



A.D. MDLXII

## **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI**

---

**-SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE-**

**Direttore: Prof. Eusebio Tolu**

**Indirizzo: Epidemiologia molecolare dei tumori**

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**Sezione di Patologia Sperimentale e Oncologia**

**(Responsabile: Prof.ssa Rosa Maria Pascale)**

### **Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi**

**Tutore**

*Chiar.ma Prof.ssa Maria Maddalena Simile*

**Relatore:**

*Chiar.ma Prof.ssa Rosa Maria Pascale*

**Tesi di Dottorato:**

*Dott.ssa Gavinella Latte*

*Anno Accademico 2011-2012*

*A chi ogni giorno crede in me  
e mi sostiene.*

*Non ci può essere morale scientifica,  
ma non ci può nemmeno essere scienza immorale.*

*Henri Poincaré*





<b>INDICE GENERALE</b> .....	pg. 6
<b>ABBREVIAZIONI</b> .....	pg. 8
<b>ABSTRACT</b> .....	pg. 9
 <b><u>SEZIONE COMPILATIVA</u></b>	
<b>1. INTRODUZIONE</b>	
1.1 Carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari alla base del suo sviluppo .....	pg. 11
1.2 Analisi delle lesioni molecolari .....	pg. 17
1.3 Epatocarcinoma ed epigenetica .....	pg. 23
1.4 SAM e metilazione del DNA .....	pg. 31
1.5 Le sequenze ARE e la regolazione post trascrizionale .....	pg. 36
1.6 Modelli sperimentali di epatocancerogenesi su roditori .....	pg. 41
 <b><u>SEZIONE SPERIMENTALE</u></b>	
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	
2.1 Osservazioni generali .....	pg. 47
2.2 Scopo della ricerca .....	pg. 49
 <b>3. MATERIALI</b>	
3.1 Animali e trattamenti .....	pg. 50
3.2 Campioni umani .....	pg. 53
3.3 Linee cellulari .....	pg. 54
 <b>4. METODI</b>	
4.1. Saggio SAM-SAO .....	pg. 55
4.2. Saggio di metilazione globale del DNA .....	pg. 55
4.3. Southern Blot .....	pg. 55

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

4.4. COBRA (Analisi combinata di bisolfito e di restrizione) .....	pg. 56
4.5. PCR Metilazione specifica .....	pg. 56
4.6. ERMA (Saggio di metilazione enzimatica specifica).....	pg. 57
4.7. MEDIP (Saggio di metilazione di DNA immunoprecipitato) ..	pg. 57
4.8. CHIP (Saggio di immunoprecipitazione della cromatina) .....	pg. 58
4.9. RIP (Saggio di immunoprecipitazione del RNA) .....	pg. 59
4.10. Western Blot .....	pg. 60
4.11. RAPD (Random amplified polymorphic DNA) .....	pg. 61
4.12. Analisi statistica.....	pg. 61

## **5. RISULTATI**

5.1. Controllo genetico dell'espressione del promotore di Mat1A e Mat2A.....	pg. 62
5.2. Metilazione del promotore di Mat1A e Mat2A .....	pg. 64
5.3. Espressione proteica di AUF1 e HuR legate all'mRNA di Mat1A e Mat2A .....	pg. 70
5.4. L'attività di MATI/III e la correlazione con parametri diagnostici.....	pg. 74
5.5. Effetti dell'iperpressione di Mat1A nei CE umani e linee cellulari.....	pg. 78

## **6. CONCLUSIONI E DISCUSSIONE .....**

## **7. BIBLIOGRAFIA .....**

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

## **ABBREVIAZIONI**

<b>AAF</b>	Acetilamminofluorene
<b>APC</b>	Poliposi adenomatosi coli
<b>BN</b>	Brown Norway
<b>CCL4</b>	Tetracloruro di Carbonio
<b>CE</b>	Epatocarcinoma
<b>COX</b>	Ciclo ossigenasi 2
<b>DENA</b>	Dietilnitrosamina
<b>DNMT</b>	DNA Metiltrasferasi
<b>F344</b>	Fischer 344
<b>FEA</b>	Foci di epatociti alterati
<b>GST7-7</b>	Glutathione S-Transferasi 7-7
<b>HAC</b>	Istone acetiltrasferasi
<b>HBV</b>	Virus dell'epatite B
<b>HCV</b>	Virus dell'epatite C
<b>IGFR2</b>	Insulin-like Growth Factor Receptor
<b>MAT</b>	Metionina AdenosilTrasferasi
<b>PH</b>	Epatectomia parziale
<b>RB</b>	Retinoblastoma
<b>SAM</b>	S-AdenosilMetionina
<b>SAO</b>	S-AdenosilOmocisteina

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



## **ABSTRACT**

**Aim:** Mat1A and Mat2A genes encode the two methionine adenosyltransferase iso-enzymes which catalyze SAM biosynthesis. Low SAM, the product of MAT genes, content favors HCC development in rodents and humans. Overall DNA hypomethylation, associated with promoter hypermethylation and inactivation of tumor suppressor genes, occurs during liver carcinogenesis (HCC).

These observations suggest the implication of epigenetic regulation of MAT isozymes expression in HCC development. We investigated the prognostic role of *MAT1A:MAT2A* ratio, and the regulation of *MAT1A* and *MAT2A* expression through the methylation status of promoter and mRNA stability during progression of hepatocarcinogenesis.

**Methods:** We performed Mat1A and Mat2A Promoter Methylation, Quantitative Real-Time Reverse Trascrption, Chromatin Immunoprecipitation assay, RNA protein interaction, Western Blot Analysis in rat and humans samples.

**Results:** Our results show a marked decrease of Mat1A expression and MATI/III activity, and an increase in Mat2A expression and MATII activity in DN and HCC of F344 rats, and in samples human SLP and HCCP compared with normal liver, whereas low/no changes in DN and HCC of resistents BN rats and in human SLB and HCCB compared with normal liver.

These results have been associated with CCGG methylation *Mat1A* of promoter, and CCGG hypomethylation of *Mat2A* promoter.

A rise in AUF1 and HuR protein levels and of their interaction with *Mat1A* and *Mat2A* mRNAs, occurred in F344 rat and human HCC, respectively. AUF1/*Mat1A* and HuR/*Mat2A* interactions increased in BN HCC and in surrounding tissue, compared to F344 lesions.

**Conclusion:** AUF1-*Mat1A*, Hur-*Mat2A* and promoter methylation of *MAT1A* and *MAT2A* genes are functionally controlled by cancer modifiers. Our data indicate, for the first time, a posttranscriptional regulation of *MAT1A* and *MAT2A* by AUF1 and HuR in HCC. We have demonstrated that a low *MAT1A:MAT2A* ratio is a prognostic marker that contributes to determine a phenotype susceptible to HCC and patients survival.

## **SEZIONE COMPILATIVA**

### **1. INTRODUZIONE**

#### **1.1. Carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari alla base del suo sviluppo.**

Il carcinoma epatocellulare (CE) è il più comune tipo di tumore epatico, rappresenta l'83% di tutti i tumori epatici<sup>1</sup>. Il carcinoma epatocellulare è il sesto tumore umano più comune al mondo con un'incidenza di 62.600 nuovi casi ed una mortalità di 59.800 casi ogni anno. La sua incidenza risulta variabile nelle varie regioni del mondo: questo è dovuto in parte a fattori razziali e/o genetici e in una certa misura a fattori ambientali, quali la distribuzione dell'infezione da virus dell'epatite B e C, a fattori alimentari, in particolare modo l'assunzione di cibi contaminati da aflatossina B1<sup>2</sup>. Dal punto di vista geografico, l'incidenza più elevata è stata riscontrata nell'Africa sub-Sahariana e nell'Asia dell'est, dove le infezioni da epatite B e C sono endemiche, ed in regioni dove si consumano cibi contaminati dal fungo aflatossina B1<sup>3</sup>. Nel 75-80% dei casi infatti, il CE insorge nel contesto di un'infezione cronica o da virus dell'epatite B (50-55%) o dell'epatite C (25-30%). Così, in Africa e Asia, aree a forte endemia per il virus HBV, questo risulta essere responsabile di circa il 60% dei casi di CE, mentre nei Paesi Occidentali ed in Giappone, grazie alle campagne di vaccinazione iniziate nei primi anni 80, che hanno portato ad una drastica riduzione delle infezioni da HBV, oggi solo il 20% degli CE è attribuibile ad un'infezione cronica da questo virus B<sup>2</sup>.

Comportamento diametralmente opposto è quello relativo all'infezione da HCV, responsabile di circa il 60% degli CE nei Paesi Occidentali, e di solo il 20% di quelli insorgenti in Africa e in Asia, dove, nonostante la prevalenza di HCV sia maggiore (circa

il 3%), l'endemia da HBV, spesso trasmesso verticalmente, rimane la principale causa responsabile dell'insorgenza di CE.

In Giappone, sebbene la prevalenza di HCV sia simile a quella degli U.S.A., l'incidenza di CE è 8-10 volte maggiore. Questo potrebbe essere dovuto ad una più precoce diffusione dell'HCV in Giappone, avvenuta circa 20-30 anni prima che negli U.S.A., e fa sospettare la previsione di un incremento dell'incidenza del CE in Europa e negli U.S.A. nei prossimi anni<sup>4</sup>.

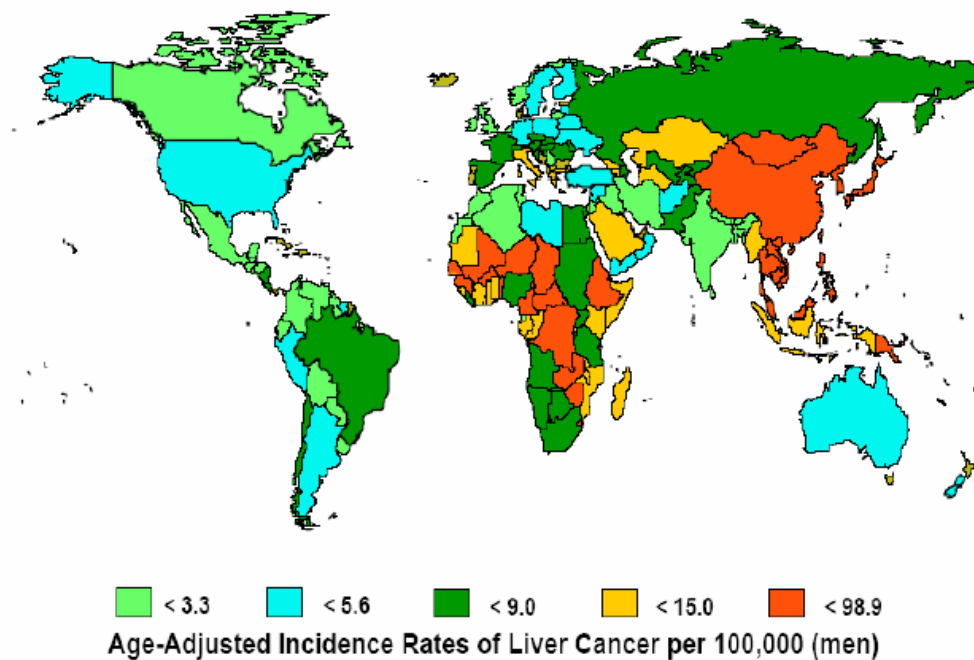
I meccanismi patogenetici alla base dell'insorgenza di CE da HBV e HCV differiscono profondamente. L'HBV, infatti, induce la neoplasia grazie all'instabilità genomica derivante dall'integrazione del virus nel DNA dell'ospite, nessun ruolo oncogenico diretto è stato dimostrato per l'HCV che condurrebbe all'HCC indirettamente, attraverso l'induzione dell'attività necro-infiammatoria epatica con conseguente danno cronico, cicli ripetuti, rigenerazione e necrosi, cirrosi. Per queste ragioni anche il tempo d'insorgenza del CE ed il grado della disfunzione epatica sottostante differiscono profondamente tra i due differenti agenti eziologici.

La trasmissione prevalentemente orizzontale dell'epatite C, attraverso trasfusioni di sangue o l'utilizzo di aghi infetti in pazienti con storia di abuso di droghe, fa sì che pochi pazienti riferiscano una familiarità per epatopatia o CE, mentre è spesso rilevabile una storia di abuso di alcol, vista la frequente associazione tra tossicodipendenza e alcolismo. L'epatite B, invece, specialmente nei Paesi ad elevata endemia, è più frequentemente trasmessa per via verticale alla nascita o acquisita durante la prima infanzia. Questo giustifica l'elevata frequenza di casi di familiarità per epatopatia e per CE. La lunga storia di esposizione al virus predispone ad un'età di insorgenza più bassa e, dato l'effetto

oncogeno diretto del virus, circa il 20% dei pazienti HBV positivi sviluppa CE su un fegato non cirrotico<sup>4</sup>. Questo dato comporta delle implicazioni importanti riguardanti la sorveglianza dei pazienti a rischio di CE che oggi è rivolta solo ai pazienti affetti da cirrosi epatica: sebbene infatti il rischio annuo di sviluppare CE è più basso nei pazienti non cirrotici rispetto ai cirrotici (0.4 vs 2-6.6%). La crescente presenza di immigrati nel nostro Paese, provenienti da Regioni ad alta endemia di HBV, dovrebbe per lo meno far riconsiderare questo aspetto, anche alla luce del fatto, che molti dei CE insorgenti su fegato non cirrotico sono maggiormente suscettibili di trattamenti radicali se diagnosticati in fase precoce, in quanto non associati a ipertensione portale o a ridotta riserva funzionale epatica.

L'epatopatia cronica correlata al consumo di alcol, soprattutto quando associata ed infezione cronica da virus B/C, determina più del 40% dei CE nei Paesi Occidentali e circa il 20% in Giappone. Non è ad oggi noto quale sia la sua responsabilità nei CE che insorgono in Africa ed Asia.

Esistono ulteriori fattori eziologici che possono essere associati allo sviluppo del CE; tra questi hanno particolare importanza l'assunzione di alcool, uso di estrogeni e alcuni cancerogeni naturali presenti nel cibo, oltre ad alcune rare sindromi genetiche (tabella 1).



**Figura 1.** L'incidenza dell'epatocarcinoma nel mondo.

<b>Cirrosi</b>	infezioni croniche da HBV e HCV, consumo di alcool, epatite attiva cronica autoimmune
<b>Assunzione di estrogeni</b>	lungo utilizzo di contraccettivi orali (donne), elevate dosi di steroidi androgeni, diabete di tipo 2
<b>Disordini genetici</b>	emocromatosi, tirosinemia ereditaria, malattie da accumulo di glicogeno (di tipo 1 e 2), deficienza di $\alpha$ -1 antitripsina, malattia di Wilson, porfiria cutanea tarda, galattosemia, aciduria orotica, sindrome colestatica congenita
<b>Agenti ambientali</b>	aflatossine, cicasina, alcaloidi pirrolizidinici, fumo di tabacco, composti N-nitrosilati, cloruro di vinile

**Tabella 1.** Condizioni associate con l'insorgenza del carcinoma epatocellulare.

Dott.ssa Gavinella Latte.

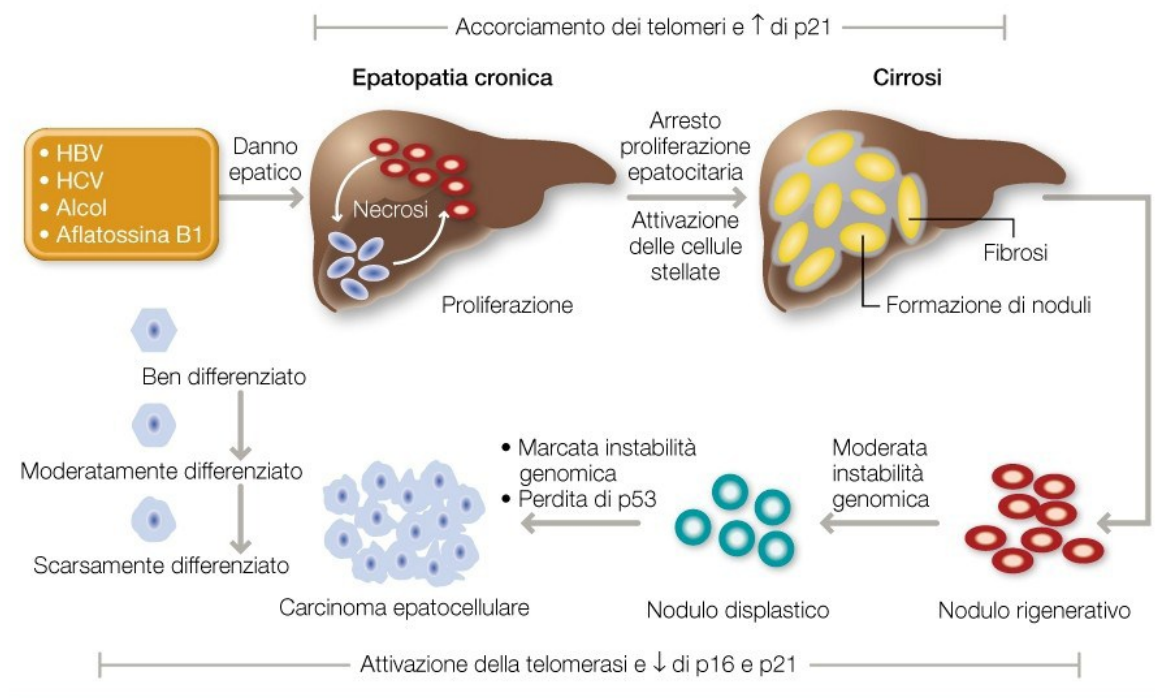
Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

Inoltre anche il sesso può influenzare il rischio di sviluppare CE, visto che i maschi rappresentano una più ampia frazione di tutti i casi <sup>4</sup> con un rapporto di 4:1; si tratta di una neoplasia rara sotto i 40 anni e che nelle popolazioni occidentali a basso rischio si manifesta nelle persone d'età maggiore ai 75 anni. In particolare, in Italia ogni anno si contano 12.000 nuovi casi e circa 5.000 decessi.

Le difficoltà nello studiare la sequenza di eventi precoci che portano allo sviluppo del CE nell'uomo rendono necessario condurre gran parte degli studi su modelli animali. E' ben noto come l'epatite cronica/cirrosi epatica costituisca un terreno fertile per la comparsa di lesioni epatocellulari di tipo displastico e francamente maligno in un processo tipicamente multifasico (fig. 2).



**Figura 2.** Progressione istopatologica e caratteristiche morfologiche dell'epatocarcinogenesi.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

Normalmente le cellule epatiche non sono mitoticamente attive, ma se subiscono una stimolazione alla divisione cellulare, possono accumulare danni indotti da cancerogeni<sup>5</sup>. Diversi fattori eziologici che inducono CE provocano un continuo alternarsi di danno agli epatociti e successiva rigenerazione, portando all'insorgenza di malattie croniche nel fegato<sup>6</sup>. Una crescita incontrollata e veloce aumenta notevolmente le probabilità di danni a livello genetico e diminuisce l'efficienza della riparazione di eventuali danni al DNA, con maggiori possibilità che le anomalie non riparate vengano fissate e quindi trasmesse alle cellule figlie, dando origine a linee di cellule alterate (cloni) che nel tempo possono evolvere a neoplasia (Figura 2).

I noduli iperplastici di epatociti rigeneranti hanno normali caratteristiche istologiche, ma rappresentano un potenziale primo passo nello sviluppo del CE. Queste lesioni acquisendo alterazioni genetiche ed epigenetiche, possono progredire a noduli displastici, lesioni premaligne che hanno anomalie istologiche, inclusa la comparsa di cellule caratterizzate dall'accumulo di glicogeno e lipidi, l'aumento del numero di nuclei per unità di area in una lesione. I noduli displastici possono evolvere ad epatocarcinoma che, oltre a tutte le caratteristiche prima citate, possono avere la capacità di invadere il tessuto fibroso circostante ed i vasi, esplicando le proprie potenzialità metastatiche<sup>7</sup>.

Allo stato attuale le certezze che supportano la predisposizione genetica al carcinoma epatocellulare sono limitate. Si è osservato un piccolo numero di pazienti con poliposi familiare del colon (FAP) che presentavano CE<sup>8</sup>, ed alcune mutazioni germinali del gene p16<sup>INK4A</sup><sup>9</sup> in pazienti con CE. E' interessante notare come i CE non si sviluppino in tutti gli individui a rischio, suggerendo la contemporanea presenza di vari fattori eziologici, associata alla componente genetica.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



Del resto, gruppi familiari con CE sono stati osservati di rado nell'uomo, il che potrebbe suggerire un ruolo minore della predisposizione genetica o, alternativamente, una predisposizione genetica complessa (con più geni coinvolti) per lo sviluppo di questa neoplasia. In quest'ultimo caso si potrebbe ipotizzare l'esistenza nell'uomo di diversi alleli di suscettibilità e di resistenza, i quali possono determinare un rischio elevato o basso a seconda della loro associazione ed interazione nell'ambito del genoma.

## **1.2 Analisi delle lesioni molecolari**

L'analisi delle alterazioni molecolari dei CE umani ha portato all'individuazione di alterazioni genetiche ed epigenetiche. Le più importanti sono rappresentate da: alterazione funzionale dei punti di controllo del ciclo cellulare ed accorciamento telomerico; disregolazione di oncogeni e geni soppressori chiave quali, p53,  $\beta$ -catenina, membri della famiglia recettoriale ErbB, MET e il suo ligando, il fattore di crescita degli epatociti (HGF), p16INK4A, E-caderina e cicloossigenasi 2 (COX-2), perdita di eterozigosi del locus del gene "insulin-like growth factor 2 receptor"(IGFR2); attivazione della via di segnale AKT, etc.

