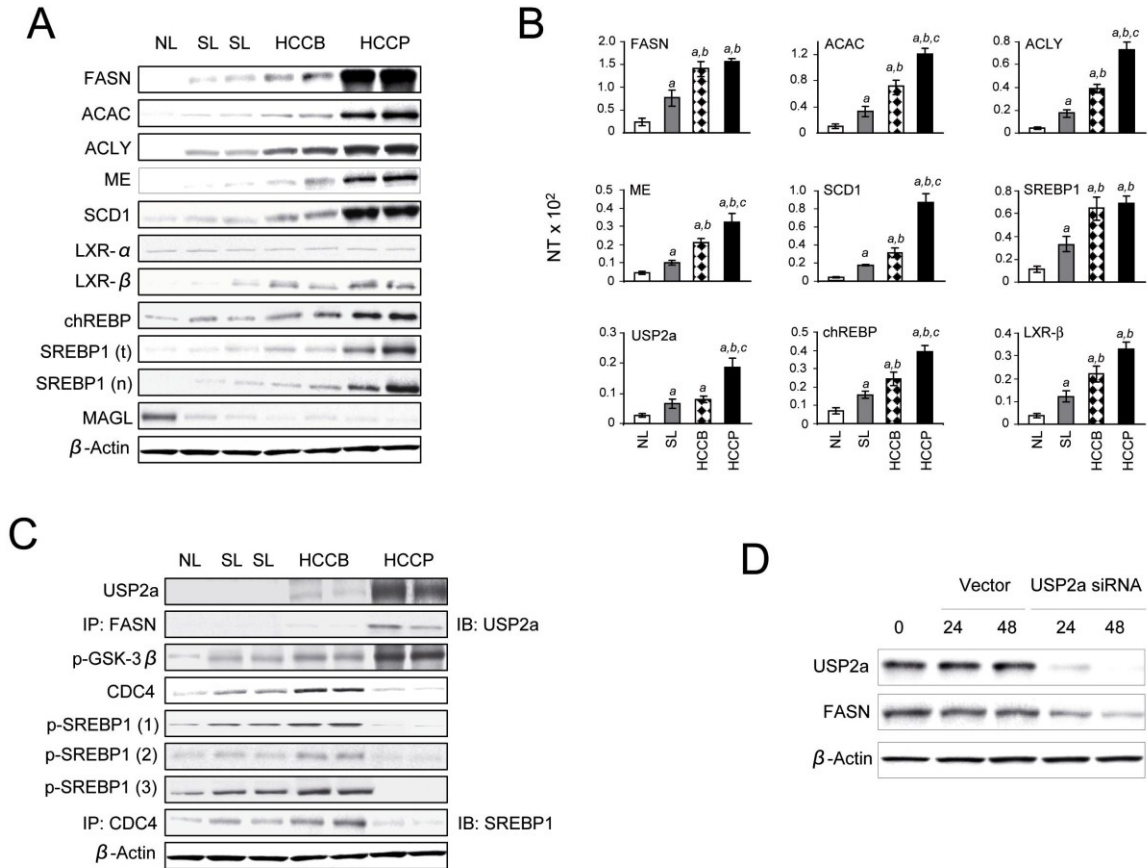
inducendo la trascrizione della deubiquitinasi, USP2a. In base alle nostre conoscenze, questa è la prima evidenza sperimentale indicante che l'induzione di USP2a è mediata da AKT nel cancro. Inoltre, USP2a potrebbe avere un ruolo più ampio nell'epatocarcinogenesi indotta da AKT, non limitata all'inibizione della proteolisi di FASN. Infatti è stato recentemente mostrato che USP2a promuove la stabilizzazione dei protooncogeni ciclina D1 e MDM2, permettendo così il progresso del ciclo cellulare e l'inibizione dell'attività di p53.<sup>105,106</sup>

Inoltre, i nostri risultati indicano che l'induzione delle proteine lipogeniche è un'importante via effettrice dell'asse AKT/mTOR. Infatti la proliferazione e la resistenza all'apoptosi indotte da AKT erano fortemente ridotte quando l'iperespressione di AKT era accompagnata da inattivazione selettiva di FASN o SCD1 *in vitro*. Inoltre, l'osservazione che la soppressione delle proteine lipogeniche portava a una marcata riduzione della crescita solo nelle cellule che iperesprimevano AKT ma non in quelle non trasfettate, indica che il trattamento con inibitori della lipogenesi *de novo* possa agire specificatamente su cellule caratterizzate dall'attivazione della via AKT/mTOR. Ulteriori studi sono necessari per meglio definire queste osservazioni.

Infine, abbiamo dimostrato che l'iperespressione di AKT è di per se sufficiente a indurre epatocarcinogenesi nel topo. Quest'osservazione suggerisce che la disregolazione di Akt ha un ruolo centrale nell'epatocarcinogenesi umana. I nostri

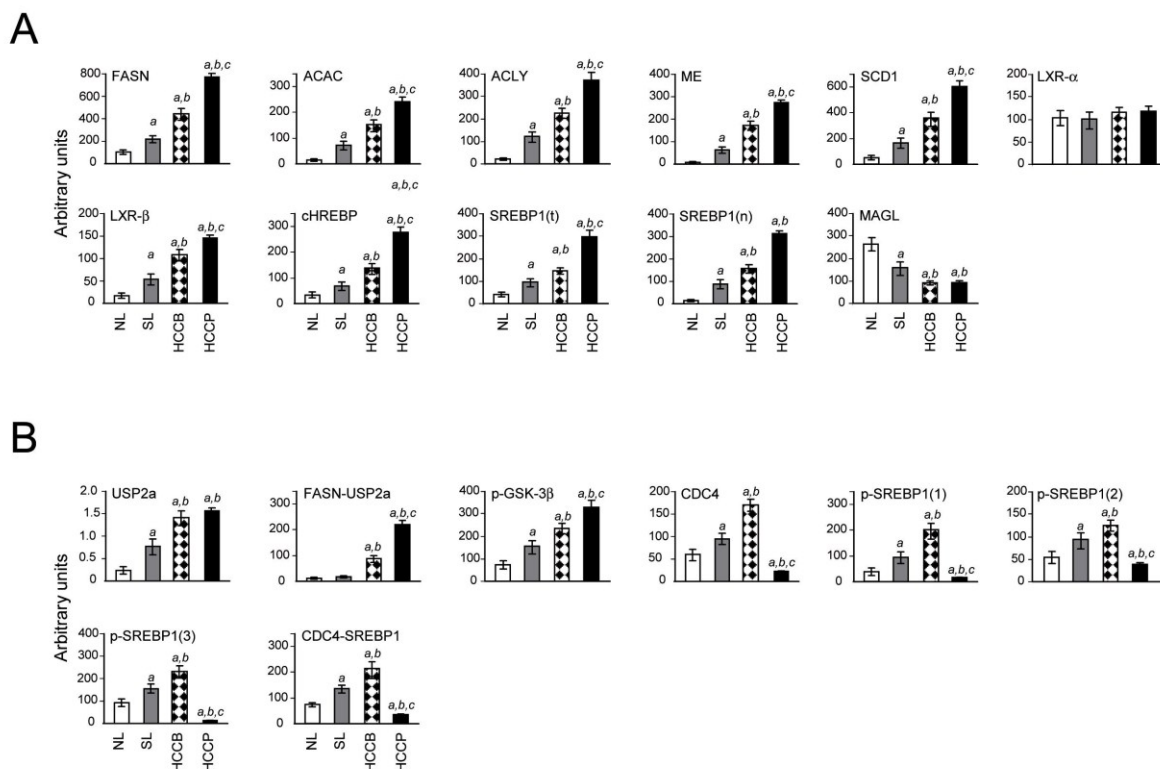
risultati concordano con i dati di uno studio effettuato su topi portatori di una delezione di PTEN, un gene oncosoppressore che regola negativamente la via di segnale AKT/mTOR. In tale modello, l'inattivazione fegato specifica di PTEN portava a steatosi e, in alcuni casi, a sviluppo di HCC.<sup>107,108</sup> In accordo con il ruolo centrale di AKT nella patogenesi degli HCC, i livelli della forma attivata di AKT sono quasi sempre indotti negli HCC umani.<sup>109</sup> I topi che iperesprimono AKT sono, pertanto, un valido modello sia per studiare i meccanismi molecolari responsabili dell'epatocancerogenesi indotta da AKT, sia per valutare l'effetto della soppressione della via AKT/mTOR e dei suoi effettori lipogenici nel trattamento degli HCC umani.

