



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Piana

INDIRIZZO IN EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI

Responsabile di Indirizzo: Prof. ssa Rosa Maria Pascale

XXVII CICLO

Ruolo dei geni *Yes Associated Protein (YAP)* e *Connective Tissue Growth factor (CTGF)* nella predisposizione e progressione della cancerogenesi epatica

Direttore:

Prof. Andrea Piana

Tutor:

Prof.ssa Rosa Maria Pascale

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Roberta Pola

Anno Accademico 2013 - 2014

0

Dott.ssa Roberta Pola – Ruolo dei geni *Yes Associated Protein (YAP)* e *Connective Tissue Growth factor (CTGF)* nella predisposizione e progressione della cancerogenesi epatica – Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche - Indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei Tumori Università degli Studi di Sassari.

Sommario

L'Epatocarcinoma	2
Introduzione.....	2
Meccanismi molecolari dell'epatocancerogenesi.....	5
Modelli sperimentali di epatocancerogenesi su roditori.....	8
Analisi delle lesioni molecolari.....	14
L'interazione della via Hippo con altre vie di trasduzione del segnale	18
La via Hippo	20
Introduzione.....	20
Via Hippo nei mammiferi	24
Yes Associated Protein	29
Introduzione.....	29
Isoforme di YAP	30
YAP oncosoppressore tumorale o oncogene	32
TEAD.....	35
CTGF	38
Domini strutturali e funzioni.....	38
Scopo della ricerca.....	42
Materiali e Metodi	43
Istologia e immunohistochimica	44
Isolamento di RNA e sintesi di cDNA.....	46
q-REAL TIME PCR	47
Risultati immunohistochimica per YAP	48
Conclusioni.....	59
Bibliografia	61

L'Epatocarcinoma

Introduzione

L'epatocarcinoma (HCC, Hepatocellular Carcinoma) è un tumore maligno primitivo responsabile dell'85-90% dei tumori primari del fegato ed è la terza causa di mortalità nel mondo[1]. Rappresenta la quinta neoplasia per incidenza, con 0,25-1 milione di nuovi casi diagnosticati ogni anno ed è responsabile di 500.000 morti l'anno [2].

L'HCC ha diverse caratteristiche epidemiologiche ed interessanti variazioni marcate tra, regioni geografiche, tra popolazioni e gruppi etnici ed infine tra uomini e donne [3]. Le aree ad alta incidenza sono rappresentate dall'Africa Subsahariana, dall'Asia orientale e Sud orientale, dove la Cina presenta più del 50% dei casi. Le aree a bassa incidenza comprendono l'Europa Settentrionale, il Nord America e l'Australia. Negli ultimi anni si è rilevato comunque un aumento di casi di HCC anche in Europa Occidentale e negli Stati Uniti, presumibilmente in seguito all'incremento dell'incidenza di epatite cronica da virus C [4]. In fig.1 è riportata l'incidenza dell'HCC nel mondo.

I principali fattori di rischio rilevanti che portano all'insorgenza dell'HCC, sono molteplici e includono infezioni croniche da virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV), cirrosi epatica di varia origine, intossicazioni dovute alla tossina epatotossica aflatoossina B1 (AFB1) ed assunzione di androgeni ad alte dosi.