P53 è un gene soppressore della crescita, mutato in circa il 50% dei tumori umani. Agisce come un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, del differenziamento, e nei meccanismi di riparazione del DNA, amplificazione genica, ricombinazione del DNA, segregazione cromosomica e senescenza cellulare. Numerosi studi hanno dimostrato un effetto dello stress ossidativo nella cancerogenesi epatica in presenza di mutazioni di p53. La perdita di p53 determina

lo sviluppo di CE, mentre mutazioni a carico di p53 contribuiscono alla fase di inizio e progressione dei tumori epatici.

La via di segnale Wnt rappresenta un regolatore chiave nello sviluppo e differenziazione dei tumori. La  $\beta$ -catenina è il maggiore effettore della via di segnale Wnt canonica. Quando la cascata Wnt è attiva, le proteine “poliposi adenomatosi coli (APC)” ed “axina” non sono più in grado di legare la  $\beta$ -catenina, la quale in questo modo viene destabilizzata e trasloca dal citoplasma al nucleo dove si associa con i fattori di trascrizione della famiglia Tcf. I fattori di trascrizione Tcf attivano bersagli genici rilevanti nello sviluppo dei tumori come MYC, ciclina D1, COX2 e metalloproteasi della matrice di tipo 7.

Nei CE sono state rilevate mutazioni ed iperespressione nucleare di  $\beta$ -catenina. Queste mutazioni impediscono alla  $\beta$ -catenina di essere fosforilata e quindi ne prevengono la degradazione, determinando l’attivazione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina. E’ stato dimostrato che mutazioni dei geni associati al segnale Wnt/ $\beta$ -catenina contribuiscono allo sviluppo di CE.

La famiglia dei recettori ad attività tirosin cinasica ErbB consiste di quattro membri (ERBB1-ERBB4), i quali sono implicati nello sviluppo di differenti tipi di tumori umani compresi i CE. E’ stato dimostrato che si ha un’iperespressione di ERBB1 (noto anche come EGFR) nel 68%, di ERBB3 nell’84%, di ERBB2 nel 21% e di ERBB4 nel 61% di casi di CE. L’iperespressione di ERBB1 e ERBB3 correla positivamente con un fenotipo più aggressivo che presenta un alto indice di proliferazione, metastasi intraepatica, indifferenziamento e aumento delle dimensioni del tumore<sup>14</sup>.

Evidenze sul coinvolgimento dei recettori ErbB nell'epatocancerogenesi provengono dal modello di topo transgenico per TGF- $\alpha$ , membro della famiglia EGF e ligando dei recettori ErbB<sup>10,11</sup>.

Il segnale del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ) è essenziale per molti processi cellulari, quali crescita, differenziazione cellulare ed apoptosi. Nel fegato, il principale ruolo di TGF- $\beta$ , prodotto dalle cellule stellate non parenchimali, è di limitare la crescita rigenerativa degli epatociti in risposta ad un danno attraverso inibizione della sintesi del DNA ed apoptosi. TGF- $\beta$  ha tre principali isoforme: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, e tre recettori: tipo I (RI), tipo II (RII) e tipo III (RIII). In seguito all'attivazione del complesso recettoriale TGF- $\beta$  R II/TGF- $\beta$  R I (TGF- $\beta$  RII/ TGF- $\beta$  RI) il segnale è trasmesso attraverso le proteine Smad o trasdotto attraverso fosfatidilinositolo 3-chinasi (PIK3), protein fosfatasi 2/cinasi p70S6 (PP2A/p70S6K) e le vie di segnale MAPK. Quando MAPK è legato al complesso TGF- $\beta$  RII viene fosforilato, e a sua volta fosforila Smad2 e Smad3, che forma in seguito un complesso con Smad4. I complessi leganti Smad4 traslocano nel nucleo dove si legano a specifiche sequenze del DNA e agiscono per reprimendo o attivando la trascrizione.

E' stato dimostrato che TGF- $\beta$  è iperespresso nel CE. L'espressione di TGF- $\beta$ 1 nel tessuto di CE è correlata con la prognosi. E' stata dimostrata, infatti, una funzione stimolante la crescita da parte di TGF- $\beta$  durante gli stadi tardivi dello sviluppo del tumore epatico<sup>15</sup>.

La proteina RB, (soppressore tumorale del retinoblastoma) è importante per lo sviluppo di differenti tipi di tumore. Rb viene fosforilata da differenti cinasi, quando defosforilata nelle cellule normali blocca la divisione cellulare e la progressione del ciclo cellulare

agendo da soppressore della crescita. Rb impedisce alle cellule che hanno subito un danno al DNA, di replicarsi bloccando il ciclo cellulare in fase G1 o S. Rb agisce come soppressore della crescita e quando è in uno stato defosforilato blocca la progressione del ciclo cellulare, legandosi ai fattori di trascrizione della famiglia E2F. Prima dell'entrata nella fase S, complessi cinasi ciclina dipendenti (CDK)/ciclina fosforilano Rb.

Quando Rb è nello stato defosforilato, si lega ai fattori di trascrizione E2F. In seguito alla fosforilazione, Rb si dissocia dai complessi con E2F-DP. I fattori di trascrizione E2F liberi possono attivare fattori che attivano il ciclo cellulare, come le ciclina, che determinano la progressione del ciclo cellulare stesso. Quando Rb è mutato, le cellule presentano un ridotto controllo nella progressione del ciclo cellulare e vanno incontro a crescita anomala. La perdita del segnale regolato da Rb è frequente nell'epatocancerogenesi.

E' ormai ampiamente riconosciuto che modificazioni a carico del gene p53 partecipino allo sviluppo di CE. Sono area di ricerca ancora molto attiva quelle che indagano i meccanismi attraverso i quali mutazioni di p53 possano contribuire alla fase d'inizio, progressione o ad entrambe nello sviluppo del CE. Nel modello transgenico per la proteina X del virus dell'epatite B (HBx), l'inattivazione funzionale di p53 da HBx è stata osservata solo nei CE ma non in foci alterati, indicando il coinvolgimento di tale gene nella fase di progressione cioè ormai tardivamente<sup>12</sup>. Nell'uomo l'analisi di CE, sviluppati in seguito ad infezione del virus dell'epatite C (HCV) e di HBV, ha dimostrato una frequenza più elevata di mutazioni in p53 nelle lesioni maligne in stadio avanzato (43%), piuttosto che in noduli rigenerativi precoci (7%)<sup>13</sup>.

Al contrario, nel caso dell'aflatossina B1, frequenti mutazioni del gene p53 sono presenti nelle lesioni iniziali<sup>14</sup>. Sembra plausibile che mutazioni di p53 possano operare sia nelle fasi di inizio che in quelle di progressione nello sviluppo di CE a seconda dei diversi agenti eziologici.

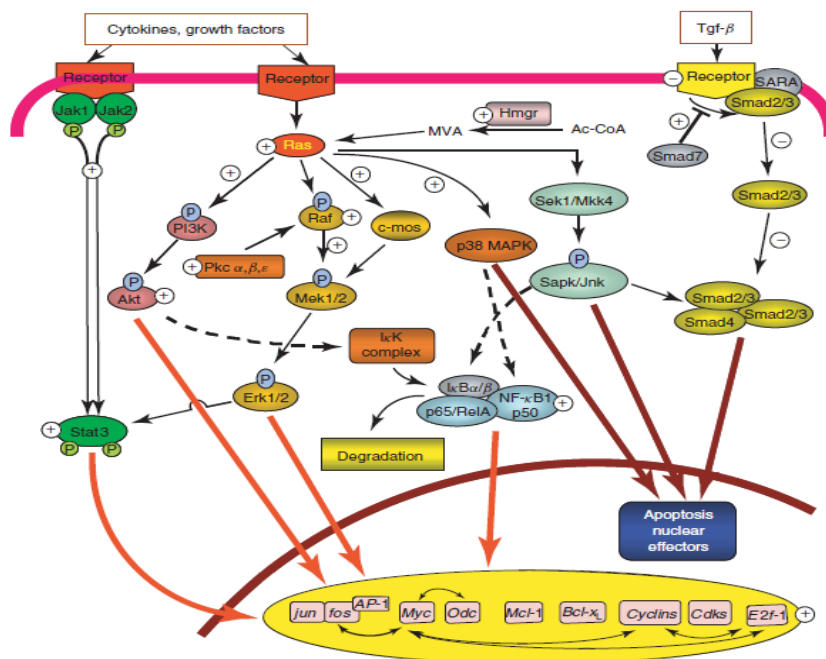
Nell'epatocancerogenesi la via RAS è tra le più studiate ed è coinvolta nel controllo dell'apoptosi, della crescita e della differenziazione cellulare. L'induzione di Ras determina l'attivazione di una serie di effettori a valle ( Raf, Mek 1/2, Erk 1/2 ) con conseguente attivazione trascrizionale di bersagli nucleari quali c-Fos, c-Jun e c-Myc. Nei CE umani Ras risulta iperespresso, tale evento si associa all'inattivazione degli inibitori dei suoi effettori, come l'inattivazione di RKIP (Raf kinase inhibitory protein), gene che inibisce la fosforilazione e quindi l'attivazione di Mek1/2, e DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1), inibitore di Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated Kinase). Tra gli effettori di Ras ci sono anche RASSF1A (Ras associated factor 1) e NORE1A (Novel Ras effector 1) che possono contrastare l'attività di Ras inducendo effetti proapoptotici. Negli epatocarcinomi umani e nei tumori polmonari, pancreatici e del colon-retto, risultano ipermetilati i promotori dei geni di RASSF1A e NORE1A. La perdita dell'espressione degli inibitori di Ras nei CE umani contribuisce ad una incontrollata crescita cellulare<sup>17</sup>.

La via JAK/STAT partecipa alla regolazione delle risposte cellulari alle citochine ed ai fattori di crescita, e riveste un importante ruolo nei processi cellulari di differenziazione, proliferazione e apoptosi<sup>17</sup>.

La trasduzione del segnale generato dall'attività delle citochine e dei fattori di crescita, mediato dalle proteine JAK e STAT, induce una risposta intracellulare, modificando

l'espressione genica. Le proteine STAT 3 e 5, presenti nel citoplasma in forma inattiva, vengono attivate in seguito alla fosforilazione mediata da JAK o dai recettori ad attività tirosin-cinasi dei fattori di crescita. In seguito ad attivazione, STAT 3 e 5 entrano nel nucleo dove agiscono come fattori di trascrizione. Nelle cellule normali, l'attivazione delle proteine STAT è transiente e sotto rigoroso controllo; nei tumori, a causa dell'inattivazione di inibitori specifici di STAT (SOCS 1-3), si verifica una mancata modulazione del segnale che, attivandosi in maniera costitutiva, provoca uno sbilanciamento di fattori antiapoptotici e proapoptotici come Bcl-x, ciclina D1 e D2, Mcl-1 etc<sup>17,18</sup>.

Nel corso dell'epatocancerogenesi risultano alterate anche altre vie di trasduzione del segnale come la via della 3-fosfoinositolo cinasi (PI3K) ed mTOR (PI3K/AKT/mTOR), del fattore di crescita degli epatociti (EGF) e del fattore di transizione mesenchimale-epiteliale, la via Hedgehog e di segnali apoptotici.



**Figura 3.** Principali vie di segnale alterate durante l'epatocancerogenesi.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

### 1.3 Epatocarcinoma ed epigenetica

Il termine epigenetica introdotto per la prima volta da un genetista Conrad Hal Waddington nel 1940, fu usato per descrivere una qualunque attività di regolazione dei geni, tramite processi chimici che non comportino cambiamenti strutturali nel codice del DNA ma possono modificare il fenotipo dell'individuo e/o della progenie. Oggi, epigenetica si riferisce allo studio delle variazioni dell'espressione genica ereditabili, senza variazioni nella sequenza genica. Queste modificazioni ereditabili possono essere conseguenza di varie modificazioni di natura chimica, primo fra tutti la metilazione del DNA caratterizzata dal legame covalente di gruppi  $\text{CH}_3$  nel C5 delle citosine.

La regolazione dell'impacchettamento della cromatina e l'accessibilità del DNA, attraverso la distribuzione spazio-temporale di questi segnali chimici, assicura un'appropriata risposta genomica durante i differenti stadi di sviluppo e tipo di tessuto. Viceversa una deregolazione del pattern epigenetico può portare all'induzione e propagazione di uno stato patologico. Il mantenimento di questi segnali epigenetici attraverso le varie divisioni cellulari assicura un'appropriata regolazione dell'attivazione e repressione genica .

Il segno distintivo del cancro è la deregolazione del profilo di espressione genica e il sovvertimento delle vie di trasduzione.

L'instabilità genomica e le mutazioni offrono alle cellule un vantaggio adattativo e proliferativo che consente la propagazione del danno al DNA favorisca l'insorgenza del tumore. E' ormai evidente che fattori epigenetici, in particolare la metilazione del DNA, possono conferire un addizionale vantaggio selettivo ai tumori.

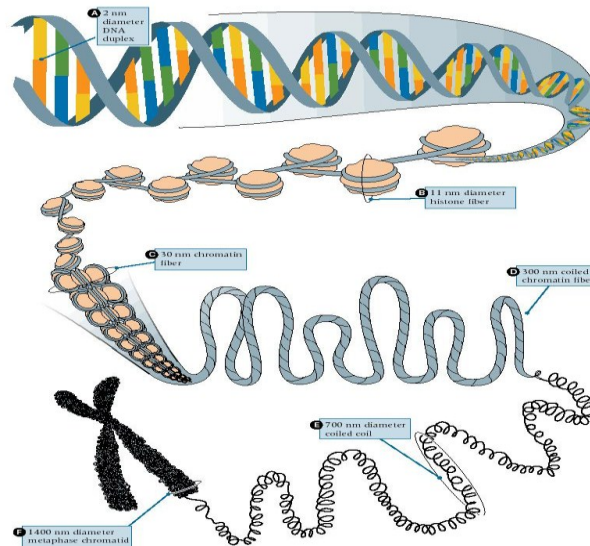
Mentre è abbastanza chiaro come modificazioni genetiche e epigenetiche possano influenzare l'espressione genica, è meno chiaro come questi meccanismi possano influenzarsi tra loro e come una serie di queste modificazioni possano co-evolvere e influenzare l'espressione genica durante la tumorigenesi<sup>27</sup>.

Il DNA nelle cellule non si trova in forma nuda, ma complessato con una serie di proteine, per formare una struttura più articolata e complessa detta cromatina.

Ci sono due classi di proteine che si possono associare con il DNA per formare la cromatina e sono gli istoni e le proteine non istoniche. Gli istoni sono molto abbondanti in tutte le cellule eucariotiche e si calcola che una cellula umana contenga circa 60 milioni di molecole istoniche. Essi contribuiscono alla formazione dei nucleosomi che formano l'unità base della cromatina. Ogni nucleosoma è composto da due coppie degli istoni H2A, H2B, H3, H4 che formano un ottamero intorno al quale si avvolgono 146 basi di DNA per 1,75 giri.

Ogni istone assume una struttura denominata "histone fold" caratterizzata dalla presenza di tre alfa eliche e di una lunga estensione N-terminale che non è strutturata. L'interazione tra il DNA e gli istoni nell'ottamero del nucleosoma avviene attraverso più di 100 legami idrogeno tra la catena principale degli istoni e i gruppi fosfato del DNA, interazioni idrofobiche e ponti salini ai quali contribuiscono le catene laterali di numerosi aminoacidi presenti trovate nelle sequenze degli istoni.





**Figura 4.** Rappresentazione schematica dell'organizzazione del DNA.

Anche se le interazioni tra gli istoni ed il DNA sono soprattutto a carico dei gruppi fosfato del DNA e non sono sequenza-specifiche lo spazio tra due nucleosomi può variare, infatti sequenze ricche di AT si ripiegano facilmente intorno ai nucleosomi di sequenza ricche in GC. Questo spiega alcuni casi di posizionamento molto preciso di nucleosomi su determinate sequenze di DNA, alle quali contribuisce la presenza di proteine adiacenti. La maggioranza delle sequenze di DNA può però interagire in modo variabile con gli istoni senza che ci siano delle regioni preferenzialmente reclutate nel nucleosoma. Le interazioni DNA-istoni nel nucleosoma costituiscono una barriera all'accesso di altre proteine al DNA.

Esistono enzimi che utilizzano l'idrolisi dell'ATP per alterare temporaneamente la struttura della cromatina consentendo così l'accesso ai fattori di trascrizione o ad enzimi di riparazione che difficilmente potrebbero raggiungere le sequenze bersaglio.

Queste ATPasi appartengono a due famiglie dette SWI/SNF e ISW e sono attivamente coinvolte nella regolazione dell'espressione genica.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

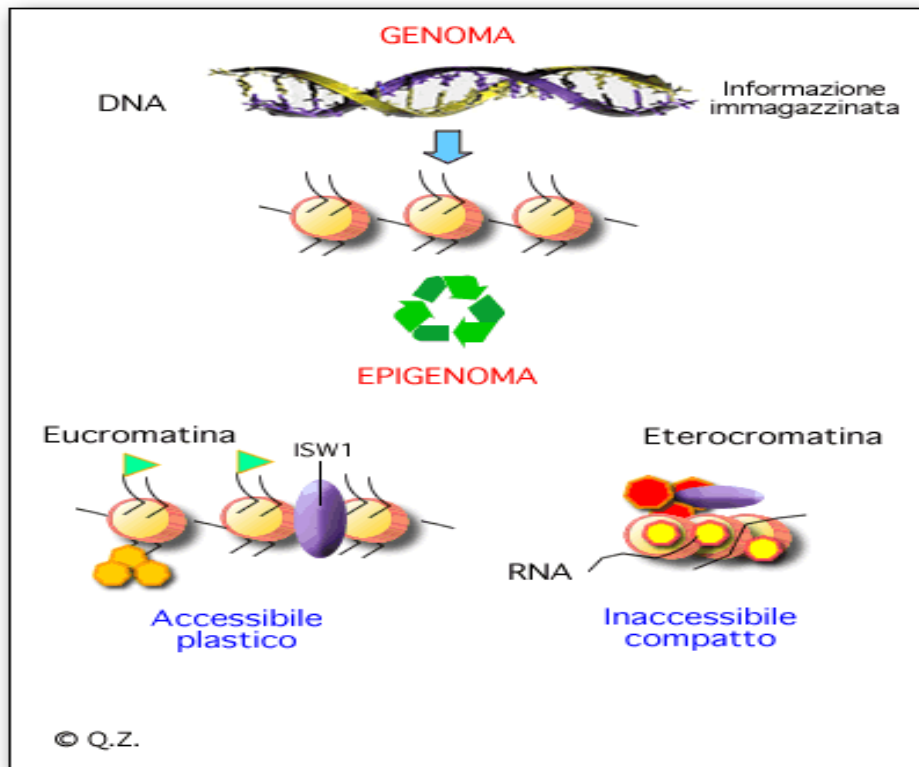
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

La maggior parte della cromatina si presenta sottoforma di un filamento di 30 nm. Alla formazione di questo filamento contribuisce l'istone H1, che è più grande e meno conservato rispetto a quelli che costituiscono il nucleosoma. Una molecola di H1 si lega ad ogni nucleosoma formando contatti con il DNA e anche con le proteine del nucleosoma stesso. La presenza di H1 altera la traiettoria con la quale il DNA fuoriesce dalla sua interazione con il nucleosoma facilitando la formazione di strutture cosiddette a zig-zag. La struttura a filamento di 30 nm viene ulteriormente condensato quando la cellula ha terminato la duplicazione del DNA nella fase S del ciclo cellulare e si appresta ad iniziare la mitosi.

Dalla struttura cristallografica del nucleosoma si evince che le code N-terminali degli istoni sono accessibili e non strutturate. Queste regioni sono soggette ad una serie di possibili modifiche post-traduzionali, come:

- La fosforilazione su residui di serina o treonina.
- L'acetilazione di residui di lisina.
- La metilazione su arginine o lisine.
- L'ubiquitinazione .
- La sumoilazione
- La glicosilazione.
- La biotinilazione.
- La carbonilazione.



**Figura 5.** Rappresentazione dell'eucromatina e dell'eterocromatina

La metilazione delle lisine aumenta la loro carica positiva e può avere effetti attivanti e repressivi sulla trascrizione a seconda del residuo coinvolto nella reazione. Metilazione della lisina 9 dell'istone H3 ad esempio è repressiva perché, è riconosciuta dalla proteina HP1 che è coinvolta nella formazione dell'eterocromatina. Al contrario, la metilazione della lisina 4 dello stesso istone è attivante nei confronti della trascrizione .

L'acetilazione è normalmente attivante, mentre la de-acetilazione è in genere inibitoria nei confronti della trascrizione.

Ci sono due meccanismi possibili attraverso i quali queste modificazioni possono influenzare la trascrizione:

1. Modulazione delle interazioni tra le code istoniche ed il DNA. La metilazione aumenta la basicità del gruppo  $\epsilon$ -amminico della lisina favorendo interazioni

elettrostatiche con i gruppi fosfato del DNA. Al contrario l'acetilazione diminuisce la basicità degli stessi residui sfavorendone in questo modo l'interazione con l'acido nucleico, e secondo questo modello, facilitando l'accesso all'apparato trascrizionale.

2. Riconoscimento delle modificazioni da parte di proteine che a loro volta modulano l'attività dell'apparato trascrizionale. Sono stati identificati domini che riconoscono modificazioni specifiche degli istoni.

