



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Scienze Biomediche

Sezione di Patologia Sperimentale e Oncologia

**DOTTORATO DI RICERCA in
EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI
XXI CICLO**

Coordinatore Prof.ssa Rosa Maria Pascale

**“Segnali di proliferazione e apoptosi sono
sotto controllo genetico durante la
cancerogenesi epatica di ratto”**

Relatore:

Prof.ssa Rosa Maria Pascale

Tesi di dottorato:

Dott.ssa Marcella Sini

Correlatore:

Dott.ssa Maddalena Frau

Anno Accademico 2007/2008

Indice

<i>Introduzione</i>	<i>pag.1</i>
 <u><i>Sezione compilativa</i></u>	
<i>1.Carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari alla base del suo sviluppo.</i>	<i>4</i>
<i>2.Modelli sperimentali di epatocancerogenesi su roditori</i>	<i>11</i>
<i>3.Segnali proapoptotici e antiapoptotici nella regolazione dell'epatocancerogenesi</i>	<i>15</i>
<i>4.Percorsi di traduzione del segnale mediati da RAS</i>	<i>25</i>
<i>4.1 Percorso di trasduzione del segnale RAS/MAPK e suoi inibitori</i>	<i>31</i>
<i>4.2 Vie che inducono l'apoptosi nel percorso RAS</i>	<i>42</i>
<i>4.3 Via del segnale RASSF1A-NORE1A</i>	<i>44</i>
<i>4.4 Via del segnale DAB2IP-ASK1</i>	<i>49</i>
<i>4.5 Attivazione dell'apoptosi attraverso i percorsi p38MAPK e JNK</i>	<i>52</i>
 <u><i>Sezione sperimentale</i></u>	
<i>5.Scopo della ricerca</i>	<i>54</i>

Marcella Sini.

Titolo della tesi:Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

6. Materiali e metodi	
6.1 Animali e trattamenti;	55
6.2 Istologia e immunoistochimica;	57
6.3 Indici di proliferazione e apoptosi	57
6.4 RT-PCR Real Time;	58
6.5 Immunoprecipitazione e Western Blot;	59
6.5 Determinazione dell'attività di RAS;	62
6.6 Analisi statistica.	62
7. Risultati:	
7.1 Sviluppo di lesioni neoplastiche	63
7.2 Controllo genetico dell'attivazione del via RAS/MAPK nelle lesioni epatiche di ratto	66
7.3 Sregolazione degli inibitori RAS/Erk nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche	69
7.4 Le vie RAS/F1A/Nore1A e Dab2IP/Ask1 sono coinvolte nell'apoptosi delle lesioni epatiche di ratto	71
8. Discussione	75
Conclusioni	82
Bibliografia	83

Introduzione

Il carcinoma epatocellulare (CE) è il quinto tumore più diffuso e la terza causa di morte per tumore al mondo (1,2). La più alta incidenza di CE si riscontra in Africa ed in Asia, ma essa è in aumento anche nei paesi occidentali, a causa di un concomitante incremento dell'incidenza di malattie epatiche causate dal consumo cronico di alcool e da infezione da epatite C. Il trattamento chirurgico a tuttoggi, incluso il trapianto, è l'unica terapia potenzialmente curativa per il CE, ma l'incidenza è alta e la sopravvivenza a lungo termine è rara. Una previsione del rischio d'incidenza di CE e di prognosi potrebbe essere utile per ottimizzare il trattamento chirurgico e chemioterapico. La scoperta di eventi genetici e molecolari coinvolti nell'epatocancerogenesi potrebbero guidare all'identificazione di marcatori molecolari della malattia, che potrebbero essere usati come bersagli terapeutici e diagnostici.

L'epatocancerogenesi è caratterizzata dalla sregolazione del bilancio tra segnali di proliferazione e morte cellulare per apoptosi, con diminuzione di segnali proapoptotici (Fas, p53, Bax o Bad) e stimolazione di segnali antiapoptotici (3). Recenti lavori sulla suscettibilità al carcinoma epatocellulare in modelli sperimentali murini e su ratti hanno portato a mappare differenti geni di suscettibilità e resistenza, che controllano la crescita, la progressione e la redifferenziazione (rimodellamento) di lesioni preneoplastiche e

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

neoplastiche (4). L'analisi dei meccanismi effettori dei geni di suscettibilità mostra che lesioni epatiche preneoplastiche, indotte chimicamente, mostrano prevalentemente aspetti morfologici di foci a cellule chiare ed eosinofile e tassi di crescita simili nel ceppo di ratto Fisher F344 suscettibile e in quello resistente Brown Norway (5,6). Tuttavia, la maggior parte delle lesioni preneoplastiche dei ratti resistenti vanno incontro a rimodellamento e solo poche acquistano la capacità di crescere e progredire in maniera autonoma a noduli displastici (adenomi) e CE (5,6). Il ruolo dell'apoptosi nell'acquisizione di un fenotipo resistente all'epatocancerogenesi è oggetto di studio. L'apoptosi nelle lesioni preneoplastiche indotte nel ceppo di ratto resistente Copenhagen o negli adenomi dei ratti BN resistenti è simile a quella delle corrispondenti lesioni dei ratti F344 suscettibili (4,7). Tuttavia, essa è maggiore nei CE indotti nel ceppo di ratti ricombinante congenici DRH.F344-*Drh1*, resistenti all'epatocancerogenesi rispetto alle lesioni dei ratti controllo suscettibili (8). Questo suggerisce che la morte cellulare dei CE è sotto il controllo di geni di resistenza, ma i meccanismi che regolano questi effetti sono sconosciuti.

Recenti studi hanno mostrato che nelle lesioni neoplastiche epatiche di ratti F344, suscettibili all'epatocancerogenesi, ma non nelle corrispondenti lesioni di ratti BN resistenti, l'espressione dei geni *c-myc*, *Ciclina D1*, *E*, *A* ed *E2F1* aumenta, aumentano i complessi *Ciclina D1-Cdk4*, *Ciclina E-Cdk2* e *E2f1-Dp1*, e l'iperfosforilazione della proteina pRb (5). Questi risultati dimostrano una disregolazione delle fasi G1 e S del ciclo cellulare nelle lesioni epatiche dei ratti suscettibili e un blocco del punto di restrizione G1-S nelle lesioni dei ratti resistenti che spiega la loro lenta progressione. Questo è

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

associato, nelle lesioni dei ratti BN, con la diminuzione dell'espressione di proteine come Cdc37, Hsp90 e Crml, le quali proteggono le cinasi del ciclo cellulare dall'inibizione da parte di p16^{INK4A} (6). Analoghe alterazioni del ciclo cellulare sono state scoperte nei CE umani, con un sottogruppo di CE a buona prognosi (classificato in base alla lunghezza del periodo di sopravvivenza dopo resezione chirurgica parziale del fegato) e nei CE dei ratti resistenti, e un sottogruppo a cattiva prognosi più simile alle lesioni dei ratti suscettibili (6).

L'effettore di RAS meglio caratterizzato è la via di segnale "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPK) che promuove la progressione del ciclo cellulare (9). La forma attivata di Ras (Ras-GTP) attiva la cascata Raf1-Mek1/2-Erk 1/2, la quale trasmette segnali di proliferazione e di sopravvivenza e, attraverso il legame di RASSF1A con la proteina relativa NORE1A può indurre l'apoptosi (10,11). RASSF1 e NORE1A sono membri della famiglia RASSF, inibitori di RAS, e formano omo ed eterodimeri che attivano la cinasi MST1, effettore a valle del segnale p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) e JNK (10-14). La forma attiva di MST1, in seguito a fosforilazione, induce l'apoptosi attraverso le vie di morte cellulare dipendenti o indipendenti dalle caspasi. Inoltre, RASSF1A può inibire il segnale ERK attraverso la sua associazione con la proteina plasma membrane calcium pump 4b (PMCA) (15). Infine, p38MAPK può anche essere attivato da DAB2IP, un inibitore di RAS-GTP, attraverso l'attivazione di ASK1, il quale fosforila p38MAPK (16).

Sezione compilativa

1. Carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari alla base del suo sviluppo.

Il tumore al fegato è il quinto tumore più diffuso e la terza causa di morte per tumore al mondo (17). Il CE rappresenta l'80-90% dei tumori primari al fegato. Esso presenta differenti aspetti epidemiologici che includono variazioni marcate in differenti aree geografiche, tra gruppi etnici, tra uomini e donne e la presenza di fattori di rischio ambientali ben conosciuti (17).

I fattori di rischio aumentano in risposta al danno epatico cronico dovuto allo stadio di cirrosi.

Geograficamente, la più elevata incidenza di CE è stata riscontrata nell'Africa sub-sahariana e nell'Asia Orientale.

Il sesso può influenzare il rischio, infatti i maschi presentano tassi di incidenza di tumore più alti rispetto alle femmine.

I principali fattori di rischio per il CE variano a seconda della regione. Nella maggior parte dei casi il principale fattore di rischio è rappresentato da un'infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV). Anche il virus dell'epatite C rappresenta un importante fattore di rischio, in particolar modo nelle aree a maggior rischio infettivo come il Giappone. Un altro fattore di rischio è dato dal consumo di alimenti contaminati dall'aflatossina B1, una micotossina prodotta dal fungo *Aspergillus Flavus*. Nel 70-90% di casi il CE si sviluppa in un contesto di infezione cronica del fegato e cirrosi. Le principali cause di

cirrosi nei pazienti con CE includono infezioni croniche da virus dell'epatite B, epatite C, malattie epatiche da abuso di alcool e steatoepatiti non alcoliche, diabete mellito, obesità. Cause meno comuni sono rappresentate da: emocromatosi ereditaria, deficienza da α -1 antitripsina, epatite autoimmune e alcune porfirie.

Nella maggior parte dei casi, il CE si presenta sporadicamente in età adulta e in individui che presentano almeno un fattore di rischio non genetico, come abuso di alcool o infezione da epatite B o C.

L'evoluzione a CE è un processo multifasico, meno definito rispetto ad altri tipi di tumore. Le difficoltà nello studiare la sequenza di eventi precoci che portano allo sviluppo dell'epatocarcinoma nell'uomo rendono necessario condurre gran parte degli studi su modelli animali.

Microscopicamente le cellule di CE hanno aspetto simile alle cellule epatiche normali ma di grandezza differente in base al grado di differenziazione (18). I nuclei sono ben evidenti con nucleoli ben riconoscibili ed un alto rapporto nucleo-citoplasma e presentano talvolta ipercromatismi ed irregolarità nucleari. Le cellule tumorali hanno un citoplasma granulare eosinofilo. Le cellule di CE inizialmente hanno un aspetto che mima i foglietti cellulari delle cellule normali, in seguito il tumore assume un aspetto trabecolare con spessi cordoni di cellule separati da sinusoidi vascolari che mimano i sinusoidi vascolari e i foglietti cellulari delle cellule normali.

L'evoluzione neoplastica dei CE procede attraverso un processo istologico che consta di differenti fasi. (20) L'eziologia che induce il CE provoca cicli continui di danno epatico e rigenerazione, che culmina nella

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

malattia epatica cronica. I noduli iperplastici di epatociti rigeneranti rappresentano una prima potenziale fase verso lo sviluppo del CE. Tali noduli iperplastici hanno aspetto citologico normale e rappresentano una prima potenziale fase verso il CE. Queste lesioni possono progredire a noduli displastici premaligni che, a loro volta, possono evolvere a CE, il quale presenta la capacità di invadere lo stroma fibroso e i vasi che circondano la lesione e occasionalmente ha potenziale metastatico.

La più comune lesione associata allo sviluppo dell'epatocarcinoma è la cirrosi, che si sviluppa dopo un periodo di lunga latenza (20-40 anni) della malattia epatica cronica (Fig.1).

L'analisi molecolare di CE umani ha portato all'individuazione di alterazioni genetiche ed epigenetiche (19). Le più importanti sono rappresentate da: accorciamento telomerico e alterazione funzionale dei punti di restrizione del ciclo cellulare; sregolazione di oncogeni chiave e geni soppressori tumorali quali p53, β -catenina, membri della famiglia recettoriale ErbB, MET e il suo ligando, il fattore di crescita degli epatociti (HGF), p16^{INK4A}, 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.

All'inizio degli anni Novanta, p53 è stato riconosciuto come un gene soppressore tumorale, mutato in circa il 50% dei tumori umani. P53 agisce come un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, nella differenziazione, amplificazione genica, ricombinazione del DNA, segregazione cromosomica e senescenza cellulare. Numerosi studi

hanno dimostrato l'effetto dello stress ossidativo nella cancerogenesi epatica in presenza di mutazioni di p53. La deficienza di p53 determina lo sviluppo di CE, mentre mutazioni a carico di p53 contribuiscono alla fase di inizio e progressione dei tumori. La proteina p53 è capace di formare tetrameri (21). Alleli che producono mutanti p53 sono in grado di eterodimerizzare con p53 wild-type e questo determina un cambiamento conformazionale che impedisce il suo legame a elementi regolati da p53. Quindi la forma mutante di p53 sopprime l'attività di p53 wild-type.

La via di segnale Wnt funziona come una regolatrice chiave nello sviluppo e differenziazione dei tumori. La β -catenina è il maggiore effettore della via di segnale Wnt canonica. Quando la cascata Wnt è attiva, le proteine poliposi adenomatosi coli (APC) e axina non sono più in grado di legare la β -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. Tali fattori di trascrizione attivano bersagli genici rilevanti nello sviluppo dei tumori come MYC, ciclina D1, COX2 e metallo-proteasi della matrice di tipo 7. Nei CE sono state rilevate mutazioni e incrementata espressione nucleare di β -catenina. Queste mutazioni impediscono alla β -catenina di essere fosforilata e quindi ne prevengono la degradazione, determinando l'attivazione del segnale Wnt/ β -catenina. E' stato dimostrato che mutazioni dei geni associati al segnale Wnt/ β -catenina contribuiscono allo sviluppo di CE.

La famiglia dei recettori ad tirosin cinasica ErbB consiste di quattro membri (ERBB1-ERBB4), i quali sono implicati nello sviluppo di differenti tipi di tumori umani. E' stato dimostrato che si ha un'iperpressione di

ERBB1 nel 68% di casi di CE, nell'84% di ERBB3, nel 21% di ERBB2 e nel 61% di ERBB4. L'iperespressione di ERBB1 e ERBB3 correla con un fenotipo più aggressivo che presenta un alto indice di proliferazione, metastasi intraepatica, indifferenziazione e aumento delle dimensioni del tumore.

Il segnale del fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) è essenziale per molti processi cellulari, quali crescita, differenziazione cellulare ed apoptosi. Nel fegato, il principale ruolo di TGF- β , 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 e inducendo apoptosi. TGF- β ha tre principali isoforme: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, e tre recettori: di tipo I (RI), di tipo II (RII) e di tipo III (RIII). In seguito all'attivazione del complesso recettoriale TGF- β di tipo II/TGF- β di tipo I (TGF- β RII/ TGF- β RI) il segnale è trasmesso attraverso le proteine Smad o trasdotto attraverso fosfatidilinositolo 3-chinasi (PIK3), protein fosfatasi 2/cinasi p70S6 (PP2A/p70S6K) e vari segnali di proteine attivate da mitogeni (MAPK). Quest'ultimo segnale non dipende dalle funzioni di Smad TGF- β RI, quando è legato da TGF- β RII e fosforilato, fosforila a sua volta Smad2 e Smad3, formando in seguito un complesso con Smad 4. I complessi leganti Smad 4 traslocano nel nucleo dove si legano a specifiche sequenze del DNA e agiscono per reprimere o attivare la trascrizione. E' stato dimostrato che TGF- β è iperespresso nel CE. L'espressione di TGF- β 1 nel tessuto di CE è correlata con la prognosi. E' stata dimostrata, infatti, una funzione stimolante la crescita da parte di TGF- β durante gli stadi tardivi dello sviluppo tumorale epatico.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

La proteina soppressore tumorale del retinoblastoma (RB) è importante per lo sviluppo di differenti tipi di tumore. Rb viene fosforilata da differenti cinasi e 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 durante la 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 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 tumore. La distruzione del segnale regolatorio Rb è frequente nell'epatocancerogenesi.

Un altro segnale coinvolto nell'epatocancerogenesi è quello del protooncogene RAS, del quale parleremo estesamente più avanti.

Nell'epatocancerogenesi sono implicati sia meccanismi genetici sia epigenetici, dei quali il più rappresentativo è quello della metilazione di geni rilevanti nello sviluppo del tumore. Cambiamenti nello stato di metilazione, in particolar modo nelle regioni del promotore di geni individuali, sono capaci di regolare l'espressione genica. La metilazione può avvenire sulle citosine, soprattutto nei nucleotidi CpG, ed i gruppi metilici possono essere aggiunti alle

pirimidine da una delle tre metiltransferasi (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b). La metilazione dei promotori può interferire con il legame di fattori di trascrizione e altri meccanismi di regolazione. La metilazione è presente nei primi stadi dell'epatocancerogenesi e ha un più ampio ruolo nella progressione tumorale. Meccanismi di ipermetilazione nel CE sono stati dimostrati nei geni p^{16INK4A}, E-caderina, COX-2 e RASSF1A.

Il CE è una malattia aggressiva ed enigmatica, causata da differenti fattori eziologici, che vanno da malattie metaboliche ad epatotossine, a virus (22). Come nel caso di molti altri tumori solidi, i profili genomici del CE, con le sue molteplici amplificazioni e delezioni, suggeriscono che attualmente vi è una conoscenza limitata dell'insieme di geni che causano la patogenesi del CE. Studi comparativi tra specie potrebbero servire per studiare l'importanza di alterazioni genomiche acquisite nei CE murini e umani e consentire indirettamente nuove conoscenze sui CE umani.

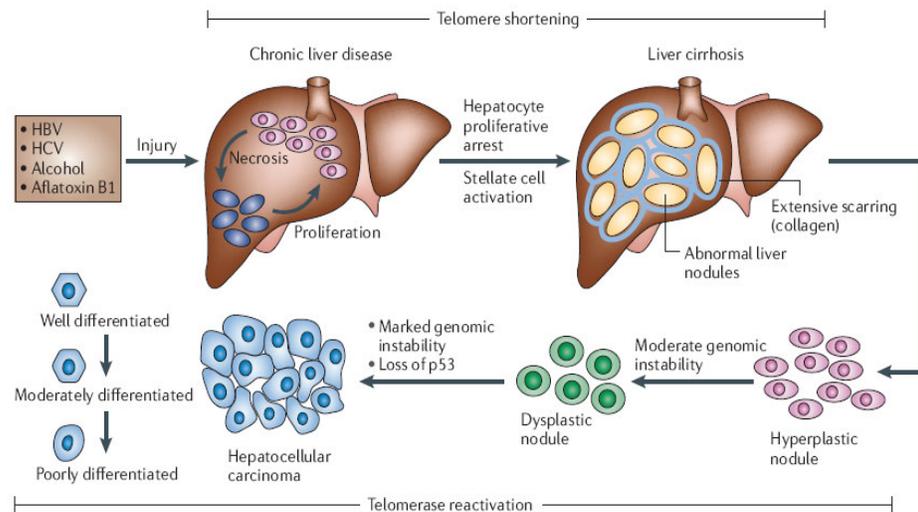


Fig.1 Progressione istopatologica e caratteristiche molecolari del CE.

In seguito a danno epatico provocato da uno o differenti fattori (virus dell'epatite B e C, alcool, aflatossina B1), vi è necrosi seguita da proliferazione riparativa degli epatociti. Cicli continui di questo processo distruttivo-rigenerativo promuovono una malattia epatica cronica che culmina nella cirrosi epatica. Essa è caratterizzata da anormale formazione dei noduli epatici circondati da deposizione di collagene. Susseguentemente, si ha la formazione di noduli iperplastici, di noduli displastici e, infine, di carcinomi epatocellulari, che possono essere ulteriormente classificati in tumori ben differenziati, moderatamente e scarsamente differenziati, l'ultimo dei quali rappresenta la forma più maligna dei carcinomi epatocellulari umani.

Tratto da PaRaskevi A.F., DePinho R.A. *Hepatocellular carcinoma pathogenesis from genes to environment. Nature* 6,674-687,2006.

2. Modelli sperimentali di epatocancerogenesi su roditori

Lo sviluppo di tumori nei mammiferi dipende dall'accumulo in cellule somatiche di differenti alterazioni, che includono attivazione di proto-oncogeni e inattivazione di geni oncosoppressori (23). L'instabilità genomica generata da danno al DNA ed errori nella riparazione del DNA giocano un ruolo importante nell'accumulo di queste alterazioni. Sono state ampiamente dimostrati comuni aspetti morfologici, biochimici, e biologici delle lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche dei roditori ed umane. Le stesse classi di bersagli genici sono coinvolte nella genesi delle lesioni, e questo suggerisce che i meccanismi alla base dello sviluppo del CE in specie differenti potrebbero essere simili. Negli ultimi anni modelli di epatocancerogenesi su ratti e topi sono stati utilizzati per mappare geni di suscettibilità, definire il modello genetico responsabile di un rischio incrementato di CE, ed esaminare i meccanismi effettori dei geni di suscettibilità tumorale.

L'epatocancerogenesi è un processo multifasico. Differenti modelli sperimentali di epatocancerogenesi chimica sono stati utilizzati per studiare le varie fasi del processo. In questi modelli, la fase di inizio degli epatociti è seguita da trattamenti che inducono l'espansione clonale degli epatociti iniziati. Durante la fase iniziale, in seguito al danno genomico indotto dai cancerogeni, alcuni epatociti possono andare incontro a morte cellulare per apoptosi. L'espansione clonale delle cellule iniziate che sopravvivono (durante la 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 per 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 stadi molto precoci attraverso colorazione immunistoichimica 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 portano le lesioni preneoplastiche ad una crescita autonoma, capace di evolvere durante la fase di progressione verso la malignità. Per una più efficace prevenzione ed un migliore trattamento 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 coinvolti (24).