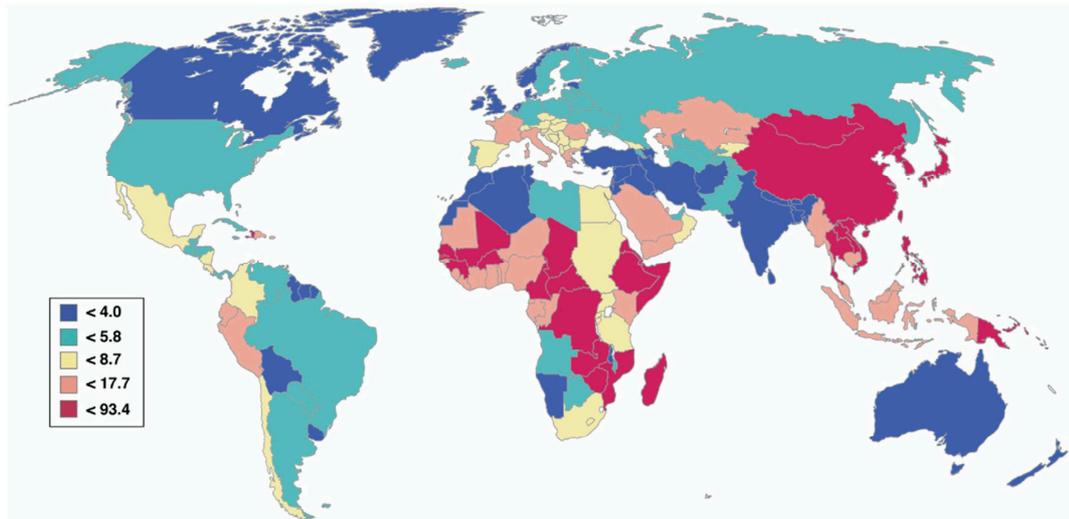


Fig 1 Incidenza dell' epatocarcinoma nel mondo.

L'AFB1 è una tossina mutagenica prodotta come metabolita dal fungo *Aspergillus Flavus* presente come contaminante in molti cibi quali noci, frutta secca, spezie ed olio di semi. L'abuso di alcool può, a sua volta, essere un fattore promotore in quanto può condurre alla cirrosi, che può frequentemente evolvere in HCC. Un altro fattore di rischio è rappresentato da malattie metaboliche ereditarie, come l'emocromatosi, la deficienza di antitripsina α -1, il morbo di Wilson e alcune porfirie, anch'esse in grado di indurre danno epatico che può evolvere a cirrosi ed eventualmente all' HCC. L'obesità ed il diabete possono portare ad una condizione di *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH); tale condizione è un processo morboso considerato un ulteriore fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare [5]. Considerata la maggiore incidenza riscontrata nella popolazione

maschile, anche la produzione ormonale potrebbe essere considerata un fattore di rischio [6].

Da studi epidemiologici [7] è noto che il tumore epatico umano, nella maggior parte dei casi, viene diagnosticato in uno stadio ormai avanzato, quando il decorso della malattia è quasi sempre caratterizzato da un rapida e fatale conclusione. In caso di malattia, ai suoi primi stadi di sviluppo, la resezione chirurgica del tumore rappresenta un efficace approccio terapeutico. Anche le alcolizzazioni, iniezioni di etanolo o trattamenti di radiofrequenza, sono terapie efficaci se applicate quando la malattia è in fase precoce. Un'opzione alternativa è fornita dal trapianto di fegato, ma solo per pazienti che presentano determinati requisiti [7].

Il Sorafenib, un inibitore multichinasico, è il solo farmaco approvato ed efficace per il trattamento dell'HCC. Tuttavia, il suo utilizzo è in grado di prolungare la sopravvivenza in pazienti con HCC per un periodo in genere non superiore ai 3 mesi. Il trattamento di HCC dipende dunque dallo stadio del tumore e dalle condizioni del paziente.

Negli ultimi anni, con un significativo progresso nei trattamenti chirurgici locoregionale, la sopravvivenza a breve termine di HCC è migliorata, ma la malattia recidiva rimane un grosso problema. E' pertanto di fondamentale importanza identificare i meccanismi molecolari coinvolti nell'induzione e nella progressione del carcinoma epatico, al fine di trovare nuove strategie terapeutiche.

Le nuove tecniche d'indagine diagnostica attualmente rappresentano un vantaggio nel determinare un intervento sempre più tempestivo ed efficace. Lo studio dei fegati rimossi dai pazienti, che hanno subito il trapianto, ha dato l'opportunità di identificare ed analizzare lesioni precancerose e tumori in fase iniziale, consentendo l'individuazione delle alterazioni molecolari in fase precoci del processo neoplastico.