Gli enzimi coinvolti nelle modificazioni istoniche sono le istone-acetiltransferasi, le istone-deacetilasi, le istone metil-transferasi e le demetilasi.

Le istone acetiltransferasi catalizzano il trasferimento di un gruppo acetile dell'acetilCoA al gruppo  $\epsilon$ -amminico di una lisina. Le circa 30 HAT sono classificate in 5 sottofamiglie che differiscono tra loro per quanto l'organizzazione strutturale e la funzione biologica. Anche il soppressore tumorale p53 è regolato attraverso acetilazione, aumentandone la sua attività trascrizionale e la capacità di indurre morte cellulare programmata.

Le istone deacetilasi hanno un effetto inibitorio sulla trascrizione, catalizzano la rimozione idrolitica del gruppo acetile dalle acetil lisine prodotte dall'azione delle istone acetiltransferasi.

La metilazione del DNA è un processo epigenetico coinvolto nella regolazione di molti processi cellulari, inclusi l'espressione genica, l'imprinting, l'inattivazione del cromosoma X, il silenziamento di elementi trasponibili e retrovirali e l'organizzazione della cromatina.

La metilazione del DNA è caratterizzata dall'aggiunta di un gruppo metilico derivato dal donatore di metili S-adenosilmetionina (SAM) sul carbonio in posizione 5 di una

citosina. Le citosine metilate sono presenti nel DNA di tutti i vertebrati e nella maggior parte degli eucarioti in particolare nelle isole CpG dei promotori genici.

La metilazione delle citosine è mediata da proteine chiamate DNA metiltrasferasi (DNMT). Più di trent'anni fa sono state predette due differenti classi di DNMT :

- DNMT di mantenimento: preservano il pattern di metilazione del DNA durante le divisioni cellulari, mediante l'azione specifica sul DNA emimetilato prodotto attraverso una replicazione semiconservativa;
- DNMT de novo: stabiliscono il pattern di metilazione di sequenze specifiche durante lo sviluppo.

Sono state identificate e caratterizzate 4 differenti DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b. La DNMT1 mostra un maggior grado di metilazione del DNA emimetilato rispetto a quello non metilato, assegnandogli pertanto la funzione di metiltrasferasi di mantenimento, sebbene mostri proprietà di metilasi de novo.

La DNMT2, sebbene sia altamente conservata e distribuita in maniera ubiquitaria nei tessuti, non mostra attività di metiltrasferasi rilevabile .

Le DNMT3a e DNMT3b sono due enzimi molto simili con attività di metiltrasferasi de novo e presentano specifiche preferenze per differenti regioni del DNA.

Molte patologie nell'uomo sono correlate con un'aberrante metilazione del DNA o mutazioni di geni coinvolti nella metilazione del DNA; tra queste patologie troviamo disordini neurologici e cardiovascolari, sindromi pediatriche e sindromi di imprinting.

La dimostrazione più convincente di alterazione della metilazione del DNA nella patogenesi umana si osserva nei tumori.

Le cellule maligne mostrano un maggior sovvertimento del profilo di metilazione del DNA che si manifesta con l'ipermetilazione dei promotori di molti geni, ipometilazione globale del DNA e aumento del tasso di mutazioni dei dinucleotidi metilati CpG.

Rispetto al resto del genoma umano, che è largamente privo di dinucleotidi CpG, approssimativamente la metà di tutti i promotori dei geni sono associati con regioni arricchite di CpG (0.5-5kb), chiamate isole CpG. Nelle cellule normali, la maggior parte delle isole CpG non metilate, permettono così la trascrizione dei geni a loro associati. Nelle cellule tumorali l'ipermetilazione di queste regioni determina la perdita della loro espressione. Sono stati identificati molti geni che presentano un'aberrante ipermetilazione del promotore, tra i quali alcuni sono regolatori del ciclo cellulare (<sup>P16INK4a, P15INK4a, RB, P14ARF</sup>), geni di riparazione del DNA (BRCA1, MGMT, MLH1), geni associati all'apoptosi (DAPK, TMS1) e molti altri.

La seconda forma di difetto nella metilazione del DNA in molti tipi di tumori è l'ipometilazione genomica. Essa è comune in molti tumori solidi come nel tumore della prostata, epatocarcinoma, così come in tumori ematologici.

L'ipometilazione aberrante si è ipotizzato che contribuisca alla progressione del tumore attraverso l'attivazione dell'oncogene H-RAS, FGFR1, c-MYC , o attraverso l'attivazione di retrotrasposomi, o attraverso l'aumento dell'instabilità cromosomica.

Infine, la metilazione del DNA è correlata con la tumorigenesi anche attraverso l'inattivazione genica mutazionale. La deaminazione delle citosine metilate nei dinucleotidi CpG può causare mutazioni puntiformi (transizioni), in geni come ad es. P53.

#### 1.4 SAM e metilazione del DNA

S-adenosilmetionina è il principale donatore biologico di metili, sintetizzato nel citosol di tutte le cellule, anche se il fegato gioca un ruolo centrale nella sua omeostasi poiché è l'organo in cui principalmente avviene la sua sintesi e degradazione. Nel fegato, circa metà della produzione di metionina giornaliera viene convertita in SAM. La metionina adenosiltrasferasi (MAT) è l'enzima responsabile della formazione di SAM a partire da metionina e ATP : il gene Mat1A, espresso solo nel fegato adulto, codifica per gli isoismi MATI/MATIII, mentre il gene Mat2A espresso in maniera ubiquitaria ma non nel fegato adulto, codifica per l'isozima MATII. Il gene Mat2A è espresso anche nel fegato fetale e nella vita adulta nel fegato rigenerante.

La SAM è correlata con tre importanti vie metaboliche: la sintesi delle poliamine, transmetilazione e transulfurazione. Nei mammiferi la SAM dona il suo gruppo metilico ad una grande varietà di molecole accettrici nelle reazioni catalizzate da metiltrasferasi. S-adenosilomocisteina (SAO) è generata come prodotto di trasmetilazione e idrolizzata a omocisteina e adenosina attraverso una reazione reversibile catalizzata dalla SAM idrolasi. SAO è un potente inibitore competitivo delle reazioni di metilazione, pertanto è necessaria una pronta rimozione dell'adenosina e dell'omocisteina per prevenire l'accumulo di SAO. L'omocisteina può essere rimetilata per formare metionina; pertanto, quando il contenuto di SAM è ridotto l'omocisteina è utilizzata per rigenerare SAM, mentre quando i livelli di SAM sono alti, l'omocisteina può essere utilizzata nella via di trans-sulfurazione.

Normalmente il DNA densamente metilato è associato all'eterocromatina condensata quindi trascrizionalmente inattiva, mentre quello scarsamente metilato è associato

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

all'eucromatina più rilassata e trascrizionalmente attiva. L'ipermetilazione dell'eterocromatina in cellule normali assicura che il DNA venga mantenuto in uno stato quiescente di replicazione e che eventuali sequenze virali e trasposomi non si possano integrare nel genoma.

L'inattivazione genica di geni oncosoppressori mediante aberrante metilazione è uno degli eventi mutazionali più comuni nello sviluppo di un tumore. Dagli studi condotti per identificare le isole CpG differenzialmente metilate nei tumori si stima che delle 45000 isole CpG presenti nel genoma umano, circa 600 esibiscono un' aberrante metilazione nelle cellule tumorali rispetto alle normali.

Le modificazioni di metilazione delle isole CpG sembrano essere degli eventi coinvolti nella cancerogenesi. L'ipermetilazione di promotori può avere un ruolo determinante nello sviluppo di un tumore quando ha come conseguenza l'inattivazione trascrizionale di geni regolatori della crescita e geni oncosoppressori. Recenti studi hanno dimostrato che questo evento si verifica nei primi stadi del processo neoplastico, compresi quelli preneoplastici.

Esiste una crescente lista di geni oncosoppressori la cui trascrizione è inibita dall'ipermetilazione del proprio promotore. Questi geni risultano essere importanti nella tumorigenesi di alcuni tumori ma non di altri.

L'ipermetilazione del gene APC risulta legato all'insorgenza del tumore al colon-retto <sup>15</sup>. Ipermetilazione di BRCA1 è associata con determinati tipi di carcinoma alla mammella, ma non con leucemia, carcinoma epatico e intestinale <sup>16</sup> dove non è presente un'anormale metilazione. Il gene O<sup>6</sup>-MGMT , che codifica un importante enzima coinvolto nella riparazione del DNA, risulta ipermetilato in molti tipi di tumori solidi <sup>17</sup>.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



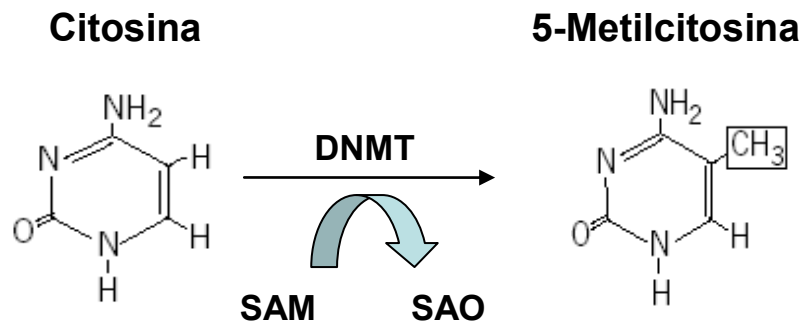
Quindi la metilazione di geni coinvolti nella riparazione del DNA, quali MGMT, può portare alla loro inattivazione, con conseguente instabilità microsatellitare e aumento della frequenza di mutazioni. Il gene che codifica la proteina p16<sup>INK4A</sup>, implicata nel processo di regolazione del ciclo cellulare ed identificata come soppressore tumorale, risulta ipermetilato durante lo sviluppo del carcinoma epatocellulare, così come in altri tipi di tumore.

Oltre l'ipermetilazione del gene p16<sup>INK4A</sup>, altri casi di ipermetilazione di promotori di geni oncosoppressori sono stati descritti nel CE umano. Tra questi abbiamo l'E-caderina, la proteina spectrina-simile associata con l'apoptosi (ASC), il gene deleto nel tumore epatico 1 (DLC1) e molti altri. Il significato biologico dell'ipermetilazione di alcuni di questi geni è stato valutato in linee cellulari di CE. In particolare, il trattamento di cellule di epatoma con agenti demetilanti aumenta l'espressione di p16<sup>INK4A</sup><sup>18</sup>, gene associato con l'inibizione della proliferazione cellulare.

La metilazione può promuovere spontanea deaminazione, aumentare il legame di cancerogeni al DNA e favorire l'assorbimento delle radiazioni ultraviolette da parte del DNA. Tutti questi fattori incrementano la quantità di mutazioni e la formazione di addotti con conseguente inattivazione genica di oncosoppressori.

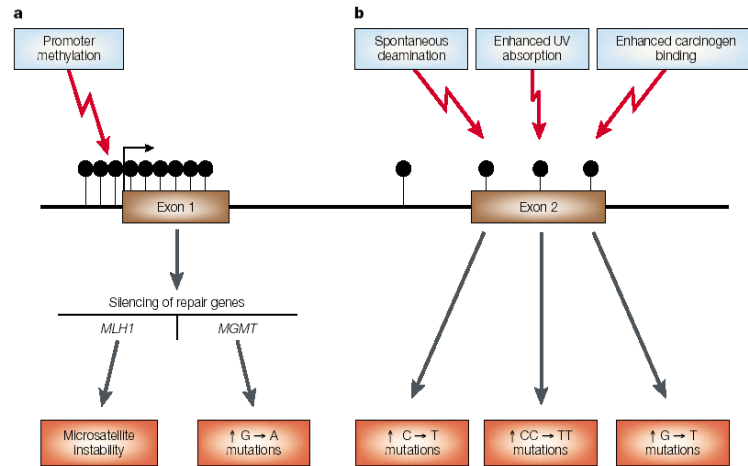
Nonostante l'aberrante metilazione di alcune sequenze, il genoma delle cellule tumorali mostra contemporaneamente ipometilazione globale. I meccanismi di questo processo non risultano ancora chiari, ma l'ipometilazione del DNA contribuisce all'acquisizione di instabilità genomica, di variazioni strutturali nei cromosomi così come all'aumento dell'espressione genica.

L'instabilità genomica è una caratteristica comune delle cellule dei CE umani. Vari meccanismi possono contribuire alla sua acquisizione, inclusi l'accorciamento dei telomeri, difetti nella segregazione dei cromosomi e alterazioni nelle vie di risposta a danni nel DNA.



**Figura 6.** Reazione di metilazione delle citosine.

La metilazione delle citosine delle isole CpG è catalizzata dalle DNA metiltransferasi (DNMT), che trasferiscono un gruppo metile dalla S-adenosilmetionina (SAM) al carbonio 5' della citosina, formando 5-metilcitosina e S-adenosilomocisteina (SAO).



**Figura 7.** Gli effetti delle modificazioni epigenetiche. a) L'ipermetilazione delle isole CpG dei promotori dei geni coinvolti nella riparazione del DNA, quali MLH1 e MGMT, può portare alla loro inattivazione, cui consegue instabilità microsatellitare ed a aumento di mutazioni G→A. b) La metilazione delle citosine nella regione codificante dei geni causa un aumento di mutazioni a causa di spontanea deaminazione, aumentato assorbimento delle radiazioni ultraviolette e del legame dei cancerogeni. (tratta da: Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Genet.* 3, 415-428, 2002).

Aberrante metilazione del DNA è stata osservata in CE umani. Questa anomalia potrebbe aumentare lo sviluppo di alterazioni genetiche nelle cellule nei diversi stadi dell'epatocancerogenesi. In particolare è stata osservata ipometilazione globale del DNA che può portare ad instabilità genetica e così facilitare l'insorgenza di variazioni genetiche irreversibili per mancato mantenimento dell'integrità dei cromosomi dovuta a variazioni nell'impacchettamento del DNA, risultando in un maggior accesso a determinate sequenze da parte di composti ossidanti ed enzimi.

Sono state osservate numerose alterazioni genetiche mediante analisi del cariotipo, ibridizzazione genomica comparativa (CGH) e perdita di eterozigosi (LOH). Queste

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

metodiche hanno consentito l'identificazione di ricorrenti regioni con variazioni nel numero di copie e sbilanciamenti allelici. Frequenti amplificazioni sono state rilevate nei cromosomi 1q, 6p, 8q e 17q, mentre delezioni nei cromosomi 1p, 4q, 8p, 13q e 17p.

Numerosi studi sono stati svolti per classificare le alterazioni genetiche in relazione allo stadio tumorale. Alti livelli di instabilità cromosomica sembrano correlare con la de-differenziazione e la progressione a CE. Altri studi suggeriscono che alcune variazioni cromosomiche risultano essere specifiche delle lesioni displastiche, altre degli stadi iniziali o più tardivi di CE e di metastasi.

### **1.5 Le sequenze ARE e la regolazione post-trascrizionale**

Il controllo dell'espressione genica è un processo fondamentale che regola la crescita, la proliferazione e il differenziamento cellulare.

Fino ad oggi gran parte della letteratura scientifica si è focalizzata sui molteplici eventi trascrizionali coinvolti nella regolazione dell'espressione genica. La regolazione post-trascrizionale comprende diversi meccanismi che riguardano il trascritto, come la rielaborazione, la traslocazione nucleo-citoplasma, la localizzazione, la degradazione e la traduzione<sup>42</sup>.

Elevati livelli di degradazione dei trascritti sono stati messi in relazione con la presenza di elementi ricchi in adenosina e uridina (AU-rich elements o AREs) nelle 3'UTR dei trascritti.<sup>44</sup>

Nelle cellule di mammifero tali sequenze ARE, sono state identificate per la loro capacità di destinare gli mRNA che le contengono ad una rapida degradazione. In generale questi mRNA codificano proteine coinvolte nella regolazione della crescita cellulare o della

risposta dell'organismo a stimoli esterni come micro-organismi, stimoli infiammatori e fattori ambientali.

E' importante considerare che la presenza di sequenze ARE non solo può portare all'instabilità del messaggero e alla sua successiva degradazione, ma anche alla sua stabilizzazione<sup>43</sup>.

Attualmente le ARE sono raggruppate in tre classi in base al numero e alla distribuzione di pentameri AUUUA presenti. La classe I contiene copie ripetute del motivo AUUUA disperse in regioni nucleotidiche ricche in uridina. La classe II contiene almeno due nonameri UUAUUUA(U/A)(U/A) sovrapposti. La classe III è meno definita e contiene regioni ricche di U ma nessun motivo pentamerico. L'esempio meglio documentato di ARE di tipo III è localizzato nella 3'UTR dell'mRNA del gene c-jun.

Come già detto la presenza di motivi ARE è spesso coinvolta nella regolazione dell'emivita dei trascritti stessi. Le RNA-binding proteins (RBP) costituiscono il 3-11 % del proteoma nei batteri, negli archea e negli eucarioti<sup>43</sup>.

Le RBP spesso contengono domini di legame all'RNA che interagiscono specificamente con sequenze o motivi strutturali presenti nell'RNA. Ad oggi è stato descritto un centinaio di domini proteici associati alle proteine che legano l'mRNA, alcuni dei quali si presume abbiano avuto origine in fasi antiche dell'evoluzione, mentre altri, come il RRM sono presenti esclusivamente in eucarioti e pertanto devono essere stati acquisiti in tempi più recenti.

Un motivo molto conservato nella scala evolutiva presente nelle proteine che legano l'RNA è il K Homology Motif (KH), identificato dapprima nella proteina hnRNP K umana. Il motivo è costituito da 60 residui circa, in maggioranza idrofobici. Una proteina

può arrivare a possedere fino a 15 motivi KH, tutti in grado di legare RNA a singolo filamento, e ciò fa ipotizzare un andamento cooperativo dell'interazione<sup>43</sup>.

Il motivo RRM è costituito da 90-100 aminoacidi ed è composto da due corte sequenze RNP1 e RNP2 separate da due aminoacidi idrofobici. La struttura tridimensionale è costituita da quattro foglietti beta e due alfa eliche orientate perpendicolarmente. Questo motivo capace di legare l'RNA è quello meglio conosciuto e caratterizzato, ed è ritrovato nella maggior parte delle proteine che legano elementi ARE.

Una classe molto conosciuta di proteine AU-Binding che contengono il motivo RRM è la proteina Hu, questa classe di proteine è molto importante per il differenziamento neurale in *Drosophila*<sup>44</sup>. Quattro sono i geni che codificano queste proteine: HuR (HuA), HuB (Hel-N1), HuC (Ple-21) e HuD. HuR è espressa ubiquitariamente, HuC e HuD sono neuroni-specifiche, mentre HuB è espressa nei neuroni e negli adipociti.

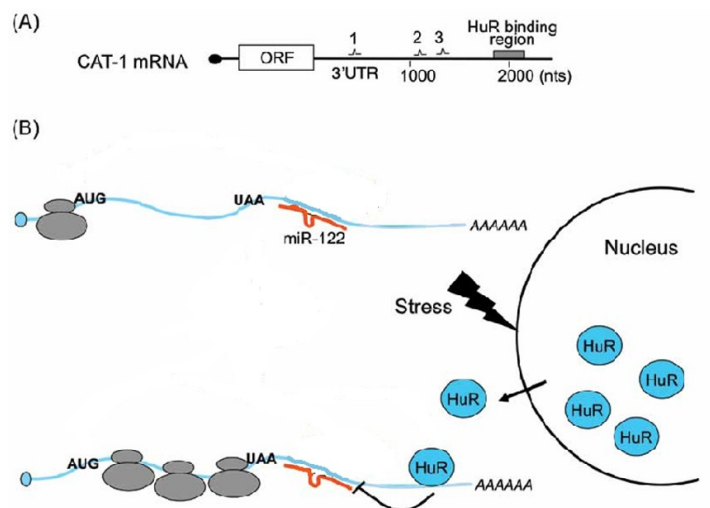
Questa famiglia di proteine è coinvolta in numerosi processi cellulari che vanno dalla crescita al differenziamento cellulare.

La proteina HuR ha un peso di 32 KDa, e il gene che la codifica è situato sul cromosoma 19p13.2; lega la sequenza AU-rich in 3'UTR di mRNA target, riconoscendo la sequenza AUUUA per la quale ha una particolare affinità e stabilizza così il messaggero. Il meccanismo con il quale agisce non è ancora completamente chiaro, ma è noto che HuR compete con altre proteine AU-binding le quali possono interagire con la stessa sequenza AUUUA: HuR ha la meglio e induce la rielaborazione delle medesime a cui si lega attraverso proteolisi<sup>45</sup>.

HuR è implicata in diversi processi cellulari come la differenziazione cellulare, la risposta immunitaria e infiammatoria. Sono numerosi gli mRNA leganti HuR : VEGF (

fattore di crescita dell'endotelio vascolare), eNOS (ossido nitrico sintasi endoteliale), e diversi mRNA di regolatori del ciclo cellulare come p21.

HuR ha una localizzazione principalmente nucleare, il suo trasporto nel citoplasma è modulato da diversi stimoli che agiscono attraverso la modulazione e l'attivazione di un certo numero di vie di segnale intracellulari, che vedono coinvolte: MAPK, CHK2, AMPK<sup>44</sup>.