## 5. FIGURE E TABELLE

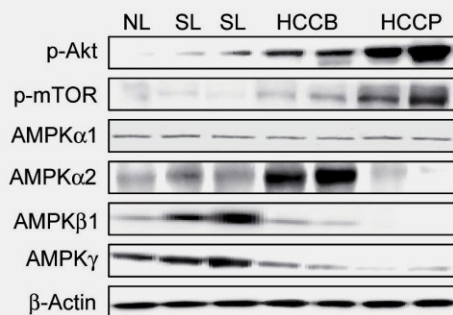
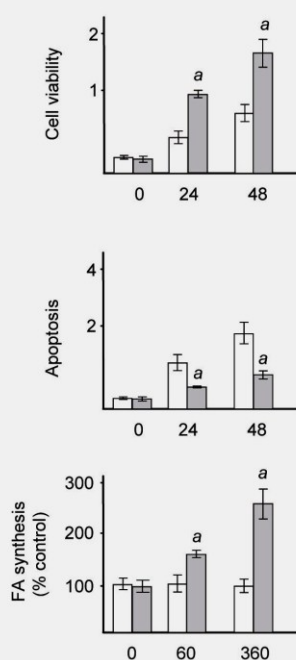
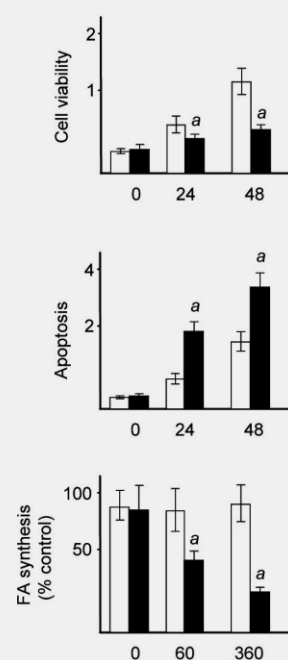


**Figura 3.** Attivazione delle proteine lipogeniche nel tumore epatico umano. (A) Immunoblotting rappresentativo delle principali proteine lipogeniche e fattori di trascrizione coinvolti nella lipogenesi. Per quanto riguarda SREBP1, sono stati determinati i livelli totale (T) e nucleare (N). (B) I livelli dell'mRNA delle proteine lipogeniche e dei fattori di trascrizione prolipogenici sono stati determinati tramite real-time PCR quantitativa. NT (Number Target) =  $2^{-\Delta Ct}$ ;  $\Delta Ct = Ct \text{ RNR18} - Ct \text{ target gene}$ . (C) valutazione dei regolatori di FASN e SREBP1 tramite immunoblotting. I siti di fosforilazione di SREBP1, Thr-426, Ser-430, and Ser-434, sono indicati come 1, 2, e 3 nella figura. (D) La soppressione di USP2a tramite siRNA nella linea cellulare Hep40 determina la riduzione dei livelli proteici di FASN. Risultati equivalenti sono stati ottenuti nelle cellule SNU-182 (non mostrati). Ogni barra rappresenta la media  $\pm$  DS. Test Tukey-Kramer:  $P < 0.0001$  *a*, vs. NL; *b* vs. SL; *c* vs. HCCB. Abbreviazioni: IB, immunoblot; IP, immunoprecipitazione; NL, fegato normale (normal

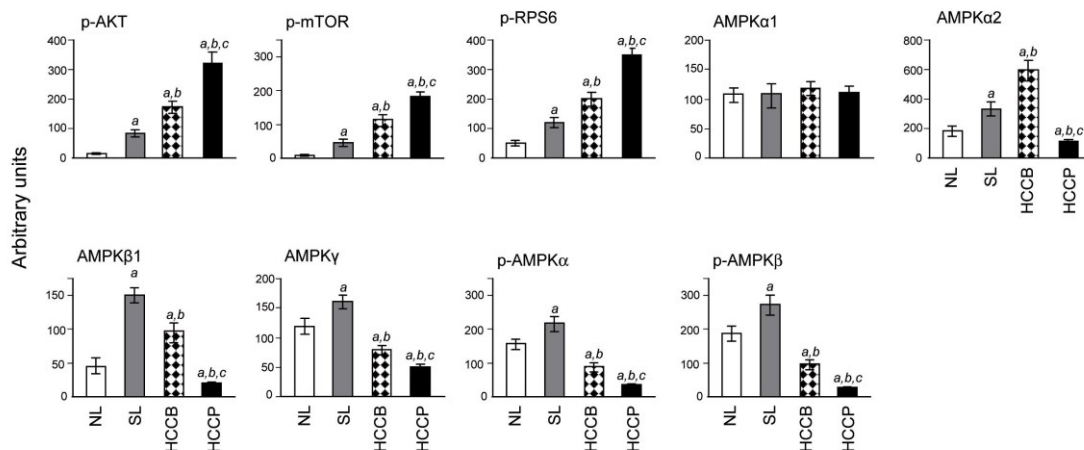
liver); SL, fegato circostante (surrounding liver); HCCB, HCC con sopravvivenza maggiore (better); HCCP, HCC con sopravvivenza più breve (poorer).



**Figura 4** Analisi in chemiluminescenza di immunoblotting e immunoprecipitazione su proteine lipogeniche e regolatori lipogenici (B) in fegati umani normali (n = 8), HCC con maggiore sopravvivenza (n = 32), HCC con sopravvivenza più breve (n = 36), e corrispondenti fegati circostanti non tumorali (SL). La densità ottica è stata normalizzata ai valori della  $\beta$ -Actina ed espressa in unità arbitrarie. Ogni barra rappresenta media  $\pm$  DS. Test di Tukey-Kramer:  $P < 0.0001$  a, vs. Fegato normale; b, vs. Fegato circostante non neoplastico; c, vs. HCCB.

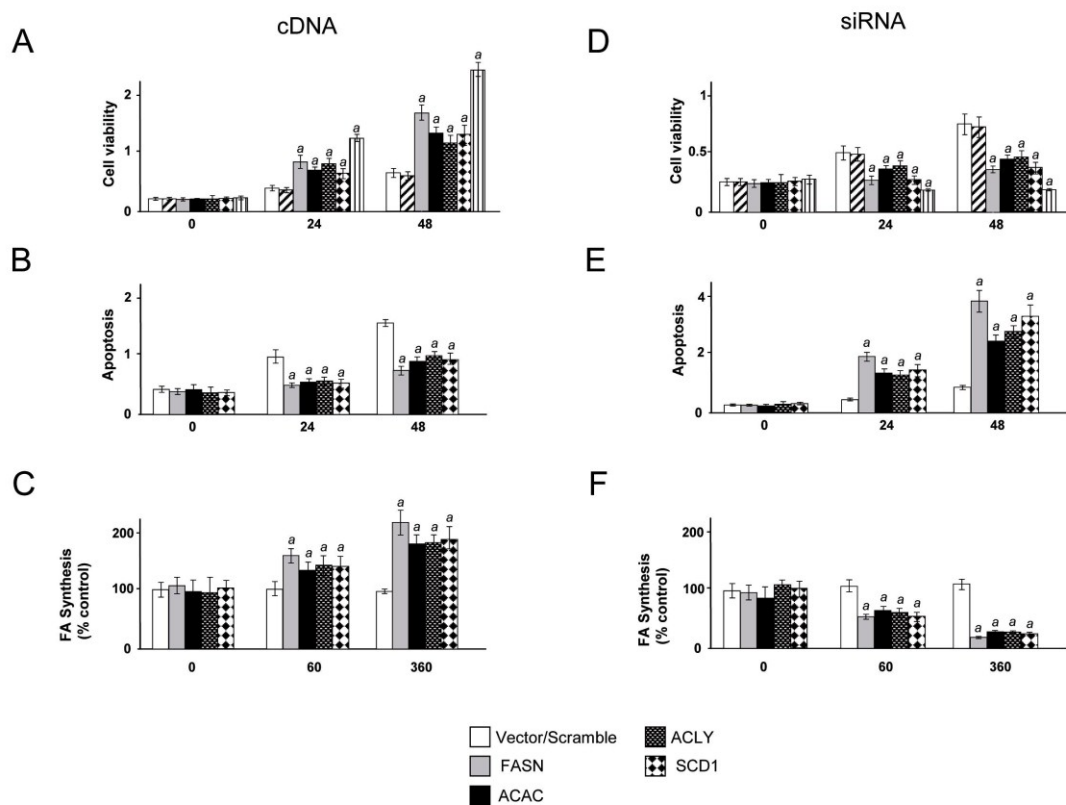
**A****B****C****D****E**

**Figura 5.** (A) Attivazione di Akt, mTOR, e perdita di proteine AMPK negli HCC. I lisati proteici sono stati preparati a partire da fegati normali (NL), fegati non-neoplastici circostanti i tumori (SL), e HCC con maggiore (HCCB) o più breve (HCCP) sopravvivenza e sottoposti a immunoblotting con gli anticorpi indicati. (B) Effetti dell'iperespressione di AKT nella linea cellulare HLE sui livelli dei principali elementi della lipogenesi e proteine AMPK. Risultati equivalenti sono stati ottenuti nelle cellule SNU-423 (non mostrati). (C) Effetto della soppressione di AKT tramite siRNA in cellule HuH1 sui livelli dei modulatori della lipogenesi e proteine AMPK. Risultati equivalenti sono stati ottenuti in cellule SNU-389 (non mostrato). (D,E) Effetto dell'iperespressione (D) o silenziamento (E) di AKT in cellule HLE e HuH1, rispettivamente, sulla vitalità cellulare (primo pannello), apoptosi (secondo pannello), e sintesi degli acidi grassi (terzo pannello). Barre bianche, trasfezione del solo vettore (D) o scramble siRNA (E); barre grigie, trasfezione di cNA diAKT; barre nere, trasfezione di siRNA contro AKT1/2. Ogni barra rappresenta la media  $\pm$  DS. Test *t* di Student (D,E):  $P < 0.0001$  *a*, vs. Vettore vuoto.