Meccanismi molecolari dell'epatocancerogenesi

L'epatocancerogenesi è un processo multifasico, molto complesso, frequentemente preceduto dalla presenza di un danno epatico cronico e solo raramente l'HCC si manifesta in individui con fegato sano.

Una condizione predisponente è la cirrosi, la quale può evolvere anche ad HCC, dopo 20-40 anni dalla diagnosi.

Per capire le basi molecolari dell'epatocancerogenesi diventa quindi importante riuscire a decifrare sia i meccanismi molecolari che avvengono durante la cirrosi epatica, sia l'insieme delle anomalie cromosomali e delle modificazioni, che si verificano durante le fasi di inizio, promozione e progressione della patologia neoplastica [8].

Nella fase pre-neoplastica, successivamente al danno cronico provocato da uno o più agenti eziologici, gli epatociti vanno incontro a un'intensa stimolazione mitogenica, dovuta all'esposizione ad elevati livelli di fattori di crescita (quali il fattore di crescita insulino simile di tipo 2, IGF-2 e il fattore di crescita trasformante α , TGF- α)

e citochine attivate in seguito a vari processi infiammatori associati a necrosi cellulare ed all'azione di proteine virali. Ripetuti cicli di risposta rigenerativa, successiva alla perdita cellulare, possono portare all'attivazione di importanti vie del segnale coinvolte nella proliferazione cellulare [9].

Cicli continui di processi necrotico/rigenerativi promuovono un danno cronico che culmina nella cirrosi epatica, caratterizzata dalla formazione di noduli epatici circondati da depositi di collagene. L'elevato tasso di proliferazione cellulare, porta all'accumulo di epatociti pronti a subire alterazioni geniche strutturali (amplificazioni, mutazioni, delezioni e trasposizioni) ed all'espansione di una popolazione epatocitaria, spesso monoclonale, che andrà a formare foci iperplastici di epatociti alterati fenotipicamente. Questi epatociti esprimono, in modo anomalo, vari geni, essi potranno progredire verso fasi più avanzate come noduli displastici, (lesioni preneoplastiche con vario grado di alterazione molecolare) e poi a tumori conclamati. In questa fase, i carcinomi epatocellulari potranno progredire ulteriormente ed essere classificati in base al loro differenziamento. La storia naturale dell'epatocarcinoma è rappresentato in fig.2 [10].