**Figura 8.** Azione della proteina HuR.

Un'altra proteina AUBP ben conosciuta e importante nel regolare la stabilità di messaggeri è AUF1 detta anche hnRNP D (Heterogeneous nuclear Ribo NucleoProtein D). Si conoscono quattro forme isomeriche di AUF di 37, 40, 42, 45 kDa, che differiscono tra loro sia nel dominio terminale, che nella specifica attività di legame agli mRNA. AUF1 lega e destabilizza i trascritti contenenti ARE, come quelli per c-myc, GM-CSF<sup>46</sup>. AUF1 come HuR è essenzialmente nucleare ma può transitare nel compartimento citoplasmatico. Questa proteina si lega alle ARE di classe I e II, mentre non è riportato nessun caso di legame con quelle di classe III.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

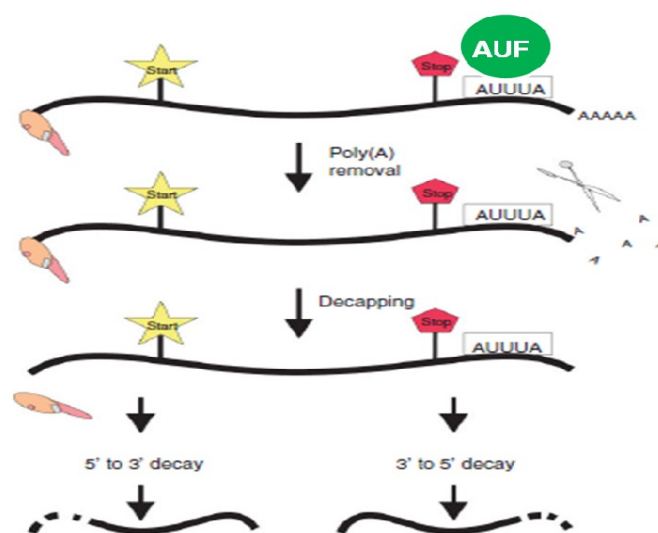
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

La correlazione tra il legame di una proteina AUF1 e il decremento della stabilità degli mRNA è stata dimostrata sia tramite overespressione sia attraverso RNA interference di AUF1 in cellule, o anche con la modulazione del contenuto in AUF1 in estratti citoplasmatici.

AUF1 è anche in grado di legare regioni ricche in AT di DNA a doppio filamento con alta specificità, agendo da regolatore trascrizionale. A parte AUF1, di tutte le hnRNP solo E2BP, la ERE-BP (*Estrogen Response Element-Binding Protein*) e CBF-A (*CArG Binding Factor A*) legano il DNA a doppio filamento; è interessante notare che tutte queste proteine mostrano alta identità con AUF1 e si ritiene che svolgano ruoli regolativi nell'espressione genica<sup>46</sup>.

Le modalità con cui le AUF1 influenzano l'espressione di geni in sistemi cellulari sono pertanto varie e diverse, e talvolta non del tutto chiarite. In generale quando la proteina esce dal nucleo, nel citosol riconosce la sequenza AUUUA del messaggero, si lega ad essa inducendo la degradazione della poly (A), la rimozione del cappuccio 5', andando così a destabilizzare il messaggero e inducendone la degradazione.



**Figura 9.** Azione della proteina AUF1

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



## 1.6 Modelli sperimentali di epatocancerogenesi su roditori

Lo sviluppo di tumori nei mammiferi dipende dall'accumulo in cellule somatiche di numerose alterazioni geniche che includono attivazione di proto-oncogeni e inattivazione di geni oncosoppressori<sup>47</sup>. L'instabilità genomica generata da danno al DNA ed errori nella riparazione del DNA giocano un ruolo importante nell'accumulo di queste alterazioni. Sono stati ampiamente dimostrati comuni aspetti morfologici, biochimici e biologici tipici delle lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche dei roditori ed umane. Le stesse classi di geni sono coinvolte nella genesi delle lesioni, questo suggerisce che i meccanismi alla base dello sviluppo del CE in specie differenti potrebbero essere simili. Negli ultimi anni vari modelli di epatocancerogenesi realizzati su ratti e topi sono stati utilizzati per mappare geni di suscettibilità e per definire il modello genetico responsabile del rischio di CE<sup>47</sup>, ed esaminare i meccanismi effettori dei geni di suscettibilità tumorale.

La diagnosi tardiva e la mancanza di terapie efficaci rendono l'epatocarcinoma umano una neoplasia con prognosi spesso infausta a breve termine dopo la diagnosi, con una sopravvivenza media del paziente minore di tre anni. Per conseguire una diagnosi più precoce e un trattamento adeguato di tale neoplasia, è necessario lo sviluppo di validi modelli di tumore epatico, nei quali possono essere indagati i meccanismi molecolari coinvolti nelle fasi precoci e tardive dell'epatocancerogenesi ed, allo scopo eventualmente di modificare tali meccanismi attraverso l'utilizzo di farmaci antineoplastici.

Studi sui roditori hanno evidenziato marcate differenze di suscettibilità allo sviluppo del tumore epatico in ceppi diversi di ratto o di topo<sup>48</sup>. In particolare, nel nostro laboratorio

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

sono stati individuati due ceppi di ratto filogeneticamente distanti e diversi nell'attivare, disattivare cancerogeni, formare addotti con il DNA e di riparare il DNA: il ceppo Fischer 344 (F344) suscettibile alla cancerogenesi epatica indotta chimicamente attraverso il modello dell'epatocita resistente, ed il ceppo Brown Norway (BN) resistente alla cancerogenesi epatica indotta attraverso il medesimo protocollo <sup>48</sup>. Nel ceppo BN, resistente all'epatocancerogenesi, è stato riscontrato un piccolo seppure evidente aumento delle cellule iniziate rispetto al ceppo F344 suscettibile nelle fasi precoci del processo. In seguito alla sospensione del trattamento promotore (che costituisce lo stimolo di crescita) le cellule iniziate delle lesioni preneoplastiche che si sviluppano nel ceppo BN manifestano una ridotta capacità di crescita, tendono a perdere alterazioni fenotipiche acquisite e regrediscono, andando perciò incontro a "*rimodellamento*" quanto meno genotipico. Pertanto la resistenza all'epatocancerogenesi da parte del ceppo BN è principalmente da ricondurre all'incapacità delle lesioni preneoplastiche di tale ceppo di progredire verso la malignità (noduli neoplastici ed epatocarcinomi), probabilmente a causa di un efficiente controllo dei meccanismi regolatori il ciclo cellulare <sup>48</sup>(Figura 10). Tali meccanismi sarebbero invece profondamente e precocemente alterati nel ceppo suscettibile F344, essi consentono una rapida progressione delle lesioni di questo ceppo <sup>48</sup>. E' importante sottolineare che numerosi studi hanno evidenziato che i meccanismi molecolari alla base della suscettibilità o della resistenza nei due ceppi riproducono piuttosto fedelmente le alterazioni molecolari evidenziate nei carcinomi epatocellulari umani <sup>47-48</sup>. Pertanto i due modelli di tumore epatico di ratto possono rappresentare un valido ed utile sistema nello studio patogenetico del CE e nel potenziale trattamento medico.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

L'epatocancerogenesi è un processo multifasico dove la fase di inizio degli epatociti (trattati con cancerogeni) è seguita da trattamenti che inducono l'espansione clonale degli epatociti iniziati, successivamente inizia la progressione.

Durante la fase iniziale, in seguito al danno genomico indotto dai cancerogeni, alcuni epatociti possono andare incontro a morte cellulare per apoptosi altri acquisiscono alterazioni genetiche.

L'espansione clonale delle cellule iniziate che sopravvivono (fase di promozione) determina lo sviluppo di foci di epatociti alterati (FEA). Queste lesioni possono essere identificate per l'alterata espressione di enzimi epatici come ad esempio diminuzione dell'espressione degli enzimi di fase I (attivatori) e aumento dell'espressione degli enzimi di fase II (coniuganti). Nei ratti, le cellule iniziate possono essere identificate in fasi molto precoci del processo neoplastico attraverso colorazione immunohistochimica ad esempio della proteina glutatione S-transferasi 7-7 (GST7-7) . La maggior parte delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche va incontro ad una diminuzione della crescita e infine regredisce (fase di rimodellamento o reversione fenotipica). Durante la fase di promozione, possono comparire mutazioni genetiche aggiuntive che favoriscono l'acquisizione di capacità di crescita autonoma, la sommatoria delle alterazioni genetiche ed epigenetiche consente la fase di progressione e la comparsa della malignità conclamata<sup>49</sup>.

Per una più efficace prevenzione ed un trattamento precoce del cancro epatico, gli studi e gli approcci terapeutici devono mirare a contrastare gli effetti delle mutazioni genetiche che sono responsabili della comparsa delle lesioni preneoplastiche e della loro progressione. Questo approccio naturalmente implica l'identificazione dei geni

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

coinvolti<sup>50</sup> nell'acquisizione delle alterazioni genetiche e molecolari che favoriscono promozione e progressione.

Questo studio può essere compiuto utilizzando modelli di epatocancerogenesi chimica su roditori, come il modello di Solt e Farber.

Differenti alterazioni genetiche caratterizzano le lesioni preneoplastiche, come per esempio, l'iperpressione e l'amplificazione di c-myc e Tgf- $\beta$  nei modelli di topi transgenici e nei ratti sottoposti a cancerogenesi chimica in vivo<sup>51-52</sup>.

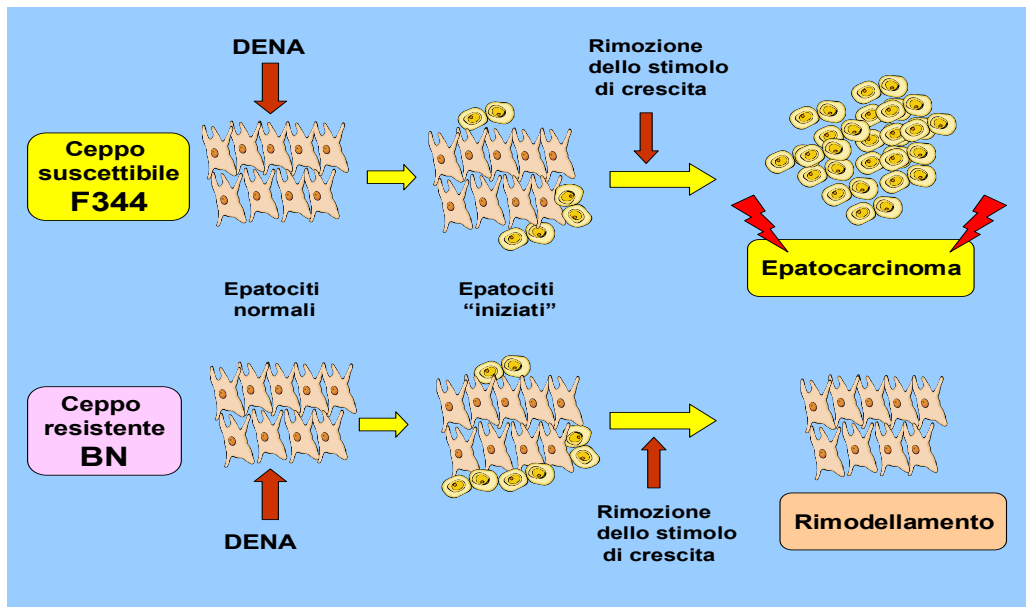
La stimolazione della crescita è essenziale per l'espansione clonale delle cellule iniziate, durante la fase di promozione, e la successiva evoluzione verso il cancro. Nel carcinoma epatocellulare, questa fase è studiata molto bene in modelli sperimentali su ratti, nei quali la promozione è indotta da stimoli differenti ad esempio induzione di fattori di crescita, dopo epatectomia o sostanze tossiche, l'uso di fegato neonatale, un insieme di agenti promoventi.

Nel "modello dell'epatocita resistente" (RH), questo meccanismo è basato sulla resistenza delle cellule iniziate al 2-acetilaminofluorene (AAF), che invece agisce come mitoinibitore per le cellule normali, quando associato ad un'epatectomia parziale (PH) od alla somministrazione di dosi necrogeniche di CCl<sub>4</sub>. In questi modelli sperimentali, foci di epatociti alterati (FEA) e noduli si sviluppano relativamente presto nel fegato<sup>53</sup>. Queste lesioni sono caratterizzate da una proliferazione elevata e veloce e da differenti alterazioni del metabolismo di carboidrati, poliamine, colesterolo, lipidi, ferro, xenobiotici. Dopo l'interruzione del trattamento promovente, solo quelle lesioni che manifestano autonomia di crescita sono in grado di progredire a CE e possono acquisire ulteriori alterazioni morfologiche, funzionali, biochimiche e molecolari. Le lesioni che

non vanno incontro a reversione spontanea, possono evolvere spesso irreversibilmente, verso il carcinoma epatocellulare. In queste lesioni, possono essere presenti numerose alterazioni genetiche. La disregolazione delle vie di trasduzione del segnale, del controllo del ciclo cellulare e di geni coinvolti nella morte cellulare, sono le alterazioni più frequenti e caratterizzano le cellule iniziate influenzando la progressione verso la malignità <sup>49</sup>.

Mutazioni a carico di alcuni geni, trasmesse geneticamente, conferiscono predisposizione al cancro. Sono stati identificati quattro loci che conferiscono suscettibilità al carcinoma epatico (Hcs 1-4) e sette loci che determinano la resistenza (Hcr 1-7)<sup>52-53</sup>. Queste differenze genetiche sono alla base della suscettibilità dei ratti Fisher (F344) allo sviluppo di epatocarcinomi e della resistenza dei ratti Brown Norway (BN). I ratti BN sono portatori della resistenza che riduce la capacità di progressione, determinando una scarsa capacità delle lesioni preneoplastiche ad evolvere in carcinomi, ma apparentemente non influenzano la fase di inizio.

Da incroci tra i due ceppi di ratti si è visto che gli alleli di resistenza sono trasmessi in maniera autosomica dominante alla progenie e modificano l'attività dei loci di suscettibilità. Esistono almeno 3 geni oncosoppressori nel locus Hcr1 <sup>50</sup>. Queste osservazioni suggeriscono che i meccanismi che controllano la crescita cellulare sono influenzati in maniera differente nelle lesioni epatiche dei ratti suscettibili e resistenti.



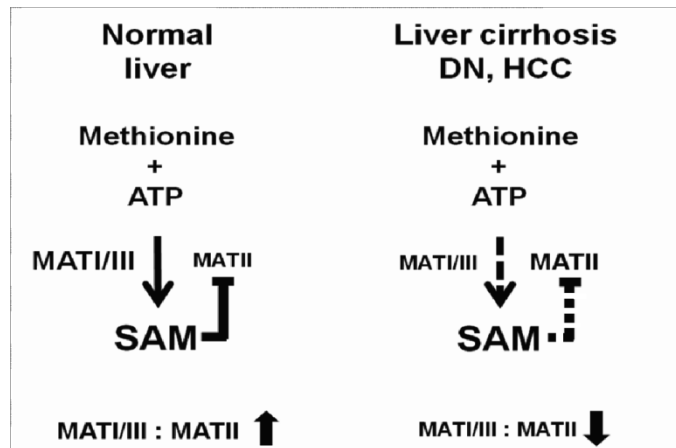
**Figura 10.** Schema illustrante la diversa suscettibilità dei ceppi di ratto BN ed F344 alla cancerogenesi epatica indotta secondo il modello dell'epatocita resistente. La somministrazione del cancerogeno chimico induce la formazione di cellule iniziate in entrambi i ceppi, ed in numero lievemente maggiore nel ceppo resistente BN. Alla sospensione dello stimolo promovente la crescita (rappresentato dallo stimolo che segue l'epatectomia parziale), un gran numero di cellule iniziate del ceppo BN sono incapaci di evolvere a malignità e vanno incontro a rimodellamento, le cellule iniziate del ceppo suscettibile F344 continuano a proliferare e conducono allo sviluppo dell'epatocarcinoma.

## SEZIONE SPERIMENTALE

### 2.SCOPO DELLA RICERCA

#### 2.1 Osservazioni generali

La metilazione dei promotori di specifici geni è una delle principali modificazioni epigenetiche che regola l'espressione genica può influenzare la cancerogenesi<sup>55-56</sup>. Recenti studi hanno dimostrato che l'ipometilazione globale del DNA, associata a ipermetilazione dei promotori ed inattivazione dei geni oncosoppressori, è un evento che si verifica comunemente nella cancerogenesi epatica dei roditori<sup>57</sup>. Una serie di evidenze indicano l'esistenza, nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche del fegato di ratto come nella cirrosi e nei CE umani, di una marcata diminuzione di S-adenosil-L-metionina (SAM) e del rapporto SAM:S-adenosilomocisteina (SAO), responsabile in parte dell'ipometilazione globale del DNA<sup>57-59-60</sup>. La diminuzione del contenuto epatico di SAM è stata attribuita a variazioni nel pattern degli isoenzimi metionina adenosiltrasferasi (MAT)<sup>59</sup>. Nei mammiferi, il gene *MAT1A*, espresso solo nel fegato, codifica l'isoenzima MATI/III, mentre *MAT2A* espresso ubiquitariamente codifica l'isoforma MATII. Una diminuzione dell'espressione di *MAT1A* con concomitante iperegolazione di *MAT2A* si verifica nelle linee cellulari di epatoma, nei CE dei roditori, così come nella cirrosi e nei CE umani<sup>59-60</sup>. L'isoforma MATII è inibita dal suo prodotto di reazione in cui la sua iperegolazione osservata nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche non compensa la diminuzione dell'isoenzima MATI/III.



**Figura 11.** Rappresentazione schematica delle variazioni dell'attività di MATI/III e MATII nel fegato sano, nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche.

La diminuzione del contenuto di SAM può essere uno dei meccanismi che portano all'ipometilazione del DNA e favorisce lo sviluppo del tumore epatico nei roditori e nell'uomo<sup>59-62-63</sup>. Nel fegato preneoplastico e neoplastico di ratti sottoposti a somministrazione di SAM, si osserva un aumento del rapporto SAM:SAO, della metilazione del DNA, a cui segue l'inibizione della crescita, e della prevenzione dello sviluppo del CE<sup>61-62</sup>. *In vitro* la crescita dei CE umani è inibita sia dalla trasfezione del gene *MAT1A* sia dall'aggiunta di SAM al terreno di colture<sup>63</sup>.

Nei CE umani si osserva una grande variabilità dell'espressione di *MAT1A* e *MAT2A* ed una ipometilazione globale del DNA<sup>63</sup>. Esiste una correlazione inversa tra la metilazione del DNA e l'instabilità genomica e una correlazione positiva con la sopravvivenza dei pazienti. Tuttavia, il ruolo dei geni della suscettibilità al carcinoma epatico nella regolazione della sintesi della SAM e nella metilazione del DNA non è stato ancora valutato.



## 2.2 Scopo della Ricerca

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'inversione del rapporto Mat1A: Mat2A, i bassi livelli di SAM e l'azione dei due geni sulla progressione neoplastica.

A questo scopo abbiamo valutato:

- La metilazione delle isole CpG del promotore di Mat1A e Mat2A, nella progressione dell'epatocancerogenesi, in ratti geneticamente suscettibili (F344) e resistenti (BN) all'epatocancerogenesi.
- L'acetilazione dell'istone H4, che potrebbe regolare l'accesso delle DNA metiltrasferasi ai promotori dei geni MaT.
- La regolazione post-trascrizionale di Mat1A e Mat2A, attraverso l'attività di proteine coinvolte nella stabilità del messaggero, come AUF1 e HuR, in campioni di fegato sano ed epatocarcinomi di ratto e umano.

Queste proteine nei nuclei si fissano agli mRNA nascenti, nel citoplasma, AUF1 resta legata all'mRNA di Mat1A e ne causa la destabilizzazione, al contrario HuR si attacca all'mRNA di Mat2A causandone la stabilizzazione. E' evidente che l'attività di queste due proteine può influenzare lo scambio funzionale del rapporto Mat1A : Mat2A.

### 3. MATERIALI

#### 3.1 Animali e trattamenti

Per il nostro studio sono stati utilizzati due ceppi di ratto: il ceppo BN che, come detto precedentemente, è resistente all'epatocancerogenesi indotta attraverso il protocollo dell'epatocita resistente, ed il ceppo F344, che invece è suscettibile all'epatocancerogenesi indotta attraverso la medesima procedura<sup>47</sup>. I ratti BN ed F344 sono stati trattati in modo identico, con una dieta semisintetica, e mantenuti in condizioni ambientali uguali e controllate. Animali maschi, del peso di circa 180 g all'inizio dell'esperimento, sono stati alimentati con una dieta standard ed acqua di fonte *ad libitum*. Essi sono stati allevati in gabbie individualmente, ad una temperatura di 22°C ed un'umidità del 55% costanti, con un ciclo di 12 ore di luce/buio.