Questo studio può essere compiuto utilizzando modelli di epatocancerogenesi chimica su roditori, come ad esempio mediante il modello di Solt e Farber (25). L'uso di modelli sperimentali su roditori può essere utile nell'identificazione dei geni che potrebbero essere bersaglio della terapia genica, nei primi stadi dell'epatocancerogenesi. Nei modelli sperimentali, gli epatociti iniziati possono essere identificati in ratti o topi trattati con cancerogeni chimici come la dietilnitrosammina (DENa) in quanto le singole cellule esprimono, ad esempio, la forma placentare della proteina glutatione transferasi 7-7 (GST7-7), come detto in precedenza.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

Gli epatociti iniziati sono incapaci di crescita autonoma, ma possono evolvere in foci di epatociti alterati (FEA) e noduli, se stimolati a proliferare. Differenti alterazioni genetiche mediano l'inizio degli epatociti, come, per esempio, l'espressione di c-myc e Tgf- α nei modelli di topi transgenici (24,26,27).

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 stimolazioni differenti di cellule iniziate alla crescita mediante stimoli fisiologici (nel fegato neonatale) o da un insieme di agenti promoventi o mediante l'inibizione della crescita delle cellule non iniziate che può essere ottenuta con mitoinibizione.

Nel "modello dell'epatocita resistente" (RH), questo meccanismo è basato sulla resistenza delle cellule iniziate al 2-acetilaminofluorene (AAF), che agisce come mitoinibitore per le cellule normali, associato ad un'epatectomia parziale (PH) od alla somministrazione di dosi necrogeniche di CCl₄. In questi modelli sperimentali, FEA e noduli si sviluppano relativamente presto nel fegato. Queste lesioni sono caratterizzate da una proliferazione veloce e da differenti alterazioni nel metabolismo di carboidrati, poliamine, colesterolo, ferro, xenobiotici; tali modificazioni sono evidenziabili attraverso metodi immunostochimici, come quello che misura l'alterata espressione di GST-P.

Dopo l'interruzione del trattamento promovente, lo sviluppo e la crescita autonoma dei noduli persistenti che progressivamente acquistano molteplici

alterazioni morfologiche, funzionali, biochimiche e molecolari, rappresenta il punto di partenza della fase di progressione della cancerogenesi epatica. Queste lesioni non vanno incontro a reversione spontanea ed evolvono irreversibilmente verso il carcinoma epatocellulare. In queste lesioni, vi sono numerose alterazioni genetiche. La sregolazione delle vie di trasduzione del segnale, del controllo del ciclo cellulare e di geni coinvolti nella morte cellulare, caratterizzano le cellule iniziate e influenzano la loro progressione verso la malignità (28).

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) (27). Questa differenza genetica è 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 di geni resistenti che interferiscono con gli stadi di progressione e di promozione, determinando una scarsa capacità delle lesioni preneoplastiche ad evolvere in adenomi e carcinomi, ma apparentemente non influenzano lo stadio iniziale. Da incroci tra i due ceppi di ratti si è visto che gli alleli resistenti sono trasmessi in maniera dominante alla progenie e modificano l'attività dei loci di suscettibilità. Esistono almeno 3 geni oncosoppressori nel locus Hcr1.

Queste osservazioni suggeriscono che i meccanismi che controllano la crescita cellulare sono influenzati in maniera differente nelle lesioni epatiche dei ratti suscettibili e resistenti.

3. Segnali proapoptotici e antiapoptotici nella regolazione dell'epatocancerogenesi

Uno dei principali marcatori della trasformazione cellulare oncogenica è dato dalla capacità delle cellule di sfuggire alla morte apoptotica, andando incontro a proliferazione cellulare e determinando lo sviluppo di tumore (30).

L'apoptosi è un processo altamente regolato e organizzato, che svolge differenti funzioni, tra le quali: eliminazione di linfociti autoreattivi, di cellule maligne o infettate da virus, e sviluppo di complessi organismi multicellulari.(29,30). Un delicato bilancio regola decisioni di vita o di morte in una data popolazione cellulare. Per esempio, l'eccessiva apoptosi genera detriti cellulari, che stimolano l'infiammazione che solitamente non si ha in risposta all'apoptosi e provoca aplasia cellulare; mentre insufficiente apoptosi determina un fallimento nell'eliminazione dei linfociti autoreattivi (con conseguente insorgenza di patologie autoimmuni) o proliferazione cellulare incontrollata che porta a tumore.

L'apoptosi è caratterizzata da alcuni cambiamenti morfologici (per esempio, restringimento della membrana, condensazione della cromatina nucleare, frammentazione del DNA e formazione di corpi apoptotici) ed è regolata da un gruppo di vie del segnale che possono essere indotte da stimoli interni o esterni. Stimoli extracellulari sono rappresentati da ligandi specifici che legano i recettori responsabili di morte sulla superficie cellulare e determinano la morte cellulare. Stimoli intracellulari sono rappresentati da

stress genotossico, ipossia e carenza di nutrienti, i quali inducono specifici segnali intracellulari che scatenano l'apoptosi o la necrosi.

Il principale organulo cellulare responsabile dell'apoptosi intrinseca è rappresentato dai mitocondri, che influenzano le caratteristiche morfologiche cellulari per la necrosi o l'apoptosi.

Gli effettori chiave della morte cellulare sono le caspasi, una famiglia di protein cinasi che taglia substrati proteici in corrispondenza di residui di acido aspartico (31) Le caspasi sono componenti di una cascata proteolitica che culmina nell'attivazione di proteine che sono essenziali per la sopravvivenza cellulare (34-38).

La famiglia di proteine Bcl (B cell leukemia) sono regolatori dell'apoptosi. Questa famiglia consiste di proteine che possono stimolare o prevenire la morte cellulare. Dipende dai livelli effettivi dei membri pro- e anti-apoptotici di questa famiglia, se vi sarà sopravvivenza o morte cellulare. Quando le proteine Bcl-2 o Bcl-XL sono iperesprese, esse possono eterodimerizzare con una proteina pro-apoptotica conosciuta come Bax e prevenire l'apoptosi. Quando l'espressione di Bcl-2 e Bcl- XL risulta essere bassa, è favorita invece l'omodimerizzazione di Bax, che determina l'apoptosi delle cellule. Bad è un membro proapoptotico della famiglia Bcl, che può eterodimerizzare con molecole anti-apoptotiche simili a Bcl-2. Questo inibisce l'eterodimerizzazione di Bcl-2 o Bcl-XL con Bax, e favorisce l'omodimerizzazione di Bax. Quando Bax è capace di omodimerizzare, si ha la formazione di un poro di permeabilità di transizione. La formazione di questo poro determina il rilascio del contenuto situato tra la membrana mitocondriale

esterna e interna. In questo modo vengono liberati il citocromo C e alcune caspasi.

Le caspasi possono essere attivate da due distinti meccanismi: apoptosi indotta da recettori di morte, e segnale intrinseco (mitocondriale) di morte; entrambi i meccanismi portano all'attivazione di simili caspasi effettrici a valle (33, Fig.2).

Nel primo caso, i segnali esterni sono rappresentati dal fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), FAS L e TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Si tratta di ligandi di recettori di morte localizzati sulla superficie cellulare e il loro legame trasduce segnali di morte nelle cellule. Questi segnali apoptotici estrinseci provocano l'apoptosi direttamente attraverso l'attivazione della caspasi 8, tramite meccanismo autocatalitico o attraverso un segnale mediato dai mitocondri. L'attivazione della caspasi 8 attiva a sua volta altre caspasi effettrici, come le caspasi 9 e 3.

Il secondo meccanismo di attivazione dell'apoptosi è denominato segnale intrinseco mitocondriale. I mitocondri sono gli organuli che producono la maggior parte dell'energia delle cellule e giocano un ruolo primario nella morte cellulare, induzione dell'apoptosi e necrosi. L'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale (MMP) provoca il rilascio di proteine apoptogeniche, come ad esempio il citocromo c (Cyt C), dallo spazio intermembrana (IMS) dei mitocondri nel citosol. Il Cyt C, insieme al fattore 1 attivante le proteasi dell'apoptosi e la procaspasi 9, forma un complesso che promuove l'attivazione delle caspasi a valle che provocano l'apoptosi. La procaspasi 9 è attivata dal legame con il Cyt C (rilasciato dai mitocondri) e

Apaf-1, in seguito a segnali che inducono l'apoptosi per formare un complesso chiamato apoptosoma, che taglia e attiva la procaspasi 3. La caspasi 3 attivata cliva, a sua volta, specifiche proteine cellulari e acidi nucleici scatenando l'apoptosi.

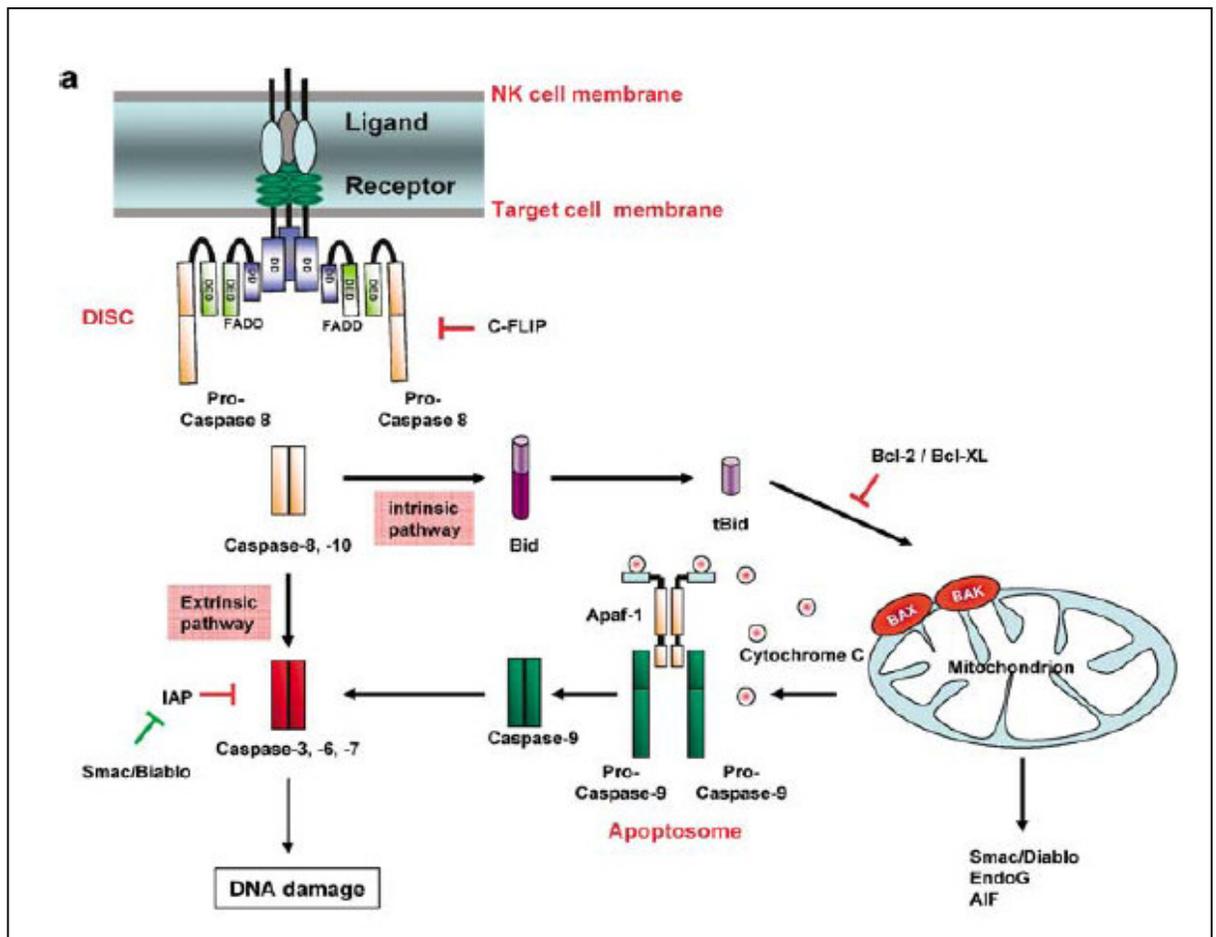


Fig.2 Segnale intrinseco ed estrinseco dell'apoptosi.

Tratto da Chan C.W., Housseau F. The "kiss of death" by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death and Differentiation* 15, 58-69, 2008.

Nelle cellule che non subiscono l'apoptosi, la fosfatidilserina è contenuta all'interno della membrana cellulare, ma quando le cellule subiscono l'apoptosi la medesima è esposta sulla superficie extracellulare della membrana. Questi processi sono seguiti dalla formazione di corpi apoptotici. Le vescicole legate alla membrana portano esposta la fosfatidilserina sulla membrana delle vescicole e questo facilita il riconoscimento delle particelle apoptotiche da parte delle cellule fagocitarie. L'attivazione di cinasi selettive che includono PAK, JNK e ASK-1 hanno sia funzioni regolatrici che effettrici sulla morte cellulare, mentre altre cinasi come ERK1 ed ERK2 inibiscono la morte cellulare.

La progressione tumorale è determinata dall'attivazione di percorsi di sopravvivenza e da tRasformazione oncogenica. Differenti oncogeni, quali Ras, Src, Raf, alla presenza dei recettori attivi HER2 e EGF, possono attivare percorsi di sopravvivenza. (29)

Il più rappresentativo tra questi oncogeni è Ras, che risulta essere mutato in circa il 20% dei tumori umani. In altri casi, l'iperespressione di EGF (recettore del fattore di crescita epidermico) e/o FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), HGF (fattore di crescita degli epatociti) regolano positivamente il segnale di Ras. Ras stimola la proliferazione attivando il segnale Raf/MAPK, oppure attivando direttamente la subunità catalitica del fosfatidilinositolo-3-cinasi (PI3K) che porta alla produzione di fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato, un secondo messaggero che interagisce con un discreto numero di enzimi a valle come AKT/PKB. AKT possiede un forte potere antiapoptotico attraverso la

fosforilazione di differenti bersagli genici, tra cui i componenti del macchinario di morte cellulare. AKT inibisce, attraverso fosforilazione, l'attività catalitica delle caspasi e di Bad, un membro proapoptotico delle famiglia di proteine bcl2. Esso fosforila anche un membro della famiglia "forkhead" di fattori di trascrizione (FKHR) inibendo la loro traslocazione nucleare e l'espressione dei suoi geni bersaglio, che includono differenti proteine proapoptotiche come FasL e Bim. Infine Akt fosforila la subunità p65 del fattore di trascrizione NF- κ B aumentando il suo potenziale transattivante e facilitando l'espressione di differenti geni antiapoptotici così come BCLxL e la famiglia di inibitori delle caspasi cIAP.

Ras attiva la proliferazione attivando anche il segnale di proliferazione Raf/MAPK. Il segnale MAPK include la famiglia ERK, JNK e p38. Ogni sottofamiglia MAPK è attivata da una specifica cinasi MAP cinasi (MAPKK) a monte, la quale fosforila residui di treonina e tirosina all'interno di una sequenza conservata T-X-Y. L'attivazione dei membri della famiglia MAPK determina la fosforilazione di differenti molecole effettrici tra le quali MAPKAPK1, MAPKAP-K2/3, Mnk1/2, fattori di trascrizione come c-jun, ATF-2, MEF2c e CHOP, i quali influenzano l'aspetto delle cellule. Le MAPK sono proteine conservate che regolano la crescita, divisione e morte delle cellule. Esse rappresentano una cascata di eventi di fosforilazione che includono tre cinasi pilota: Raf, MEK (MAP kinase kinase) ed ERK (MAP kinase) che attivano la proliferazione cellulare.

Le glicoproteine della famiglia Wnt si legano ai membri della famiglia recettoriale frizzled (Fdz) e attivano gli effettori a valle dishevelled (Dvl), i

quali impediscono la fosforilazione di β -catenina da parte di GSk3 β e la sua susseguente degradazione. L'accumulo della β -catenina nel citoplasma è seguita dalla sua traslocazione nel nucleo dove essa agisce come coattivatore di fattori di trascrizione coinvolti in processi antiapoptotici, nell'angiogenesi, nella formazione della matrice extracellulare e nella proliferazione. L'attivazione del segnale Jun-N-terminal kinase (JNK) è implicato nella risposta apoptotica al danno al DNA ed allo stress cellulare. Nelle cellule normali, l'attivazione di JNK è un evento proapoptotico e determina l'attivazione di membri proapoptotici della famiglia Bcl-2, che causano un'induzione del rilascio del citocromo c dai mitocondri. L'attivazione dei percorsi JNK e p38 promuove l'apoptosi, mentre l'attivazione del segnale di ERK tende ad essere antiapoptotico.

P53, un gene soppressore tumorale, svolge un ruolo centrale nel danno del DNA, transizione del ciclo cellulare e controllo dell'apoptosi in risposta ad un danno. P53 regola la trascrizione di geni coinvolti in entrambi i percorsi apoptotici mitocondriali e attivati da recettore, come ad esempio APAf-1, Bax, NOXA, PERP, PTEN, PUMA, FAS, CD95, TRAIL-R1 e TRAIL-R2.

NF-kB comprende una famiglia di fattori di trascrizione inducibili che agiscono come regolatori della risposta immune e dell'infiammazione. Esso è un eterodimero composto dalle subunità p50 e p65/RelA, che lega specifiche sequenze nel DNA e regola la trascrizione di differenti geni. Nelle cellule non stimolate, NF-kB si trova nel citoplasma in associazione con una famiglia di molecole inibitorie conosciute come I κ B. Il meccanismo di attivazione di NF-kB coinvolge la fosforilazione di I κ B attraverso il complesso di I κ B cinasi

(IKK). Ci sono due differenti cinasi che fosforilano le IKK: cinasi indotte da NF- κ B e MEKK1. In seguito alla fosforilazione da parte di IKK, esse vanno incontro a ubiquitinizzazione e susseguente degradazione da parte del proteasoma 26S. Quindi, gli eterodimeri p50/p65 traslocano al nucleo dove attivano la trascrizione di geni bersaglio di NF- κ B, la maggior parte dei quali sono coinvolti nell'induzione dell'apoptosi, come BCLxL, XIAP, c-IAP-1,2 e Fas L, ma è in grado anche di attivare proteine antiapoptotiche come Bfl-1. Anche le cinasi che fosforilano Ik-B svolgono un ruolo importante nella risposta anti-apoptotica. Le cinasi I- κ B sono fosforilate da Ik-cinasi. Le Ik-cinasi sono richieste per l'azione anti-apoptotica di Akt. I- κ B è anche un bersaglio a valle di Mekk1. Mekk1 media segnali sia pro- che anti-apoptotici.

L'attivazione di Jak cinasi determina la loro capacità di fosforilare residui di tirosina nella porzione citoplasmatica dei loro recettori. Questa fosforilazione determina il legame mediato da SH2 delle proteine Stat (in particolare Stat3) al recettore. Quando Stat3 è legato al recettore, esso è fosforilato dalle cinasi Jak. Stat3 fosforilato si dissocia dal recettore, dimerizza e trasloca al nucleo dove agisce come fattore di trascrizione. Le proteine Stat promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare tramite numerosi meccanismi.

L'apoptosi indotta da TGF- β è associata con la rimozione di cellule danneggiate ed il mantenimento dell'omeostasi cellulare (3). Nel fegato, TGF- β è normalmente prodotto dalle cellule stellate e determina la limitazione della crescita degli epatociti in risposta ad un danno inibendo la sintesi del DNA, bloccando la progressione del ciclo cellulare e inducendo l'apoptosi. TGF- β si

a lega due tipi di recettori: T β R-I e T β R-II, i quali contengono domini di legame extracellulari e domini cinasi serina-treonina intracellulari. TGF- β proteoliticamente attivo lega il recettore T β R-II, il quale interagisce e transfosforila T β R-I. I fattori di trascrizione SMAD2 e SMAD3 sono reclutati dal complesso recettoriale e attivati attraverso fosforilazione, la quale permette il loro rilascio dal complesso recettoriale e la loro eterodimerizzazione con SMAD4 seguita da traslocazione nel nucleo. A livello nucleare, SMAD attivato e SMAD4 regolano la trascrizione formando complessi con altri coregolatori funzionali. Negli epatociti, TGF- β induce l'espressione di protein cinasi associate alla morte (DAP-kinase) come effetto principale dipendente da SMAD. Altri mediatori apoptotici di TGF- β sono la proteina adattatrice DAXX, la quale associandosi con T β R-II attiva il segnale cinasi Jun aminotermine (JNK) e GADD45, la cui espressione SMAD-dipendente è responsabile del ritardo nell'attivazione del segnale p38 mitogen activated protein (MAP) kinase. Inoltre TGF- β sopprime segnali di sopravvivenza (come PI-3K/AKT) tramite l'attivazione di fosfatasi o la proteolisi mediata dalle caspasi.

Ci sono differenti segnali che sono coinvolti nel bilancio tra sopravvivenza e morte cellulare. La sregolazione di uno di questi percorsi può portare alla tRasformazione maligna epatica (Fig.3).

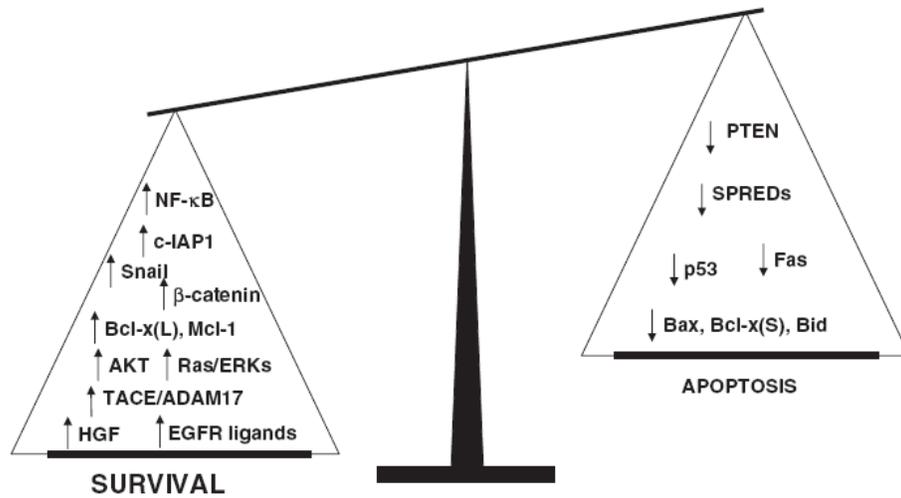


Fig.3 Sregolazione del bilancio in favore di segnali antiapoptotici nel carcinoma epatocellulare.