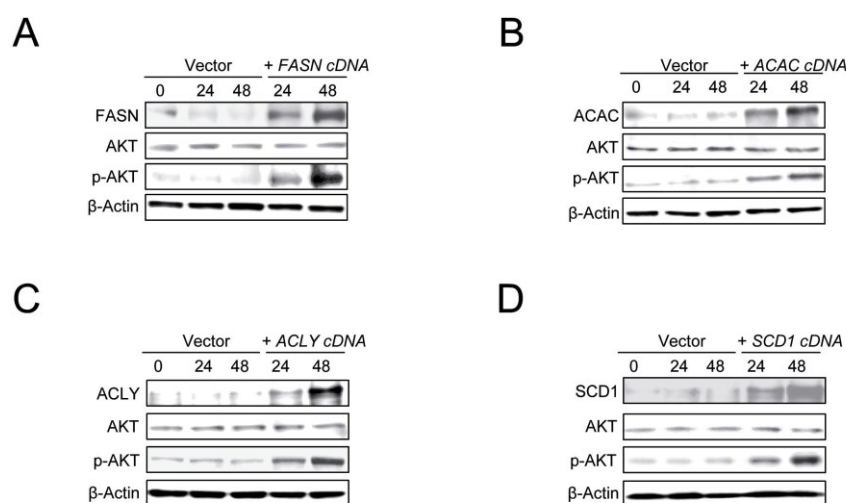


**Figura 6** Analisi in chemiluminescenza di immunoblotting sui livelli di AKT e mTOR attivati/fosforilati e livelli totali delle proteine AMPK in fegati umani normali (NL; n = 8), HCC con maggiore sopravvivenza (HCCB; n = 32), HCC con sopravvivenza più breve (HCCP; n = 36), e fegati circostanti non tumorali corrispondenti (SL). La densità ottica è stata normalizzata ai valori della  $\beta$ -Actina ed espressa in unità arbitrarie. Ogni barra rappresenta media  $\pm$  DS. Test di Tukey-Kramer test:  $P < 0.0001$  *a*, vs. Fegato normale; *b*, vs. Fegato circostante non neoplastico; *c*, vs. HCCB.

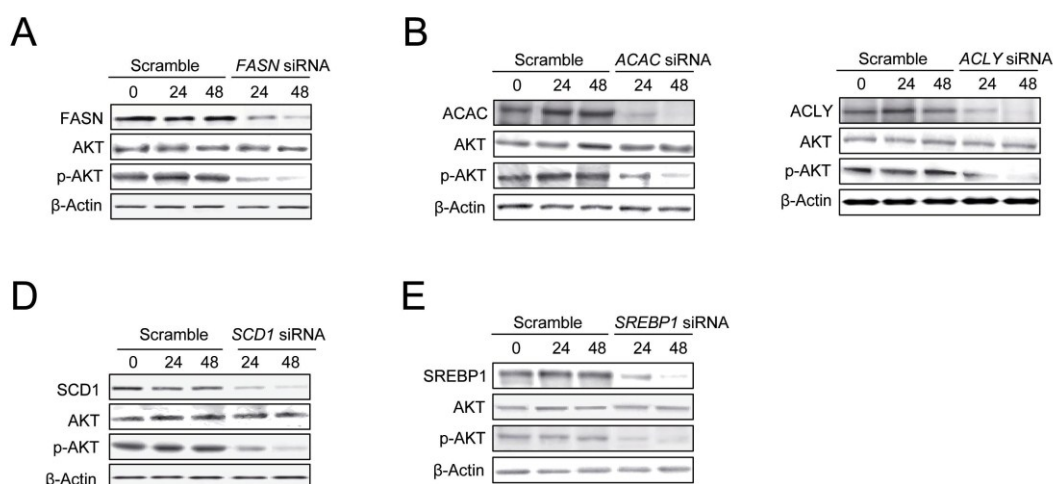




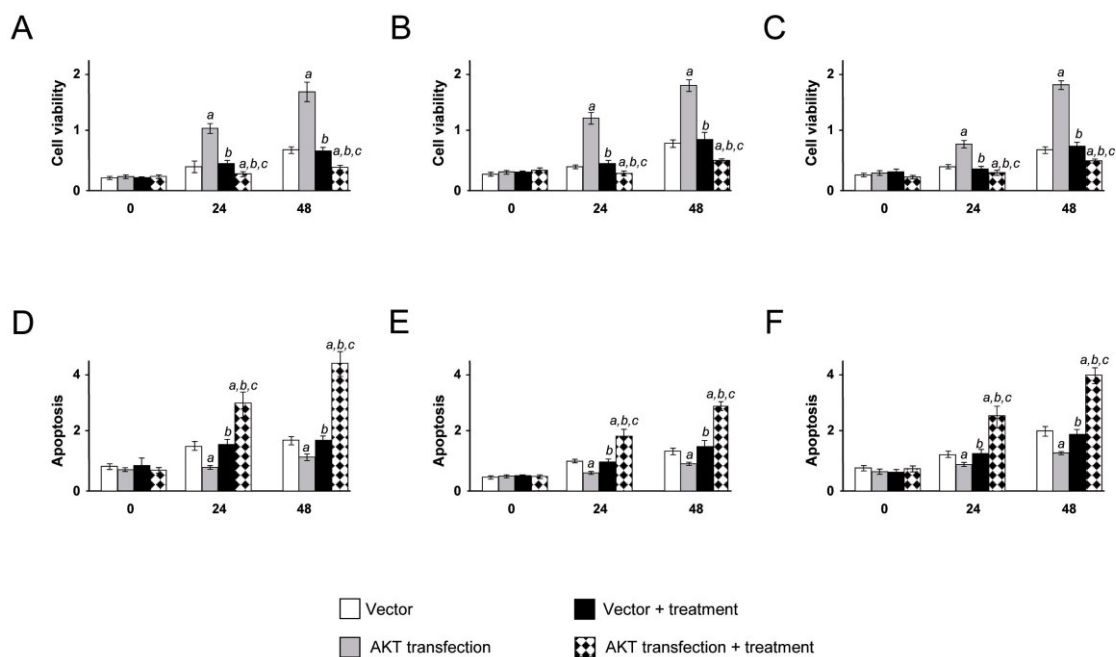
**Figure 7.** Effetto dell'iperespressione forzata del cDNA di *FASN*, *ACLY*, *ACAC* e *SCD1* attraverso trasfezione transiente nella linea cellulare 7703 (che esprime bassi livelli delle quattro proteine) sulla vitalità cellulare (A), apoptosi (B) e sintesi degli acidi grassi (C). Risultati equivalenti sono stati ottenuti nelle cellule Focus cells (non mostrato). Effetto del silenziamento di *FASN*, *ACLY*, *ACAC* e *SCD1* attraverso siRNA in cellule HuH1 (che esprimono alti livelli delle quattro proteine) su vitalità cellulare (D), apoptosi (E) e sintesi degli acidi grassi (F). Risultati equivalenti sono stati ottenuti in cellule SNU-389. Ogni barra rappresenta media  $\pm$  DS. Test t di Student:  $P < 0.0001$  a, vs. Vettore vuoto o scramble siRNA.