I noduli neoplastici e gli epatocarcinomi sono stati indotti nei due ceppi utilizzando il modello dell'epatocarcinoma resistente (resistant hepatocyte model, RH) o di Solt e Farber, in grado di indurre la neoplasia nel 100% dei ratti suscettibili (Figura 12)<sup>47</sup>. Secondo questo protocollo si somministra una singola dose necrogenica del cancerogeno dietilnitrosamina (DENa) per via intra-peritoneale. Dopo riparazione del danno tessutale i ratti ricevono una dieta iperproteica contenente lo 0.02% di acetilaminofluorene o AAF (un inibitore della proliferazione degli epatociti normali) per 14 giorni. A metà di tale trattamento, affinché venga stimolata la crescita epatocitaria, viene effettuata un'epatectomia parziale. I ratti vengono poi nutriti fino al sacrificio con una dieta standard<sup>47</sup>. La somministrazione del mitoinibitore AAF induce una soppressione della crescita degli epatociti normali, mentre le cellule iniziate non rispondendo all'azione del mitoinibitore AAF continuano a proliferare. Qualche giorno dopo l'epatectomia parziale,

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

iniziano ad essere evidenziabili centri focali di crescita delle cellule preneoplastiche denominati foci. Durante la fase di espansione clonale delle cellule iniziate dal cancerogeno, le lesioni focali epatiche vanno incontro ad una rapida crescita. Con l'avanzare del processo di epatocancerogenesi, a circa 15 settimane dall'inizio, si possono individuare alcuni noduli persistenti caratterizzati dalla presenza di varie manifestazioni displastiche. Il numero di queste è minore rispetto a quello dei foci preneoplastici formati nella fase di promozione. Questo indica che le lesioni preneoplastiche possono seguire almeno due opzioni biologiche:

1. Molte lesioni scompaiono almeno fenotipicamente.
2. Alcune lesioni possono persistere e progredire.

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

1. *Inizio*, fase corrispondente alla somministrazione del cancerogeno (DENA nel modello di Solt e Farber) e caratterizzato da interazione cancerogeno terminale e macro-molecole bersaglio (ad es. DNA)
2. *Promozione*, fase durante la quale si osserva l'espansione clonale e lo sviluppo di numerosi foci preneoplastici, che in seguito, possono dar luogo a noduli precoci.
3. *Progressione*, fase durante la quale le lesioni preneoplastiche assumono capacità di crescita autonoma e caratteristiche di malignità conclamata.

Le lesioni preneoplastiche possono dunque seguire due differenti destini, potendo infatti andare incontro a regressione o a progressione neoplastica. Nel caso in cui si abbia la scomparsa delle lesioni, si parla di reversione fenotipica o rimodellamento fenotipico.

Durante il rimodellamento si verifica la progressiva scomparsa di almeno alcune

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

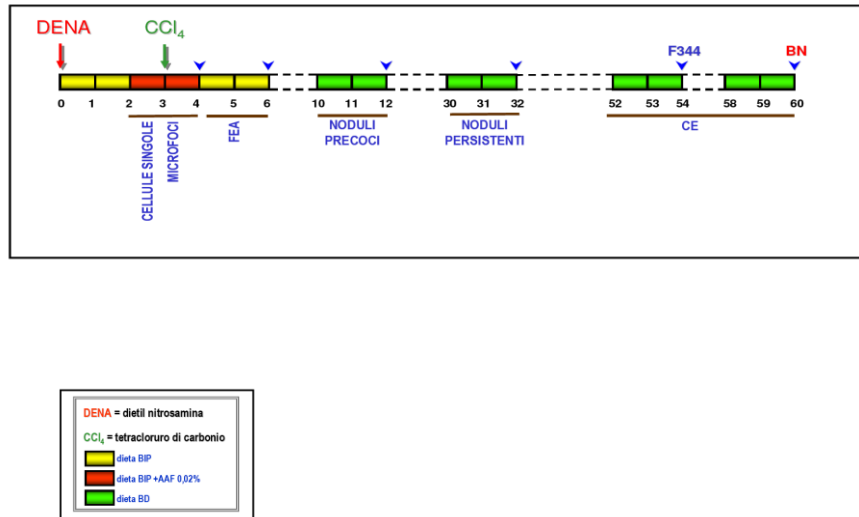
Università degli studi di Sassari.

anormalità fenotipiche, caratteristiche del tessuto preneoplastico e neoplastico. Tuttavia, molto probabilmente tali lesioni preneoplastiche non scompaiono completamente, ma rimangono in uno stato di quiescenza. E' stato infatti dimostrato che gli epatociti componenti le lesioni preneoplastiche andate incontro a rimodellamento possono spesso riacquistare elevata capacità di crescita in seguito all'applicazione di un nuovo stimolo promovente. Nei ratti BN, resistenti all'epatocancerogenesi, soltanto alcuni noduli precoci, su centinaia presenti, sono in grado di evolvere a carcinomi epatocellulari. Questa osservazione sperimentale sottolinea dunque il fatto che una larga parte di noduli va incontro a reversione fenotipica nel ceppo resistente<sup>49</sup>.

I noduli epatici che sono in grado di procedere nel loro sviluppo, una volta interrotto lo stimolo promovente, vanno incontro alla fase di progressione ed evolvono a carcinoma epatocellulare conclamato.

Nel presente progetto di ricerca, i ratti trattati secondo il modello di Solt e Farber, gruppi di ratti maschi F344 e BN controllo, della stessa età sono stati sacrificati sotto anestesia generale con etere. Il fegato è stato prelevato e tagliato in fettine di 2-3 mm di spessore. Da ogni lobo epatico sono stati isolati i noduli e/o carcinomi in modo tale da evitare per ciascuna lesione la contaminazione da parte del parenchima sano circostante.

Gli animali utilizzati hanno ricevuto trattamento umano adeguato secondo i protocolli e le norme che disciplinano l'utilizzo di animali in laboratorio.



**Figura 12.** Modello “dell’epatocita resistente” o di Solt e Farber (35). Abbreviazioni utilizzate: DENA, dietilnitrosamina; AAF, acetilaminofluorene.

### 3.2 Campioni umani

Sono stati utilizzati sei fegati sani, 47 carcinomi epatici asportati chirurgicamente e i corrispondenti tessuti epatici circostanti apparentemente non tumorali. I carcinomi epatici sono stati divisi in due gruppi in base alla durata di sopravvivenza del paziente e altri parametri clinico patologici (Tabella 2).

I carcinomi epatici sono stati suddivisi in: carcinomi epatici con prognosi peggiore (HCCP; n=20) e carcinomi epatici con prognosi migliore (HCCB; n=20), rispettivamente caratterizzati da una più breve (< 3 anni) o una più lunga (> 3 anni) sopravvivenza in seguito a resezione epatica parziale. I campioni sono stati forniti dal Dipartimento di Chirurgia “Pietro Valdoni”, Università di Roma “La Sapienza”, e dal Dipartimento di Chirurgia di Sassari, col consenso informato del paziente e dei parenti.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell’epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

Variable	Overall Survival		
	Hazard Ratio	95% Confidence Interval	P Value
Sex	2.27	0.85-6.09	0.102
Age	0.96	0.92-1.00	<b>0.047</b>
Etiology	0.69	0.49-0.97	<b>0.031</b>
Cirrhosis	1.11	0.37-3.31	0.849
Tumor size	1.74	0.59-5.13	0.310
Edmondson-Steiner grade	2.83	1.07-7.50	<b>0.037</b>
AFP secretion	1.53	0.65-3.62	0.334
MAT1/III:MATII ratio	0.76	0.62-0.94	<b>0.010</b>
PCNA	1.06	1.01-1.11	<b>0.011</b>
Apoptosis	1.08	0.75-1.55	0.697
Global DNA methylation	1.19	1.02-1.41	<b>0.032</b>
Genomic instability (RAPD)	1.22	1.09-1.37	<b>0.001</b>

AFP,  $\alpha$ -Fetoprotein; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RAPD, random amplified polymorphic DNA.

**Tabella 2.** Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con HCC a differente prognosi.

HCCB, CE a miglior prognosi; HCCP, CE a peggior prognosi.

### 3.3 linee cellulari

Linee cellulari di carcinoma epatico umano HepG2, che presentano il gene p53 wildtype, e Huh7 e Hep3B, con il gene p53 mutato, sono coltivate in monostrato in terreno DMEM (Eagle di Dulbecco modificato) completato con il 10% di siero bovino fetale. Si sono piastrate  $6 \times 10^3$  cellule per pozzetto in piastra da 96 pozzetti. Le cellule sono state trasfettate con DNA complementare (cDNA) Mat1A contenuto nel vettore di espressione pCMV6-XL (Origine Technologies, Rockville, MD). Attraverso la tecnica del MTT si è valutata la vitalità cellulare.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

## **4 Tecniche**

### **4.1 Saggio SAM-SAO**

E' stata determinata l' attività enzimatica di MATI/MATIII e di MATII, il contenuto di SAM e SAO è stato valutato con HPLC. Per l'analisi quantitativa del contenuto di SAM e SAO, l'area dei picchi cromatografici nei tessuti estratti è stata comparata con quantità nota di molecole.

### **4.2 Saggio di metilazione globale del DNA**

Il saggio di metilazione è stato eseguito utilizzando 2 µg di DNA genomico in NE Buffer-2 ( BioLabs New England)1x contenente 160 µM di SAM e 5µC di [<sup>3</sup>H] SAM, e 4U di Sss1 Metilasi (BioLabs). La percentuale di citosine metilate per µg di DNA di tessuto epatico è stata determinata attraverso tecnica HPLC.

### **4.3 Southern Blot**

Per l'analisi Southern sono stati digeriti 10 ug di DNA genomico con HpaII o MspI. Dopo elettroforesi i campioni sono stati trasferiti in membrana di nylon, le membrane sono state ibridizzate overnight a 42°C, con una sonda generata per PCR da DNA genomico di fegato. Le membrane sono state lavate per 15' in SSC/0.5% 2X a temperatura ambiente. Dopo a 65° e in seguito per 15' in SDS SSC/0.5% a 65°C.

#### **4.4 COBRA (analisi combinata trattamento con bisolfito e analisi di restrizione)**

Il DNA genomico è stato modificato con bisolfito ed è stato utilizzato per l'analisi COBRA. Con l'analisi COBRA sono state analizzate le citosine metilate sui siti TCGA del promotore del promotore di Mat1A in posizione -1437 e in posizione -1385. Per la reazione di PCR è stato utilizzato un volume di reazione in cui sono presenti: 100 ng di DNA genomico trattato con bisolfito, 2 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.025 mM di Dntp, 1.65 unità di AmpliTaq Gold polymerase ( Applied Biosystems, Roche, Milano, Italy), buffer TAPS 1X, 1.25 M di betaina, 1mM 2-mercaptoetanolo e 100 µM di primers.

I prodotti PCR sono stati purificati utilizzando la High Pure Purification kit ( Applied Biosystems) e dopo digestione con enzimi di restrizione, sono stati separati in un gel di agarosio MS-8 al 3%. Le bande sono state quantificate attraverso Molecular Imager ChemiDoc XRS, utilizzando il software Quantity One 1-D Analysis.

#### **4.5 PCR Metilazione specifica**

Il DNA genomico è stato modificato con bisolfito, sono stati amplificati 30 ng di DNA genomico in 15 µl di Mix contenente 2.25 mg di MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di Dntp, 0.5 unità di AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems), Buffer TAPS 1x, betaina 1.25M, 2 mercaptoetanolo 1mM e i primers contenenti dinucleotidi CpG.

Come controlli positivi e negativi sono stati utilizzati rispettivamente: CpGenome Universal Methylated DNA e CpGUniversal Unmethylated DNA (Millipore Corp. Headquarters, MA).



#### 4.6 ERMA ( Saggio di metilazione enzimatica specifica)

Per l'analisi ERMA il tratto di promotore dei geni Mat1A e Mat2A di cui si è voluto studiare lo stato di metilazione, è stato amplificato tramite PCR, eseguita in un volume di reazione di 50 µl contenente 2 µl (100ng) di DNA trattato con bisolfito, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP 0.25 mM, 1.65U di AmpliTaq Gold Polimerasi (Applied Biosystems), TAPS buffer 1X, betaina 1.25M, 2-mercaptoetanololo 1mM e 100 µM di primers scelti senza dinucleotidi CpG al loro interno e con due sequenza GATC al terminale 5' ciascuno. I prodotti PCR sono stati purificati attraverso un kit QIA quick PCR Purification Kits, Quiagen, e metilati in vitro con la citosina metiltrasferasi di *E. coli* (*SssI*), in presenza di SAM marcata con <sup>3</sup>H. I siti GATC presenti al 5' dei primers sono stati marcati dall'enzima adenina metiltrasferasi *dam* in presenza di SAM marcata con <sup>14</sup>C e usati come controllo interno per standardizzare la quantità di DNA analizzata. I risultati sono espressi come percentuale del rapporto <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C rispetto al controllo positivo totalmente metilato.

#### 4.7 MeDip (Saggio di metilazione del DNA immunoprecipitato)

Per MeDip sono stati utilizzati 8 µg di DNA genomico sonicato, questo è stato immunoprecipitato con anti 5' metilcitosina (Mab-5MECYT-100; Diagenode S.A., Liege, Belgium), gli immunoprecipitati sono stati eluiti, purificati, precipitati e risospesi in acqua. I campioni input sono stati processati in parallelo.

Cinque ng di INPUT e campioni immunoprecipitati sono stati amplificati con PCR e l'efficienza dell'immunoprecipitazione del DNA metilato è stato calcolato: MeDNA-

$$IP/INPUT = 2^{[Ct^{(input)} - Ct^{MeDNA-IP}]} \times 100.$$

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

#### **4.8 Chip (Saggio di immunoprecipitazione della cromatina)**

La tecnica ChIP (immunoprecipitazione della cromatina) permette di determinare dove e come, nel genoma alcuni fattori interagiscono direttamente e indirettamente con il DNA. Essa inoltre permette di mappare in vivo i fattori che legano la cromatina e di studiare come questi siano in grado di regolare l'espressione genica rimodellando la struttura del DNA. Ad esempio è utile nell'analisi dello stato di acetilazione degli istoni e nella capacità di legame dei fattori di trascrizione associati a regioni specifiche del genoma. Questa tecnica è un metodo potente per analizzare le specifiche associazioni DNA-proteine nel contesto cromatinico mediante l'uso di anticorpi specifici. L'efficienza di precipitazione dipende dalla specificità degli anticorpi e della cromatina di partenza. La conformazione delle proteine antigeniche dipende dallo stato nativo che assumono in soluzione e questo può alterare la specificità dell'anticorpo. La specificità deve essere controllata ed è necessario evitare reazioni aspecifiche utilizzando un siero pretrattato o un controllo che non è legato dall'anticorpo; inoltre la purificazione per affinità del antisiero minimizza il background.

Sono stati isolati i nuclei in buffer ipotonico contenente inibitori di proteasi e inibitore di istone deacetilasi, Na- butirrato.

La cromatina è stata digerita con micrococcal nuclease S7 (Roche Diagnostic GmbH Mannheim, Germany 10U/100 mg of froze tissue) e usata come materiale Input per Chip. Sono stati ottenuti piccoli frammenti di cromatina, i nuclei sono stati centrifugati 10' per 10000 RPM, il pellet ottenuto è stato risospeso in buffer di dialisi, mentre il soprannatante e frazioni di pellet sono stati dializzati per 12-16 ore a 4°C. Si è proceduto con la

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

risospensione dei nuclei che ha permesso la scoperta di una seconda frazione della cromatina, includendo frammenti più lunghi. La quantità e la qualità della frazione di cromatina dializzata è stata analizzata attraverso la densità ottica, e corsa elettroforetica su gel di agarosio. Dopo estrazione di materiale aspecifico attraverso la precipitazione dei campioni con proteina A/G Sepharose, la cromatina è stata immunoprecipitata con anticorpo anti-istone-acetilasi H4 (Millipore Corp. Headquarters, MA).

La frazione di cromatina trattata con IgG Normal Control ( Santa Cruz Biotechnolgy, Inc. Santa Cruz, CA) è stata usata come controllo negativo. Il DNA input e la cromatina immunoprecipitata sono stati trattati con proteinasi K, DNAase free e RNAase free e amplificata con PCR, con primers che si appaiano ai promotori dei geni Mat1A e Mat2A. I risultati sono stati normalizzati e presentati come percentuale del DNA input.

#### **4.9 RIP (Saggio di immunoprecipitazione del RNA)**

E' stata determinata l'interazione di AUF1 e HuR rispettivamente con Mat1A e Mat2A attraverso l'immunoprecipitazione delle ribonucleoproteine in tessuti di fegato di ratto e umano. I tessuti sono stati omogenati in RIPA Buffer [50mM TrisCl (ph7.5), 1% NP40, 0.5%Na-desossicolato, 1mM EDTA, 150 Mm NaCl, 0.05%SDS] contenente inibitori di proteasi e fosfatasi (Roche Molecular Biomedicals, Indianapolis, IN). I campioni sono stati centrifugati per 10'a 12.000g e il sopranatante è stato purificato e immunoprecipitato con anticorpo specifico AUF1 (Millipore 03-111, Millipore S.P.A. Vimodrone, Milano, Italy), HuR ( Millipore 03-102) o IgG ( Millipore). L'RNA è stato isolato, convertito in cDNA e analizzato attraverso qPCR.

#### **4.10 Western Blot**

I tessuti epatici sono stati omogeneizzati in lysis buffer (tris 30mM, NaCl 150mM, Nadesossicolato, 0,5%, SDS 1%, glicerolo 10%, e EDTA 2mM), contenente inibitori di proteasi e fosfatasi ( Roche Molecular Biochemicals), successivamente sonicato.

La concentrazione delle proteine sono state determinate con Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio Rad Hercules, CA), utilizzando come standard albumina bovina sierica.

Le membrane sono state ibridizzate con anticorpo primario monoclonal anti mouse AUF1e HuR, e  $\beta$ -actina (Abcam AB-636276-, Abcam Cambridge, UK). Le membrane ibridizzate con anticorpo primario sono state incubate con anticorpo secondario diluito 1:5000 per 1 ora e rivelate con Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate Kit (Pierce Chemical Co., New York, NY). Per queste proteine la densità è stata calcolata utilizzando ImageQuant 5.1 software ( Ge Healthcare, Piscataway, NJ), normalizzate con la  $\beta$ -actina e per ciascun valore è stata determinata la significatività statistica.

#### **4.11 RAPD (Random amplified polymorphic DNA)**

Le reazioni RAPD sono state eseguite utilizzando 22 primers arbitrari ricchi di GC che individuano alterazioni genomiche nel CE umano. Ogni esperimento include 3 diverse concentrazioni di DNA genomico per ogni gruppo di primers per valutare la riproducibilità del metodo.

#### **4.12 Analisi Statistica**

La significatività statistica è stata valutata utilizzando GraphPad Prism5.01, attraverso i test di Tukey-Kramer e Mann-Whitney e analisi lineari di regressione. La sopravvivenza

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

è stata valutata con il test di Kaplan-Kramer e Log-rank (Mantel-Cox). La sopravvivenza predetta è stata stimata con il metodo Cox.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

## RISULTATI

### 5.1 Controllo genetico dell' espressione del promotore di Mat1A e Mat2A

Durante l'epatocancerogenesi, la metilazione aberrante del DNA, rappresenta una delle principali modificazioni epigenetiche. Durante la cancerogenesi epatica nei roditori si osserva un'ipometilazione globale del DNA, associata ad ipermetilazione ed inattivazione dei promotori di geni oncosoppressori rispetto al fegato normale.

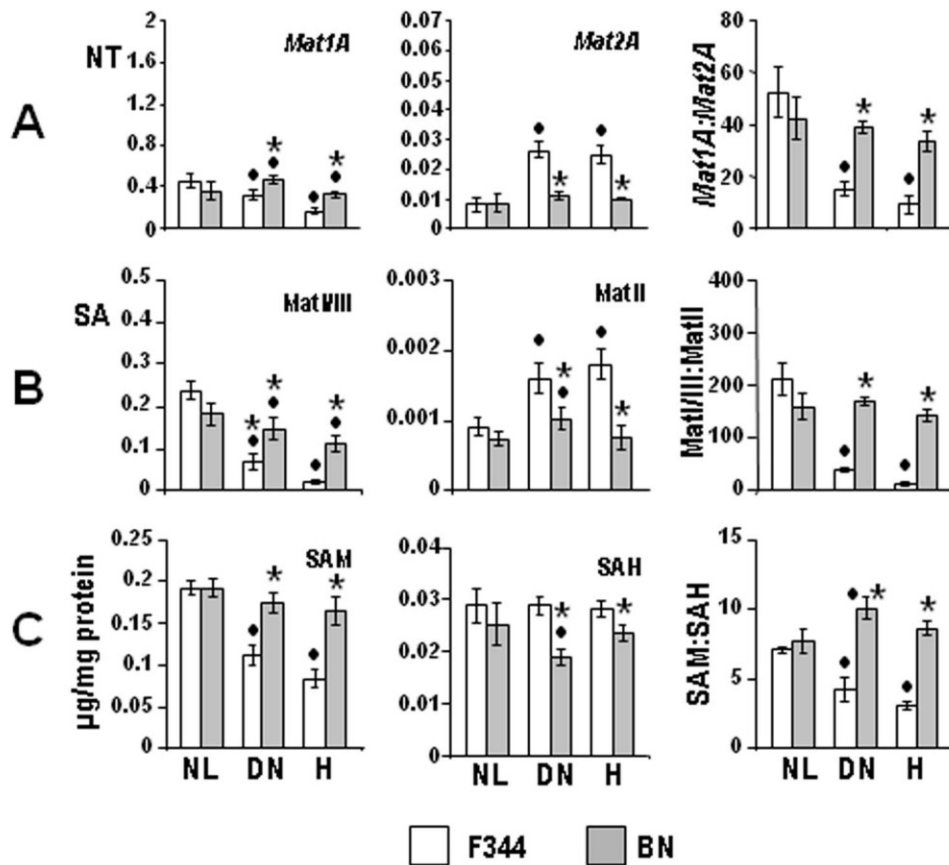
Queste modificazioni potrebbero generare alterazioni genetiche, inducendo instabilità genomica e facilitando il verificarsi di mutazioni geniche irreversibili.

Nelle lesioni epatiche preneoplastiche e nei CE dei ratti si osserva una marcata diminuzione del rapporto SAM:SAO.