Tratto da Fabregat I., Roncero C., Fernandez M., Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer, Liver International ISSN 1478-3223, 2007.

4. Percorsi di trasduzione del segnale mediati da RAS

Negli organismi multicellulari, lo stato fisiologico delle cellule normali è regolato da un insieme complesso di vie di trasduzione del segnale che stimolano la proliferazione cellulare solo quando vi è una richiesta da parte del corpo, come durante lo sviluppo o la guarigione delle ferite. (33) Lo sviluppo dei tumori è causato da un'alterazione della regolazione della normale crescita cellulare per difetti in tali vie di trasduzione del segnale. Le prime proteine ad essere identificate per la capacità di regolare la crescita cellulare sono state le proteine della famiglia Ras. Le proteine Ras svolgono ruoli essenziali nel controllare l'attività di differenti vie del segnale che regolano la normale proliferazione cellulare (39). I tumori umani esprimono molto frequentemente proteine Ras che sono attivate da mutazioni puntiformi; circa il 20-30% di tutti i tumori, infatti, presentano una mutazione attivante a carico di uno dei geni Ras. In questi tumori, la proteina Ras contribuisce significativamente a differenti aspetti del fenotipo maligno, tra cui sregolazione della crescita, morte cellulare programmata, invasività e capacità di formare nuovi vasi sanguigni (40).

Le proteine Ras sono membri di una grande superfamiglia di proteine leganti GTP, a basso peso molecolare, le quali possono essere suddivise in differenti famiglie in base al grado di conservazione della sequenza. Le differenti famiglie sono importanti per differenti processi cellulari: la famiglia Ras regola la crescita cellulare, mentre la famiglia RHO regola l'actina citoscheletrica (Fig.4). Tre membri della famiglia Ras (HRAS, KRAS, NRAS) sono attivati da mutazioni puntiformi nei tumori umani. Nella loro forma

attiva, le proteine Ras sono localizzate nella parte interna della membrana plasmatica, mentre sono localizzate nel citosol quando in forma inattiva. L'enzima farnesyltransferasi (Ftase) catalizza il trasferimento della catena isoprenoide del carbonio 15 del farnesilpirofosfato (FPP) su un residuo di cisteina sull'estremità carbossilica di Ras. Questo determina l'associazione di Ras sulla membrana intracellulare attraverso il suo gruppo farnesilico (F). Dopo isoprenilazione, un'endopeptidasi rimuove tre aminoacidi all'estremità carbossiterminale della proteina e questa estremità viene metilata da parte di una metiltransferasi. In seguito, una palmitoiltransferasi catalizza l'aggiunta di due gruppi di acidi grassi palmitoilici a lunga catena su un residuo di cisteina appena a monte della cisteina carbossiterminale farnesilata e questo stabilizza l'interazione di RAS con la membrana.

Lo stato di attivazione delle proteine Ras dipende dal fatto che siano legate a GTP (in questo caso esse sono attive e capaci di interagire con bersagli enzimatici) o GDP (in questo caso esse sono inattive e non sono in grado di interagire con i loro effettori). Nelle cellule normali l'attività delle proteine Ras è controllata dal tasso di GTP e GDP legato. In vitro, Ras purificato possiede una bassa attività GTPasica intrinseca che determina che GTP legato sia lentamente convertito a GDP. Esso ha anche un lento tasso di scambio nucleotidico tramite il quale GDP legato è gradualmente sostituito da GTP. Questi processi sono catalizzati dentro la cellula da due enzimi: lo scambio nucleotidico da parte di fattori di scambio guanina nucleotide (GEF) e l'idrolisi dei nucleotidi da parte di proteine attivanti le GTPasi (GAP). Il bilancio tra queste proteine determina lo stato di attivazione di Ras e dei suoi bersagli a

valle. Molti tipi di recettori, tra cui i recettori a tirosin cinasi ed i recettori accoppiati a proteine G, sono in grado di attivare Ras. In seguito ad attivazione di recettori a tirosin cinasi, come il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), il recettore autofosforilato lega domini SH2 della proteina 2 legante il fattore di crescita della proteina adattatrice (GRB2). Attraverso il suo dominio SH3, GRB2 è legato a SOS sulla membrana plasmatica dove si trova Ras in seguito al processo di farnesilazione. La vicinanza di SOS a Ras determina un incrementato scambio nucleotidico di Ras, sul quale GDP è sostituito da GTP. I recettori accoppiati a proteine G possono attivare in Ras la stimolazione di fattori di scambio. In alcuni casi, questo coinvolge la transattivazione di recettori a tirosin cinasi per fattori di crescita. Altre proteine non recettoriali possono essere fosforilate su residui di tirosina e favorire l'interazione con GRB2. La diversità di questi fattori di scambio implica che Ras è attivato da molteplici stimoli extracellulari. Quest'attivazione è inibita dagli effetti di differenti GAP che promuovono l'idrolisi di GTP legato a Ras e determinano la rapida inattivazione di Ras dopo stimolazione.

Ras legante GTP è capace di legare e attivare differenti enzimi effettori che partecipano nella regolazione della proliferazione cellulare, sopravvivenza ed altri aspetti del comportamento cellulare che possono contribuire al fenotipo trasformato.

Il primo effettore di Ras ad essere caratterizzato nei mammiferi è la protein cinasi serina/treonina RAF. Ras legante GTP lega e contribuisce all'attivazione di tre proteine RAF: c-RAF-1, BRAF, ARAF. Questa interazione determina la localizzazione di RAF sulla membrana plasmatica e la sua conseguente

attivazione. Una volta attivato, RAF fosforila e attiva a valle protein cinasi 1 e 2 attivate da mitogeni (MEK1 e MEK2), cinasi che sono capaci di fosforilare e attivare le protein cinasi attivate da mitogeni 1 e 2 (MAPK) ERK1 e ERK2 (cinasi 1 e 2 regolate da segnali extracellulari). I substrati di ERK1/2 sono proteine citosoliche e nucleari che possono essere trasportate nel nucleo in seguito ad attivazione come nella regolazione dei fattori di trascrizione. ERK fosforila i fattori di trascrizione della famiglia ETS ed ELK1; quest'ultimo regola l'espressione di FOS. ERK fosforila anche c-JUN e determina l'attivazione del fattore di trascrizione AP-1, il quale è generato da eterodimeri FOS-JUN. Questi fattori di trascrizione modulano proteine regolatrici del ciclo cellulare come le cicline di tipo D, che rendono le cellule capaci di progredire oltre la fase G1 del ciclo cellulare. L'attivazione di RAF insieme ad altri segnali può promuovere la progressione del ciclo cellulare.

Oltre al segnale Ras/MAPK, Ras è in grado di attivare altri percorsi effettori.

Ras può interagire con la subunità catalitica del fosfatidilinositolo 3-cinasi di tipo I (PIK3) determinando l'attivazione di una cinasi lipidica come conseguenza della sua traslocazione sulla membrana e del suo cambiamento conformazionale. PIK3 fosforila il fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato (PtdIns 4,5 P₂) per produrre il fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PtdIns 3,4,5 P₃), un secondo messaggero che lega un ampio numero di proteine. PIK3 controlla l'attività di un gran numero di enzimi a valle, i più importanti dei quali sono la cinasi PDK1 (protein cinasi 1 dipendente dal 3-fosfoinositide) e AKT (anche conosciuto come PKB). PDK1 è importante per l'attivazione di numerose

protein cinasi. AKT/PKB ha un grande potere antiapoptotico che svolge attraverso la fosforilazione di numerosi bersagli e ha un ruolo molto importante nel segnale di sopravvivenza generato da Ras. L'attivazione di PIK3 determina la stimolazione di RAC, un membro della famiglia di proteine RHO che è coinvolto nella regolazione del citoscheletro di actina e di fattori di trascrizione, come ad esempio NF- κ B. L'attivazione di RAC è importante nella trasformazione indotta da RAS attraverso percorsi dipendenti e indipendenti da PIK3.

La cascata Ras, PI(3)K ed mTOR forma un segnale biochimico che, quando mutato, determina la proliferazione cellulare anche in assenza di stimoli ambientali di crescita (41). Questo segnale causa lo sviluppo della cancerogenesi attraverso la fosforilazione coordinata di proteine che regolano direttamente la sintesi delle proteine, la progressione del ciclo cellulare e il metabolismo e, attraverso la regolazione di fattori di trascrizione, l'espressione di geni coinvolti in questo processo. MTOR è una cinasi serina/treonina altamente conservata che è coinvolta nel controllo della crescita cellulare in risposta a svariati stimoli ambientali. Recenti lavori hanno dimostrato che Ras e PI(3)K convergono per attivare mTOR in modo che possa stimolare la crescita cellulare.

Una terza famiglia di effettori di Ras è rappresentata dalle proteine fattori di scambio RAL. Le proteine RAL sono fattori di stimolazione del gene RALGDS, gene simile a RALGDS (RGL/RBS2) e RGL2/RLF. Grazie a queste proteine, Ras è capace di stimolare RAL determinando l'attivazione della fosfolipasi D1 e l'attivazione della proteina 1 legante CD42/RAC-GAP-RAL

(RALBP1). Il segnale RALGDS contribuisce insieme ad AKT/PKB all'inibizione dei fattori di trascrizione FORKHEAD della famiglia FoxO. Essi sono implicati nella promozione dell'arresto del ciclo cellulare attraverso l'induzione di inibitori di cinasi ciclina-dipendenti, KIP1 o p27 e dell'apoptosi attraverso l'espressione di BIM e del ligando FAS.

Attraverso l'azione combinata di questi segnali di risposta a Ras, l'espressione di Ras attivo costitutivamente a causa di mutazione può promuovere molte caratteristiche della trasformazione maligna. Queste includono l'incrementata proliferazione attraverso l'induzione di regolatori del ciclo cellulare, come la ciclina D1, la quale determina l'inattivazione del segnale del retinoblastoma e la soppressione di inibitori del ciclo cellulare come KIP1. Inoltre le cellule diventano resistenti all'apoptosi attraverso l'attivazione di AKT/PKB e di meccanismi a valle di RAF. I percorsi effettori di Ras hanno effetti sulla proliferazione e la sopravvivenza, ma conducono anche all'attivazione dell'angiogenesi, principalmente attraverso la stimolazione di fattori angiogenici mediata da ERK, e portano all'incrementata invasività.

L'alterazione dei percorsi mediati da Ras è la conseguenza della generazione di classi differenti di danno causato da mutazione nelle cellule tumorali(42-45). Il 20% dei tumori umani presentano mutazioni puntiformi attivanti Ras, la maggior parte in KRas (circa l'85% del totale) rispetto a NRas (circa il 15%) e HRas (meno dell'1%). Queste mutazioni compromettono l'attività GTPasica di Ras, impedendo a GAP di idrolizzare il GTP legato a Ras e quindi causando l'accumulo della forma attiva di Ras. L'attivazione di Ras

nei tumori è dovuta a mutazioni nei codoni 12, 13 e 61. Ras può anche essere attivato da delezioni di GAP. Il segnale di Ras è attivato anche nei tumori nei quali i recettori a tirosin cinasi per fattori di crescita sono iperespressi. Le tirosin cinasi della famiglia EGFR sono comunemente attivate attraverso produzione autocrina dei fattori simili a EGF, così come il fattore di crescita trasformante α (TGF- α) nei tumori.

L'inibizione o il blocco dell'attività di Ras e dei suoi effettori potrebbe avere un potenziale impatto su differenti aspetti della malignità.

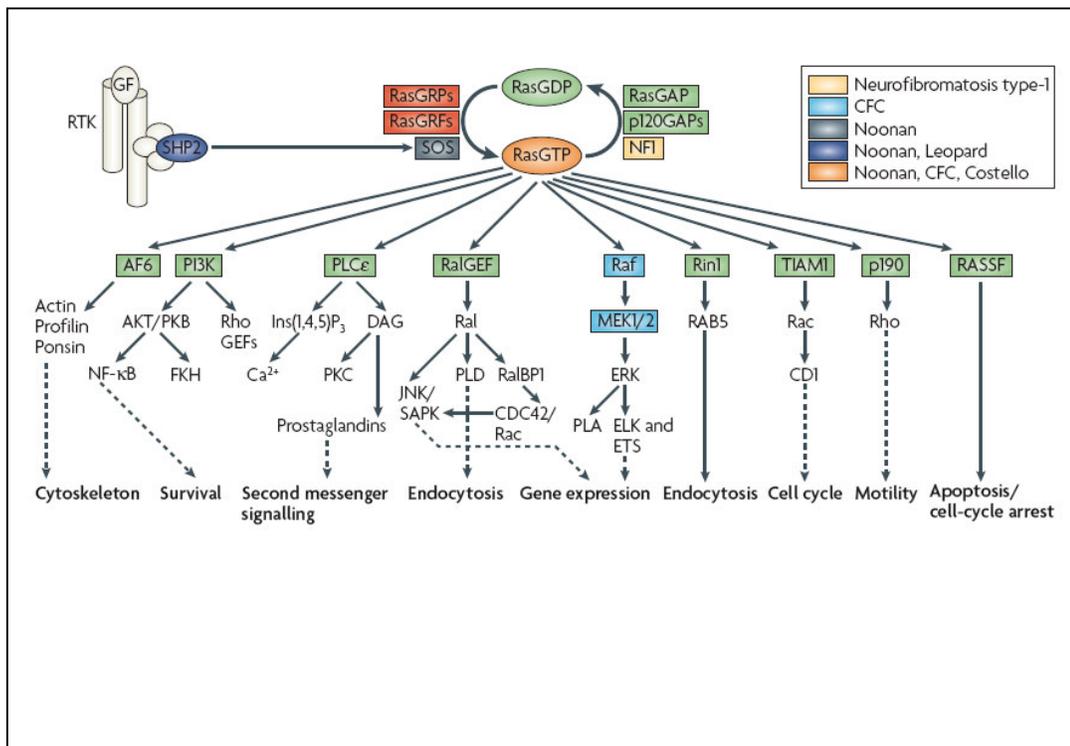


Fig.4 Vie del segnale attivate da Ras.

Le proteine Ras funzionano come switch guidati da nucleotidi che in seguito a stimoli extracellulari attivano vie del segnale a cascata citoplasmatiche. Il legame di GTP alle proteine Ras le converte nel loro stato attivo, il quale favorisce interazioni ad alta affinità con bersagli a valle che sono chiamati effettori. In seguito, una bassa attività intrinseca di GTPasi inattiva il γ -fosfato determinando l'inattivazione funzionale di Ras e quindi il blocco del segnale. L'attivazione del segnale è strettamente regolato da proteine attivanti le GTPasi (GAP) e fattori di scambio guanina nucleotide (GEF). GAP, così come p120GAP o la neurofibromina (NF1), aumentano la loro attività GTPasica intrinseca e quindi regolano negativamente la funzione della proteina Ras. Conseguentemente, GEF così come RasGRF e SOS catalizzano il distacco del nucleotide e quindi facilitano il legame di GTP e l'attivazione della proteina. La via classica di Ras è caratterizzata dall'attivazione di Ras e dal suo reclutamento sulla membrana plasmatica in seguito a stimolazione di recettori tirosin chinasi da parte di fattori di crescita. Ras attivato attiva molecole effettrici, che appartengono a differenti famiglie effettrici che danno inizio a differenti cascate di trasduzione del segnale. Mutazioni attivanti nei differenti componenti del segnale Ras-Raf-mitogen-activated-protein kinase (MAPK) sono associate con malattie dello sviluppo indicate nel testo.

Tratto da Carnoub A.E., Weinberg R.A. Ras oncogenes: split personalities. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9,517-531,2008.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

4.1 Percorso di trasduzione del segnale Ras/MAPK e suoi inibitori

Fattori di crescita, citochine e protooncogeni trasducono segnali che promuovono la crescita attraverso l'attivazione di Ras, una piccola proteina G, la quale determina l'attivazione della cinasi serina/treonina RAF e in seguito l'attivazione di (MEK) protein cinasi attivate da mitogeni (MAPK). MEK fosforila e attiva MAPK anche conosciuta come cinasi regolata da segnali extracellulari (ERK).(39)

Le MAPK sono enzimi evolutivamente conservati che connettono recettori sulla superficie cellulare a bersagli regolatori critici dentro la cellula. L'attività delle MAPK è regolata da una cascata composta di una MAPK, una cinasi MAPK (MAPKK, MKK o MEK) e una cinasi MAPKK o MEK cinasi (MAPKKK o MEKK). La loro attività può essere modulata da cinasi STE20 o da piccole proteine leganti GTP come Ras. (40)

La progressione del ciclo cellulare indipendente dall'ancoraggio è un marcatore del fenotipo neoplastico. Differenti fattori di crescita e recettori di adesione cellulare che sono coinvolti nella regolazione dell'entrata del ciclo cellulare indipendente dall'ancoraggio, stimolano numerosi percorsi che includono la fosfatidilinositolo 3-cinasi e la cascata MEK-ERK. E' stata ampiamente dimostrata l'importanza del segnale Ras-MEK-ERK nella crescita e nella progressione tumorale.

La proliferazione cellulare può essere attivata da recettori per fattori di crescita o tramite il legame di integrine a molecole specifiche per la matrice extracellulare durante l'adesione cellulare. L'attivazione di questi recettori è associata con l'induzione della ciclina D1 e la repressione di inibitori endogeni cinasi ciclina dipendenti, come p21 (anche conosciuta come WAF1 o CIP1) e p27 (anche conosciuta come KIP1). L'attivazione di ERK è richiesta per l'espressione della ciclina D1, l'intensità e la durata del segnale di questo segnale determineranno se una cellula andrà incontro a differenziazione, proliferazione o arresto del ciclo cellulare.

Differenti isoforme di RAF si adattano al macchinario del ciclo cellulare. Un forte stimolo da parte di RAF determina un arresto del ciclo cellulare specifico della fase G1, attraverso l'induzione di p21 che inibisce cinasi ciclina D ed E dipendenti (40). L'attivazione persistente di MEK provoca arresto del ciclo cellulare, mentre una moderata attività di RAF induce l'espressione della ciclina D1 e la sintesi del DNA. Lo stato di fosforilazione e i livelli di espressione di un ampio gruppo di prodotti genici del segnale MAPK, così come i fattori di trascrizione FOS, MYC, JUN regolano processi biologici. FOS funziona come un sensore della durata del segnale di Ras. Quando l'attivazione di Ras è transitoria, la sua attività diminuisce prima che la proteina FOS si accumuli. Attività sostenuta di ERK provoca la fosforilazione di FOS, determinando la sua stabilizzazione e attivando l'entrata nel ciclo cellulare.

Il segnale MEK-ERK media sia la progressione del ciclo cellulare sia il suo arresto, ma nella maggior parte dei tumori vi è un'attivazione persistente

del segnale Ras-MEK-ERK (Fig.5). Questo segnale contribuisce ad uno dei meccanismi che le cellule tumorali utilizzano per promuovere la loro sopravvivenza cellulare, esercitando un controllo sull'induzione dell'apoptosi.

Studi in differenti modelli sperimentali hanno evidenziato il coinvolgimento del segnale Ras-MEK-ERK nel controllo della sopravvivenza cellulare.

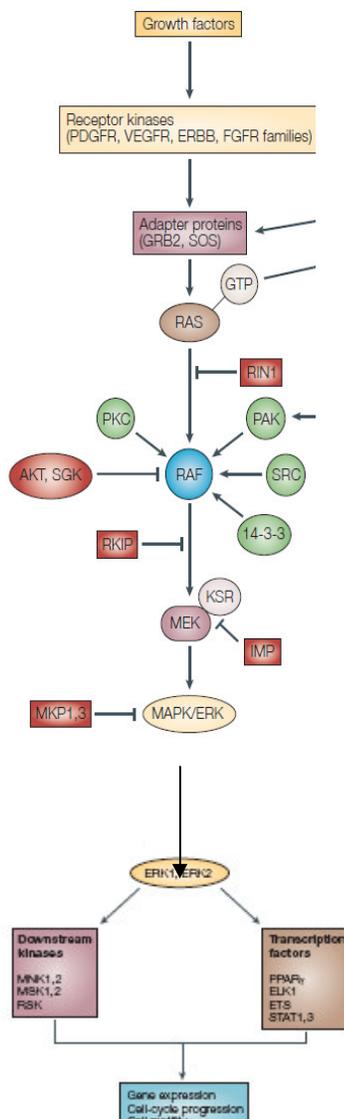


Fig.5 Via del segnale protein cinasi attivata da mitogeni.

In seguito al legame di ligandi a recettori a tirosin cinasi da parte di fattori di crescita come il recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR), il recettore per il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR), il recettore ERBB e il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR), essi si attivano. Questo induce il legame di proteine adattatrici come la proteina 2 legante il recettore per fattore di crescita (GRB2), che lega residui specifici fosforilati sulla porzione citoplasmatica dei recettori attivati. Insieme a GRB2, SOS, fattore di scambio guanina nucleotide attiva RAS, favorendo lo scambio di GDP con GTP. Nella sua forma legante GTP, RAS attiva l'attività cinasica di RAF e le sue vie del segnale a valle. RAF fosforila le cinasi protein cinasi attivate da mitogeno (MEK), le quali fosforilano e attivano le cinasi regolate da segnali extracellulari (ERK). ERK1 e ERK2 regolano differenti effetti cellulari. Essi attivano differenti cinasi e fattori di trascrizione. I cambiamenti risultanti nella regolazione genica hanno effetti sulla progressione del ciclo cellulare e la motilità cellulare.