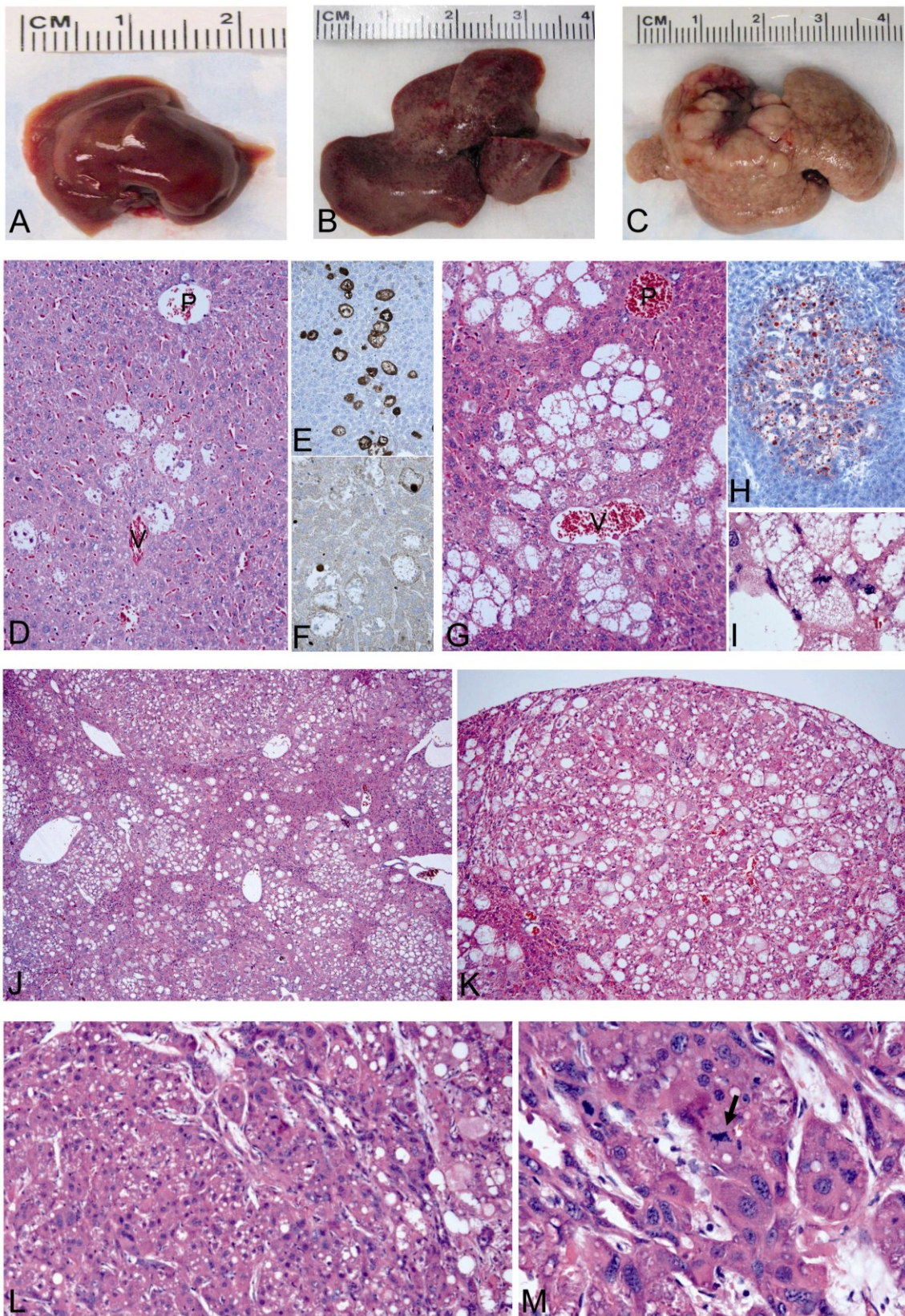
**Figura 8.** Analisi rappresentativa di immunoblotting che mostra induzione di FASN, ACAC, ACLY, e SCD1 in seguito a trasfezione di cDNA degli stessi geni nella linea cellulare 7703 (A,B,C,D, rispettivamente). L'iperpressione forzata di ciascuna delle quattro proteine è risultata in un incremento dei livelli di AKT attivata, senza incidere sui livelli totali di AKT. Risultati equivalenti sono stati ottenuti sulla linea cellulare Focus (non mostrati). La trasfezione transiente è stata condotta con 500 ng di cDNA per *FASN*, *ACAC*, e *ACLY* in un plasmide pCMV6-XL4 (OriGene Technologies), e *SCD1* in un plasmide pCMV6-XL6 (Origene Technologies). I livelli di FASN, ACAC, ACLY, SCD1, AKT totale e attivata a 24 e 48 ore dalla trasfezione sono mostrati. C, controllo al tempo 0.



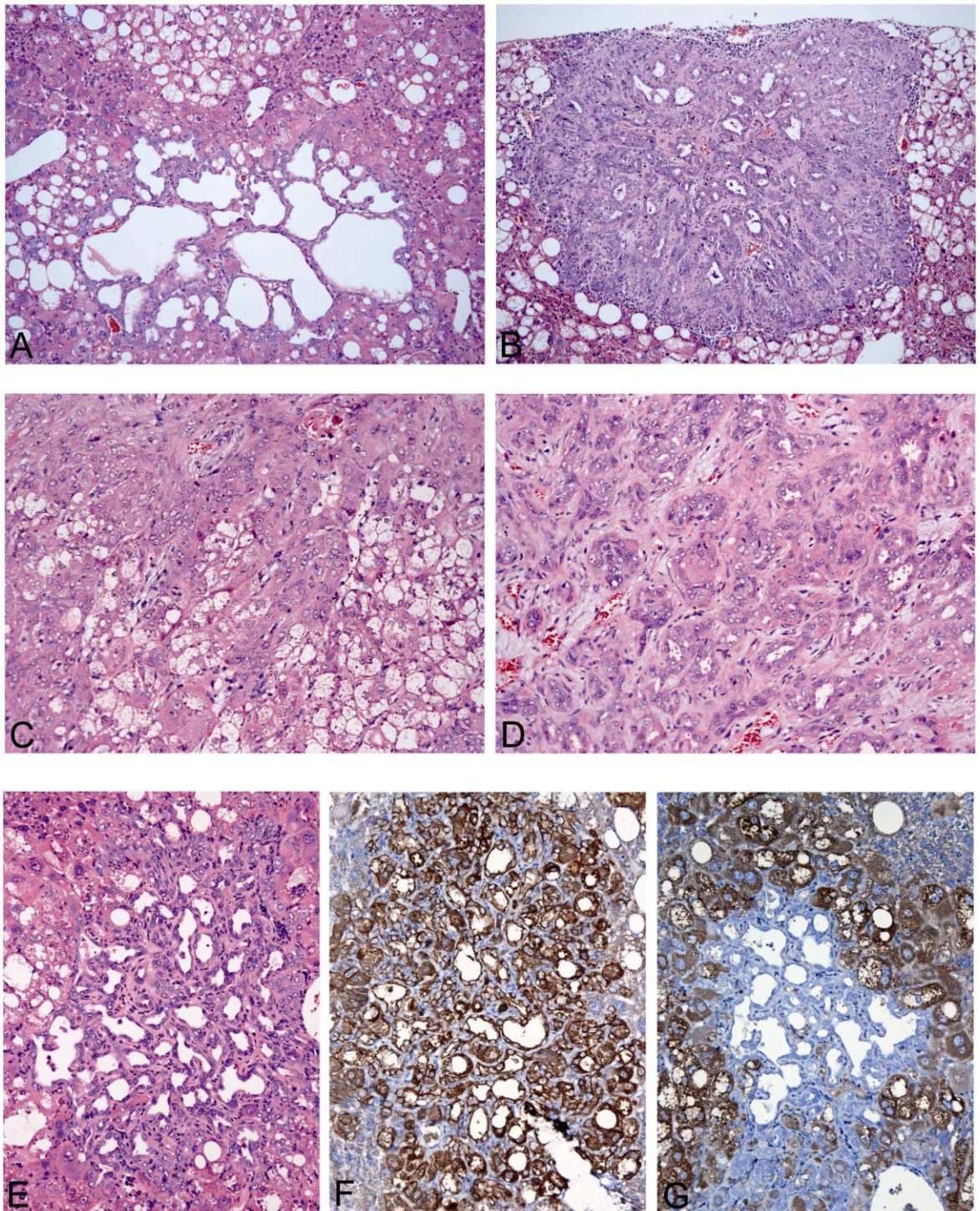
**Figura 9.** Analisi rappresentativa di immunoblotting che mostra il silenziamento dell'espressione di FASN, ACAC, ACLY, e SCD1 in seguito a trasfezione di 500 ng di siRNA specifico contro gli stessi geni nella linea cellulare HuH1. La soppressione di ciascuno dei 4 geni è risultata in un calo dei livelli di espressione di AKT attivata, senza incidere sui livelli totali di AKT. Risultati equivalenti sono stati ottenuti sulla linea cellulare SNU-389 cells (non mostrati). I livelli di FASN, ACAC, ACLY, SCD1, AKT totale e attivata a 24 e 48 ore dalla trasfezione sono mostrati. C, controllo al tempo 0.



**Figura 10.** Effetti dell'inattivazione dell'espressione di FASN (A,D), ACAC (B,E), e SCD1 (C,F) attraverso inibitori specifici in cellule HLE trasfettate stabilmente con AKT. (A-C) Effetto sulla vitalità; (D-F) effetto sull'apoptosi. Le cellule sono state trattate con l'inibitore di FASN, C75 (A,D), l'inibitore di ACAC, 5-(tetradecyloxy)-2 Furoic Acid (TOFA) (B,E), e l'inibitore di SCD1, 4-(2-Chlorophenoxy)-N-(3-(3-methylcarbamoil)phenyl)piperidine-1-carboxamide (C,F) alla concentrazione di 30, 20, e 15  $\mu\text{g/ml}$ , rispettivamente. Sono mostrati i risultati a 24 e 48 ore dal trattamento. Risultati equivalenti sono stati ottenuti sulla linea cellulare SNU-423 (non mostrati). Ogni barra rappresenta media e DS di 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Test di Tukey-Kramer:  $P < 0.0001$  a, vs. Vettore vuoto; b, vs. Cellule trasfettate solo con AKT.