Nei ratti F344 geneticamente suscettibili allo sviluppo del CE, la diminuzione del contenuto di SAM è correlata ad una profonda alterazione nel pattern degli isoenzimi metionina adenosil trasferasi (MAT), nei diversi stadi della cancerogenesi epatica. È stato individuato una marcata riduzione di espressione del gene Mat1A e dell'attività dell'isoenzima MATI/III nei tessuti preneoplastici e nei CE rispetto al fegato normale (Figura 13A-B). La diminuzione di Mat1A è associata all'aumento dell'espressione di Mat2A, infatti l'espressione di Mat2A aumenta significativamente nei tessuti preneoplastici e neoplastici rispetto ai tessuti sani, con conseguente aumento dell'attività di MATII. Come conseguenza di questi cambiamenti il rapporto dell'espressione di Mat1A:Mat2A e l'attività di MATI/III:MATII diminuiscono in tutti gli stadi dell'epatocancerogenesi e in maniera più evidente nei CE (Figura 13B).

Nei ratti geneticamente resistenti BN, l'espressione dei geni Mat1A e Mat2A, così come il rapporto Mat1A:Mat2A, non presenta nessuna variazione significativa, tra il tessuto

sano, le lesioni preneoplastiche e i CE, così come non si osservano variazioni significative per gli isoenzimi MATI/MATIII e MATII. Questi risultati sono accompagnati da scarsi cambiamenti del contenuto di SAM e di SAO e del rapporto SAM:SAO nelle lesioni e nei CE di ratti BN rispetto ai tessuti sani (Figura 13C).



**Figura 13.** A) Risultati dell'espressione di Mat1A e Mat2A, B) dell'attività specifica di MATI/MATIII, C) della concentrazione epatica di SAM e SAO in NL, DN, CE, di ratti F344 e BN.

## 5.2 Metilazione del promotore di Mat1a Mat2A

La nostra attenzione si è concentrata sull'analisi dell'espressione del gene Mat1A e Mat2A, e quanto questa sia dipendente dalla metilazione nei rispettivi promotori dei geni.

Lo stato di metilazione del promotore di Mat1A e Mat2A è stato analizzato attraverso l'analisi Southern, questa tecnica ci ha permesso di studiare la metilazione delle isole CpG di frammenti di DNA genomico, digeriti con gli enzimi di restrizione HpaII (enzima inibito quando le citosine interne delle sequenze CCGG sono metilate), MspI (enzima insensibile alla metilazione dei residui interni di citosine), dei promotori di Mat1A e Mat2A in tessuti normali e CE di ratti F344 e BN.

L'analisi Southern mostra lo stato di metilazione delle sequenze CCGG nel promotore di Mat1A i risultati ottenuti non mostrano differenze ne tra i CE e fegati controllo del ceppo suscettibile, ne differenze tra ceppi nel primo frammento del promotore, mentre nel secondo frammento osserviamo una ridotta digestione da parte di HpaII nei CE (quello più vicino all'ATG) del gene Mat1A che giustifica la ridotta espressione genica nei ratti F344. Non ci sono invece differenze di digestione da parte dei due enzimi MSPI e HpaII tra fegati controllo e CE dei ratti resistenti BN nel secondo frammento del gene Mat1A.

L'analisi di restrizione del promotore di Mat2A presenta l'assenza della banda più pesante dopo digestione con HpaII nei CE dei ratti suscettibili. Ciò indica un ipometilazione che spiegherebbe l'aumento di espressione e quindi, forse, di attività enzimatica di Mat2A.

L'analisi di digestione di questo primo frammento di Mat2A non presenta differenze tra fegato normale e CE nel ceppo BN resistente.

Dott.ssa Gavinella Latte.

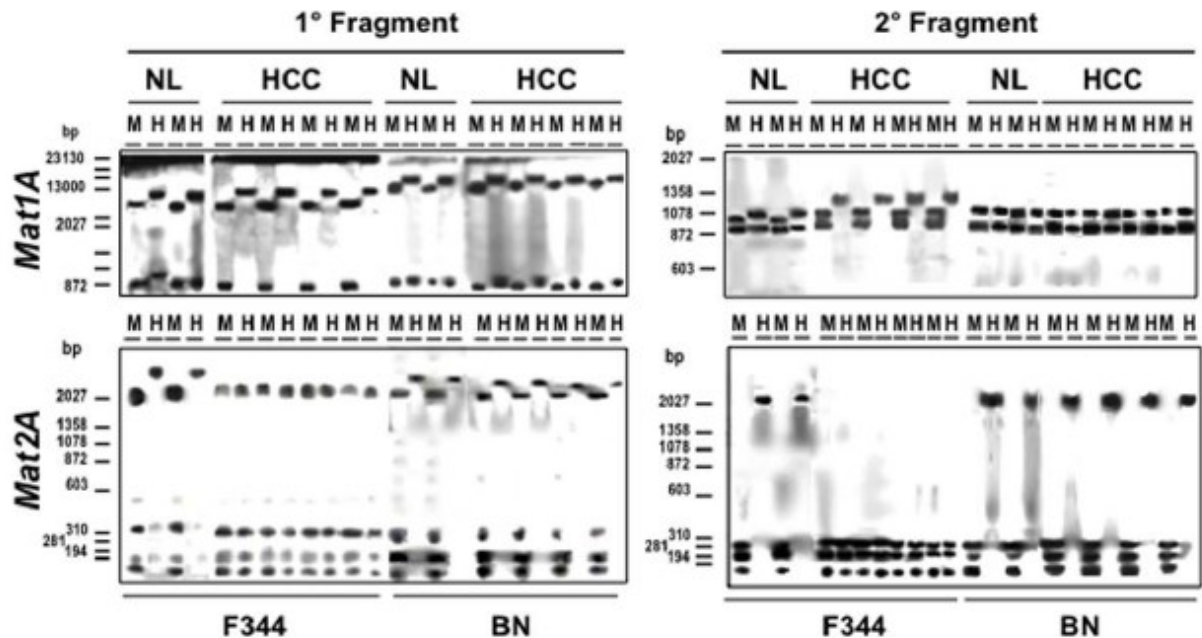
Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



Ipometilazione si osserva anche nel secondo frammento (quello più vicino all'ATG) di Mat2A sempre nei CE dei ratti F344. Ancora una volta come per Mat1A non ci sono differenze di digestione tra fegati normali e CE nel secondo frammento di Mat2A nei ratti BN.



**Figura 14.** Analisi southern dei frammenti I e II dei promotori di Mat1A e Mat2A digeriti con l'enzima HpaII, o MspI nel fegato sano, nei DN e nei CE di ratti F344 e BN.

Se con l'analisi southern si è potuto analizzare la metilazione del promotore di Mat1A e Mat2A attraverso l'attività enzimatica di MspI e HpaII; utilizzando la tecnica COBRA si è studiato lo stato di metilazione delle sequenze TCGA del promotore di Mat1A in posizione -1437 (sito I) e in posizione -1385 (sito II). Questa analisi mostra un significativa ipermetilazione nei carcinomi dei ratti F344 rispetto ai tessuti controllo per

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

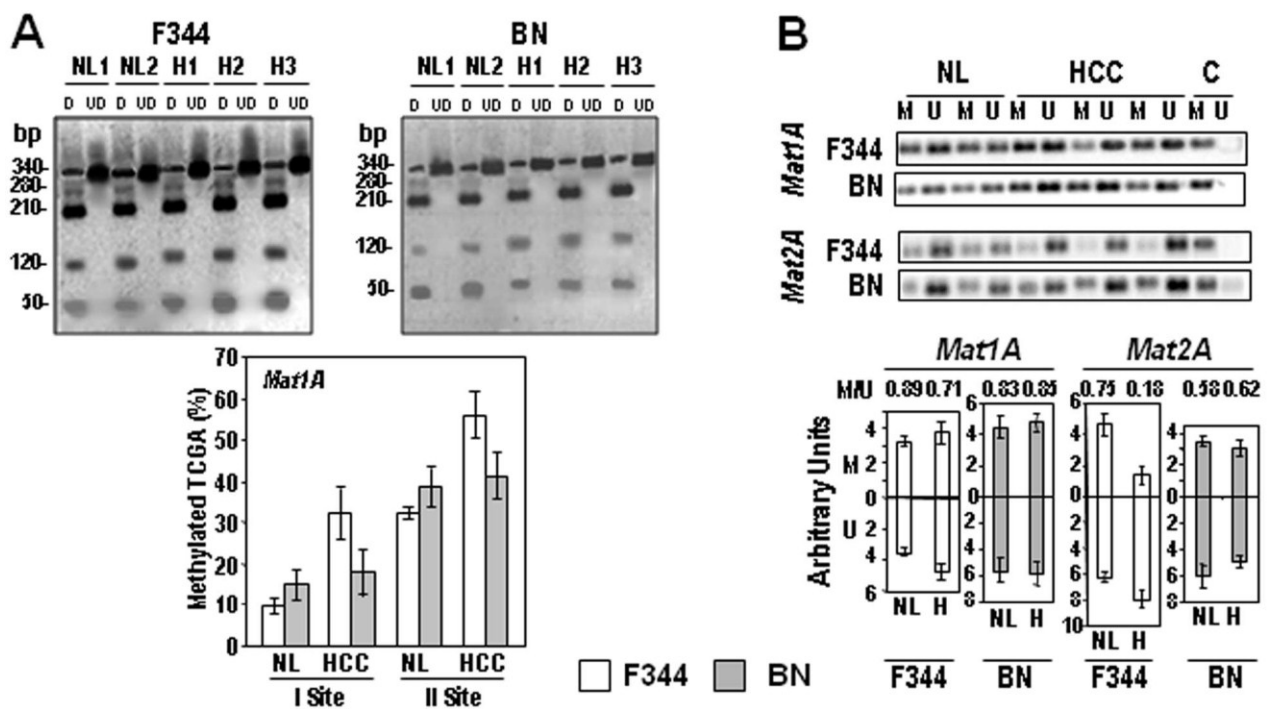
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

entrambi i siti. Nessuna differenza significativa tra carcinomi e tessuti controllo nel ceppo resistente BN.

Con la tecnica msPCR sono analizzati due frammenti del promotore di Mat1A, uno in posizione -765 e l'altro in posizione -458.

Nessuna differenza di metilazione è presente nelle isole CpG del promotore di Mat1A per entrambi i frammenti in entrambi i ceppi. Si presenta una riduzione di metilazione del promotore di Mat2A, nei carcinomi dei ratti F344 rispetto ai tessuti controllo.



**Figura 15.** A) Analisi COBRA del sito I e II del promotore di Mat1A. B) msPCR dei frammenti I e II dei promotori di Mat1A e Mat2A nel fegato sano e nei CE di ratto F344 e BN.

Nei CE dei ratti F344 e BN si è anche esaminato lo stato di metilazione delle isole CpG, presenti nei promotori di Mat1A e Mat2A attraverso la tecnica ERMA.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

Sono stati analizzati tre frammenti del promotore di Mat1A, contenente CpGs tra -1205: -909, 778: -573, e -658: -242, i risultati ottenuti tramite la tecnica ERMA mostrano un ipermetilazione significativa nei tumori dei ratti F344 rispetto ai tessuti controllo nel primo e nel terzo frammento. Nessuna differenza significativa si presenta nel ceppo BN. Per il promotore di Mat2A è stata fatta l'analisi di due frammenti, nei siti tra -837: -333 e -439: +66, i risultati ottenuti evidenziano un ipometilazione delle isole CpGs nei carcinomi dei ratti F344 nel primo e nel secondo frammento rispetto ai tessuti sani. Per i ratti BN si presenta un ipermetilazione nei carcinomi rispetto ai tessuti controllo solo nel secondo frammento.

Per completare la visione globale della metilazione del promotore dei geni MAT attraverso la tecnica Medip (Methylated DNA Immunoprecipitation) abbiamo analizzato la metilazione dei frammenti dei promotori dei geni MAT, situati nel sito di inizio di trascrizione. Dai dati ottenuti, si evince che non cambia lo stato di metilazione delle singole CpG nel promotore di Mat1A, nei carcinomi epatici rispetto ai fegati sani per entrambi i ceppi. Si osserva invece una riduzione di metilazione di ben 5 volte nel promotore di Mat2A nei CE di ratti F344 rispetto ai tessuti controllo (dato in accordo con l'analisi ERMA) e una riduzione non significativa di metilazione nei CE dei ratti BN rispetto al fegato sano.

La nostra indagine sullo studio dell'espressione genica dei geni Mat1A e Mat2A è proseguita con lo studio, attraverso la tecnica Chip, dell'acetilazione del DNA, meccanismo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica.

E' stata determinata l'acetilazione dell'istone H4, nel promotore di Mat1A e Mat2A. I risultati ottenuti con l'analisi ChIP mostrano un'ipoacetilazione istonica sul promotore

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

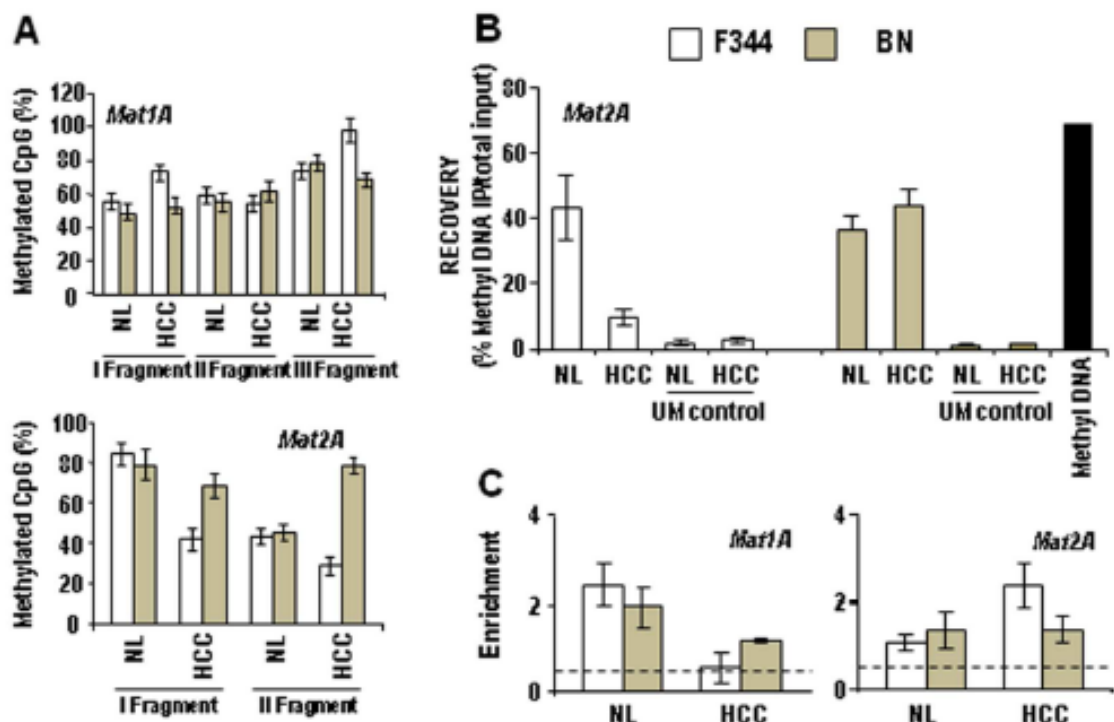
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

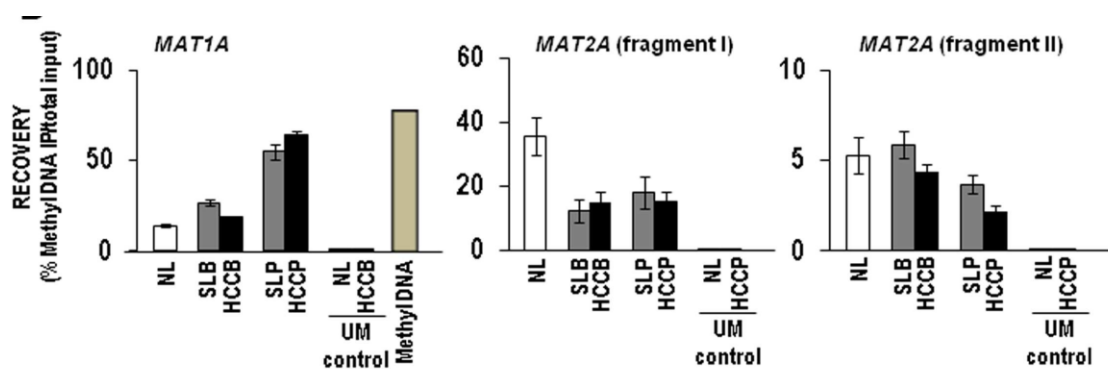
del gene Mat1A (che come sappiamo è inversamente proporzionale all'espressione del gene in questione) ed in'iperacetilazione sul promotore del gene Mat2A (direttamente proporzionale alla sua espressione), nei tumori dei ratti F344 rispetto ai tessuti controllo. Nei CE dei ratti BN, si osservano modificazioni significative rispetto ai tessuti controllo solo per ciò che concerne l'acetilazione del promotore di Mat1A, in cui si presenta un ipoacetilazione nei CE rispetto ai fegati sani, mentre non si osservano modificazioni significative di acetilazione nel promotore di Mat2A (Figura 16 C).

Oltre a campioni epatici di ratto, con l'analisi medip abbiamo voluto analizzare e valutare, lo stato di metilazione dei CE umani a buona e cattiva prognosi, i dati ottenuti mostrano un aumento da 3.8 a 4.3 volte nella metilazione del promotore di Mat1A negli SLP/HCCP, e nessun significativo cambiamento di metilazione nei SLB/HCCB, se comparati al fegato sano (Figura 17).

La metilazione del promotore di Mat2A tra -440 e-121 diminuisce da 1.9 a 3 volte sia in SLB/HCCB che in SLP/HCCP. Una riduzione significativa di metilazione è presente anche a -121 e +100 sia negli HCCB, che negli SLP e negli HCCP.



**Figura 16.** A) Analisi ERMA del frammento I,II,III del promotore del gene Mat1A, e del I e II frammento del promotore del gene Mat2A, in tessuti di fegato sano e CE di ratti F344 e BN. B) Analisi Medip di Mat2A tra -124 e +10 paia di basi. C) Acetilazione dell'istone H4 in tessuti di fegato sano e CE di ratti F344 e BN.



**Figura 17.** Analisi di Mat1A e Mat2A con la tecnica meDIP in tessuti umani NL, SLB,HCCB,SLP,HCCP.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

### **5.3 Espressione proteica di AUF1 e HuR legate all'mRNA di Mat1A e Mat2A**

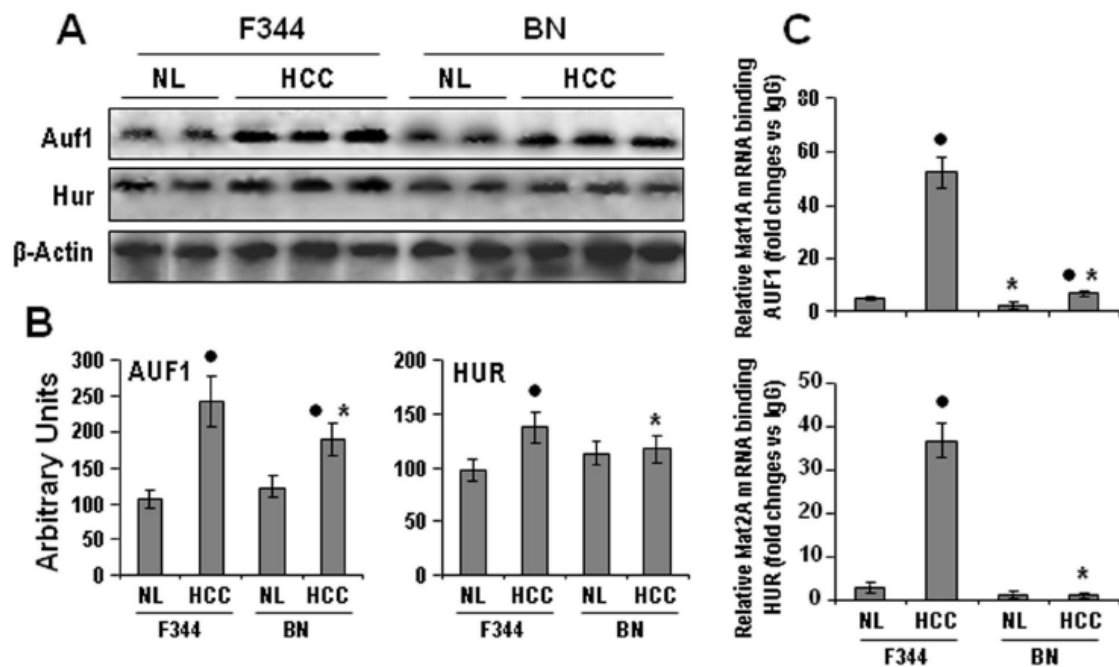
Recenti lavori hanno mostrato un aumento dei livelli di HuR e AUF1 in tessuti di epatocarcinoma umano, suggerendo una deregolazione post-trascrizionale dei geni MAT in CE umani.

Abbiamo voluto studiare la possibile interazione di AUF1 e HuR con l'mRNA di Mat1A e Mat2A in CE di ratto e umano.

I dati ottenuti mostrano un elevato aumento dei livelli proteici di AUF1 nei CE sia del ceppo suscettibile F344 che in quello resistente BN rispetto al fegato sano (Figura 18B).

L'espressione proteica di HuR presenta un aumento nei CE dei ratti suscettibili rispetto al fegato sano, ma non si osservano cambiamenti significativi nell'espressione proteica di HuR tra tessuti sani e CE dei ratti BN.