Tratto da Sebolt-Leopold J.S., Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews Cancer* 4, 937-947, 2004

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

I membri della famiglia RAF (BRAF e c-RAF/RAF1) sono importanti mediatori dell'attività antiapoptotica. Entrambi i meccanismi dipendenti e indipendenti dalle cinasi di RAF mediano funzioni antiapoptotiche. RAF inibisce direttamente l'attività promuovente la morte della cinasi 1 che regola segnali di apoptosi attraverso un'interazione fisica tra le due proteine.

Il segnale classico attraverso il quale RAF regola l'apoptosi coinvolge la sua attività cinasica, la quale regola l'attività trascrizionale delle cellule e l'attività di proteine proapoptoiche. Il segnale può essere diviso tra eventi dipendenti e indipendenti da MEK. L'attivazione di ERK e della protein cinasi ribosomale S6 di 90 kDa dipendente da MEK determina la fosforilazione e inattivazione della proteina proapoptotica BAD. L'attivazione di RSK provoca la fosforilazione del fattore di trascrizione CREB, promuovendo in tal modo la sopravvivenza.

Tre proteine hanno ricevuto grande attenzione come bersagli farmacologici del segnale MAPK: RAF, MEK ed ERK. Queste proteine sono modulate da proteine regolatrici che agiscono tramite un meccanismo di feedback negativo. Le funzioni di questi componenti sono spesso sregolate durante la trasformazione oncogena. (45)

La proteina Disabled-2 (DAB2) è una fosfoproteina che risponde a stimoli mitogenici ed è stato dimostrato che funziona come un regolatore negativo della crescita cellulare (46, Fig.6), mediante la trasmissione di segnali.

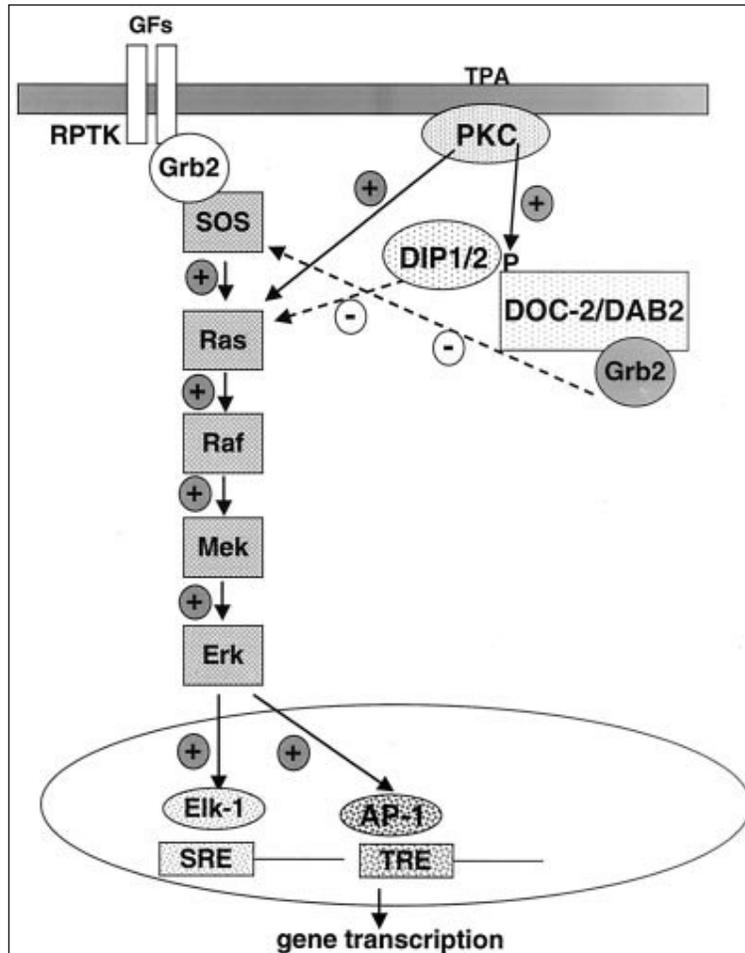


Fig.6 Il meccanismo di azione di DOC-2/DAB2 nella via di trasduzione del segnale di Ras.

L'estremità C-terminale di DOC-2/DAB2 (dominio ricco di proline) compete con SOS per il legame a Grb2, determinando l'inattivazione del segnale MAPK.

Tratto da Wang Z., Tseng C., Pong R., Chen H., McConnel J.D., Navone N., Hsieh J. *The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. The Journal of Biological Chemistry*, 277, 12622-12631, 2002.

La sua sequenza evidenzia il suo coinvolgimento nella trasduzione di segnali. Essa contiene un dominio di interazione con fosfotirosine (PID o PTB) situato nei 140 aminoacidi alla sua estremità aminoterminale e un dominio carbossiterminale ricco di proline, la cui sequenza somiglia a quella dei motivi ricchi di proline di Sos, il fattore di scambio guanina nucleotide di Ras.

E' stato dimostrato che Dab2 interagisce con Grb2. Il legame è dato dall'interazione tra i domini SH3 di Grb2 e le sequenze ricche di prolina di Dab2. Grb2 solitamente si lega a Sos tramite i suoi domini SH3. Pertanto Dab2 compete con Sos per il legame a Grb2. In questo modo Dab2 può agire come regolatore negativo dell'attivazione di Ras impedendo il legame di Grb2 a Sos e la conseguente attivazione di Raf, il primo effettore a valle del segnale di Ras. Raf attiva il segnale di Ras legandosi a Ras nella sua forma attiva (47).

La proteina Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) ha la capacità di legare le proteine Raf-1, MEK ed ERK in vivo e in vitro (48). Essa è un membro della famiglia di proteine leganti fosfatidiletanolamina (PEBP), ma può anche legare nucleotidi e oppioidi (49). RKIP interferisce con l'attivazione del segnale Raf-MEK-ERK in vivo e in vitro. E' stato dimostrato che l'iperespressione di RKIP sopprimeva il segnale ERK. Studi genetici hanno dimostrato che RKIP funziona all'interfaccia Raf-1/MEK. L'effetto inibitorio di RKIP sull'attivazione di MEK da parte di Raf-1 dipende dal legame di RKIP a Raf-1 e/o MEK. Essa formerebbe un complesso ternario con Raf, MEK, ERK. MEK ed ERK possono legare RKIP contemporaneamente, ma il legame

di Raf-1 o MEK a RKIP sono esclusivi. RKIP riduce l'affinità di Raf-1 a MEK inducendo probabilmente un cambiamento conformazionale (Fig.7).

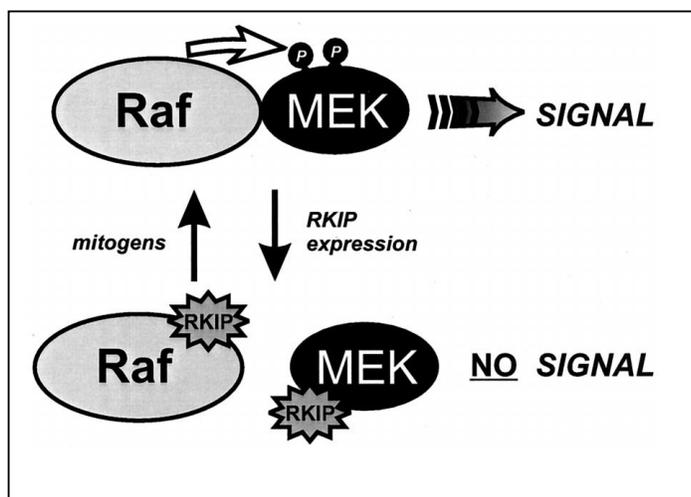


Fig 7. Modello della funzione di RKIP.

L'attivazione di MEK da parte di Raf-1 richiede l'interazione fisica tra Raf-1 e MEK. Il legame di RKIP a Raf-1 è regolato negativamente da stimoli mitogenici.

Tratto da Yeung K., Janosh P., McFerran B., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J., Kolch W. Mechanism of suppression of Raf/Mek/Extracellular signal – regulated kinase pathway by Raf kinase inhibitor protein. Molecular and Cellular Biology 20, 3079-3085, 2000.

Il legame di RKIP a Raf o MEK crea un ingombro sterico che impedisce la formazione del complesso. I siti di legame di RKIP e MEK su Raf-1 e di RKIP e Raf-1 su MEK sono localizzati all'interno del dominio cinasico. Quindi il legame di RKIP a Raf-1 e MEK può competere con il legame che essi formano tra loro e interferire con la formazione del complesso Raf-1-MEK. La formazione di questo complesso è necessaria per un'efficiente fosforilazione e attivazione di MEK.

La perdita della proteina RKIP endogena contribuisce all'attivazione costitutiva di ERK e alla trasformazione maligna degli epatociti (50,51). Meccanismi epigenetici potrebbero determinare la riduzione dei livelli di RKIP negli CE poiché nel suo promotore vi sono numerosi dinucleotidi CpG.

L'attività del segnale a valle di ERK dipende da varie risposte biologiche, come l'arresto del ciclo cellulare, la trasformazione, la mitogenesi e la differenziazione. RKIP eserciterebbe un'influenza profonda su questi parametri (50). La perdita di RKIP è un marcatore dello sviluppo e della progressione degli HCC.

La fosforilazione delle proteine rappresenta un meccanismo attraverso il quale l'attività di numerose proteine (enzimi, recettori, trasportatori) è attivata o inattivata in vari processi biologici che vanno dalla crescita cellulare alla differenziazione, apoptosi e sviluppo di malattie (52). Una volta fosforilate, le proteine devono essere defosforilate per ottenere una perfetta armonia nel macchinario cellulare. Il compito di svolgere la fosforilazione o la rimozione di gruppi fosfato dalle proteine è svolto da enzimi denominati protein fosfatasi.

Esistono differenti famiglie di fosfatasi che fosforilano proteine strutturalmente e funzionalmente diverse.

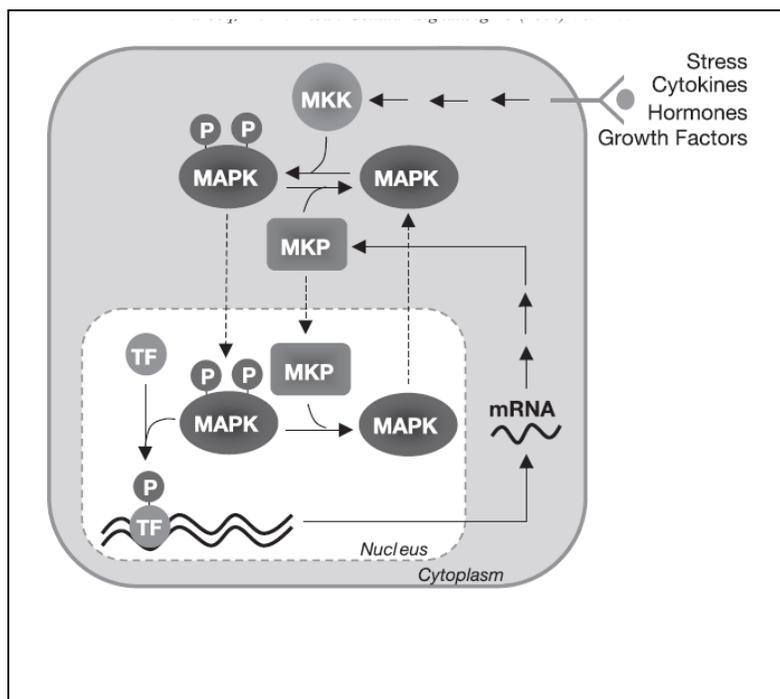


Fig.8 Il segnale MAPK e la sua inibizione da parte di MKP.

Vari stimoli come stress, citochine, ormoni e fattori di crescita attivano MKK. MKK fosforilano residui di tirosina e treonina all'interno del motivo -pTXpY-localizzato nel dominio di attivazione di MAPK. MAPK può quindi interagire con e fosforilare proteine citoplasmatiche, che alternativamente traslocano al nucleo, dove MAPK può interagire con fattori di trascrizione specifici (TF) che attivano la trascrizione genica di proteine specifiche che includono MKP. MKP a loro volta vanno incontro ad un meccanismo regolatorio a feedback negativo attraverso l'inattivazione di MAPK tramite duplice defosforilazione di -pTXpY-nel citoplasma e nel nucleo.

Tratto da Farooq A., Zhou M.. Structure and regulation of MAPK phosphatases. Cellular signalling 16, 769-779, 2004.

Le mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatases (MPK) sono una famiglia di fosfatasi capaci di fosforilare le MAP cinasi (Fig.8). Le MKP inattivano MAPK attraverso la defosforilazione di residui treonina e tirosina dentro la sequenza aminoacidica -pTXpY- localizzata nel sito di attivazione delle MAP cinasi, dove pT e pY sono fosfotreonine e fosfotirosine. Le MPK sono divise in tre principali categorie in base alla loro preferenza per la defosforilazione di residui di tirosina, serina/treonina o sia serina che treonina (dual specificity). Le fosfatasi dual specificity (DS-MKP o DUSP) contengono una sequenza aminoacidica: HCXXXXXR che è caratteristica di tutte le fosfatasi. I residui di cisteina e arginina dentro la sequenza aminoacidica del sito attivo e un residuo di aspartato localizzato nel sito acido sono posizionati l'uno vicino all'altro nel sito attivo della protein fosfatasi ed essi svolgono un ruolo essenziale nella defosforilazione di MAPK da parte di DS-MKP. La famiglia "DUSP" comprende quattro membri che sono classificati in base alle loro caratteristiche strutturali e funzionali. Quelle di tipo I sono residui di 200 aminoacidi e contengono solo un dominio DSP. Esse mostrano unica specificità per le MAPK, in particolare per ERK. L'attività e regolazione di ERK sono regolate da dual specificity phosphatases (DUSP), le quali agiscono legando e catalizzando la rimozione di treonine e tirosine fosforilate dentro il sito di attivazione. Una sottofamiglia di DUSP, chiamate MAPK fosfatasi nucleari inducibili, sono indotte rapidamente da stimoli e sono localizzate esclusivamente nel nucleo (53). DUSP-1/MKP-1 fa parte di questo gruppo. Esso è in grado di defosforilare ERK ed è attivo anche nei confronti di c-Jun

N-terminal kinase e/o p38. DUSP-1 funziona come un regolatore negativo nei confronti di ERK. Il legame di ERK alle fosfatasi è regolato da siti altamente specifici. DUSP-1 contiene domini che possono legare ed efficientemente defosforilare ERK. La defosforilazione di ERK determina la sua inattivazione e il suo conseguente passaggio dal nucleo al citoplasma.

Lo studio di questi regolatori negativi del segnale di proliferazione RAS-MEK-ERK è importante nella terapia genica per ostacolare lo sviluppo e la progressione degli HCC.

4.2 Vie che inducono l'apoptosi nella cascata Ras

Molti studi hanno avuto come oggetto il ruolo principale di Ras nel promuovere la proliferazione cellulare incontrollata associata allo sviluppo di tumori. La morte cellulare indotta dall'apoptosi è un meccanismo che le cellule adottano per prevenire il raggiungimento dello stato neoplastico. Recenti studi si sono occupati del potenziale ruolo di Ras in questo processo (10). Ras e altri oncogeni inducono paradossalmente segnali pro e antiapoptotici. Nelle cellule normali, un alto livello della forma attiva di Ras induce una risposta proapoptotica protettiva per prevenire l'oncogenesi in risposta a segnali iperproliferativi. Nelle cellule che sono già trasformate, l'attività oncogenica di Ras stimola maggiormente la sopravvivenza rispetto alla morte cellulare. Accanto a differenti vie che provocano la proliferazione cellulare, vi sono percorsi che sopprimono la cancerogenesi indotta da Ras inibendo la sopravvivenza delle cellule trasformate.

Una via di segnale proapoptotica recentemente scoperta è mediata dal legame di Ras ad un complesso formato dalle proteine NORE1A (novel Ras effector 1) e Mst1 (mammalian Ste20-like kinase). NORE1A è stata la prima proteina identificata che è capace di legare la forma attiva di Ras. Essa è un effettore di Ras. NORE1A fa parte di una famiglia di proteine prodotte dallo splicing alternativo del gene soppressore tumorale RASSF1. Essa eterodimerizza con RASSF1A nelle cellule e quindi può influenzare l'attività antineoplastica di RASSF1A. Quest'ultimo è un oncosoppressore tumorale la cui espressione è frequentemente perduta attraverso metilazione del promotore nei tumori (11). NORE1A promuove l'apoptosi attraverso un meccanismo tramite il quale RASSF1 e NORE1A legano Mst1, una protein cinasi implicata nel processo apoptotico. Mst1 è un membro relativo della famiglia Ste20 del gruppo II delle cinasi GC che promuove l'apoptosi. Mst1 attiva la caspasi 3, la quale in seguito a taglio determina l'apoptosi in presenza di stimoli apoptotici come per esempio il ligando Fas. Mst1 è sia un bersaglio clivato e attivato dalla caspasi 3, sia uno stimolatore della sua attivazione.

La completa attivazione di Mst1 richiede la sua fosforilazione, tramite Ras. La scoperta del complesso Nore1A-RASSF1A-Mst1 come un distinto segnale effettore di Ras che induce l'apoptosi aumenta la nostra comprensione del ruolo di Ras nelle decisioni di vita o morte delle cellule.

P120RasGAP funziona sia come un regolatore negativo, catalizzando l'idrolisi del GTP legato sia come un effettore di Ras. Esso è un importante mediatore dell'apoptosi, poiché è un substrato del taglio delle caspasi in seguito a differenti stimoli apoptotici, tra i quali Fas, TRAIL e agenti

danneggianti il DNA. P120RasGAP è tagliato in frammenti apoptotici in seguito ad induzione da parte di TRAIL. Un meccanismo tramite il quale P120RasGAP può indurre l'apoptosi è tramite la sua interazione diretta con modulatori di eventi apoptotici.

Ras può quindi funzionare come un regolatore positivo o negativo della crescita cellulare, modulando la crescita o la morte. Se una proteina oncogena promuove la proliferazione o la morte cellulare dipende dall'intensità del segnale, dal contesto nel quale la cellula si trova, dal tipo di cellule e dal tessuto di origine. Differenti segnali extracellulari possono promuovere la sopravvivenza o l'apoptosi modulando la specificità delle vie del segnale di Ras alle sue differenti proteine effettrici.

4.3 Via del segnale RASSF1A-NORE1A

Recentemente, è stata identificata una nuova famiglia di geni che codificano un dominio RA (dominio di associazione RaGDS/Ras) chiamati Ras-association domain family (RASSF). Essi consistono di 8 membri: RASSF1, RASSF2, RASSF3, RASSF4, RASSF5 (NORE1), RASSF6, RASSF7, RASSF8. Essi interagiscono direttamente o indirettamente con Ras nella forma attiva (54). Essi modulano alcune delle risposte inibitorie della crescita mediate da Ras e possono funzionare come geni soppressori tumorali. Le proteine RASSF sono soppressori tumorali, al contrario degli effettori tradizionali come Raf e PI3-K che sono invece oncoproteine.

Il locus genico di RASSF1 è localizzato sul cromosoma 3p21.3 e consiste di otto esoni che si estendono per circa 11kb. Da essi, sono generati sette differenti trascritti (RASSF1A-G) tramite differenti promotori e differente splicing alternativo.

RASSF1A è ubiquitariamente espresso nei tessuti normali. Esso ha quattro esoni C-terminali (esoni 3-6) che codificano un dominio di associazione a Ras (RA) e un dominio (Hippo) Sav/RASSF/Hpo (SARAH) che è l'omologo di Drosophila del gene Mst1/2, il quale unendosi con Salvador (Sav) e Warts (Wts) promuove l'uscita dal ciclo cellulare e l'apoptosi durante lo sviluppo. Il dominio RA media le interazioni con Ras e altre piccole GTPasi e il dominio SARAH media le interazioni proteina-proteina cruciali nel segnale che induce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi (interazioni eterotipiche nel caso di Sav, RASSF, Hpo e omotipiche nel caso di Mst1). Il trascritto da 1,9kB inizia da un promotore localizzato nella prima isola CpG e la trascrizione inizia con l'esone 1 α seguito dall'esone 2 α , che contengono un dominio legante diacilglicerolo/forbolo (DAG) anche conosciuto come regione conservata protein cinasi C la quale contiene un dominio zinc finger (Fig.9).

Nei tumori umani si verifica perdita dell'espressione di RASSF1A in seguito ad aberrante metilazione del promotore; tale alterazione è stata riportata in almeno 37 tipi di tumore, che includono: paraganglioma addominale, tumori alla vescica, cervello, mammella, cervicale, colangiocarcinoma, del colon, esofageo, gastrico, della testa e del collo, epatocellulare, linfoma di Hodgkin, ecc... La perdita di espressione di RASSF1A può essere dovuta, in qualche caso, anche a mutazioni somatiche. Differenti studi hanno evidenziato una

correlazione tra mutazioni di K-Ras e inattivazione di RASSF1A per metilazione.

Smith e colleghi sono stati i primi ad aver prodotto topi knockout per *Rassf1*, che presentano una delezione di 370 kb sulla regione sintenica alla regione di minima delezione sul cromosoma umano 3p21.3 (55). Topi knockout per RASSF1A mostravano un'incidenza incrementata di cancerogenesi spontanea ed un tasso di sopravvivenza diminuito. L'inattivazione di RASSF1A in combinazione con altre alterazioni genetiche o epigenetiche può produrre un fenotipo più suscettibile ai tumori. Nel carcinoma epatocellulare, la frequenza di metilazione di RASSF1A è molto alta, comparando qualche volta fino al 100% dei casi (56,57). RASSF1A svolge differenti funzioni che includono regolazione dell'apoptosi, instabilità genomica, regolazione della dinamica dei microtubuli durante la progressione del ciclo mitotico e cellulare e quindi può determinare l'integrazione di vie del segnale che controllano differenti funzioni cellulari. RASSF1 svolge anche altre funzioni dentro la cellula. Esso interagisce, infatti, con un enzima coinvolto nel trasporto del calcio al di fuori della cellula: plasma membrane calmodulin –dependent Ca^{2+} ATPase (PMCA), il quale può indicare una connessione con il segnale del calcio. (15) Esso può anche influenzare numerosi geni coinvolti nella trascrizione, sintesi delle proteine, regolazione del ciclo cellulare, metabolismo e adesione cellulare. (58)

Ras nella forma attiva è solitamente coinvolto nell'aumento della proliferazione, trasformazione e sopravvivenza cellulare. Esso può anche indurre un effetto inibitorio sulla proliferazione inducendo l'apoptosi.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

RASSF1, in quanto effettore di Ras, è specializzato nell'inibizione della crescita e induzione della morte cellulare. Nella cancerogenesi si ha l'inibizione di questi segnali attraverso metilazione del promotore di RASSF1A.