**Figure 11.** Processo multifasico di epatocancerogenesi in topi iniettati con AKT miristilata/attivata. A livello macroscopico, i fegati dei topi iniettati 12 settimane prima con AKT miristilata avevano un aspetto chiazzato e più pallido (B) rispetto ai controlli normali della stessa età (A) ed erano sensibilmente ingrossati. Questi cambiamenti nel fegato erano molto più marcati 28 settimane dopo l'iniezione, quando sono emersi diversi grossi tumori (C). A livello istologico, le prime alterazioni del tessuto epatico erano già visibili dopo tre soli giorni dall'iniezione: diversi epatociti erano alterati, mostrando un citoplasma chiaro e fortemente dilatato (D). Le cellule lesionali erano situate soprattutto intorno alla vena epatica (v) nella zona 3 dell'acino, mentre gli epatociti periportali (zona 1 dell'acino) non subivano modificazioni (p, tratto portale). Si è dimostrato con tecniche di immunistochemica che le cellule ospitavano Ha-tag (E). Anche se non erano visibili figure mitotiche, l'aumento dell'espressione di PCNA indicava attività proliferativa. (F). Dopo 12 settimane, come risultato della proliferazione delle cellule preneoplastiche che iperesprimevano AKT, circa il 50% del tessuto epatico dei topi iniettati con AKT era occupato da foci preneoplastici a cellule chiare, che consistevano di grandi gruppi di cellule (G). A causa delle dimensioni, le lesioni spesso invadevano le aree periportali (zone 1 e 2 dell'acino) anche se restavano situate principalmente nella zona 3 (v: vena epatica; p: zone 1 e 2). Il citoplasma delle lesioni era ricco di lipidi (H) come provato dalla colorazione con Oil Red O. In queste grandi lesioni, erano occasionalmente visibili figure mititiche (I). Dopo 28 settimane, l'80% del fegato era occupato da tessuto lesionale (J). I foci preneoplastici si erano ingrossati a un punto tale da essere adiacenti, conflueno in vaste aree preneoplastiche. La morfologia a cellule chiare (ricche di lipidi) era ancora mantenuta. In aggiunta, erano visibili numerosi tumori epatocellulari. Un piccolo adenoma epatocellulare, a 12 settimane dall'iniezione, è mostrato in (K). Questi tumori normalmente mantenevano la morfologia a cellule chiare e le cellule non presentavano nessuna atipia, mostrando comunque crescita espansiva (notare il rigonfiamento sulla superficie del fegato). I carcinomi epatocellulari (L,M), inoltre, presentavano crescita macrotrabecolare, contenuto lipidico citoplasmatico sensibilmente inferiore, ma aumentata basofilia citoplasmatica, atipia nucleare significativa, molteplici figure mitotiche (freccia in M) e, in alcuni casi, necrosi. Il bordo inferiore del pannello rappresenta: 0.4 mm (D,F,G,H); 0.2 mm (E,M); 0,1 mm (I; immersione in olio); 2.5 mm (J); 1 mm (K), 1.6 mm (L).

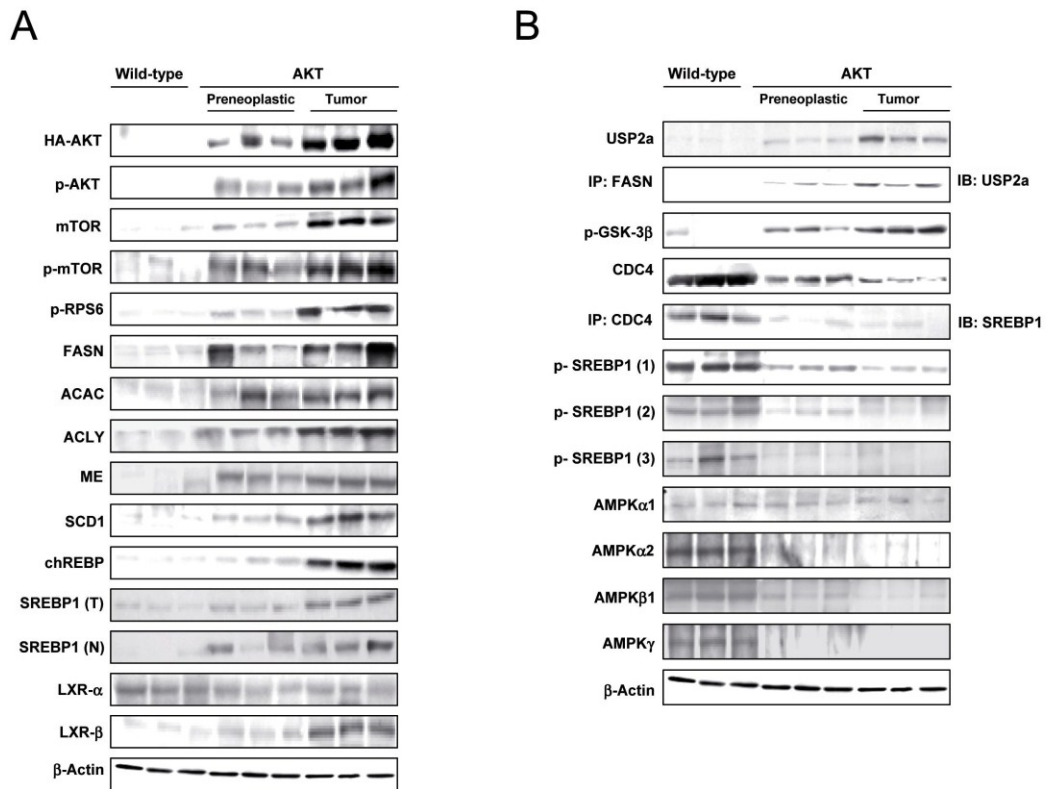




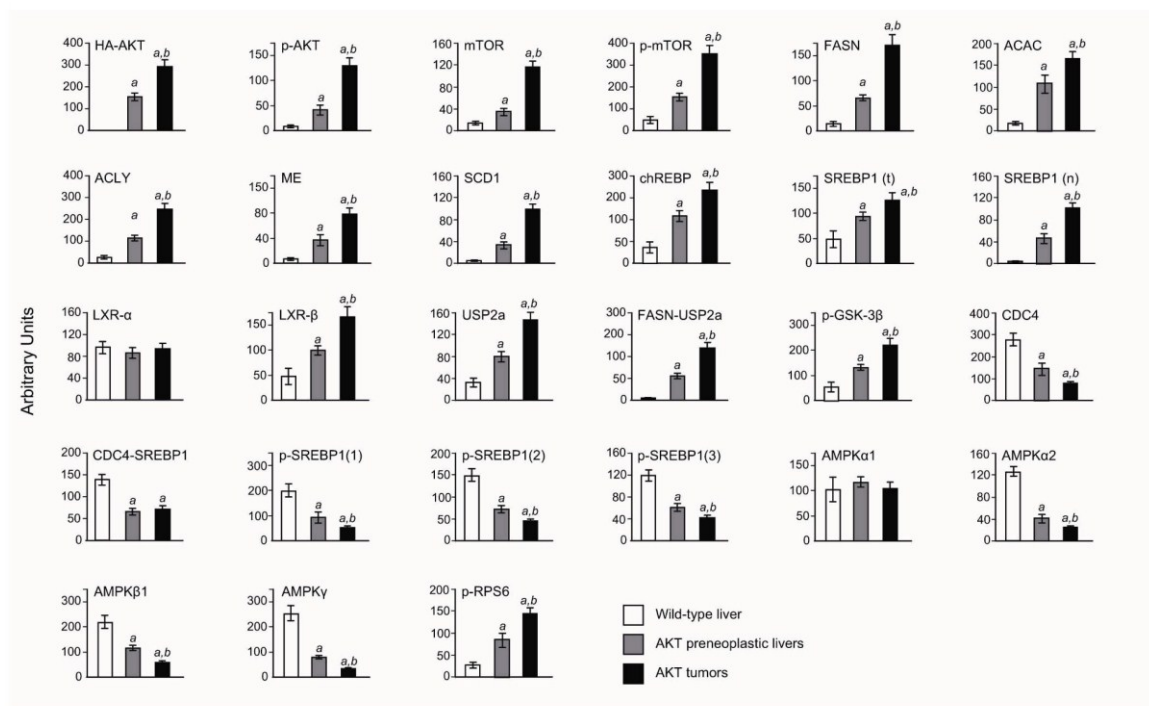


**Figura 12.** Sviluppo di lesioni colangiocellulari in fegati iniettati con AKT. (A, B) Esempi di rari tumori colangiocellulari puri, che si sono sviluppati tra le numerose lesioni epatocellulari (notare gli epatociti preneoplastici a cellula chiare circostanti). Alcuni dei tumori, come quelli mostrati in (A) sono diventati microcistici. (C, D) Aree differenti dello stesso tumore, un HCC con aree predominanti di HCC convenzionale ben differenziato (C) e aree di differenziazione duttale/pseudoghiandolare (D). Nonostante anche i tumori colangiocellulari puri o le lesioni simili a tumore mostravano iperespressione di AKT (E,F), il fenotipo lipogenico, i.e. l'espressione di FASN, ACLY, SCD1, e ACAC, non era mai osservato nelle cellule costituenti le pseudoghiandole, in contrasto con gli epatociti preneoplastici e neoplastici ricchi di lipidi circostanti [in (G), ACAC come esempio di enzima lipogenico]. A-E, colorazione con ematossilina e eosina (EE); F, analisi immunohistochimica per AKT; G, analisi immunohistochimica per ACAC.