Attraverso l'immunoprecipitazione delle ribonucleoproteine Mat1A-AUF1 e Mat2A-HuR, i risultati ottenuti hanno mostrato che la ribonucleoproteina Mat1A-AUF1 aumenta di 10 volte nei CE dei ratti suscettibili rispetto ai tessuti di fegato sano e 2 volte nei CE dei ratti BN sempre rispetto al fegato sano. Ciò contribuisce a destabilizzare l'mRNA di Mat1A. La ribonucleoproteina Mat2A-HuR come la ribonucleoproteina Mat1A-AUF1 aumenta 10 volte nei CE dei ratti suscettibili rispetto ai tessuti di fegato sano, mentre non cambia nei CE dei BN rispetto al fegato sano.



**Figura 18.** A) Rappresentazione di dati western blot di AUF1 e HuR. B) Analisi di chemiluminescenza (media  $\pm$  DS di 3 ratti per il controllo e 5 per i CE), la densità delle bande è stata normalizzata con i livelli di  $\beta$ -actina ed espressa in unità arbitrarie (arbitrary units). C) Complessi mRNA-proteina e IgG immunoprecipitate con specifico anticorpo, l'RNA è stato isolato, convertito in cDNA e analizzato con qPCR. Le ribonucleoproteine AUF1 e HuR sono state calcolate come variazioni di numeri di volte rispetto alle IgG.

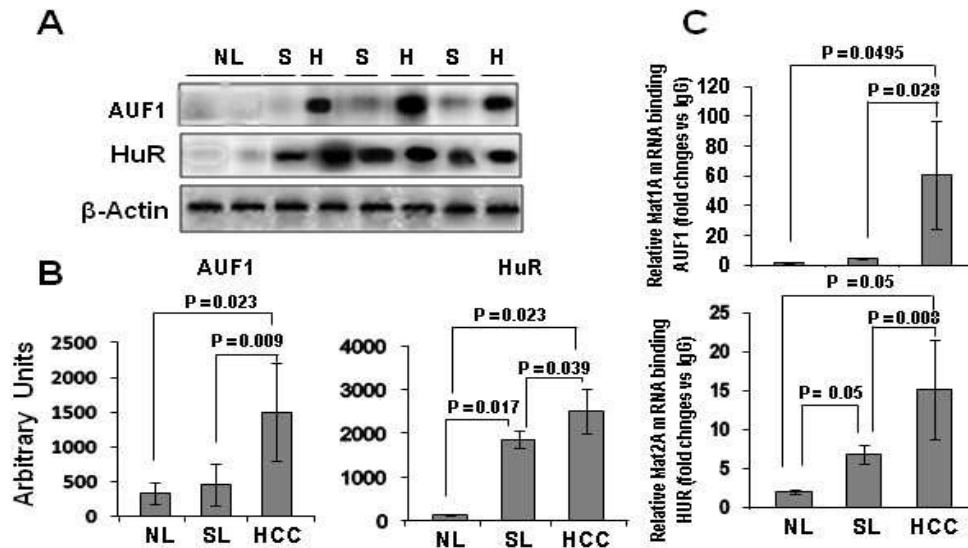
Lo studio è stato condotto anche in tessuti di fegato umano: si è osservato che negli epatocarcinomi si presenta un aumento significativo della ribonucleoproteina Mat1A-AUF rispetto ai fegati sani, per Mat2A-HuR l'aumento si presenta non solo negli epatocarcinomi ma anche nei fegati apparentemente sani circostante la lesione rispetto al tessuto sano.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



**Figura 19.** A) Rappresentazione di dati western blot di AUF1 e HuR in campioni umani.

B) Analisi di chemiluminescenza (media  $\pm$  DS di 3 tessuti umani per il controllo e 6 per i CE con i corrispondenti tessuti circostanti), la densità delle bande è stata normalizzata con i livelli di  $\beta$ -actina ed espressa in unità arbitrarie (arbitrary units). C) Complessi mRNA-proteina e IgG immunoprecipitate con anticorpo specifico, l'RNA è stato isolato, convertito in cDNA e analizzato con qPCR. Le ribonucleoproteine AUF1 e HuR sono state calcolate come variazioni di numeri di volte rispetto alle IgG.

Abbiamo studiato in vitro quanto la metilazione e la regolazione post-trascrizionale possa influire nella regolazione del rapporto Mat1A:Mat2A. Nelle cellule Huh7 abbiamo analizzato gli effetti dell'ipometilazione del DNA e il silenziamento di AUF1 sull'espressione del gene Mat1A. I dati mostrano che nelle cellule trattate con azacitidina si ha una riduzione di metilazione del promotore di Mat1A da 3 a 9 volte e un aumento da 6 a 9 volte dell'espressione del gene Mat1A. Le cellule trattate con siRNA specifico per silenziare AUF1 presentano una riduzione dell'espressione di AUF1 da 1.6 a 2.5 volte e un aumento dell'espressione di Mat1A da 2 a 3.5 volte. Questi dati indicano che

Dott.ssa Gavinella Latte.

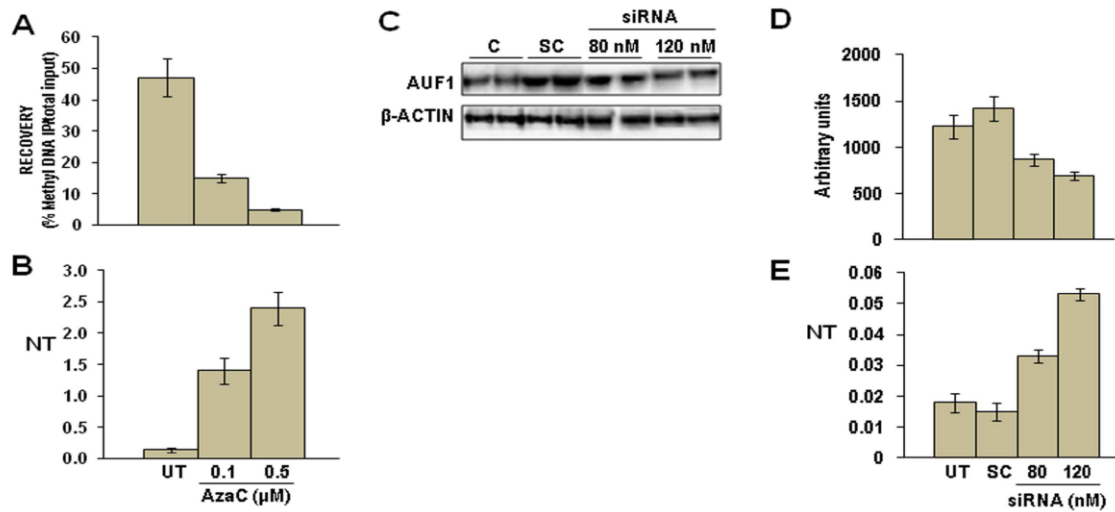
Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



sia lo stato di metilazione del promotore che la modulazione dell'espressione di AUF1, possono contribuire alla deregolazione dell'espressione di Mat1A e del rapporto Mat1A:Mat2A nei CE delle cellule.



**Figura 19.** Effetti dell'ipometilazione del DNA e il silenziamento di AUF1 sull'espressione di Mat1A nelle cellule Huh7, analisi meDIP della metilazione del promotore di Mat1A e Mat2A tra +100 e -370 paia di basi. **A)** % di DNA metilato in cellule non trattate e cellule incubate per 24 ore con 0.1 o 0.5 μM di 5-azacitidina. **B)** Espressione di Mat1A. **C)** Rappresentazione western blot e analisi di chemiluminescenza dell'espressione di AUF1. **D)** Espressione di AUF1 in cellule non trattate e incubate con siRNA di AUF1. **E)** Espressione di Mat1A nelle medesime cellule.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

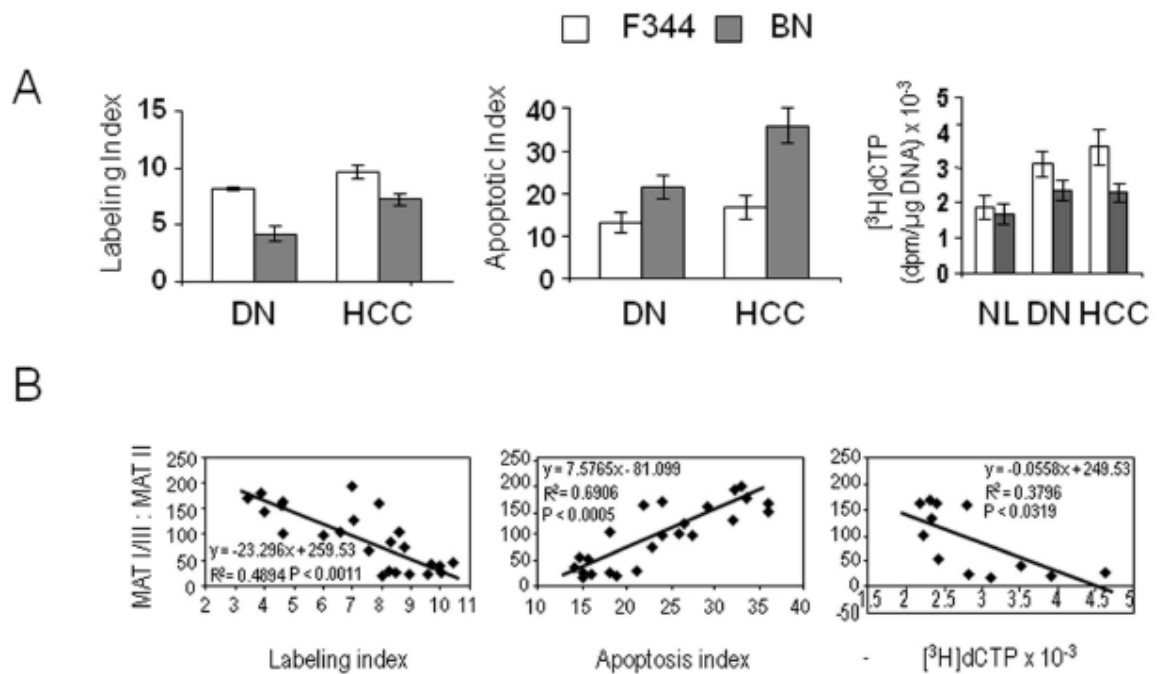
#### **5.4 L'attività di MATI/III e la correlazione con parametri diagnostici**

Una riduzione del rapporto di espressione Mat1A:Mat2A e una riduzione del rapporto dell'attività MATI/III:MATII nei CE dei ratti F344 suggerisce che questi parametri possono influenzare la progressione del tumore e sono da considerarsi come marker prognostici. Per validare questa ipotesi è stata fatta la correlazione tra il rapporto MATI/III:MATII con vari parametri relativi alla progressione dell'epatocancerogenesi umana e del ratto.

Per il ceppo F344 non si ha alcuna differenza tra DN e CE sulla sintesi del DNA, che però è sempre maggiore rispetto al fegato sano, mentre si presenta un aumento di sintesi solo nei CE dei BN che è maggiore rispetto ai DN e al fegato di controllo.

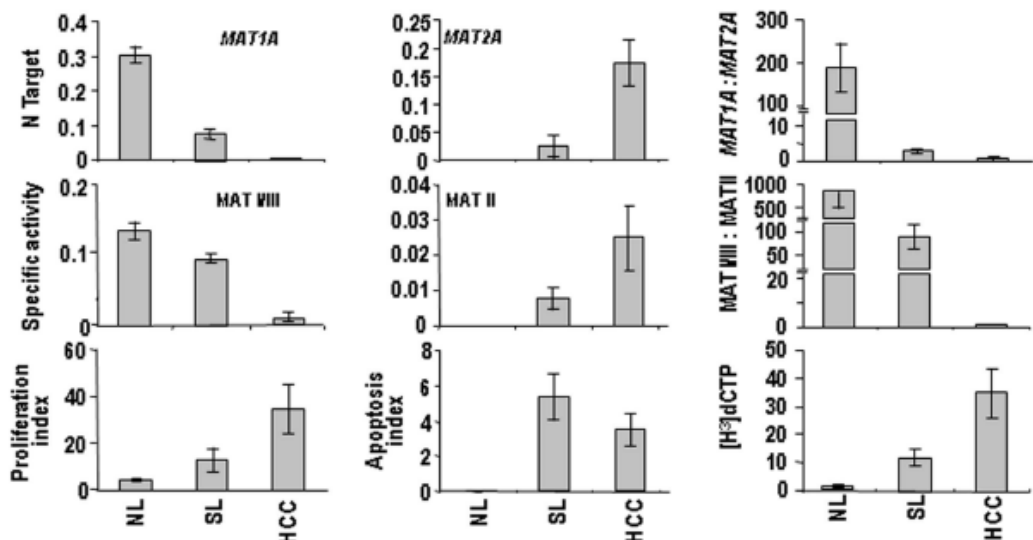
Un aumento nell'indice apoptotico si presenta nei CE del ceppo BN non solo rispetto alle lesioni preneoplastiche dello stesso ceppo ma anche rispetto alle lesioni e ai CE del ceppo suscettibile.

Il rapporto MATI/III:MATII e il rapporto dell'espressione di Mat1A:Mat2A sono correlati negativamente con la sintesi del DNA e correlati positivamente con l'apoptosi nelle lesioni di entrambi i ceppi. Una correlazione negativa del rapporto MATI/III:MATII con (<sup>3</sup>H)dCTP indica una correlazione positiva con la metilazione del DNA.



**Figura 20.** Relazione tra l'attività di MATI/III:II, l'indice apoptotico e la metilazione globale del DNA. **A)** L'indice apoptotico è espresso in percentuale di nuclei BrdUp positivi e cellule apoptotiche. **B)** Analisi delle regressioni lineari in accordo al coefficiente di Pearson con il coefficiente di determinazione.

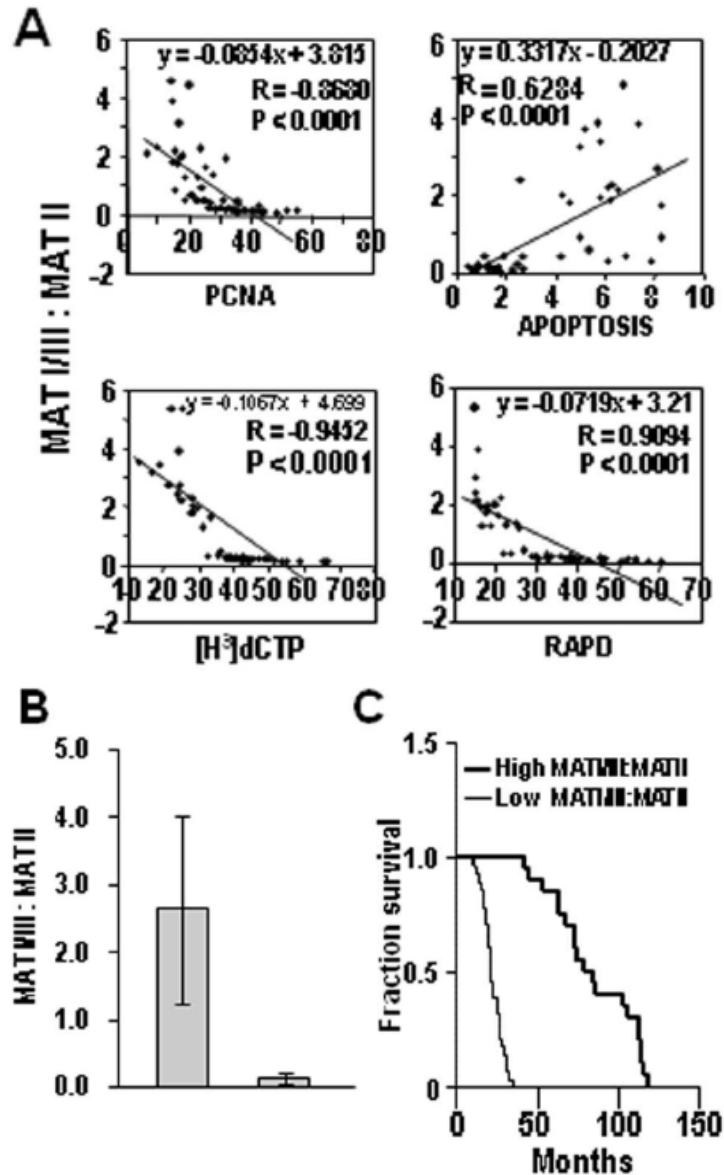
L'analisi di 48 CE umani ha mostrato una significativa riduzione di espressione del gene Mat1A ed una ridotta attività di MATI/III nei fegati circostanti la lesione e negli epatocarcinomi comparati con i fegati sani. Si presenta invece un aumento progressivo di espressione genica di Mat2A e dell'attività di MATII nei fegati circostanti la lesione e negli epatocarcinomi comparati con i fegati sani. Questi cambiamenti vanno associati ad un progressivo aumento nella proliferazione, ad un aumento dell'indice apoptotico ed una riduzione nella metilazione globale del DNA, nei fegati circostanti la lesione e negli epatocarcinomi sempre comparati con fegati sani



**Figura 21** . Espressione di Mat1A e Mat2A, indice di proliferazione e indice apoptotico, metilazione del DNA in CE umani e tessuti sani circostanti la lesione. L’espressione del gene è stata valutata attraverso qPCR e i risultati espressi con la media e la  $\pm$ DS di 48 CE e i corrispettivi SL.

L’analisi di correlazione rivela una correlazione negativa dell’espressione Mat1A:Mat2A e del rapporto che compara l’attività MATI/III a quella di MATII con l’espressione di PCNA, con l’instabilità genomica, e una correlazione positiva con la metilazione globale del DNA e con l’apoptosi.

L’analisi Cox ha mostrato che il rapporto MATI/III:MATII è significativamente predittivo in pazienti a lunga sopravvivenza. Con un Hazard ratio di 0.811, un intervallo di confidenza compreso tra 0.663 e 0.993,  $P=0.042$ . L’analisi della varianza indica che il rapporto MATI/III:MATII è associato alla sopravvivenza, all’età dei pazienti, all’eziologia, al grado del tumore, all’espressione di PCNA, alla metilazione del DNA.



**Figura 22.** A) Relazione tra MATI/III:MATII, indice di proliferazione, indice apoptotico, metilazione globale de DNA, instabilità genomica. B) Rapporto tra MATI/III:MATII in due distinti sottogruppi di pazienti con CE,(buona e cattiva prognosi) C) Curva di sopravvivenza Kaplan Meier di CE umani con alto e basso rapporto MATI/III:MATII.

Dott.ssa Gavinella Latte.

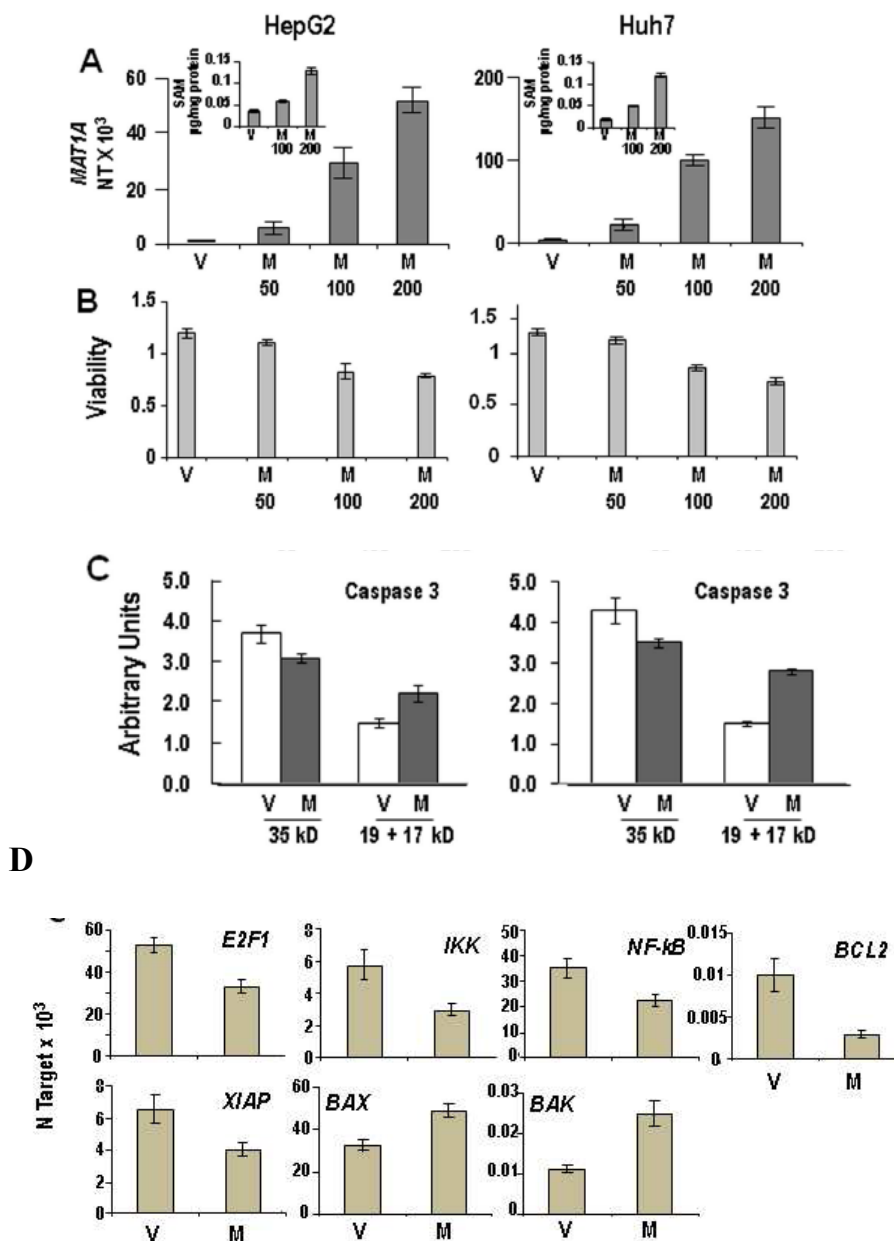
Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

## **5.5 Effetti dell'iperpressione di Mat1A nei CE umani e linee cellulari**

Tutti i risultati ottenuti suggeriscono che l'espressione di Mat1A e il rapporto Mat1A:Mat2A hanno un ruolo importante nella soppressione della crescita e nell'induzione dell'apoptosi nei CE umani. I livelli di SAM modulano l'attività di IKK- $\beta$  nelle cellule che crescono in vitro e interagiscono nell'attivazione di NF- $\kappa$ B nei foci preneoplastici dei ratti. Abbiamo valutato gli effetti dell'iper regolazione di Mat1A sulla proliferazione, sull'apoptosi, e sulla cascata di segnale IKK-NF- $\kappa$ B nei CE umani e in linee cellulari trasfettate con Mat1A e si è visto che la trasfezione con Mat1A aumenta di 70-95 volte l'espressione del gene medesimo a 96 ore dal trattamento, aumenta da 5 a 7 volte i livelli di SAM; presenta un aumento nell'apoptosi, (dato spiegato attraverso il clivaggio della caspasi 3) nelle cellule HepG2 e Huh7. Tutto questo è associato ad una sottoregolazione significativa dei geni: ciclina D1, E2F, IKK, NF- $\kappa$ B, e geni antiapoptotici come BCL2 e XIAP, e una sovra-regolazione di geni proapoptotici come BAK e BAX, nelle cellule a 72 e 96 ore dopo la trasfezione.