RASSF1A è capace di formare sia omodimeri che eterodimeri con la proteina legante Ras-GTP, Nore1. Esso è in grado di eterodimerizzare con Nore1, stabilendo così un'associazione indiretta con Ras-GTP in vivo.

Il gene più strettamente omologo a RASSF1 è il novel Ras effector 1 (NORE1A), anche conosciuto come RASSF5. NORE1A è localizzato sul cromosoma 1q32.1, e differenti trascritti sono prodotti da questo locus. NORE1a codifica per NORE1A, una proteina di 418 aminoacidi che contiene i domini RA, SARAH e un dominio legante DAG. L'eterodimerizzazione di NORE1 con RASSF1 è essenziale per la capacità di RASSF1A di associarsi con GTPasi simili a Ras.

NORE1A è ampiamente espresso nei tessuti normali e in differenti linee cellulari tumorali. Recenti lavori hanno dimostrato inattivazione epigenetica di NORE1A per metilazione del promotore nei tumori (59).

Esso è implicato nella soppressione della crescita in una maniera dipendente da Ras. Svolge questa funzione inducendo l'apoptosi attraverso il legame del suo dominio SARAH alla protein cinasi proapoptotica MST1. NORE1A endogeno e MST1 formano un complesso che si associa in vivo con Ras endogeno e mediante la formazione di questo complesso essi mediano l'effetto apoptotico di Ras.

NORE1A e RASSF1A formano costitutivamente un complesso con MST1 e possono modulare segnali proapoptotici iniziati dal segnale di Ras (60,61). MST1 appartiene alla famiglia di protein cinasi dei mammiferi simili a SPS1/STE20. L'iperpressione di MST1 o MST2 nei mammiferi promuove l'apoptosi (62,63). MST1 contiene un dominio catalitico aminotermine e un'estremità carbossiterminale non catalitica. Il sito di legame di NORE1A e RASSF1A a MST1 è localizzato nella loro porzione carbossiterminale, mentre MST1 lega NORE1A tramite la sua porzione carbossiterminale. (14) Lo stato di fosforilazione di Mst1 influenza la sua attività cinasica. RASSF1A è richiesto per la massima attivazione di Mst1 in risposta a segnali proapoptotici. (13). MST1 attiva i segnali JNK e p38 MAP kinase; inoltre induce frammentazione del DNA attraverso l'attivazione di caspasi, raggrinzimento della membrana, formazione di corpi apoptotici anche quando l'attivazione delle caspasi è soppressa (13).

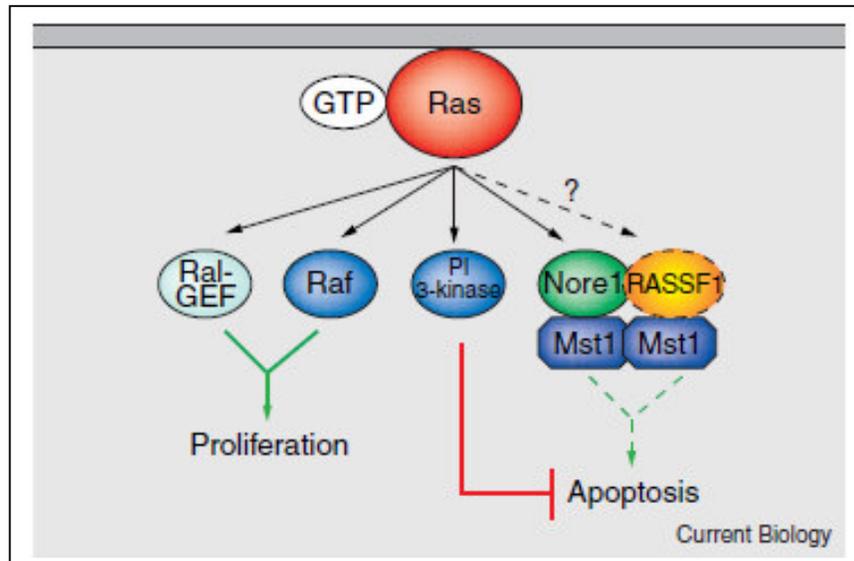


Fig.9 Attivazione della via apoptotica RASSF1A/NORE1A/MST1
 La perdita del soppressore tumorale RASSF1A può sopprimere la capacità della forma attiva di Ras legante-GTP di promuovere l'apoptosi attraverso Nore1A-Mst1, stimolando Ras ad attivare preferenzialmente la via del segnale PI 3-cinasi antiapoptotica. Insieme con la stimolazione mitogenica indotta da Raf e Ral GEF, questo potrebbe predisporre le cellule alla trasformazione oncogena.
Feig L.A., Buchsbaum R.J. Cell signaling: life or death decisions of Ras proteins. Current Biology, 12, 259-261, 2002

4.4 Via del segnale DAB2IP-ASK1

ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) è una proteina cinasi serina-treonina di 170 KDa che attiva il segnale a cascata JNK e p38 in risposta a citochine proinfiammatorie e stress ossidativo (16). E' stato dimostrato che nelle cellule endoteliali, l'iperespressione di ASK1 induce l'apoptosi. La cinasi ASK1 è composta di un dominio NH₂-terminale, un dominio interno cinasico e un dominio regolatorio COOH-terminale. Il dominio cinasico è richiesto per l'attivazione di JNK indotta dalle citochine per l'attivazione della morte cellulare. Il dominio NH₂-terminale ha azione inibitoria e interagisce con differenti proteine cellulari e previene l'attivazione di ASK1. Differenti fattori cellulari che includono tioredossina, glutaredossina e 14-3-3 inibiscono l'attivazione di ASK1. 14-3-3, una famiglia di molecole dimeriche leganti la fosfoserina, legano ASK1 in maniera specifica sulla Ser-967 dell'estremità COOH-terminale di ASK1 e inibiscono l'apoptosi indotta da ASK1 (Fig.10).

Una proteina recentemente identificata attivante Ras-GTPasi è la proteina 1 che interagisce con ASK1 (AIP1/DAB2IP), la quale promuove l'attivazione di ASK1 indotta da TNF (fattore di necrosi tumorale), facilitando la dissociazione di ASK1 da 14-3-3, il suo inibitore endogeno. DAB2IP consiste di differenti domini strutturali conservati: quello omologo alla pleckstrina (PH) la regione 2 conservata protein cinasi C (C2), la Ras-GAP all'estremità NH₂-terminale e all'estremità COOH-terminale una sequenza ricca di proline e un motivo leucine-zipper (65). TNF- α e altri stimoli extracellulari attivano DAB2IP inducendo il suo cambiamento conformazionale da una forma

superavvolta ad una forma che espone il suo dominio NH₂-terminale, rendendolo disponibile per l'interazione con il dominio COOH-terminale di ASK1. La porzione COOH-terminale di DAB2IP la mantiene in uno stato chiuso inattivo. Il legame di DAB2IP a ASK1 distrugge il complesso ASK1/14-3-3. La dissociazione di ASK1 da 14-3-3 è accompagnata dalla defosforilazione di ASK1 sulla Ser-967 da parte di fosfatasi come cdc25 e PP5. I siti di legame di DAB2IP e 14-3-3 su ASK1 si trovano in una sequenza vicina, ma DAB2IP, al contrario di 14-3-3, ha un'affinità più alta per la forma defosforilata di ASK1 sulla Ser-967. TNF induce la fosforilazione di DAB2IP sulla Ser-604 e il conseguente legame a 14-3-3 (75). DAB2IP interagisce in maniera specifica con ASK1 per attivare la cascata apoptotica ASK1-JNK/p38 (66,68-73).

L'espressione di DAB2IP è diminuita nelle linee cellulari tumorali epatiche e nei campioni di CE a causa dell' ipermetilazione del suo promotore, e questo dimostra la sua funzione di gene soppressore tumorale (67) L'omologo di ratto di DAB2IP è capace di inibire la crescita di linee cellulari tumorali umane. La metilazione del DNA è il principale meccanismo che inattiva l'espressione di DAB2IP nei tumori epatici.

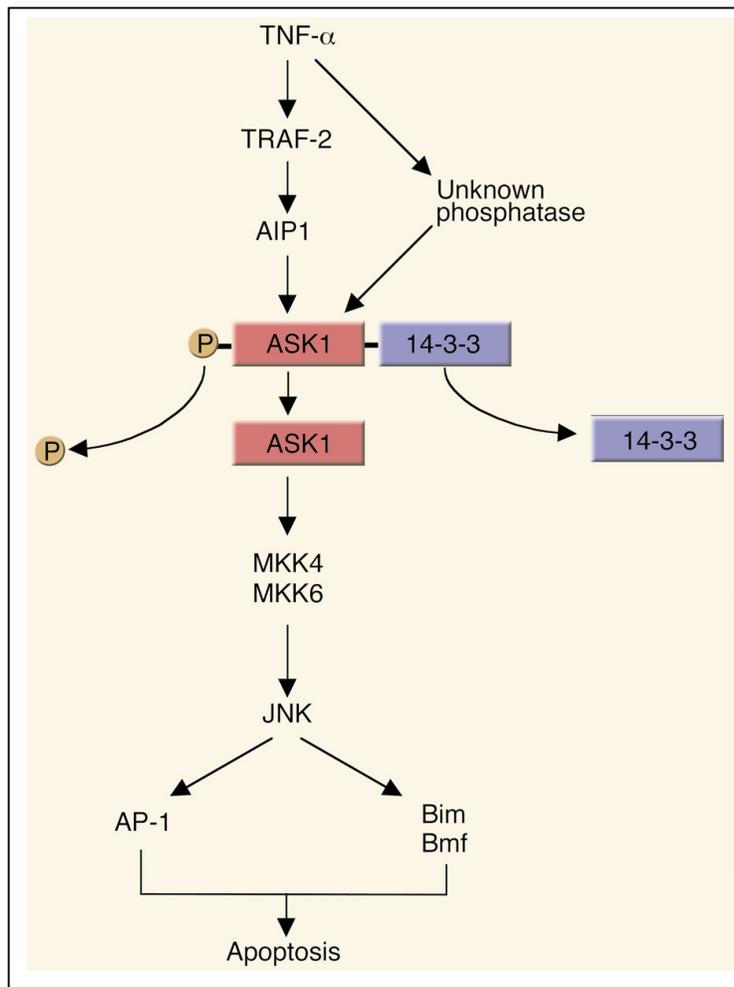


Fig.10 **Modello della via del segnale TNF- α attraverso TRAF2/DAB2IP/ASK1.**

L'attivazione di TNF-R1 determina il reclutamento della proteina adattatrice TRAF2 e l'attivazione concomitante di una fosfatasi non conosciuta attraverso un meccanismo che deve essere ancora identificato. TRAF2 media l'associazione di ASK1 con AIP1 (DAB2IP), il quale facilita il rilascio di ASK1 dal suo inibitore endogeno 14-3-3. La distruzione del complesso ASK1-14-3-3 e la defosforilazione di ASK1 da parte di una fosfatasi sconosciuta causa l'attivazione di ASK1. ASK1, a sua volta, attiva JNK attraverso percorsi dipendenti da MKK4 o MKK6. L'attivazione di JNK regola positivamente il macchinario apoptotico attraverso meccanismi dipendenti e indipendenti dall'apoptosi.

Tratto da Guicciardi M.E., Gores G.J., AIP1: a new player in TNF signaling. The Journal of Clinical Investigation 111, 1813-1815, 2003.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

4.5 Attivazione dell'apoptosi attraverso i percorsi p38MAPK e JNK

Le p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK) sono un gruppo di protein cinasi serina/treonina che insieme con ERK e JNK convertono differenti segnali extracellulari in specifiche risposte cellulari attraverso l'interazione e la fosforilazione di bersagli a valle (76). Le proteine della famiglia p38 MAPK con JNK regolano principalmente le risposte infiammatorie e allo stress. Il segnale p38 MAPK può funzionare da soppressore tumorale attraverso la regolazione della proliferazione, trasformazione, invasione e morte cellulare dipendente da Ras. L'attivazione di p38 inibisce l'espressione genica della ciclina D1, un essenziale effettore a valle del segnale proliferativo di Ras. L'attività di p38 può avere effetti regolatori sulla biosintesi e sulla stabilità di molecole proinfiammatorie, le quali giocano un ruolo importante nella regolazione della fase di inizio e di progressione dei tumori. Una moderata attivazione del segnale p38 frequentemente determina risposte di inibizione della crescita nei tumori.

L'attività del segnale di p38 è principalmente proapoptotica. Il segnale p38 può mediare vari segnali a monte che inducono la morte cellulare. P38 può promuovere l'apoptosi attraverso fosforilazione diretta delle proteine della famiglia Bcl-2: essa fosforila la proteina Bim sulla Ser65 per aumentare le sue funzioni proapoptotiche, e fosforila Bcl-2 sulla Thr56 e sulla Ser87 per inibire il suo potenziale antiapoptotico. P38 può funzionare sia a monte che a valle delle caspasi nell'apoptosi (77).

Le proteine JNK sono protein cinasi attivate dallo stress (78-81). Esse legano e fosforilano la proteina c-Jun legante il DNA e incrementano la sua attività trascrizionale. C-Jun è un componente del complesso trascrizionale AP-1, il quale è un regolatore importante dell'espressione genica. Le proteine JNK sono importanti nel controllare la morte cellulare programmata.

MST1 attiva i percorsi MAP kinase JNK e p38 attraverso MKK4/MKK7 e MKK3/MKK6. Il dominio COOH-terminale di MST1 ha un ruolo regolatorio negativo. Le caspasi tagliano e attivano MST1 attraverso la rimozione del suo dominio COOH-terminale. Un'ampia varietà di stimoli apoptotici induce il taglio di MST1 da parte delle caspasi, producendo un frammento iperattivo di 36 kDa. In alcuni casi l'attivazione di MST1 avviene attraverso fosforilazione. L'espressione di MST1 determinava l'attivazione delle caspasi suggerendo un meccanismo a feedback positivo tra MST1-JNK e le caspasi. MST1 induce l'apoptosi attraverso l'attivazione di JNK e p38.

Sezione sperimentale

5. Scopo della ricerca

L'influenza dei geni di suscettibilità sul controllo del segnale Ras-ERK e sulle vie del segnale apoptotiche RASSF1A-NORE1A e DAB2IP-ASK1 e il ruolo di questi percorsi nell'acquisizione di un fenotipo resistente all'epatocancerogenesi non sono conosciuti. I ceppi di roditori resistenti all'epatocancerogenesi sono caratterizzati da diminuzione nella capacità di crescita o aumento della redifferenziazione delle lesioni preneoplastiche (4,5). Studi sui meccanismi che stanno alla base dell'acquisizione di un fenotipo suscettibile o resistente all'epatocancerogenesi in differenti ceppi di roditori, determinando la progressione di lesioni preneoplastiche a CE, può guidare alla scoperta di marcatori prognostici e bersagli terapeutici per le malattie umane.

Scopo di questo studio è stato quello di investigare il ruolo degli inibitori del segnale Ras/ERK, coinvolti nel blocco della crescita cellulare e nella morte cellulare, e dei percorsi RASSF1A/Nore1A e DAB2IP/Ask1, implicati nella morte cellulare, nell'acquisizione di un fenotipo resistente o suscettibile all'epatocancerogenesi nei ceppi di roditori.

6. Materiali e metodi

6.1 Animali e trattamenti

Ratti Fisher 344 (F344) e Brown Norway (BN), del peso di 140-160 g all'inizio del trattamento, sono stati alimentati con una dieta standard e con acqua di fonte *ad libitum*, e sono stati allevati in gabbie singole in un ambiente a temperatura ed umidità costanti, rispettivamente 22 °C e 50% e con un ciclo sonno-veglia di 12 ore. I ratti F344 e BN, sono stati trattati secondo il "modello dell'epatocita resistente", che include un trattamento iniziante con una singola dose necrogenica (150mg/kg per via intraperitoneale) di Dietilnitrosamina (DENa), seguita dopo la crescita riparativa, da 15 giorni di dieta iperproteica contenente il mitoinibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF) allo 0,02%, con un'epatectomia parziale (PH) a metà di tale trattamento (protocollo inizio/selezione o IS) (25).

I ratti F344 e BN che non hanno subito alcun trattamento sono stati usati come controlli.

Gli animali sono stati sacrificati per perfusione dell'aorta toracica, sotto anestesia indotta da etere; il fegato preneoplastico (FP, 4-12 settimane dall'inizio del trattamento), i noduli neoplastici (NN, a 32 settimane) e i carcinomi epatocellulari (CE, a 57 e 60 settimane), sono stati isolati e utilizzati per gli esperimenti (Fig.11).

Sono state identificate varie lesioni precancerose: i foci di epatociti alterati (FEA) ed i noduli precoci sono stati identificati come cellule chiare eosinofile senza evidenti aspetti atipici. Trentadue settimane dopo inizio del trattamento, erano presenti nel fegato noduli con aspetto neoplastico (altamente displastico). I noduli mostravano alterazioni nella disposizione laminare, ispessimento delle lamine, accumuli di epatociti in cordoni o nidi, dilatazioni sinusoidali e atipie nucleari. Nella fase di promozione e di progressione, i carcinomi epatocellulari dei ratti F344 erano altamente o moderatamente differenziati, mentre nei ratti BN sono stati riscontrati soltanto carcinomi epatocellulari ben differenziati.

Tutti gli animali hanno ricevuto cure umane, e i protocolli di studio sono stati eseguiti in osservanza delle linee guida delle norme che disciplinano l'utilizzo di animali in laboratorio.

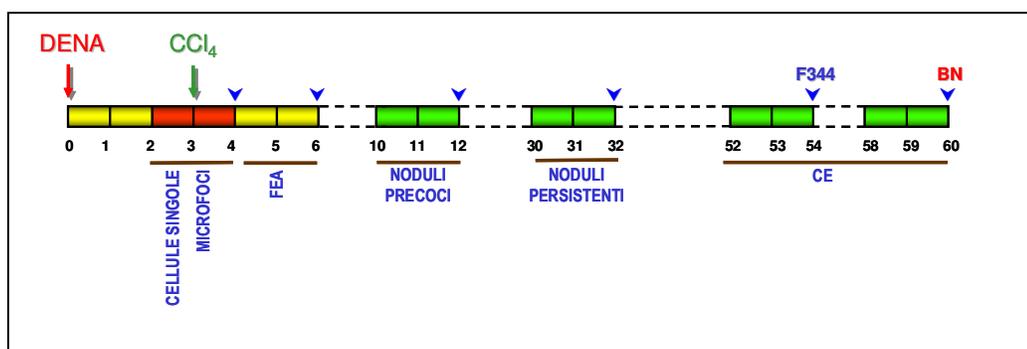
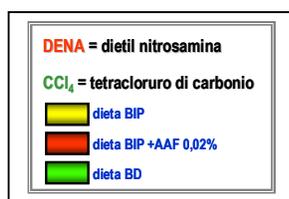


Fig. 11 Modello di Solt e Farber o dell'epatocita resistente



Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

6.2 Istologia e immunoistochimica

I tessuti epatici dei ratti erano fissati in formalina tamponata (pH 7) e utilizzati per le colorazioni ematossilina/eosina o per le colorazioni immunoistochimiche dell'isoforma 7-7 glutatione-S-transferasi, Nore1A, (61) e della forma clivata della caspasi 3. Dopo l'inclusione in paraffina, sono state effettuate sezioni seriali dello spessore di 5 μm e utilizzate per la colorazione immunoistochimica glutatione S-transferasi di tipo placentare (GST-P) o la colorazione ematossilina/eosina. Nella colorazione immunoistochimica GST-P, le sezioni sono state lavate nella serie decrescente degli alcool; nel metanolo assoluto contenente lo 0.03 % di perossido d'idrogeno, per eliminare l'attività perossidasi endogena. In seguito ai lavaggi in acqua distillata, le fettine sono state poste in microonde per venti minuti immerse in tampone sodio citrato 0.01 M (pH 6), sono state lavate in PBS 1 X, pH 7.4, e sono stati legati i siti aspecifici con siero normale di capra al 5 %. Le fettine sono state incubate tutta la notte a 4 °C con gli anticorpi primari anti-isoforma 7-7 della glutatione-S-transferasi, Nore1A, la forma clivata della caspasi 3. Dopo aver lavato le fettine in PBS, esse sono state incubate con l'anticorpo secondario biotinilato e in seguito con il complesso perossidasi standard avidina-biotina fornito dal kit ABC Vectastain. La reazione è stata sviluppata con la diaminobenzidina (DAB). Infine, le fettine sono state contrastate con l'ematossilina. Come controlli positivi, sono state utilizzate sezioni di tessuto positive alla colorazione GST-P; i controlli negativi non sono stati incubati con l'anticorpo

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

primario. Il numero e il volume delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche positive alla colorazione anti-GST-P sono state calcolate attraverso analisi morfometrica.

Nella colorazione ematossilina/eosina non si ha l'incubazione delle fettine con gli specifici anticorpi.

6.3 Indici di proliferazione e apoptosi

Gli indici di proliferazione sono stati determinati dopo iniezione intraperitoneale di 5 mg/100g di peso corporeo di 2- bromo-deossiuridina (BrdU), due ore prima del sacrificio (64).