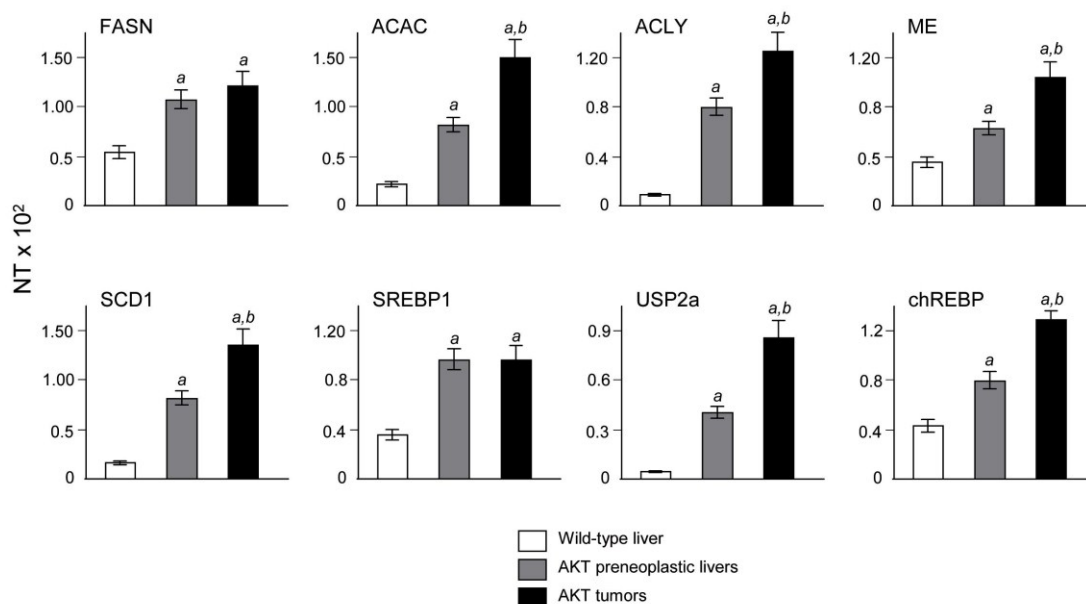
Il lato inferiore del pannello rappresenta 1 mm (in A, B), 0.5 mm (in C, D) e 0.4 mm (in E-G)



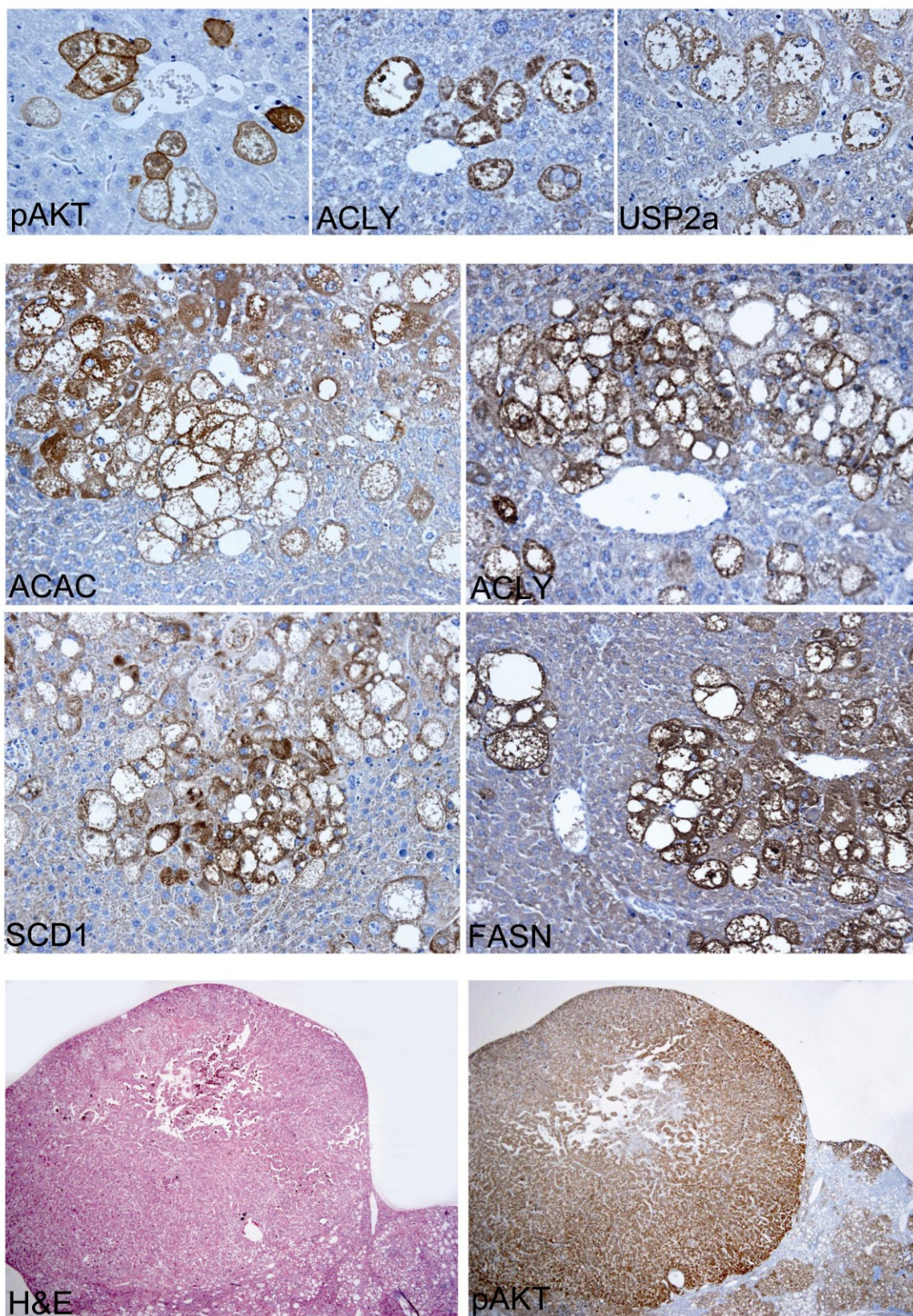
**Figura 13.** Attivazione delle proteine lipogeniche nelle lesioni epatiche da topi iniettati con AKT miristilata Akt. (A) Analisi tramite immunoblotting di AKT, mTOR e i loro effettori lipogenici a valle in fegati wild type non iniettati e fegati preneoplastici e tumori (adenomi e carcinomi epatocellulari) da topi iniettati con AKT. (B) Espressione di USP2a, CDC4, GSK-3 $\beta$  fosforilata/inattivata e SREBP1, e proteine AMPK in lesioni epatiche da topi iniettati con AKT. Sono stati utilizzati dai sei agli otto campioni per ogni gruppo, e sono mostrate immagini rappresentative. La  $\beta$ -actina è stata usata come controllo. Abbreviazioni: IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitazione.



**Figura 14.** Analisi in chemiluminescenza di immunoblotting e immunoprecipitazione su AKT, mTOR, e proteine lipogeniche in fegati wild-type, fegati preneoplastici e tumori (adenomi e carcinomi epatocellulari) di topi iniettati con AKT. Sono stati analizzati dai sei agli otto campioni per ogni gruppo. Le densità ottiche sono state normalizzate ai valori della  $\beta$ -Actina ed espressi in unità arbitrarie. Ogni barra rappresenta media  $\pm$  SD. Test di Tukey-Kramer:  $P < 0.0001$  *a*, vs. Fegato wild-type; *b* vs. Lesioni epatiche preneoplastiche.



**Figura 15.** Rivelazione tramite real-time RT-PCR quantitativa di FASN, ACAC, ACLY, ME, SCD1, SREBP1, USP2a, e chREBP in fegati wild-type, e fegati preneoplastici e tumori (adenomi e carcinomi epatocellulari) da topi iniettati con AKT. Sono state effettuate misurazioni accoppiate di geni target e di riferimento e il numero target (NT) =  $2^{-\Delta Ct}$ , dove il valore  $\Delta Ct$  di ogni campione era calcolato sottraendo il valore medio Ct di target gene dal valore medio Ct di determinazioni effettuate in triplicato del gene ribonucleic acid ribosomal 18S (*RNR-18*, controllo interno). Sono stati analizzati dai sei agli otto campioni per ogni gruppo. Ogni barra rappresenta media  $\pm$ DS. Test di Tukey-Kramer:  $P < 0.0001$  *a*, vs. Fegato wild-type; *b* vs. Lesioni epatiche preneoplastiche.



**Figura 16.** Attivazione di AKT, USP2a, ed elementi della via lipogenica in topi che iperesprimono AKT miristilata, come mostrato dalla colorazione immunohistochimica. La prima riga mostra iperespressione di AKT fosforilata/attivata, ACLY (come esempio di enzima lipogenico) e USP2a in epatociti preneoplastici, 3 giorni dopo l'iniezione. Il blocco centrale di quattro pannelli mostra l'iperespressione combinata di tutti i 4 enzimi chiave del fenotipo lipogenico (ACAC, ACLY, SCD1 e FASN) in epatociti preneoplastici, 12 settimane dopo l'iniezione. Nei tumori epatocellulari sono stati ottenuti gli stessi risultati. Nell'ultima riga, è mostrato un esempio di un grande adenoma epatocellulare e tessuto epatico circostante misto normale e preneoplastico (sezioni seriali) che illustra l'iperespressione di AKT. Notare la forte immunoreattività nel tumore quando comparata alle cellule preneoplastiche adiacenti (28 settimane dopo l'iniezione). Il bordo inferiore del pannello rappresenta 0.25 mm nella riga superiore, 0.5 mm nel blocco mediano, e 5 mm nell'ultima riga.