**Figura 23.** Espressione di Mat1A in HepG2 e Huh7 alle 72 e 96 ore, dopo trattamento con vettore vuoto e con vettore contenente cDNA di Ma1A. **B)** Vitalità cellulare delle cellule HepG2 e Huh7 a 72 e 96 ore dopo trasfezione. **C)** Clivaggio della caspasi 3 nelle cellule HepG2 e Huh7 a 72 e 96 ore dopo trasfezione con vettore vuoto o vettore contenente cDNA di Mat1A. **D)** Espressione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare, antiapoptotici e proapoptotici

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

## 6. Conclusioni e Discussione

L'espressione di MAT1A e il rapporto di MAT1A:MAT2A sono i due maggiori determinanti del contenuto di SAM nelle cellule epatiche del ratto e dell'uomo; essi influenzano largamente la proliferazione cellulare epatica e la tumorigenesi<sup>57</sup>.

I risultati ottenuti nel nostro lavoro, mostrano una riduzione di espressione di Mat1A e dell'attività di MATI/III, un aumento dell'espressione di Mat2A e dell'attività di MATII e una riduzione del rapporto Mat1A:Mat2A e MATI/III:MATII nei DN e nei CE dei ratti geneticamente suscettibili all'epatocancerogenesi. L'espressione di Mat1A e Mat2A e degli isoenzimi MAT non cambiano significativamente o cambiano molto poco nei DN e CE dei ratti geneticamente resistenti all'epatocancerogenesi.

Cambiamenti nell'espressione dei geni MAT e degli isoenzimi MAT come quelli osservati nei CE dei ratti F344, si presentano nei CE umani. Nei CE umani abbiamo osservato metilazione della sequenza CCGG del promotore di Mat1A e ipometilazione della sequenza CCGG del promotore di Mat2A. In accordo con questi dati, la metilazione prevalente nelle isole CpG si accompagna a deacetilazione dell'istone H4 del promotore di Mat1A, l'ipometilazione prevalentemente nelle isole CpG ad acetilazione dell'istone H4 del promotore Mat2A nei CE dei ratti F344. Quando abbiamo analizzato le regioni intorno all'ATG dei due geni MAT (da +10 a -778 pb e da +66 a -837 pb per Mat1A e Mat2A rispettivamente) attraverso la tecnica ERMA, abbiamo osservato che circa l'82 % e il 60% delle isole CpG sono state metilate nel promotore di Mat1A dei CE degli F344 e dei BN. La metilazione del 85-86% delle isole CpG è presente intorno all'ATG del promotore Mat1A nei CE delle cellule Huh7. Per quanto riguarda il promotore di Mat2A il 68% delle isole CpG non sono metilate negli F344 e il 20% non lo

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.



sono nei CE dei BN. Nel caso dei CE umani il 62% delle isole CpG del promotore di Mat1A sono metilate negli HCCP, mentre solo il 25% negli HCCB. Il promotore di Mat2A è ipometilato, nessuna differenza si presenta tra HCCP e HCCB. Queste differenze si presentano anche nei CE dei due ceppi di ratto.

Il meccanismo che regola la metilazione nell'epatocancerogenesi è ancora sconosciuto. L'interazione delle DNMT con la cromatina, inducono la metilazione del DNA e la loro attività può essere ridotta dall'acetilazione istonica.

La soppressione dell'espressione genica è frequentemente associata con lo stato di metilazione del DNA e di acetilazione degli istoni, in una struttura della cromatina piuttosto densa; mentre l'attivazione di espressione genica è legata ad un DNA non metilato, ad una acetilazione istonica condizioni che favoriscono una cromatina aperta e quindi più accessibile.

Questi risultati mostrano anche un ruolo di regolazione post-trascrizionale dei geni MAT nella progressione e nell'aggressività del tumore. Abbiamo osservato un aumento dei livelli proteici di AUF1 e HuR e la loro interazione rispettivamente con i messaggeri di Mat1A e Mat2A nei CE di ratto e di uomo. Visto che la proteina AUF1 induce la degradazione del messaggero di Mat1A e HuR promuove la stabilizzazione del messaggero di Mat2A, questo spiegherebbe in parte la riduzione di espressione del gene Mat1A e l'aumento di Mat2A nei CE. L'interazione AUF1-Mat1A e HuR-Mat2A è molto bassa nei CE dei ratti BN, in questi ratti non abbiamo osservato alcun cambiamento di espressione dei due geni, comparando tra CE e fegato sano. Tutto ciò indica che la metilazione dei promotori di Mat1A e Mat2A e la loro regolazione post-trascrizionale può influenzare la suscettibilità dei ratti al CE. Questo indica che la

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocancerogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

regolazione epigenetica contribuisce creare un fenotipo suscettibile/resistente all'epatocancerogenesi.

In accordo con quanto detto possiamo concludere che il rapporto Mat1A:Mat2A e MATI/III:MATII possono essere considerati dei marcatori prognostici per il CE.

1. Il rapporto Mat1A:Mat2A e MATI/III:MATII sono correlati negativamente con la proliferazione e positivamente con l'apoptosi cellulare.
2. La diretta correlazione tra MATI/III:MATII e la metilazione globale del DNA, e la correlazione negativa con l'instabilità genomica, sono meccanismi importanti nella progressione tumorale.
3. Il rapporto MATI/III:MATII è strettamente correlato alla sopravvivenza del paziente.

I legami funzionali tra i livelli cellulari di SAM e le vie di segnale (NFkB, ERK, etc.) sono rafforzati dall'osservazione che l'attività di MATI/III e il rapporto tra MATI/III:MATII sono correlati negativamente con il livello di proliferazione e positivamente con l'apoptosi nei CE. La correlazione positiva tra l'attività di MATI/III la metilazione globale del DNA, l'apoptosi e la correlazione negativa tra l'instabilità genomica e la progressione tumorale <sup>63</sup>, suggeriscono la possibilità che l'attività di MATI/III e l'espressione Mat1A siano marcatori prognostici del CE. Ciò suggerisce che nell'uomo, come nell'epatocancerogenesi del roditore, una precoce deregolazione del rapporto di MATI/III:MATII potrebbe influenzare l'evoluzione da lesioni preneoplastiche a cancro.

La trasfezione di Mat1A in vitro in cellule di CE porta ad una inibizione della crescita<sup>57-58</sup> nonché una diminuzione nell'espressione di IKK (che a sua volta inibisce l'inibitore di

NF-Kb), I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF-kB, Erk1/2, il maggior effettore della cascata delle MAPK, E2F1, essenziale per la transizione del ciclo cellulare G1/S, e i geni anti-apoptotici BCL2 e XIAP. I meccanismi alla base dei cambiamenti dell'espressione genica nelle cellule del CE con sovraespressione di Mat1A forzata, sono sconosciuti. Molte osservazioni indicano che la SAM è coinvolta in numerosi processi biologici. Elevati livelli di SAM sono associati ad elevata metilazione globale del DNA ed a lenta crescita, mentre l'ipometilazione del DNA aumenta la crescita di lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche<sup>64</sup>. Inoltre, la SAM ha un effetto antiossidante<sup>65</sup> ed interferisce con l'attività di diversi geni e proteine correlati alla crescita. La somministrazione di SAM nei ratti inibisce l'attività dell'ornitina decarbossilasi e la sintesi di poliammine in lesioni epatiche preneoplastiche, un effetto attribuito alla 5-metiliodenosina prodotta in elevata quantità dai trattamenti con SAM<sup>66</sup>. Questo inibisce anche il lipopolisaccaride indotto dal TNF- $\alpha$  e l'espressione di iNOS nel fegato di topo e nella linea cellulare RAW 264.7<sup>68</sup>, e aumenta la sintesi della proteina I $\kappa$ B- $\alpha$  agendo sul gene corrispondente<sup>69</sup>. Inoltre, la SAM stabilizzando la proteina APEX1<sup>69</sup>, deputata alla riparazione del DNA favorisce così il mantenimento della stabilità genomica. Così, una bassa attività di MAT1/III e un basso contenuto di SAM nel fegato precanceroso e nel CE di ratti suscettibili favorisce un aumento dello stress ossidativo e nitrativo, instabilità genomica, la sovraespressione di NF-kB e l'aumento di crescita. Si ha anche l'iperespressione dei geni regolati dai fattori nucleari, come c-Myc, Ciclina D1, iNos e VegfA<sup>68,69</sup>. E' interessante notare che la transizione G1/S e l'attività RAS/ERK, l'espressione di NF-kB, e dei suoi target, sono più bassi significativamente nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei ratti BN e

nelle cellule del CE umane di pazienti con una migliore prognosi, rispetto ai ratti F344 e ai CE con una peggiore prognosi.

E' interessante anche notare che il gene Mat1A è localizzato sul cromosoma 16 di ratto, tra i microsatelliti D16Mit2 e D16Rat6, vicino al picco di LOD score del locus di suscettibilità, Hcs4. La sua posizione nel genoma non indica, di per se, che Mat1A sia un gene modificatore del tumore. In realtà i nostri risultati indicano che l'attività di Mat1A è almeno influenzata da geni modificatori delle capacità di sviluppo neoplastico.

## **Bibliografia**

1. American Cancer Society. Cancer Facts and FIGS 2005.
2. **Badvie S.** Hepatocellular carcinoma. Postgrad. Med. J. 76, 4-11, 2000
3. **Feitelson M.A., Sun B., Tufan N.L.S., Liu J., Pan J., Lian Z.** Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. Oncogene 21, 2593-2604, 2002
4. **Sherman M.** Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. Seminar Liver Dis. 25, 143-154, 2005
5. **Ballardini G., Groff P., Zoli M., Bianchi G., Giostra F., Francesconi R., Lenzi M., Zauli D., Cassani F., Bianchi F.** Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrosis and with high hepatocellular proliferation. J. Hepatol.2, 218-22, 1994
6. **Farazi P.A., DePinho R.A.** Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. Nature Rev. Cancer 6, 674-687, 2006
7. **Okuda K.** Hepatocellular carcinoma. J. Hepatol 32, 225-237, 2000
8. **Hasan F., Jeffers L.F., De Medina M., Reddy K.R., Parker T., Schiff R., Houthon M., Choo Q.L., Kuo G.** Hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. Hepatology 12, 589-591, 1990
9. **Gruner B.A., De Napoli T.S., Andrews W., Tomlinson G., Bowman L., Weitman S.D.** Hepatocellular carcinoma in children associated with Gardner syndrome or familial adenomatous polyposis. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 20, 274-278, 1998

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

10. **Chaubert P., Gayer R., Zimmermann A., Fontollet C., Stamm B., Bosman F., Shaw P.** Germ-line mutations of the p16INK4(MTS1) gene occur in a subset of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25, 1376-1381, 1997.
11. **Feo F., De Miglio M.R., Simile M.M., Muroli M.R., Calvisi D.F., Frau M., Pascale R.M.** Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretative analysis of rHCCent developments on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1765, 126-147, 2006.
12. **Liu C.J., Kao J.H.** Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc.* 2007 Apr;70(4):141-5.
13. **Bosch F.X., Ribes J., Díaz M., Cléries R.** Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S5-S16.
14. **Ito Y., et al.** Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 2001; 84: 1377-1383.
15. **Daveau M. et al.** Hepatocyte growth factor, transforming growth factor- $\alpha$ , and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.* 2003; 36: 130-141.
16. **Wang R., Ferrel L.D., Faouzi S., Maher J.J. & Bishop J.M.** Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 2001; 153: 1023-1034.
17. **Feo F., Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Muroli M.R., Calvisi D.F.** Genetic alterations in liver carcinogenesis. *Crit Rev Oncog* 11: 19-62, 2000.

18. **Feo F., De Miglio M.R., Simile M.M., Muroi M.R., Calvisi D.F., Frau M., Pascale R.M.** Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretative analysis of recent developments on genetic predisposition. *BBA Cancer Rev* 1765:126–147, 2006
19. **Kanai Y. et al.** Aberrant DNA methylation on chromosome 16 is an early event in hepatocarcinogenesis. *Jpn J. Cancer Res.* 1996; 87: 1210-1217.
20. **Yu J. et al.** Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *Cell Res.* 2003; 13: 319-333.
21. **Feitelson M.A. et al.** Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604.
22. **Wong I.H. et al.** Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 1999; 59: 71-73.
23. **Matsuda Y., Ichida T., Matsuzawa J., Sugimura K. & Asakura H.** p16(INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1999; 116: 394-400.
24. **Liew C.T. et al.** High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 789-795.
25. **Murata H. et al.** Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Lab. Invest.* 2004; 84: 1050-1059.
26. **Kubo T. et al.** Apoptotic speck protein-like, a highly homologous protein to apoptotic speck protein in the pyrin domain, is silenced by DNA methylation and

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

- induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 5172-5177.
27. **Wong C.M., Lee J.M., Ching Y.P., Jin D.Y. & Ng IO.** Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 7646-7651.
28. **Maeta Y., Shiota G., Okano J. & Murawaki Y.** Effect of promoter methylation of the p16 gene on phosphorylation of retinoblastoma gene product and growth of hepatocellular carcinoma cells. *Tumour Biol.* 2005; 26: 300-305.
29. **McGlynn K.A., London W.T.** Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Prac Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19(1): 3-23.
30. **Calvisi D.F., Ladu S., Gorden A., Farina M., Conner E.A., Lee J.S, Factor V.M. and Thorgeirsson S.S.** Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130(4): 1117-1128.
31. **Bromberg J., Darnell J.E. Jr.** The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19: 2468-2473.
32. **Browmann T., Garcia R., Turkson J., Jove R.** STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-2488.
33. **Toscani A., Mettus R.V., Coupland R., et al.** Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature* 1997; 386: 713-717.
34. **Trauth K., Mutschler B., Jenkins N.A., et al.** Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13: 5994-6005.



35. **Shin D.H., Lee H.V., Jeon G.S., et al.** Constitutive expression of c-myc mRNA in the adult rat brain. *Brain Res* 2001; 892: 203-207.
36. **Orphanides & Reinberg,** A unified theory of gene expression *cell*. 2002 108(4):439-51.
37. **Breeden et al.** Periodic transcription: a cycle within a cycle *Curr Biol*. 2003 Jan 8;13(1):R31-8.
38. **Garneau N.L., Wilusz J., Wilusz C.J.** The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):113-26.
39. **Selinger D.W., Saxena R.M., Cheung K.J., Church G.M.** Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res*. 2003 Feb;13(2):216-23.
40. **Yang L., Mei Q., Zielinska-Kwiatkowska A., Matsui Y., Blackburn M.L., Benedetti D., Krumm A.A., Taborsky G.J. Jr., Chansky H.A.** An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J*. 2003 Feb 1;369(Pt 3):651-7.
41. **Fasken M.B., Corbett A.H.** Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Jun;12(6):482-8.
42. **Conne B., Stutz A., Vassalli J.D.** The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med*. 2000 Jun;6(6):637-41.
43. **Raghavan A., Robison R.L., McNabb J., Miller C.R., Williams D.A., Bohjanen P.R.** HuA and tristetraprolin are induced following T cell activation

and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J Biol Chem.* 2001 Dec 21;276(51):47958-65.

44. **Chen C.Y., Shyu A.B.** AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 1995 Nov;20(11):465-70.
45. **Raineri I., Wegmueller D., Gross B., Certa U., Moroni C.** Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2004 Feb 19;32(4):1279-88. Print 2004.
46. **Perona R., Sanchez-Perez I.,** Control of oncogenesis and cancertherapy resistance. *British Journal of Cancer* (2004) 90: 573-577.
47. **Solt D.B., Medline A., Farber E.** Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol.* (1977) Sep;88(3):595-618.
48. **Wood G.A., Sarma D.R.S., Archer M.C.** Resistente to promotion of glutatione S-transferasi 7-7 liver lesions in Copenhagen. *Carcinogenesis* (1999) 20:1169-117.
49. **Feo F., Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Muroli R.M., Calvisi D.F.** Genetic alteration in liver carcinogenesis: implication for new preventive and therapeutic strategies (2000). *Critic Rev Oncogen* 11, 19- 62.
50. **Calvisi D.F., Pascale R.M., Feo F.** Dissection of Signal Transduction Pathways as a tool for the Development of Targeted Therapies of Hepatocellular Carcinoma. *Recent Clinical Trials* 2, 217-236,2007.
51. **Orlando V., Strutt H., Paro R.** Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross linking methods (1997), 11: 305-314.

Dott.ssa Gavinella Latte.

Ruolo della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale della metionina adenosiltrasferasi nel corso dell'epatocarcinogenesi.

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari.

52. **Orlando V., et al.** Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-cross linked-chromatin immunoprecipitation. *Trends biochem sci.* (2000), 25: 99-104.
53. **O'neill L.P., Turner B.M.,** Immunoprecipitation of chromatin methods *enzymol.*1996 274: 189-97.
54. **Zing J.M., Jones P.A.,** Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:869-82.
55. **Esteller X.** Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007;16:R50-9.
56. **Garcea R., Daino L., Pascale R.M., et al.** Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis* 1989;10:1183-92.
57. **Lee S., Lee H.J., Kim J.H., Lee H.S., Jang J.J., Kang G.H.** Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003;163:1371-8.
58. **Mato J.M., Corrales F.J., Lu S.C., Avila M.A.** S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J* 2002;16:15–26.
59. **Cai J., Sun W.M., Hwang J.J., Stain S.C., Lu S.C.** Changes in S-adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance. *Hepatology* 1996;24:1090-7.

60. **Pascale, R.M., Simile M.M., Satta G., et al.** Comparative effects of L-methionine, S-adenosyl-L-methionine and 5'-methylthioadenosine on the growth of preneoplastic lesions and DNA methylation in rat liver during the early stages of hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res* 1991;11:1617-24.
61. **Garcea R., Daino L., Pascale R.M., et al.** Inhibition of promotion and persistent nodule growth by S-adenosyl-L-methionine in rat liver carcinogenesis: role of remodeling and apoptosis. *Cancer Res* 1989;49:1850-6.
62. **Pascale R.M., Marras V., Simile M.M., et al.** Chemoprevention of rat liver carcinogenesis by S-adenosyl-L-methionine: a long-term study. *Cancer Res* 1992;52:4979-86.
63. **Feo F., Frau M., Tomasi M.L., Brozzetti S., Pascale R.M.** Genetic and Epigenetic Control of Molecular Alterations in Hepatocellular Carcinoma. *Exp Biol Med.* 2009 May 8. [Epub ahead of print].
64. **Martínez-Chantar M.L., Corrales F.J., Martínez-Cruz L.A., et al.** Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J* 2002;16:1292-4.
65. **Pascale R.M., Simile M.M., Ruggiu M.E., et al.** Reversal by 5-azacytidine of the S-adenosyl-L-methionine-induced inhibition of the development of putative preneoplastic foci in rat liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 1991;56:259-65.
66. **Pascale R.M., Simile M.M., Ruggiu M.E., et al.** Reversal by 5-azacytidine of the S-adenosyl-L-methionine-induced inhibition of the development of putative preneoplastic foci in rat liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 1991;56:259-65.

67. **Garcea R., Pascale R.M., Daino L., et al.** Variations of ornithine decarboxylase activity and S-adenosyl-L-methionine and 5'-methylthioadenosine contents during the development of diethylnitrosamine-induced liver hyperplastic nodules and hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 1987;8:653-8.
68. **Ara A.I., Xia M., Ramani K., Mato J.M., Lu S.C.** S-adenosylmethionine inhibits lipopolysaccharide-induced gene expression via modulation of histone methylation. *Hepatology* 2008;47:1655-66.
69. **Calvisi D.F., Pinna F., Ladu S., et al.** Aberrant iNOS signaling is under genetic control in rodent liver cancer and potentially prognostic for human disease. *Carcinogenesis* 2008;29:1639-47.
-