La quantità di BrdU incorporata nei nuclei è stata determinata immunostochimicamente utilizzando il " kit della proliferazione cellulare". L'indice apoptotico è stato determinato contando i corpi apoptotici in almeno 2000 epatociti su fettine colorate con ematossilina/eosina. Gli indici di proliferazione e apoptosi erano espressi come percentuale rispetto al numero totale di cellule contate. I cambiamenti nucleari che rappresentano l'apoptosi (condensazione, marginazione e frammentazione della cromatina) sono stati rivelati attraverso la colorazione dello ioduro di propidio (64).

6.4 RT-PCR Real time

I primers per i geni *Dab2*, *Rkip*, *Dusp1*, *Rassf1A*, *Nore1A* e l'acido ribonucleico ribosomale 18S (RNR-18) sono stati scelti con l'assistenza di "Assay-on Demand™ Products" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le reazioni di PCR erano eseguite con 75-300 ng di cDNA usando il sistema ABI

Prism 7000 e la Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La PCR è stata condotta con un ciclo iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguito da 40 cicli a 95°C per 15 secondi ed uno finale a 60°C per 1 minuto. I valori quantitativi sono stati calcolati usando il software PE Biosystems Analysis.

6.5 Immunoprecipitazione e Western Blot

Campioni di tessuto di fegato umano sono stati omogenizzati in tampone di lisi (30 mM di Tris HCl pH 7.5, 150 mM di NaCl, 1%NP-40, 0.5%di Na deossicolato, 0.1% di SDS, 10% di Glicerolo, 2mM di EDTA) contenente inibitori di proteasi e in seguito sonicati e centrifugati (3000 rpm/10'). Le reazioni di immunoprecipitazione sono state eseguite usando 4 ug di anticorpo coniugato ad agarosio. Gli anticorpi utilizzati sono elencati in tabella 1. L'anticorpo anti-Dab2IP è stato generosamente donato dal dott. J.T. Hsieh (Università del Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX). La concentrazione delle proteine è stata determinata usando il metodo di Lowry, utilizzando come standard l'albumina di siero bovino. Aliquote da 100 µg sono state denaturate in seguito ad ebollizione in tampone Tris-Glycina SDS, separate su SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa.. Le membrane sono state bloccate per 1 ora con latte scremato al 5% in TBS contenente Tween-20 allo 0,05% e successivamente messe ad incubare per 1 ora con i rispettivi anticorpi secondari biotinilati.

I complessi RassF1A/Nore1A, Ras/Dab2IP e 14-3-3/Ask1 erano studiati attraverso immunoprecipitazione di RassF1A, pan Ras e 14-3-3 con lo specifico anticorpo. Le proteine immunoprecipitate erano soggette a Western blotting e le membrane erano incubate con gli anticorpi anti-Nore1A, anti-Dab2IP o anti-Ask1. L'attivazione di HIF-1 α è stata accertata attraverso la determinazione dei complessi HIF-1 α attraverso immunoprecipitazione con l'anticorpo policlonale anti-p300.

La densità delle bande delle proteine è stata quantizzata in unità arbitrarie attraverso Molecular Imager ChemiDoc XRS, usando il Software di analisi Quantity One 1-D ed è stata normalizzata sui livelli di actina di ciascun campione.

Tabella 1. Lista di anticorpi primari utilizzati per l'analisi di immunoprecipitazione e co-immunoprecipitazione.

Proteina	Anticorpo	Epitopo
Pan-Ras	Topo monoclonale	Full length [†]
DAB2	Capra policlonale	COOH terminus [†]
DUSP1 (MKP-1)	Coniglio policlonale	COOH terminus [†]
RAF-1	Coniglio policlonale	COOH terminus [†]
pRAF-1	Coniglio policlonale	pSer338*
pMEK1/2	Coniglio policlonale	p217/221*
pERK1/2	Topo monoclonale	pThr202/Tyr204*
HIF-1 α	Coniglio policlonale	COOH terminus [†]
HXK II	Capra policlonale	COOH terminus [†]
VEGF- α	Topo monoclonale	Amino acids 1–140 [†]
p300	Topo monoclonale	Full length [†]
RASSF1A	Topo monoclonale	Full length [‡]
pMST1/pMST2	Coniglio policlonale	pThr183/Thr180*
pp38 MAPK	Topo monoclonale	pTyr182 [†]
pJNK	Topo monoclonale	pThr183/Tyr185 [†]
Cleaved caspase 3	Coniglio policlonale	Cleaved fragment*
ASK1	Capra policlonale	NH ₂ terminus [†]
14-3-3 β	Coniglio policlonale	NH ₂ terminus [†]
β -ACTIN	Coniglio policlonale	COOH terminus [†]

* Fornito dalla Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA).

[†] Fornito dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

[‡] Fornito dalla eBioscience Inc. (San Diego, CA).

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

6.6 Determinazione dell'attività di Ras

I livelli della forma attivata di Pan-Ras (Pan-Ras-GTP), legante RAF-1 sono stati determinati usando il kit “Ras Activation Assay Kit” (Millipore). I tessuti epatici erano omogenati in un tampone di lisi che conteneva HEPES 125 mM pH 7,5, NaCl 750 mM, Igepal CA-630 5%, MgCl₂ 50 mM, EDTA 5mM, glicerolo 10%, e inibitori di proteasi. Aliquote da un mg di lisato tissutale epatico erano soggette a “Ras pull-down assay” tramite incubazione overnight con 10 ug di Raf-1 RBD agarosio. Le proteine erano separate su SDS-PAGE, trasferite su membrane di nitrocellulosa e incubate con l'anticorpo monoclonale anti-Pan-Ras e successivamente con l'anticorpo secondario.

6.7 Analisi statistica

I dati sono stati riportati come media \pm deviazione standard (SD). I tests t-Student e Tuckey-Kramer sono stati utilizzati per verificare la significatività statistica. Valori di P < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

7.Risultati

7.1 Sviluppo di lesioni neoplastiche

La maggior parte dei foci preneoplastici positivi alla colorazione immunoistochimica GST 7-7 sviluppati nel fegato di ratti F344 e BN a 4 e 6 settimane dall'inizio del trattamento, mostravano aspetto istologico di lesioni a cellule chiare e eosinofile. Come già dimostrato in lavori precedenti (6), in questo stadio non vi è nessuna differenza interceppo nel numero e nel volume delle lesioni. A 12 settimane, la maggior parte delle lesioni preneoplastiche si presentavano come noduli a cellule chiare e eosinofile, di dimensioni più grandi di un lobulo epatico e che comprimevano il parenchima circostante in entrambi i ceppi di ratto. Essi erano più numerosi nei ratti BN (numero/cm³: 6400 per i ratti BN e 4000 per gli F344, P< 0,001, n=8), ma il volume delle lesioni era molto più piccolo nei ratti BN rispetto agli F344 (cm³ x 10⁴: 1,9 nei ratti BN e 13,5 negli F344, P<0,001, n=8). I noduli displastici (adenomi) e i CE scarsamente differenziati erano presenti a 32 e 57 settimane solo nei ratti F344. CE moderatamente differenziati si sviluppavano nel 70% dei ratti F344. Nei ratti BN, la maggior parte di tutti i noduli epatici era costituita da cellule chiare e eosinofile, senza aspetti atipici. Essi sviluppavano CE (per il 92% ben differenziati) a 60 settimane.

Come mostrato in Fig.12, il fegato preneoplastico di ratti F344 a 4 e 6 settimane dall'inizio del trattamento presentava un elevato indice di proliferazione. Questo era ancora relativamente alto nei noduli precoci a 12

settimane e nei noduli neoplastici a 32 settimane nel ceppo F344 e subiva un decremento nel CE, rimanendo di 10 volte più alto rispetto al controllo normale. Nel fegato preneoplastico dei ratti BN, a 4 e 6 settimane, si aveva un elevato indice di proliferazione, mentre diminuiva nei noduli precoci e neoplastici e nei CE a valori di 1,5-2,5 volte più bassi rispetto a quello dei ratti F344 ($P < 0,001$).

Un incremento relativamente lieve dell'indice apoptotico è stato trovato nel fegato preneoplastico e nei noduli di entrambi i ceppi e nei CE del ceppo F344 (Fig.12). L'indice apoptotico dei CE dei ratti BN era di 11 volte e 3 volte più alto rispetto al fegato di controllo e ai CE dei ratti F344 ($P < 0,001$).

Questi dati mostrano che nei ratti BN la lenta progressione dei noduli a CE dipende essenzialmente da una lenta progressione del ciclo cellulare, mentre l'alta apoptosi è il componente principale che determina la lenta progressione dei CE.

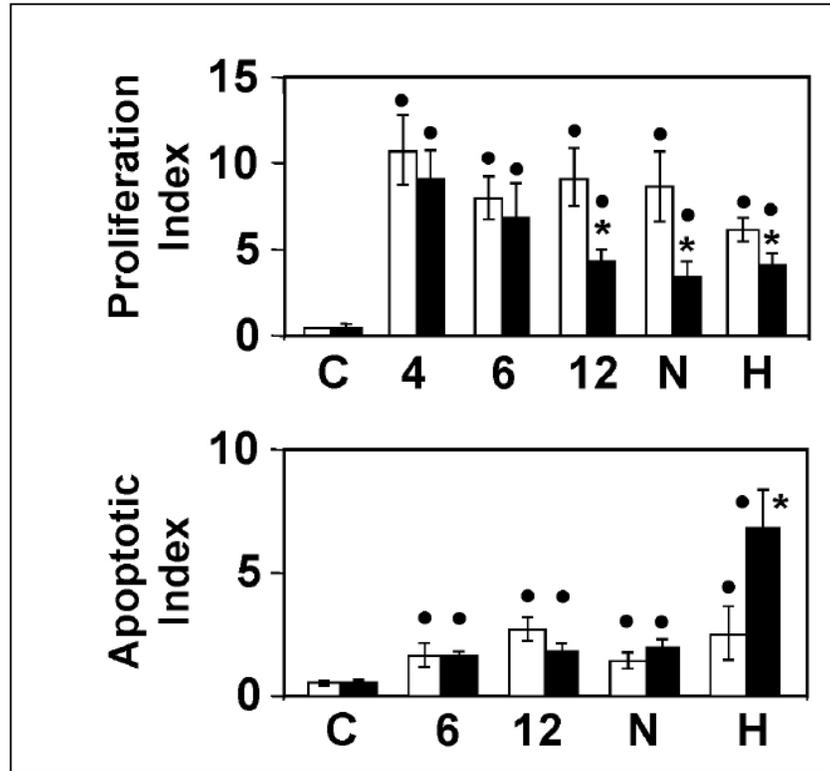


Fig.12 Indici di proliferazione e apoptosi nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche di ratti F344 e BN.

Gli indici di proliferazione e apoptosi rappresentano il numero di cellule con incorporazione nucleare di BrdU e il numero di corpi apoptotici, rispettivamente, espresso come percentuale del numero totale di cellule almeno 2000) contate all'interno di foci GST7-7 (4 e/o 6 settimane dall'inizio del trattamento), noduli precoci (12 settimane), noduli neoplastici (N 32 settimane) e HCC (H) nei ratti F344 (colonne bianche) e BN (colonne nere) trattati secondo il "modello dell'epatocita resistente".

I dati sono espressi come media±SD di 6 ratti.

Test Tuckey-Kramer: lesioni vs controllo (C) : (•) P < 0.001; BN vs F344, P < 0.001

7.2 Controllo genetico dell'attivazione del segnale

Ras/MAPK nelle lesioni epatiche di ratto

Per studiare se la differente suscettibilità all'epatocancerogenesi è associata con differente attività del segnale Ras sono stati determinati i livelli di Ras attivato nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei ratti F344 e BN. Nel fegato preneoplastico, nei noduli e nei CE dei ratti BN resistenti vi è un incremento di Ras-GTP rispetto ai valori del fegato di controllo, che raggiunge livelli significativamente più alti nelle lesioni corrispondenti dei ratti F344 suscettibili (Fig.13). Un simile andamento è stato riscontrato anche nella proteina Raf1. Tuttavia, nei CE si sono osservati alti livelli di Ras attivato accompagnati da un incremento di 1,5-1,7 volte di Raf1 attivato (pRaf1) e nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche di entrambi i ceppi di ratto si è osservato un lieve incremento di Mek1/2 (pMek1/2). Valori lievemente più alti di pRaf1 erano presenti nei CE dei ratti F344 e BN. Un incremento molto piccolo delle proteine totali Er1 e Erk2 si osservava nelle lesioni preneoplastiche a 12 settimane, noduli e CE senza differenze significative interceppo, eccetto per i noduli nei quali i livelli di Erk1/2 erano lievemente più bassi nei ratti BN rispetto agli F344. Al contrario, Erk1/2 attivato (pErk1/2) lievemente aumentava nelle lesioni preneoplastiche, noduli e, a livelli più alti, nei CE dei ratti F344, mentre vi è stata una minore induzione di pErk1/2 nelle lesioni corrispondenti dei ratti BN.

Questi dati indicano che la suscettibilità all'epatocancerogenesi è associata con un'attivazione più marcata della cascata Erk in entrambi i ceppi di ratto. Quindi, l'induzione degli effettori di Erk, che includono il fattore indotto dall'ipossia (Hif-1 α), la forma attiva di Hif-1 α (legante p300), il fattore di crescita endoteliale vascolare alfa (Vegf- α) e l'esochinasi II (Hxk II) compariva precocemente ed era significativamente più marcata nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei ratti F344 e BN.

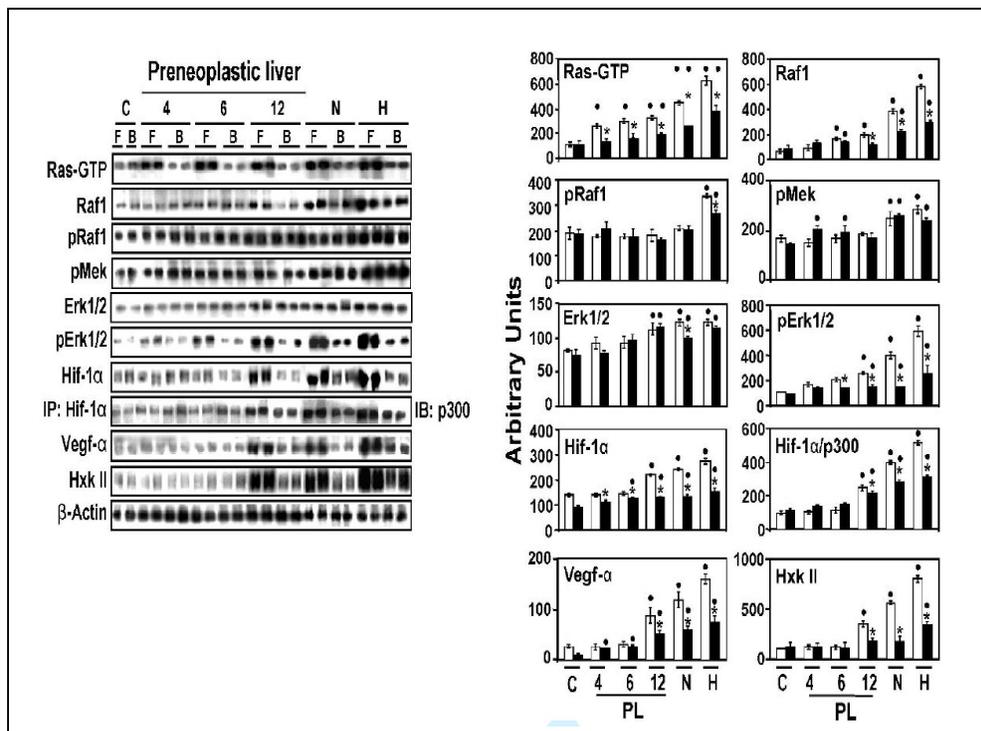


Fig.13 Attivazione della via di Ras nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche di ratti F344 (colonne bianche) e BN (colonne nere).

I fegati preneoplastici (4 e 6 settimane dall'inizio del trattamento), i noduli precoci (12 settimane), i noduli neoplastici e i CE erano indotti in ratti trattati secondo il "modello dell'epatocita resistente". I lisati proteici erano immunoprecipitati con specifici anticorpi e separati tramite SDS-PAGE.

Figura a sinistra: Analisi di immunoprecipitazione di Ras attivato e dei suoi effettori a valle (Raf1, pRaf1, pMek, pErk1/2, Hif-1α, Vegf-α e HXKII) nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche.

Figura a destra: Analisi di chemiluminescenza che mostra la media±SD di almeno 5 ratti controllo e 5 lesioni. Le densità ottiche dei picchi erano normalizzate ai valori di β-catenina e espressi in unità arbitrarie.

Test Tuckey-Kramer: (•) trattati con cancerogeno vs controlli, almeno $P < 0.01$; (*) BN vs F344, almeno $P < 0.05$.
 Abbreviazioni: C, fegato di controllo (normale); PL, fegato preneoplastico, N, noduli; H, HCC.

7.3 Sregolazione degli inibitori del segnale Ras/Erk nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche

Recenti studi hanno dimostrato che l'ampiezza e l'importanza della via del segnale di Ras possono essere modulate da inibitori specifici come le proteine Disabled homolog (Dab) 2, RAF Kinase inhibitor protein (Rkip) e Dual-Specificity Phosphatase 1 (Dusp1), le quali inibiscono l'attivazione di Raf1, Mek1/2 ed Erk1/2 rispettivamente. (46, 50, 74). L'apparente discrepanza tra i livelli delle proteine di Raf1 totale e quelli di Raf1 attivato suggeriscono che l'attivazione di Raf1 è controllata da Dab2. Per studiare le relazioni tra lo stato di attivazione di Raf1, Mek1/2 ed Erk1/2 e i rispettivi livelli di inibitori cellulari, sono stati determinati i livelli di mRNA degli inibitori Dab2, Rkip e Dusp1 nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei ratti F344 e BN (Fig 14A). Dab2 e Rkip erano indotti progressivamente dal fegato preneoplastico fino ai CE, ma sempre con livelli significativamente più alti nei ratti F344 rispetto ai BN. Invece, l'andamento di espressione di Dusp1 ricalcava quelli di Dab2 ed Rkip solo per quanto riguarda i ratti BN, mentre una graduale diminuzione di Dusp1 era presente nelle lesioni epatiche dei ratti F344 a partire da 12 settimane dopo l'inizio del trattamento e raggiungendo livelli più bassi nei CE dei ratti F344. L'andamento di espressione di Dab2 e Dusp1 è stato confermato anche dai livelli di proteine attraverso immunoprecipitazione (Fig.14B). Questi dati suggeriscono che una risposta efficace di Dusp1 potrebbe contribuire ad una limitata attivazione delle proteine Erk nei ratti BN.

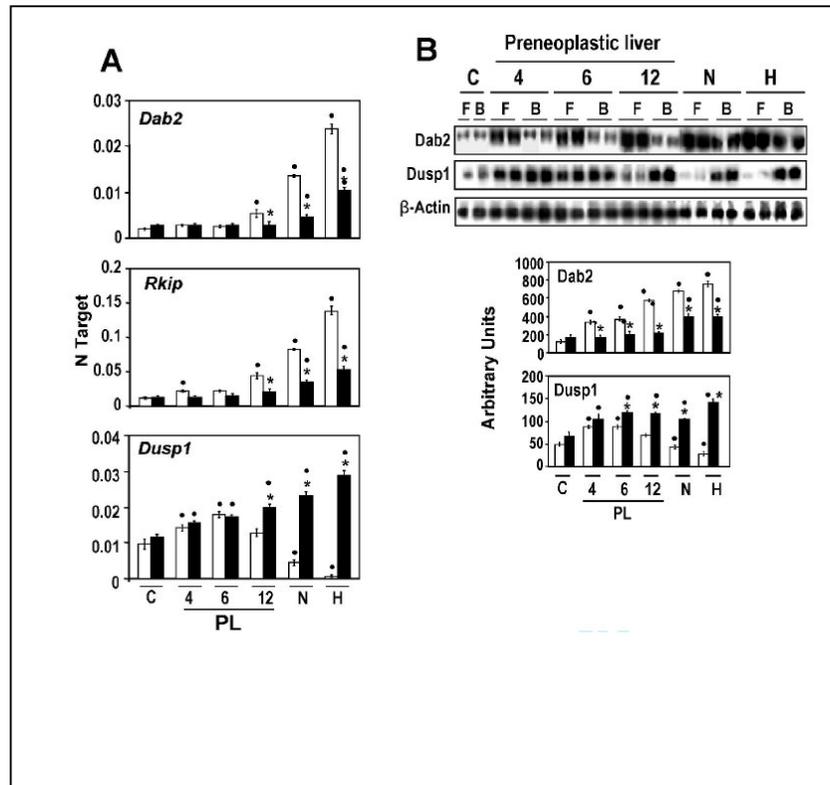


Fig.14 RT-PCR (A) e immunoprecipitazione (B) degli inibitori di Ras-MAPK nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche di ratti F344 (colonne bianche) e BN (colonne nere).

Fegato preneoplastico (4 e 6 settimane dall'inizio), noduli precoci (12 settimane), noduli neoplastici e CE erano indotte nei ratti trattati secondo il "modello dell'epatocita resistente".

(A) N target (NT) = $2^{-\Delta C_t}$, dove i valori di ΔC_t di ogni campione erano calcolati sottraendo il valore di Ct del gene bersaglio dal valore medio del Ct del gene RNR-18. I dati sono media \pm SD di N target di almeno 5 ratti di controllo e 5 lesioni.

(B) I campioni di proteine erano immunoprecipitati con anticorpi specifici e separati tramite SDS-PAGE.

Figura superiore: analisi di chemiluminescenza che mostra la media \pm SD di almeno 5 ratti di controllo e 5 lesioni. Le densità ottiche dei picchi erano normalizzate ai valori di β -actina ed espresse in unità arbitrarie.