**Tabella 1.** Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da HCC

| Variabili   | Caratteristiche   |                   |
|---|-------------------|-------------------|
|   | HCCB <sup>a</sup> | HCCP <sup>b</sup> |
| No. di Pazienti   | 32                | 36                |
| Maschi  | 29                | 32                |
| Femmine   | 3                 | 4                 |
| Età (Media ± DS)  | 58.2<br>± 12.8    | 56.6<br>± 14.2    |
| Eziologia   |                   |                   |
| HBV   | 14                | 14                |
| HCV   | 11                | 12                |
| Etanolo   | 6                 | 8                 |
| Morbo diWilson  | 0                 | 1                 |
| Emocromatosi  | 1                 | 1                 |
| Cirrosi   |                   |                   |
| +   | 20                | 24                |
| -   | 12                | 14                |
| Dimensione del Tumore   |                   |                   |
| > 5 cm  | 18                | 24                |
| < 5 cm  | 14                | 12                |
| Grado di Edmondson e Steiner                                  |                   |                   |
| I   | 4                 | 4                 |
| II  | 10                | 6                 |
| III   | 10                | 14                |
| IV  | 8                 | 12                |
| Secrezione di alfa-fetoproteina                               |                   |                   |
| > 300 ng/ml of serum  | 11                | 14                |
| < 300 ng/ml of serum  | 21                | 22                |
| Sopravvivenza dopo resezione parziale<br>del fegato<br>(mesi) | 96.4              | 20.2              |
| Media ± DS <sup>f</sup>                                       | ± 36.55           | ± 9.50            |

<sup>a</sup>HCCB, HCC with better/longer survival

<sup>b</sup>HCCP, HCC with poorer/shorter survival

**Tabella 2.** Lista degli anticorpi primari usati per analisi di immunoblotting e immunoprecipitazione

| <b>Protein</b>  | <b>Antibody</b>   | <b>Epitope mapping</b>                               |
|-----------------|-------------------|--|
| Phospho-AKT     | Rabbit monoclonal | Serine 473 <sup>†</sup>                              |
| mTOR            | Rabbit monoclonal | Residues surrounding Serine 2481 <sup>†</sup>        |
| Phospho-mTOR    | Rabbit monoclonal | Serine 2448 <sup>†</sup>                             |
| FASN            | Mouse monoclonal  | NH <sub>2</sub> terminus <sup>††</sup>               |
| ACAC            | Rabbit polyclonal | Residues surrounding Serine 523 <sup>†</sup>         |
| ACLY            | Rabbit polyclonal | COOH terminus <sup>†</sup>                           |
| ME              | Mouse monoclonal  | Full length <sup>*</sup>                             |
| SCD1            | Rabbit polyclonal | Full length <sup>*</sup>                             |
| LXR- $\alpha$   | Goat polyclonal   | NH <sub>2</sub> terminus <sup>*</sup>                |
| LXR- $\beta$    | Goat polyclonal   | Full length <sup>†</sup>                             |
| chREBP          | Rabbit polyclonal | COOH terminus <sup>#</sup>                           |
| SREBP1          | Rabbit polyclonal | Internal region <sup>*</sup>                         |
| SREBP1          | Mouse monoclonal  | Internal region <sup>*</sup>                         |
| MAGL            | Rabbit polyclonal | Full length <sup>**</sup>                            |
| USP2a           | Rabbit polyclonal | COOH terminus <sup>#</sup>                           |
| HA-Tag          | Mouse monoclonal  | HA-Tag <sup>†</sup>                                  |
| CDC4            | Rabbit polyclonal | COOH terminus <sup>†</sup>                           |
| AMPK $\alpha$ 1 | Goat polyclonal   | Internal region <sup>*</sup>                         |
| AMPK $\alpha$ 2 | Goat polyclonal   | Internal region <sup>*</sup>                         |
| AMPK $\beta$ 1  | Rabbit polyclonal | NH <sub>2</sub> terminus <sup>*</sup>                |
| AMPK $\gamma$   | Goat polyclonal   | Internal region <sup>*</sup>                         |
| Raptor          | Mouse monoclonal  | Full length <sup>*</sup>                             |
| Rictor          | Rabbit polyclonal | NH <sub>2</sub> terminus <sup>*</sup>                |
| p-RPS6          | Rabbit monoclonal | Residues surrounding Serine 235 and 236 <sup>†</sup> |
| $\beta$ -ACTIN  | Rabbit polyclonal | COOH terminus <sup>*</sup>                           |

<sup>†</sup> Fornito da Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA).

<sup>††</sup> Fornito da BD Biosciences (San Diego, CA).

<sup>†††</sup> Fornito da Atlas Antibodies AB (Stockholm, Sweden).

\* Fornito da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

\*\* Fornito da Abcam (Cambridge, MA).

\*\* Fornito da Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL)

# Fornito da Abgent (San Diego, CA).

## Fornito da Invitrogen (Carlsbad, CA).



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Bruix J, Sherman M, et al: **Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference.** European association for the study of the liver. *J Hepatol* 2001; 35(3):421
2. Hashem B, El Serag: **Hepatocellular Carcinoma: an Epidemiologic view.** *J Clin Gastroenterol* 2002;35(suppl 2):S72-S78
3. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS: **Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis B virus: a prospective study of 22,700 men in Taiwan.** *Lancet* 1981;2:1129-1133
4. Beasley RP: **Hepatitis B virus: the major etiology of hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1988; 61:1942-56)
5. Bosch, F.X., Ribes, J. & Borràs, J.: **Epidemiology of primary liver cancer.** *Semin. Liver Dis.* 1999;19, 271–285
6. Sherman M. **Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma.** *Oncology* 2010;78 (suppl 1):7-10
7. Pang R.W.C., Poon R.T.P.: **From Molecular Biology to Targeted Therapies for Hepatocellular Carcinoma: The Future Is Now.** *Oncology* 2007;72(suppl 1):30–44
8. Theise ND, Park YN, Kojiro M: **Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis.** *Clin Liver Dis* 2002; 6: 497–512.

9. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS: **A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells.** *Nat Med* 2006; 12: 410–416.
10. Wicha MS, Liu S, Dontu G: **Cancer stem cells: an old idea- a paradigm shift.** *Cancer Res* 2006;66:1883-1890;discussion 95-96
11. Villanueva A., Newell P., Ckang DY., Friedman SL., Llovet JM.: **Genomics and signaling pathways in Hepatocellular carcinoma.** *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76.
12. Neuveut C., Wei Y., Buendia MA.: **Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis.** *Journal of Hepatology* 2010; vol. 52 j 594–604
13. Minguez B., Tovar V., Chiang D., Villanueva A., Llovet JM.: **Pathogenesis of Hepatocellular carcinoma and molecular therapies.** *Current Opinion in Gastroenterology* 2009,25:186-194
14. Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, et al. **Mutational spectrum of beta catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas.** *Oncogene* 2002; 21:4863–4871
15. Ben Ze'ev A., Geiger B.: **Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer.** *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:629-639

16. Huber AH, Weis WI. **The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin.** *Cell* 2001;105:391–402
17. Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. **Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase.** *Biochim Biophys Acta* 2004;1691:1–15
18. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, et al. **Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas.** *Oncogene* 2007; 26:774–780.
19. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, et al. **Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC.** *Hepatology* 2006;43:515–524
20. Merle P, de la Monte S, Kim M, et al. **Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2004;127:1110–1122
21. Lees C, Howie S, Sartor RB, Satsangi J. **The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease.** *Gastroenterology* 2005;129:1696–1710
22. Saqui-Salces M., Merchant JL.: **Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 (2010) 786–795

23. Huang S, He J, Zhang X, et al. **Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas.** *Carcinogenesis*. 2006;27:1334–1340
24. Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, et al. **Dysregulation of the hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis.** *Carcinogenesis* 2006;27:748–757
25. Hwang YH, Choi JY, Kim S, Chung ES, Kim T, Koh SS et al. **Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.** *Hepatol Res* 2004;29: 113–121.
26. Schuierer MM, Bataille F, Weiss TS, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. **Raf kinase inhibitor protein is downregulated in hepatocellular carcinoma.** *Oncol Rep* 2006;16: 451–456.
27. Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, Koga H, Nakamura K, Tokunaga Y et al. **Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors.** *Oncogene* 2006;25: 6056–6066.
28. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K et al. **Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection.** *J Hepatol* 2008;48: 83–90.