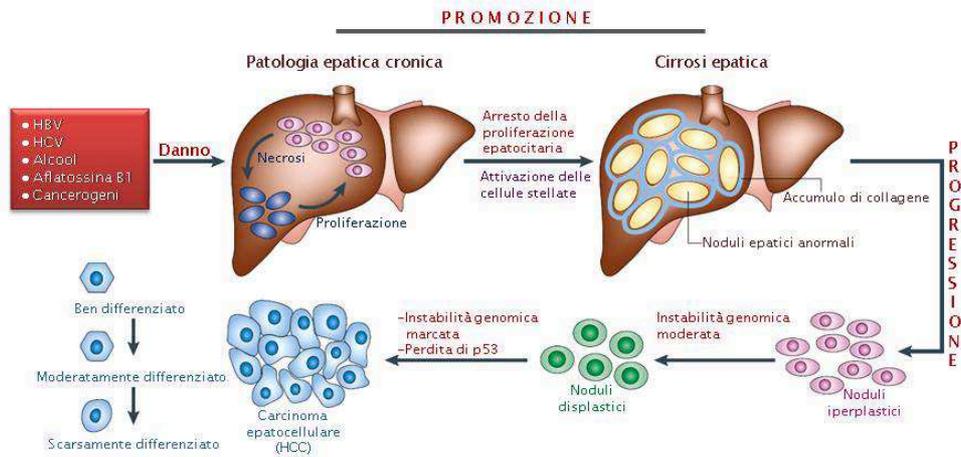


Fig.2 Progressione istopatologica e molecolare del HCC. In seguito a danno epatico provocato da uno o differenti fattori (cancerogeni, virus dell'epatite B e C, alcool, aflatoxina B1), vi è necrosi seguita da proliferazione riparativa degli epatociti. Cicli continui di questo processo distruttivo/rigenerativo promuovono una malattia epatica cronica, che culmina nella cirrosi epatica. Essa è caratterizzata da anormale formazione dei noduli epatici circondati da deposizione di collagene. Successivamente, si ha la formazione di noduli iperplastici, di noduli displastici ed infine, di carcinomi epatocellulari che possono essere classificati in tumori ben differenziati, moderatamente e scarsamente differenziati, l'ultimo dei quali rappresenta la forma più maligna dei carcinomi epatocellulari umani. Questi possono ulteriormente progredire.

Modelli sperimentali di epatocancerogenesi su roditori

Lo sviluppo di tumori nei mammiferi dipende dall'accumulo in cellule somatiche di alterazioni molecolari, genetiche ed epigenetiche che includono attivazione di proto-oncogeni ed inattivazione di geni oncosoppressori [11]. L'instabilità genomica generata da danno al DNA, ed errori nella riparazione del DNA stesso, giocano un ruolo importante nell'accumulo di queste alterazioni. Sono stati ampiamente dimostrate comuni alterazioni morfologiche, metaboliche e biologiche nelle lesioni epatiche, preneoplastiche e neoplastiche, in roditori e negli uomini. Spesso le stesse alterazioni molecolari genetiche ed epigenetiche sono coinvolte nella genesi delle lesioni di vari tessuti e questo suggerisce che i meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo di diversi tumori incluso l'HCC, in specie differenti, potrebbero essere simili.

Negli ultimi anni sono stati utilizzati modelli sperimentali di epatocancerogenesi su ratti e topi; questi hanno consentito di mappare geni di predisposizione, definire il modello genetico responsabile di rischio di HCC ed esaminare i meccanismi effettori dei geni di suscettibilità tumorale.

L'epatocarcinogenesi è un processo multifasico, frequentemente preceduto da danno epatico cronico. Raramente l'HCC si sviluppa su fegato sano.

Per studiare le varie fasi del processo epatocancerogenetico, sono stati utilizzati differenti modelli sperimentali di epatocancerogenesi chimica. In questi modelli, l'iniziazione con il cancerogeno è definito fase di inizio; essa è seguita da trattamenti che inducono l'espansione clonale degli epatociti iniziati : fase di promozione.

L'acquisizione di alterazioni genetiche ed epigenetiche irreversibili è responsabile della fase di progressione che porta alla comparsa del tumore conclamato. Durante la fase di inizio, in seguito al danno genomico indotto dai cancerogeni, alcuni epatociti possono andare incontro a morte cellulare per apoptosi, altri sopravvivono e si adattano. Il fenomeno di apoptosi può comunque essere presente anche nelle fasi successive.

L'espansione clonale delle cellule iniziate (fase di promozione) determina lo sviluppo di foci di epatociti alterati (FEA). Queste lesioni possono essere identificate in seguito all'alterata espressione di enzimi epatici, come la diminuzione dell'espressione degli enzimi di fase I, (attivatori metabolici) e/o l'aumento dell'espressione degli enzimi di fase II (coniuganti).

Nei ratti, le cellule iniziate possono essere identificate in stadi molto precoci attraverso colorazione immunohistochemica della proteina glutatione S-transferasi 7 (GST7-7). La maggior parte delle lesioni epatiche, preneoplastiche e neoplastiche precoci, va incontro a diminuzione della crescita ed a regressione (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 responsabili della comparsa delle lesioni preneoplastiche e della loro

progressione. Questa possibilità naturalmente implica l'identificazione dei geni coinvolti [12-13].

L'individuazione delle alterazioni molecolari che progressivamente compaiono può essere ottenuto utilizzando modelli di epatocancerogenesi sperimentale chimica su roditori, come ad esempio il modello di Solt e Farber [14], vedi figura 3.