Test Tuckey-Kramer, (A): (•) trattati con cancerogeno vs controllo, $P < 0.001$; (*) BN vs F344, $P < 0.001$. (B) (•) trattati con cancerogeno vs controllo, $P < 0.001$; (*) BN vs F344, $P < 0.001$. Abbreviazioni: C, fegato di controllo (normale), PL fegato preneoplastico, N, noduli; H, CE.

7.4 Le vie *RassF1A/Nore1A* e *Dab2IP/Ask1* sono coinvolte nell'apoptosi delle lesioni epatiche di ratto

Successivamente, abbiamo determinato se il coinvolgimento di Ras nella morte cellulare, mediato dai segnali apoptotici *RassF1A/Nore1A* (10-14) e *Dab2IP/Ask1* (16) è influenzato da geni di suscettibilità all'epatocancerogenesi nei ratti F344 e BN. Si ha un aumento progressivo degli mRNA di *Rassf1A* e *Nore1A* nelle lesioni preneoplastiche e nei noduli di entrambi i ceppi di ratto, raggiungendo valori significativamente più alti nei ratti F344 (Fig.15A). Tuttavia, gli mRNA di *Rassf1A* e *Nore1A* presentavano valori più alti nei CE dei ratti BN rispetto agli F344. Queste differenze erano confermate anche a livello di proteine per *Nore1A* (Fig.15B). In accordo con questi dati, il complesso *Rassf1A/Nore1A*, un indicatore dell'apoptosi mediata dal segnale *Rassf1A/Nore1A* (10, 14), presentava livelli più alti nel fegato preneoplastico e nei noduli dei ratti F344 rispetto ai BN, ma valori più elevati nei CE dei ratti BN rispetto agli F344 (Fig.15B). Un simile andamento è stato osservato studiando i livelli della forma attivata di *Mst1* (p*Mst1*), un bersaglio del complesso *Rassf1A/Nore1A* (12,13). In seguito, abbiamo investigato il coinvolgimento del segnale mediato dal complesso tra la proteina che interagisce con *Dab2* (*Dab2IP*; anche denominata *Aip1*, proteina che interagisce con *Ask1*) e la cinasi 1 che regola il segnale dell'apoptosi, *Ask1*, nell'apoptosi epatica di ratto. *Dab2IP* inibisce *Ras-GTP* (47) attraverso interazione diretta e facilita il rilascio di 14-3-3 da *Ask1*, attivando la morte cellulare programmata (16,65). I dati mostrati nella figura 15B evidenziano un

piccolo incremento progressivo del complesso Ras/Dab2IP nelle lesioni preneoplastiche di entrambi i ceppi di ratto, senza differenze tra i due ceppi. I livelli del complesso Ras/Dab2IP subivano una diminuzione nei noduli e nei CE dei ratti F344, ma continuavano a incrementare nelle lesioni dei ratti BN. Di conseguenza, i livelli del complesso Ras/Dab2IP erano 5 volte più alti nei CE dei ratti BN rispetto agli F344. Questi dati potrebbero evidenziare, almeno parzialmente, i livelli significativamente più alti di Ras-GTP nei noduli e nei CE dei ratti F344 (nei quali Ras-GTP non è inibito da DAB2IP) rispetto alle lesioni corrispondenti del ceppo di ratti BN (Fig.13). Inoltre, come ipotizzato, il complesso 14-3-3/Ask1 (che riflette lo stato di inattivazione dell'apoptosi provocata da Ask1) mostrava cambiamenti relativamente lievi nelle lesioni preneoplastiche e nei noduli di entrambi i ceppi di ratto mentre esso incrementava lievemente nei CE dei ratti BN. Questi cambiamenti non erano associati con variazioni della proteina totale Ask1 durante l'epatocancerogenesi in entrambi i ceppi di ratto. I livelli dei meccanismi effettori proapoptotici di Rassf1A/Nore1A e Ask1 che comprendono p38Mapk (P38Mapk) e JNK (pJNK Fig.15B) erano ugualmente o lievemente più alti nelle lesioni preneoplastiche e nei noduli dei ratti F344 rispetto ai BN. Nei CE, si osservava un'ulteriore induzione di queste proteine, con valori più alti nei ratti BN.

In accordo con questi risultati, è stata evidenziata, attraverso colorazione immunostochimica un'espressione maggiore dell'effettore a valle della forma attivata caspasi 3 (caspasi 3 clivata), che colocalizzava con le cellule positive per Nore1A, nei CE dei ratti BN rispetto agli F344. Questo era associato con un'apoptosi più marcata nei CE dei ratti BN rispetto agli F344 (Fig.16).

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

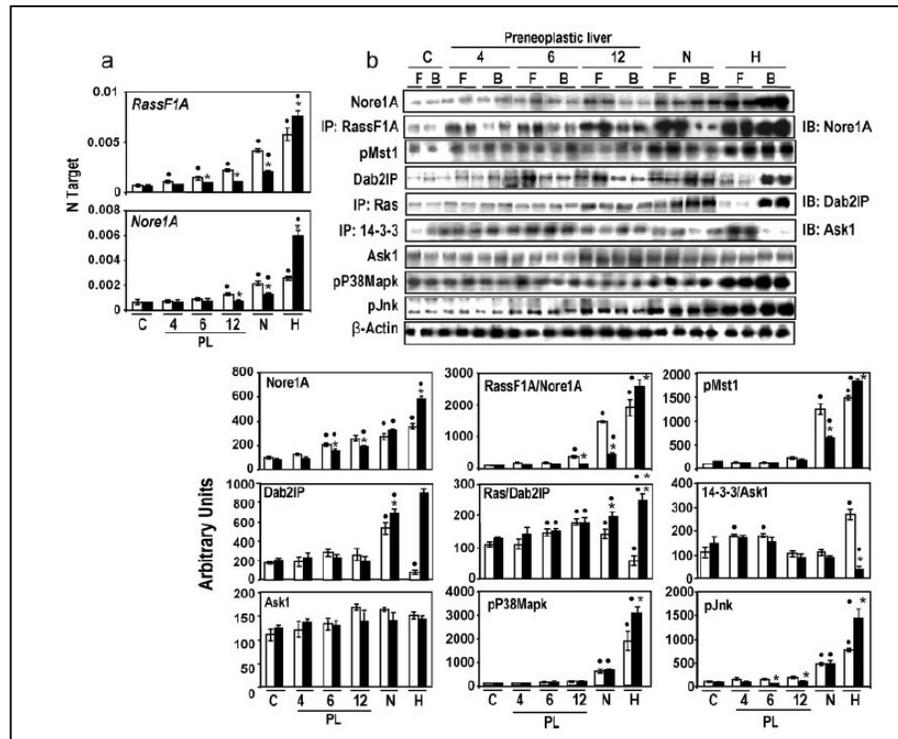


Figura 15. Attivazione delle vie apoptotiche Rassf1A/Nore1A e Dab2IP/Ask1 nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei ratti F344 (colonne bianche) e BN (colonne nere).

Fegato preneoplastico (4 e 6 settimane dall'inizio), noduli precoci (12 settimane), noduli neoplastici e CE erano indotte nei ratti trattati secondo il "modello dell'epatocita resistente".

(A) Determinazione della RT-PCR real time quantitativa dell'espressione di *Rassf1A* e *Nore1A* nei controlli e nelle lesioni. $N\ target\ (NT) = 2^{-\Delta Ct}$, dove i valori di ΔCt di ogni campione erano calcolati sottraendo il valore di Ct del gene bersaglio dal valore medio del Ct del gene RNR-18.

(B) I campioni di proteine erano immunoprecipitati con anticorpi specifici e separati tramite SDS-PAGE.

Figura superiore: Analisi di immunoprecipitazione dei percorsi *Rassf1A/Nore1A* e *Dab2IP/Ask1* e loro effettori a valle (pP38Mapk, pJNK).

Figura inferiore: analisi di chemiluminescenza che mostra $media \pm SD$ di almeno 3 esperimenti. Le densità ottiche dei picchi erano normalizzate ai valori di β -actina ed espresse in unità arbitrarie.

Test Tuckey-Kramer, (A): (•) trattati con cancerogeno vs controllo, $P < 0.001$; (*) BN vs F344, $P < 0.005$. (B) (•) trattati con cancerogeno vs controllo, $P < 0.001$; (*) BN vs F344, $P < 0.001$. Abbreviazioni: C, fegato di controllo (normale), PL fegato preneoplastico, N, noduli; H, CE.

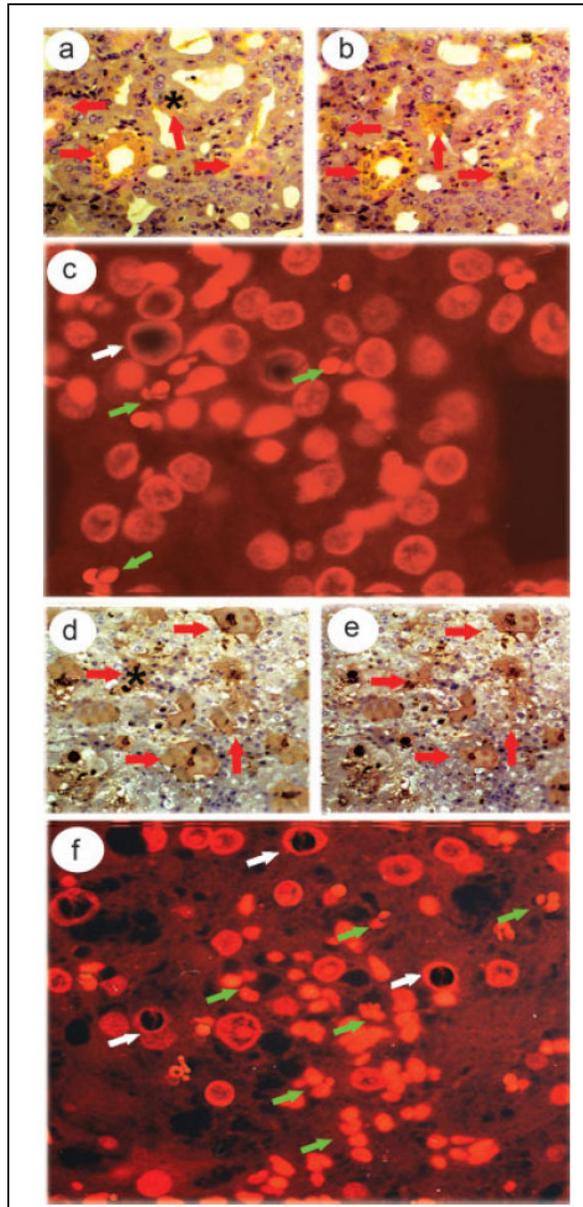


Figura 16. Analisi immunoistochimica dell'apoptosi nell'epatocarcinogenesi di ratto.

Immunoistochimica della forma clivata della caspasi 3 (A e D) e Nore1A (B ed E) nel CE dei ratti F344 (A e B) e BN (D ed E). I caratteristici cambiamenti nucleari dell'apoptosi, mostrati dalla colorazione Ioduro di propidio, in aree ad alto ingrandimento di CE di ratti F344 (C) e BN (F), corrispondono approssimativamente agli asterischi in A e D, rispettivamente. Alcune aree positive per la caspasi 3 clivata (A e D) e Nore1A (B ed E) sono indicate dalle frecce rosse.

Alcune figure apoptotiche rappresentate dalla condensazione/frammentazione e marginazione della cromatina sono indicate da frecce verdi e bianche, rispettivamente.

Notare la presenza di figure apoptotiche più numerose nei CE dei ratti BN rispetto agli F344. Ingrandimenti: A, B D, E, 40x; C, F, 840x.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

8. Discussione

Una caratteristica peculiare della resistenza geneticamente trasmessa all'epatocancerogenesi nei roditori è rappresentata dalla scarsa capacità delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche a progredire verso stadi più maligni (4-6). Precedenti lavori mostravano che questo dipende dall'incapacità delle lesioni preneoplastiche a crescere autonomamente anche in assenza di stimoli promoventi, una caratteristica associata all'inibizione di alcuni geni che controllano il ciclo cellulare, così come c-myc, le cicline e E2f1 (5,82) e di proteine come Hsp90, Cdc37 e Crm1, le quali proteggono il ciclo cellulare dall'inibizione da parte di p16^{INK4A} (6). In questo lavoro, abbiamo studiato gli effetti dei geni di suscettibilità/resistenza su uno dei percorsi che regolano la crescita cellulare: la cascata Ras/Erk, la cui sregolazione è fortemente coinvolta nell'epatocancerogenesi (3,21,27). In accordo ai risultati ottenuti, la suscettibilità genetica alla cancerogenesi epatica di ratto chiaramente influenza il segnale Ras/Erk1/2 (Fig.17), come mostrato dal differente comportamento dei geni chiave e degli inibitori di questo segnale nei ratti con suscettibilità o resistenza all'epatocancerogenesi trasmessa geneticamente. Una progressiva stimolazione di Ras-GTP e Raf-1, durante l'epatocancerogenesi del ceppo di ratti suscettibili F344, è associata con l'assenza di cambiamenti nell'espressione delle forme attivate di Raf-1 e Mek1/2 (pRaf1, pMek1/2), nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche o con un lieve incremento nei CE.

Questo è compatibile con una limitata attivazione di Raf1 mediata da Ras-GTP dovuta all'induzione dell'inibitore di Raf1, Dab2 (46, 50; Fig.17). Nei CE dei ratti F344, nei quali vi era un lieve incremento di pRaf1 in presenza di alti livelli di Dab2, è ipotizzabile che l'attività inibitoria di Dab2 su pRaf1 fosse soverchiata da stimoli a monte che portavano all'attivazione di pRaf1. Nelle lesioni del ceppo di ratto resistente BN, la minore espressione di Dab2 è associata con la minore espressione di Ras-GTP e Raf1, e conseguentemente, con un basso livello di pRaf1. Presumibilmente, meccanismi simili possono evidenziare l'effetto di Rkip sullo stato di attivazione di Mek1/2 e determinare l'assenza di differenze tra i due ceppi dell'espressione di pMek1/2. Tuttavia, la possibilità che altre fosfatasi interferiscano con lo stato di attivazione di Raf e Mek, durante la cancerogenesi epatica di ratto, non può essere esclusa e deve essere oggetto di ulteriori ricerche.

L'inibitore di pErk1/2, Dusp1, mostra un differente comportamento. Dusp1 era, infatti, lievemente stimolato nel fegato preneoplastico di entrambi i ceppi di ratto, ma la sua espressione diminuiva progressivamente nei ratti suscettibili a 12 settimane, nei noduli e nei CE dei ratti F344 in coincidenza con lo sviluppo di lesioni dotate di crescita autonoma (4,5,6). Al contrario, nelle lesioni dei ratti BN, Dusp1 incrementava ulteriormente. Questo suggerisce che anche in presenza di un limitato incremento degli attivatori a monte (Raf-1, Mek1/2), un fallimento nel meccanismo che regola l'attivazione di Erk1/2, rappresentato dall'induzione di Dusp1, potrebbe sostenere l'attivazione di Erk1/2 e contribuire allo sviluppo di lesioni epatiche dotate di crescita autonoma nei ratti F344. Questa conclusione è ulteriormente sostenuta

dall'iperpressione dei geni bersaglio di pErk1/2, come Hif1- α e Vegf- α , che regolano l'angiogenesi, e HxkII. Quest'ultimo gene è un enzima chiave della glicolisi, la cui espressione è correlata con l'mRNA di Hif1- α e può promuovere lo sviluppo del CE mediante meccanismi differenti, che includono aumentata produzione di energia, iperpressione di enzimi antiapoptotici e dei precursori metabolici per la crescita cellulare (83). La situazione era completamente differente nei ratti BN, nei quali un incremento progressivo nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche è stato associato con una bassa espressione di pErk1/2 e dei suoi bersagli. Questo potrebbe contribuire alla scarsa capacità delle lesioni dei ratti BN a crescere e progredire a CE.

Il meccanismo che sta alla base degli effetti dei geni di suscettibilità sulla sregolazione degli inibitori della cascata Ras/Erk non è completamente compreso. L'aumento progressivo dell'espressione degli inibitori del segnale Ras/Erk, che comprendono Dab2 e Rkip, nelle lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche dei ratti F344, suggerisce un meccanismo compensatorio che controlla (almeno parzialmente) la stimolazione di Ras-GTP, pRaf1 e pMEK1/2 in questo modello di ratto. L'inattivazione degli inibitori RKIP e DAB2 è frequente nei CE umani, in particolare nei tumori a peggiore prognosi (51,58), suggerendo una sregolazione più pronunciata dell'asse Ras/Raf1/Mek nei CE umani rispetto ai ratti F344. Per quanto riguarda le proteine Erk, noi abbiamo osservato una loro attivazione sostenuta nei noduli e nei CE dei ratti F344. In queste ultime lesioni, l'attività non bloccata di Erk potrebbe essere dovuta alla soppressione dell'inibitore specifico di Erk, Dusp1, come dimostrato nei CE umani a prognosi peggiore (59). Attivazione incrementata di

Erk induce la riduzione dei livelli di Dusp1 attraverso la fosforilazione della serina 296 di Dusp1 stesso, cui fa seguito la degradazione proteosomica di Dusp1 complessato con le proteine S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) e CDC28 protein kinase 1b (CKS1) (60 Fig.17). Questo può ulteriormente amplificare gli effetti di Erk sulla crescita del CE. L'iperespressione di Dusp1 nelle lesioni tardive dei ratti BN suggerisce una possibile bassa degradazione proteosomica della proteina Dusp1 in questo ceppo, determinando un'ulteriore inibizione di pErk1/2. Questi risultati supportano l'ipotesi che Dusp1 è probabilmente uno dei geni coinvolti nell'acquisizione di un fenotipo resistente. Dusp 1, inoltre, colocalizza con il locus di resistenza Hcr1 sul cromosoma 10, in corrispondenza di un picco di LOD, una regione frequentemente colpita da LOH durante l'epatocancerogenesi di ratto (61,62). L'esistenza di localizzazione e plausibilità funzionale non prova "per se" che Dusp1 è un "gene modificatore" dell'epatocancerogenesi (48). Dusp1 potrebbe essere, infatti, a sua volta controllato da geni modificatori della cancerogenesi epatica. In accordo con quest'ultima ipotesi, l'assenza di polimorfismi funzionali nel gene Dusp1 nei tessuti epatici dei ratti F344 e BN verificato attraverso il sequenziamento del DNA, suggerisce che Dusp1 non abbia un ruolo come gene modificatore tumorale. Ulteriori studi sono necessari per chiarire questo punto.

Il ruolo dell'apoptosi nella determinazione di un fenotipo resistente all'epatocancerogenesi è controverso. La morte cellulare nelle lesioni preneoplastiche precoci e nei noduli displastici ha mostrato di non essere influenzata dalla suscettibilità genetica all'epatocancerogenesi (5,6,7).

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

Tuttavia, apoptosi significativamente maggiore è presente nei CE indotti nei ceppi di ratti resistenti ricombinanti congenici DRH.F344.*Dhr1* e BN rispetto ai CE indotti nei ratti suscettibili. Questo e precedenti lavori (5,6,7) suggeriscono che il contributo dell'apoptosi alla resistenza geneticamente determinata caratterizza gli stadi tardivi dell'epatocancerogenesi nei ratti resistenti. I nostri risultati mostrano per la prima volta una stimolazione progressiva delle vie del segnale Rassf1A/Nore1A/Mst1 e Dab2IP/Ask1 (Fig.17) nel tessuto preneoplastico e neoplastico epatico di entrambi i ceppi di ratto, con una prevalenza significativa nei CE dei ratti BN. La via del segnale Dab2IP/Ask1 era più attiva nei CE dei ratti BN rispetto agli F344, determinando una significativa diminuzione del complesso inattivo 14-3-3/Ask1, senza cambiamenti in Ask1 totale in entrambi i ceppi. Questo dovrebbe pertanto risultare in una maggiore disponibilità di Ask1 libero e dell'apoptosi dipendente da Ask1. L'attivazione del segnale Rassf1A/Nore1A/Mst1 e Dab2IP/Ask1 dovrebbe determinare un'elevata fosforilazione delle proteine proapoptotiche p38Mapk e JNK (10,11,12 14, 46) da parte di pMST1 e/o Ask1, che è stata infatti osservata nei ratti BN. L'associazione di un alto indice apoptotico nei CE dei ratti BN con l'attivazione delle vie del segnale Rassf1A/Nore1A/Mst1 e Dab2IP/Ask1 suggerisce che questi segnali cellulari sono sotto il controllo di geni di suscettibilità/resistenza. Tuttavia, i meccanismi che determinano l'attivazione del segnale proapoptotico solo negli stadi tardivi dell'epatocancerogenesi, nei ratti resistenti, non sono ancora completamente compresi. Si dovrebbe considerare anche che l'incremento nelle vie del segnale

Rassf1A/Nore1A/Mst1 e Dab2IP/Ask1 non influenza esclusivamente la morte cellulare. Infatti, Dab2IP agisce anche come inibitore di Ras-GTP, e Nore1A può inibire la crescita cellulare indipendente da Ras o dalle cinasi proapoptotiche Mst1/2 (64). Il meccanismo della attività soppressoria tumorale di Nore1A non è ancora conosciuto, ma un'espressione significativamente più alta di Nore1A nei CE dei ratti BN rispetto agli F344 suggerisce che esso potrebbe essere un evento tardivo controllato da geni di suscettibilità/resistenza.