- 29.Y, Takeda T, Higashiyama S, Sakon M, Wakasa KI, Tsujimoto M et al.  
**Expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study.**  
*Oncol Rep* 2001;8: 903–907.
- 30.Whittaker S., Marais R., Zhu AX., **The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma.**  
*Oncogene* 2010; 29, 4989–5005
- 31.Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. **Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts.** *Trends Biochem Sci* 2004;29:233-42
- 32.Franke TF. **PI3K/Akt: getting it right matters.** *Oncogene* 2008;27:6473-88
- 33.Martelli AM., Evangelisti C., Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L., McCubrey JA.: **Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia.** *Expert Opin. Investig. Drugs* 2009;18(9):1333-1349
- 34.Bozulic L, Hemmings BA.: **PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation.** *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:256-61
- 35.Memmott RM, Dennis PA.: **Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer.** *Cell Signal* 2009;21:656-64

36. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN.: **TOR signaling in growth and metabolism.** *Cell* 2006;124:471-84
37. Dunlop EA, Tee AR.: **Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms.** *Cell Signal* 2009;21:827-35
38. Shi Y, Yan H, Frost P, et al.: **Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade.** *Mol Cancer Ther* 2005;4:1533-40
39. Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C, et al.: **Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition.** *Mol Cancer Ther* 2009;8:742-53
40. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, et al.: **Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer.** *J Clin Invest* 2008;118:3065-74
41. Chan S. **Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer.** *Br J Cancer* 2004;91:1420–1424

42. Chen YL, Law PY, Loh HH.: **Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy.** *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005;5: 575–589.
43. Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A: **An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis.** *Biochem Pharmacol* 2004;68: 1003–1015.
44. Yeh YC, Tsai JF, Chuang LY, Yeh HW, Tsai JH, Florine DL et al: **Elevation of transforming growth factor alpha and its relationship to the epidermal growth factor and alpha-fetoprotein levels in patients with hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 1987;47: 896–901.
45. Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW et al.: **Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 2003;97:1929–1940.
46. Feitelson MA, Pan J, Lian Z.: **Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy.** *Surg Clin North Am* 2004;84:339–354.

47. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW et al.: **PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas.** *Oncogene* 2005;24: 1477–1480.
48. Greer EL, Brunet A.: **FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.** *Oncogene* 2005;24: 7410–7425.
49. Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J.: **New therapies for hepatocellular carcinoma.** *Oncogene* 2006;25: 3866–3884)
50. Roberts LR, Gores GJ.: **Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets.** *Semin Liver Dis* 2005;25: 212–225)
51. Warburg, O.: **On the origin of cancer cells.** *Science* 1956;123, 309–314
52. Averous, J. & Proud, C. G.: **When translation meets transformation: the mTOR story.** *Oncogene* 2006;25, 6423–6435
53. Voeller, D., Rahman, L. & Zajac-Kaye, M.: **Elevated levels of thymidylate synthase linked to neoplastic transformation of mammalian cells.** *Cell Cycle* 3, 2004;1005–1007
54. Kuhajda, F. P.: **Fatty-acid Synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology.** *Nutrition* 2000;16, 202–208
55. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV.: **RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene**



- attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2003;63:3799–3804.
56. Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP.: **Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells.** *Cancer Res* 2003;63:7330–7337
57. Yang YA, Han WF, Morin PJ, Chrest FJ, Pizer ES.: **Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3- kinase.** *Exp Cell Res* 2002;279:80–90
58. Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV.: **Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2002;62:642–646.
59. Van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G, Swinnen JV.: **Highlevel expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB.** *J Pathol* 2005;206:214–219
60. Bauer, D. E. et al.: **ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation.** *Oncogene* 2005;24, 6314–6322

- 61.Hatzivassiliou, G. et al.: **ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth.** *Cancer Cell* 2005;8, 311–321
- 62.Brusselmans, K. et al.: **RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells.** *Cancer Res.* 2005;65, 6719–6725
- 63.Chajès, V. et al. : **Acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  is essential to breast cancer cell survival.** *Cancer Res.* 2006;66, 5287–5294
- 64.Budker V., Zhang G., Knechtle S., et al.: **Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes.** *Gene Ther* 1996; 3:593-98
- 65.Zhang G., Vargo D., Budker V et al.: **Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers.** *Hum Gene Ther* 1997; 8:1763-72
- 66.Zhang G, Budker V, Wolff JA.: **High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA.** *Hum Gene Ther* 1999;10: 1735–1737
- 67.Liu F, Song Y, Liu D.: **Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA.** *Gene Ther* 1999;6: 1258–1266.

68. Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ et al.: **High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection.** *J Gene Med* 2002;4: 333–341.)
69. Suda T., Liu D.: **Hydrodynamic gene delivery: its principles and application.** *Mol Ther.* 2007;15: 2063-9
70. Khorsandi SE., Bachellier P., Weber JC., et al.: **Minimally invasive and selective Hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human.** *Cancer Gene Ther* 2008; 15:225-230
71. Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E.: **Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume.** *Gene Ther* 2006; 13:1969-1702
72. Budker VG, Budker T, Zhang G, Subbotin VM, Loomis A, Wolff JA.: **Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process.** *J Gene Med* 2000;2: 874–888.
73. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ et al.: **Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery.** *Gene Ther* 2004;11: 675–682
74. Sawyer GJ, Relat M, Davenport M, et al. : **Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application.** *Current gene therapy* 2009, 9, 128-135)

- 75.Liu F, Song Y, Liu D.: **Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA.** *Gene Ther* 1999;6: 1258–1266.
- 76.Bruix J, Boix L, Sala M, et al.: **Focus on hepatocellular carcinoma.** *Cancer Cell* 2004;5:215-219.
- 77.Thorgeirsson SS, Grisham JW.: **Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.** *Nat Genet* 2002;31:339-346.
- 78.Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL.: **Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases.** *Eur Heart J* 2008;29:2959-2971
- 79.Kuhajda FP.: **Fatty-acid Synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology.** *Nutrition* 2000;16:202–208.
- 80.Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G.: **Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:358–365.
- 81.Menendez JA, Lupu R.: **Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2007; 7:763–777.
- 82.Flowers MT, Ntambi JM.: **Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism.** *Curr Opin Lipidol* 2008;19:248-256.
- 83.Murthy S, Tong H, Hohl RJ.: **Regulation of fatty acid synthesis by farnesyl pyrophosphate.** *J Biol Chem* 2005;280:41793-41804.

84. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, et al.: **Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;15597-15602.
85. Alli PM, Pinn ML, Jaffee EM, et al.: **Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice.** *Oncogene* 2005;24:39-46.
86. Yahagi N, Shimano H, Hasegawa K, et al.: **Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma.** *Eur J Cancer* 2005;41:1316-1322.
87. Yamashita T, Honda M, Takatori H, et al.: **Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.** *J Hepatol* 2009;50:100-110.
88. Gao Y, Lin LP, Zhu CH, et al.: **Growth arrest induced by C75, A fatty acid synthase inhibitor, was partially modulated by p38 MAPK but not by p53 in human hepatocellular carcinoma.** *Cancer Biol Ther* 2006;5:978-985.
89. Lee JS, Chu IS, Heo J, et al.: **Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling.** *Hepatology* 2004;40:667-676.

90. Lee SA, Ho C, Roy R, et al.: **Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer.** *Hepatology* 2008;47:1200-1210.
91. Frith CH, Ward JM, Turusov VS.: **Tumours of the liver.** *IARC Sci Publ* 1994;111:223-269.
92. Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, et al.: **Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7).** *Cell Metab* 2005;1:379-391.
93. Pizer ES, Thupari J, Han WF, et al.: **Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts.** *Cancer Res* 2000;60:213-218.
94. Nomura DK, Long JZ, Niessen S, et al.: **Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis.** *Cell* 2010;140:49-61.
95. Kotani K, Ogawa W, Hino Y, et al.: **Dominant negative forms of Akt (protein kinase B) and atypical protein kinase C lambda do not prevent insulin inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription.** *J Biol Chem* 1999;274:21305-21312.

96. Xu CR, Lee S, Ho C, et al.: **Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis.** *Mol Cancer Res* 2009;7:1937-1945.
97. Na TY, Shin YK, Roh KJ, et al.: **Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2009;49:1122-1131.
98. Oem JK, Jackel-Cram C, Li YP, et al.: **Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2.** *J Gen Virol* 2008;89:1225-1230.
99. Yang W, Hood BL, Chadwick SL, et al.: **Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production.** *Hepatology* 2008;48:1396-1403.
100. Yin HQ, Kim M, Kim JH, et al.: **Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:225-233.
101. Evert M, Schneider-Stock R, Dombrowski F.: **Overexpression of fatty acid synthase in chemically and hormonally induced hepatocarcinogenesis of the rat.** *Lab Invest* 2005;85:99-108.

102. El-Serag HB, Hampel H, Javadi, F.: **The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:369–380.
103. Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, et al.: **PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP.** *Oncogene* 2005;24:6465-6481.
104. Shan J, Zhao W, Gu W.: **Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation.** *Mol Cell* 2009;36:469-476.
105. Stevenson LF, Sparks A, Allende-Vega N, et al.: **The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2.** *EMBO J* 2007;26:976-986.
106. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al.: **Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas.** *J Clin Invest* 2004;113:1774-1783.
107. Stiles B, Wang Y, Stahl A, et al.: **Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2082-2087.
108. Ladu S, Calvisi DF, Conner EA, et al. : **E2F1 inhibits c-Myc-driven apoptosis via PIK3CA/Akt/mTOR and COX-2 in a mouse model of human liver cancer.** *Gastroenterology* 2008;135:1322-1332.