I risultati di studi epidemiologici suggeriscono un controllo poligenico dell'incidenza dei tumori al fegato negli uomini (65-67), e l'esistenza di differenti sottogruppi di geni a bassa-penetranza in differenti sottogruppi di popolazioni. Una complessa combinazione e intergioco di alleli di suscettibilità o resistenza determina il rischio individuale. I geni coinvolti nella determinazione del rischio individuale e i meccanismi effettori da essi controllati non sono conosciuti. Tuttavia prendendo in considerazione che l'attività proliferativa e il rimodellamento delle cellule iniziate nei roditori e l'attività delle vie del segnale sono sotto il controllo di geni di suscettibilità/resistenza (48,68) ci si può aspettare che il substrato genetico influenzi ampiamente la prognosi. Infatti, è interessante l'osservazione che i meccanismi che controllano il ciclo cellulare, influenzati da suscettibilità genetica nei ratti, sono anche alterati nei CE umani e la loro alterazione correla con la prognosi (4,5,6). In linea con questa conclusione, recenti osservazioni indicano che l'attivazione del segnale Ras/ERK coincide con la soppressione di RASSF1A/NORE1A nei CE umani (69). Inoltre, livelli significativamente più

alti di DUSP1 erano presenti nei CE umani a buona prognosi (quando confrontati con tessuti epatici normali e circondanti le lesioni non tumorali), mentre l'espressione di DUSP1 diminuiva lievemente in tutti i CE a cattiva prognosi nei quali, di conseguenza, si aveva un'attività più alta della cascata Ras/ERK (59). Questi dati dimostrano pertanto l'esistenza di un parallellismo tra la resistenza geneticamente trasmessa ai CE e la bassa propensione a progredire a CE e sostiene il valore del modello comparativo di ratto per l'identificazione di marcatori prognostici e bersagli terapeutici per i CE umani.

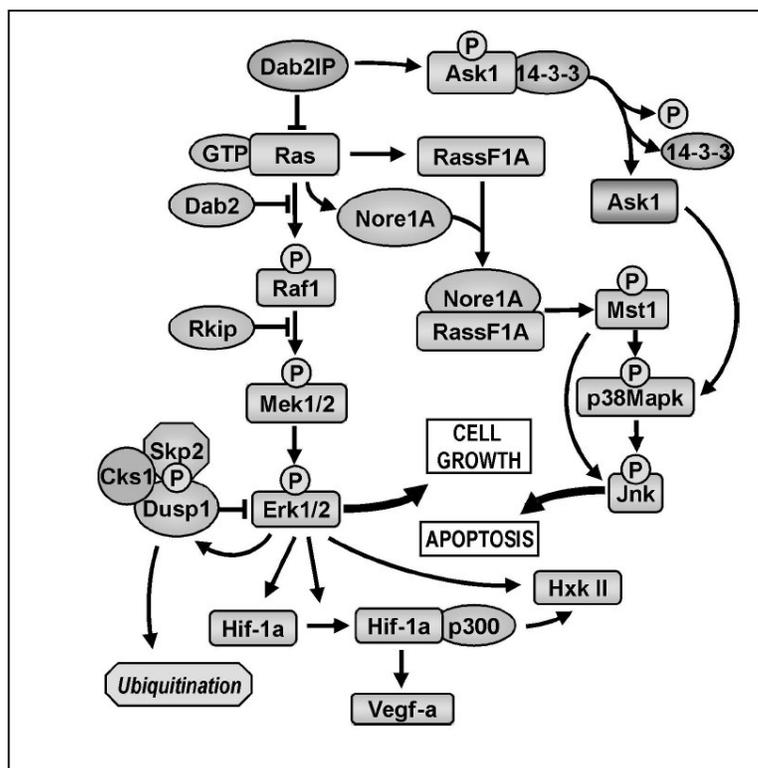


Fig.17 Rappresentazione schematica dei percorsi attivati Ras-Mapk e RassF1A/Nore1A e Dab2IP/Ask1 che stimolano la crescita cellulare e l'apoptosi, rispettivamente, e gli effetti degli inibitori Dab2, Rkip e Dusp1.

Abbreviazioni: Ask1, apoptosis signal-regulating kinase 1; Csk1, CDC28 protein kinase 1b; Dab2, disabled homolog 2; Dab2IP, Dab2-interacting protein; Dusp1, dual-specificity phosphatase 1; Erk, extracellular signal-regulated kinase; Hif-1- α , ipoxia-inducibile factor 1 α ; Hxk II, hesokinase II; Mst1, mammalian sterile twenty kinase 1; Nore1A, novel Ras effector 1; Rassf1A, Ras association domain family 1; Rkip, Raf kinase inhibitory protein; Skp2, S-phase kinase-associated protein 2 (p45); Vegf- α , vascular endothelial growth factor α .

9. Conclusioni

L'influenza dei geni di suscettibilità sul controllo del segnale Ras-ERK e sui segnali di apoptosi RASSF1-NORE1A e DAB2IP-ASK1, e il ruolo di questi segnali nell'acquisizione di un fenotipo resistente all'epatocancerogenesi non sono conosciuti. I ceppi di roditori resistenti all'epatocancerogenesi presentano lesioni preneoplastiche con diminuita capacità di crescita e aumentato rimodellamento (4,5). Studi sui meccanismi che regolano un fenotipo suscettibile o resistente all'epatocancerogenesi nei ceppi di roditori, che presentano lesioni preneoplastiche con differente capacità a progredire a CE, può guidare alla scoperta di marcatori prognostici e bersagli terapeutici per i CE umani.

In questo studio, abbiamo indagato comparativamente in differenti ceppi di ratto il ruolo degli inibitori del percorso Ras/Erk, coinvolti nel blocco della crescita e della morte cellulare, nell'acquisizione di un fenotipo resistente o suscettibile all'epatocancerogenesi. I nostri risultati mostrano che il segnale Ras/Erk e i segnali proapoptotici RASSF1A/Nore1A e Dab2IP/Ask1 sono sotto il controllo di geni di suscettibilità all'epatocancerogenesi. I nostri dati evidenziano un ruolo prominente di Dusp1 nell'acquisizione di un fenotipo resistente allo sviluppo di CE nei ratti BN. Inoltre, abbiamo evidenziato che l'attivazione tardiva dei segnali RASSF1A/Nore1A e Dab2IP/Ask1 è associata con un alto tasso di morte cellulare nei CE dei ratti resistenti.

Bibliografia

- 1) Bruix J., Boix L., Sala M., Llovet J.M.. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*;5:215-9, 2004.
- 2). Bosch F.X., Ribes J., Diaz M., Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*;127: S5-16, 2004
- 3) Fabregat I., Roncero C., Fernandez M., Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer, *Liver International ISSN 1478-3223*, 2007.
- 4) 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. Interpretive analysis of recent development on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta 1765*, 126-147, 2006.
- 5) Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Muroi M.R., Calvisi D.F., Asara G., Casabona D., Frau M., Seddaiu M.A., Feo. F. Cell cycle deregulation in liver lesions of rats with and without genetic predisposition to hepatocarcinogenesis. *Hepatology*;35: 1341-50, 2002.
- 6) Pascale R.M., Simile M.M., Calvisi D.F., Frau M., Muroi M.R., Seddaiu M.A., Daino L., Muntoni M.D., De Miglio M.R., Thorgeirsson S.S., Feo F.. Role of HSP90, CDC37, and CRM1 as modulators of P16(INK4A) activity in rat liver carcinogenesis and human liver cancer. *Hepatology*;42: 1310-9, 2005.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

- 7) Wood G.A., Korkola J.E., Lee V.M., Sarma D.S.R., Archer M.C.. Resistance of Copenhagen rats to chemical induction of glutathione S-transferase 7-7-positive liver foci. *Carcinogenesis* ;18: 1745-50,1997.
- 8) Liu H, Higashi K, Hiai, H. Prole of resistant *Drh1* locus in chemical carcinogen-induced hepatocarcinogenesis in rats: Analysis with a speed congenic strain.
Cancer Sci;96:164-9, 2005.
- 9) Marshall C.. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol*;11: 732-6,1999.
- 10) Feig L.A., Buchsbaum R.J.Cell signaling: life or death decisions of Ras proteins. *Current Biology*, 12, 259-261, 2002.
- 11) Cox A.D., Der C., The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8999-9006, 2003.
- 12) Johnston A.M., Naselli G.,Gonez L.J., Martin R.M., Harrison L.C., DeAizpurua H.J. SPAK, a STE20/SPS1-related kinase that activates the p38 pathway. *Oncogene* 19, 4290-7, 2000
- 13) Ura S., Masuyama N., Graves J.D., Gotoh Y. Mst1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways. *Genes to Cells* 6, 519-530, 2001.
- 14) Khokhlatchev A.,Rabizadeh S., Xavier R., Nedwidek M., Chen T., Zhang X., Seed B.,Avruch J. Identification a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Current Biology*, 12, 253-265, 2002.
- 15) Armesilla A.L., Williams J.C., Buch m.H., Pickard A., Emerson M., Cartwright E.J., Oceandy D., Vos M.D., Gillies S.,Clark G.J., Neyses L.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor ras-associated factor 1 (RASSF1). *The Journal of biological chemistry*, 279, 31318-31328, 2004.

16) Guicciardi M.E., Gores G.J., AIP1: a new player in TNF signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 111, 1813-1815, 2003.

17) El-Serag H.B., Rudolph L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis *Gastroenterology* 132, 2557-76, 2007.

18) Goodman Z. D., Neoplasm of the liver *Modern Pathology*, 20, S49-S60, 2007.

19) Thorgeirsson S.S., Grisham J.W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genet.* 31, 339-346, 2002

20) Farazi P.A., De Pinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer* 6, 674-687, 2006.

21) Teufel A., Staib F., Kanzler S., Weinmann A., Schulze-Bergkamen H., Galle P.R. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007 13, 2271-2282, 2007.

22) Paraskevi A.F., DePinho R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis from genes to environment. *Nature* 6, 674-687, 2006.

23) Wood G.A., Sarma D.R.S., Archer M.C. Resistant to promotion of glutathione S-transferase 7-7 liver lesions in Copenhagen. *Carcinogenesis* 20:1169-1175, 1999.

- 24) Yoshimoto F., Masuda S., Higashi T., Nishii T., Takamisawa I., Tateishi N., Sakamoto Y. Comparison of drug-metabolizing activities in the livers of carcinogens-sensitive parent rats and carcinogen resistant descendans. *Canc Res* 45, 6155-6159, 1985.
- 25) Solt D.B., Medline A., Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis for liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 88, 595-618, 1977.
- 26) Dianzani U. Istituzioni di Patologia generale, 4° edizione, 2004, Utet.
- 27) Feo F., Pascale R.M., Simile M.M., De Miglio M.R., Muroni R.M., Calvisi D.F. Genetic alteration in liver carcinogenesis: implication for new preventive and therapeutic strategies. *Critic Rev Oncogen* 11, 19-62, 2000
- 28) 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.
- 29) Perona R., Sanchez-Perez I., Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *British Journal of Cancer* 90, 573-577, 2004.
- 30) Utz PJ, Anderson P., Life and death decision: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death and Differentiation* 7, 589-602, 2000.
- 31) Franklin R.A., McCubrey J.A., Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 14, 2019-2034, 2000.
- 32) Li Q-X, Yu D.H., Ke N., McKelvy J., Wong-Staal F. Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation. *Cell Death and Differentiation* 15, 1197-1210, 2008.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

- 33) Downward J., Targeting ras signaling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 11-22, 2002.
- 34) Chan C.W., Housseau F. The “kiss of death” by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death and Differentiation* 15, 58-69, 2008.
- 35) Galluzzi L., Tasdemir E., Maiuri M.C., Hergartner M., Penninger J., Madeo F., Kroemer G. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death and Differentiation* 15, 1113-1123, 2008.
- 36) Klein S., McCormick F., Levitzki A. Killing time for cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 5, 573-580, 2005.
- 37) Leist M., Jaattela M., Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 1-10, 2001.
- 38) Lowe S.W., Cepero E., Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315, 2004.
- 39) Sebolt-Leopold J.S., Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews Cancer* 4, 937-947, 2004.
- 40) Chang L., Karin M., Mammalian MAP kinase signalling cascade. *Nature* 410, 37-40, 2001.
- 41) Shaw R.J., Cantley L.C., Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 44, 424-430, 2006.
- 42) Huynh H., Nguyen T.T.T., Chow K.P., Tan P.H., Soo K.C., Tran E. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

(MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterology* 3,1-21,2003.

43) Malumbres M., Barbacid M. Ras oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* 3,7-13,2003.

44) Shields J.M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C.J. Understanding Ras: "it ain't over til it's over". *Trends in Cell Biology* 10, 147-154,2000.

45) Amit I., Citri A., Shay T., Lu Y., Katz M., Zhang F., Tarcic G., Siwak D., Lahad J., Jacob-Hirsch J., Amariglio N., Vaisman N., Segal E., Rechavi G., Alon U., Millis G.B., Domany E., Yarden Y., A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature Genetics*, 39, 503-512, 2007.

46) Xu X.X., Yi T., Lambeth J.D., .Dab2 is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene* 16, 1561-1569, 1998.

47) Wang Z., Tseng C., Pong R., Chen H., McConnel J.D., Navone N., Hsieh J. The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 12622-12631, 2002.

48) Yeung K., Janosh P., McFerran B., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J., Kolch W. Mechanism of suppression of Raf/Mek/Extracellular signal-regulated kinase pathway by Raf kinase inhibitor protein. *Molecular and Cellular Biology* 20, 3079-3085, 2000.

49) Granovsky A.E., Rosner M.R. Raf kinase inhibitor protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Research* 18, 452-457, 2008

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

- 50) Yeung K, Seitz T., Li S., Janosh P, McFerran B, Kaiser C., Fee F., Katsanakis K.D., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J., Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401, 173-177, 1999.
- 51) Schuierer M.M., Bataille F., Weiss T.S., Hellerbrand C., Bosserhoff A.K., Raf kinase inhibitor protein is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncology reports* 16, 451-456, 2006.
- 52) Farooq A., Zhou M.. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling* 16, 769-779, 2004.
- 53) Caunt C.J., Rivers C.A., Conway-Campbell B.L., Norman M.R. Epidermal growth factor receptor and protein kinase C signaling to ERK2: spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases. *J Biol Chem* 283, 6241-6252, 2008.
- 54) Van der Weyden L., Adams D.J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1776, 58-85, 2007.
- 55) Tommasi S., Damman R., Zhang Z., Wang Y., Liu L., Tsark W.M., Wilczynski S.P., Li J., You M., Pfeifer G. Tumor susceptibility of Rassf1A knockout mice. *Cancer Res* 65, 92-98, 2005.
- 56) Pfeifer G.P., Damman R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry* 70, 576-583, 2005.
- 57) Schagdarsurengin U., Wilkens L., Steinemann D., Flemming P., Kreipe H.H., Pfeifer G., Schlegelberger B., Damman R. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22, 1866-1871, 2003.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

- 58) Donniger H., Vos M.D., Clark G.J. The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science* 120, 3163-3172, 2007.
- 59) Hesson L., Dallol A., Minna J.D., Maher E.R., Latif F. NORE1A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers. *Oncogene* 22, 947-954, 2003.
- 60) Ortiz-Vega S., Khokhlatchev A., Nedwidek M., Zhang X., Damman R., Pfeifer G.P., Avruch J., The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene* 22, 1381-1390, 2002.
- 61) Vos M.D., Martinez A., Ellis C.A., Vallecorsa T., Clark G. The proapoptotic Ras effector may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 21938-21943, 2003.
- 62) Lee K., Ohyama T., Yajima N., Tsubuki S. MST, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 19276-19285, 2001.
- 63) Oh H.J., Lee K., Song S.J., Jin M.S., Song M.S., Lee J.H., Im J., Yonehara S., Lim D. Role of the tumor suppressor RASSF1A in mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res* 66, 2562-2569, 2006.
- 64) Garcea R., Daino L., Pascale R.M., Simile M.M., Puddu M., Frassetto S., Cozzolino P., Seddaiu M.A., Gaspa L., Feo F. Inhibition of promotion and persistent nodule growth by S-adenosyl-L-methionine in rat liver carcinogenesis: role of remodeling and apoptosis. *Cancer res* 49, 1850-1856, 1989.

65) Zhang R., He X., Liu W., Lu M., Hsieh J., Min W. AIP1 mediates TNF- α -induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3. *The Journal of Clinical Investigation* 111, 1933-1943, 2003.

66) Zhang R., Zhang H., Lin J., Pober J.S., Min W. RIP1-mediated AIP1 phosphorylation at 14-3-3-binding site is critical for tumor necrosis factor-induced ASK1-JNK/p38 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 14788-14796, 2007.

67) Qiu G., Xie H., Wheelhouse N., Harrison D., Chen G.G., Salto-Tellez M., Lai P., Ross J.A., Hooi S.C. Differential expression of hDAB2IPB in normal tissue and promoter methylation of hDAB2IPA in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 46, 655-663, 2007

68) Bunkoczi G., Salah E., Filippakopoulos P., Fedorov O., Muller S., Sobott F., Parker S.A., Zhang H., Min W., Turk B.E., Knapp S. Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure* 15, 1215-1226, 2007.

69) Zhang H., Zhang R., Luo Y., D'Alessio A., Pober J.S., Min W. AIP1/DAB2IP, a novel member of the Ras-GAP family, transduces TRAF2-induced ASK1-JNK activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 44955-44965, 2004.

70) Du J., Cai S.H., Shi Z., Nagase F. Binding activity of H-Ras is necessary for in vivo inhibition of ASK1 activity. *Cell research* 14, 148-154, 2004.

71) Takeda K., Matsuzawa A., Nishitoh H., Ichijo H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell structure and function* 28, 23-29, 2003.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

72) Hatai T., Matsuzawa A., Inoshita S., Mochida Y., Kuroda T., Sakamaki K., Kuida K., Yonehara S., Ichijo H., Takeda K. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 26576-26581, 2000.

73) Tobiume K., Matsuzawa A., Takahashi T., Nishitoh H., Morita K., Takeda K., Minowa O., Miyazono K., Noda T., Ichijo H. ASK1 is required for sustained activation of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports* 2, 222-228, 2001.

74) Krautwald S., Buscher D., Dent P., Ruthenberg K., Baccarini M. Suppression of growth factor-mediated MAPK activation by v-raf in macrophages: a putative role for the MKP-1 phosphatase. *Oncogene* 10, 1187-92, 1995.

75) Xing H., Zhang S., Weinheimer C., Kovacs A., Muslin A.J. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *The EMBO Journal* 19, 349-358, 2000.

76) Loesch M., Chen G. The p38 MAPK stress pathway as a tumor suppressor or more? *Frontiers in Bioscience* 13, 3581-3593, 2008.

77) Zarubin T., Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* 15, 11-18, 2005.

78) Johnson G.L., Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK e p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912, 2002.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

79) Johnson G.L., Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912, 2002.

80) Hui L., Bakiri L., Mairhorfer A., Schweifer N., Haslinger C., Kenner L., Komnenovic V., Scheuch H., Beug H., Wagner E.F. p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature Genetics* 39, 741-749, 2007.

81) Wada T., Stepniak E., Hui L., Leibbrandt A., Katada T., Nishina H., Wagner E.F., Penninger J.M. Antagonist control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. *Cell Death and Differentiation* 15, 89-93, 2008.

82) De Miglio M.R., Simile M.M., Muroi M.R., Pusceddu S., Calvisi D.F., Carru A., Seddaiu M.A., Daino L., Deiana L., Pascale R.M., Feo F. c-myc overexpression and amplification correlate with progression of preneoplastic liver lesions to malignancy in the poorly susceptible Wistar rat strain. *Mol. Carcinogen*;25,21-9,1999.

83) Pederson P.L., Mathupala S., Rempel A., Geschwind J.F., Ko Y.H. Mitochondrial bound type II hesokinase: a key player in the growth and survival of many cancer and an ideal prospect for the therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 1555, 14-20, 2002.

84) Calvisi D.F., Ladu S., Gorden A., Farina M., Lee J.S., Conner E.A., Schroeder I., Factor V.M., Thorgeirsson S.S. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.

J Clin Invest;117:2713,2007.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

85) Calvisi D.F., Pinna F., Meloni F., Ladu S., Pellegrino R, Sini M., Daino L., Simile M.M., De Miglio M.R., Viridis P., Frau M., Tomasi M.L, et al. DUSP1 ubiquitination in ERK-mediated control of growth in human hepatocellular carcinoma.

Int. J. Cancer: 123, 2057–2064 ,2008

86) Lin Y.W., Yang J.L. Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling

J Biol Chem 2006;281: 915-26.

87) De Miglio M.R., Canzian F., Pascale R.M., Simile M.M., Muroni M.R., Calvisi D.F., Romeo G., Feo F. Identification of genetic loci controlling hepatocarcinogenesis on rat chromosomes 7 and 10. *Cancer Res;59:4651-7, 1999,*.

88). De Miglio M.R., Muroni M.R., Simile M.M., Viridis P., Asara G., Frau M., Calvisi D.F., Seddaiu M.A., Pascale R.M., Feo F. Frequent loss of heterozygosity at the Hcr1 (hepatocarcinogenesis resistance) locus on chromosome 10 in primary HCCs from LFF1 rat strain. *Hepatology;33: 1110-7, 2001.*

89) Aoyama Y, Avruch J, Zhang XF. Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases. *Oncogene,23: 3426-33,2004.*

90) Fernandez E., La Vecchia C., D'Avanzo B., Negri E., Franceschi S. Family history and the risk of liver, gallbladder, and pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev;3:209-12,1994,*.

91). Hemminki K., Li X. Familial risks of cancer as a guide to gene identification and mode of inheritance. *Int. J. Cancer;110:291-4,2004,*.

Marcella Sini.

Titolo della tesi: Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto.

Tesi di dottorato in Epidemiologia Molecolare dei Tumori.

Università degli studi di Sassari

92) Cai R.L., Meng W., Lu H.Y., Lin W.Y., Jiang F., Shen F.M.
Segregation analysis of hepatocellular carcinoma in a moderately high-
incidence area of East China.

World J Gastroenterol;9:2428-32, 2003,.

93) De Miglio M.R., Pascale R.M., Simile M.M., Muroli M.R., Viridis
P., Kwong KM-T., Wong L.K.L., Bosinco G.M., Pulina F.R., Calvisi
D.F., Frau M., Wood G.A., et al. Polygenic control of
hepatocarcinogenesis in Copenhagen x F344 rats.

Int J Cancer;111:9-16, 2004.