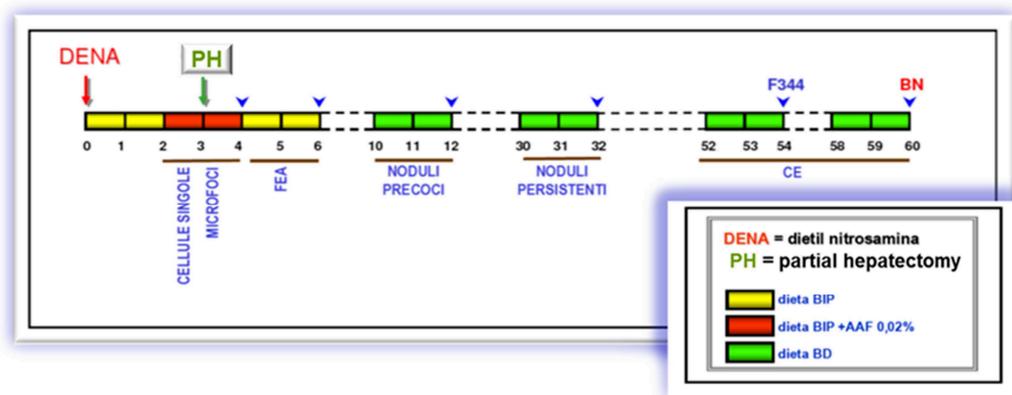


Fig. 3 Modello Solt-Farber o dell'epatocita resistente.

L'uso di modelli sperimentali su roditori può essere utile nell'identificazione dei geni che potrebbero essere bersaglio della terapia genica, nei vari stadi dell'epatocancerogenesi, in tali modelli, gli epatociti iniziati possono essere identificati in ratti trattati con cancerogeni chimici come la dietilnitrosammina (DENNA), in quanto le singole cellule esprimono geni in modo anomalo come ad esempio, la forma placentare della proteina glutazione transferasi 7-7 (GSTP-7).

Gli epatociti iniziati sono incapaci di crescita autonoma, ma possono evolvere in foci di epatociti alterati (FEA) e noduli, se stimolati a proliferare durante la fase di promozione.

Nel carcinoma epatocellulare, questa fase è studiata molto bene in modelli sperimentali sui ratti, nei quali la promozione è indotta da stimoli differenti delle cellule iniziate, come stimoli fisiologici (nel fegato neonatale) o vari agenti promoventi o mediante l'inibizione della crescita delle cellule non iniziate, che può essere ottenuta con mitoinibitori. Nel "modello dell'epatocita resistente" (RH), questo meccanismo è basato sulla resistenza delle cellule iniziate all'azione del 2-acetilaminofluorene (AAF), mitoinibitore per le cellule normali ed alla sua associazione ad un'epatectomia parziale (PH) o alla somministrazione di dosi necrogeniche di CCl₄. In questi modelli sperimentali, i foci di epatociti alterati ed i noduli si sviluppano relativamente presto nel fegato, già dopo 5-6 settimane dal trattamento con il cancerogeno.

Queste lesioni sono caratterizzate da proliferazione intensa 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 alterazioni morfologiche, funzionali, biochimiche e molecolari aggiuntive, rappresenta il punto di partenza della fase di progressione della cancerogenesi epatica. Le lesioni persistenti non

vanno incontro a reversione spontanea ed evolvono irreversibilmente verso il carcinoma epatocellulare.

Queste lesioni presentano numerose alterazioni genetiche, come l'alterazione delle vie di trasduzione del segnale, del controllo del ciclo cellulare e di geni coinvolti nella morte cellulare. Queste alterazioni caratterizzano le cellule iniziate e influenzano la loro progressione verso la malignità [14]. Alcune alterazioni genetiche possono avvenire a carico di geni responsabili della suscettibilità alla cancerogenesi epatica.

Mutazioni a carico di alcuni geni, trasmesse geneticamente, conferiscono predisposizione al cancro.

Sono stati identificati nei ratti quattro loci che conferiscono suscettibilità al carcinoma epatico (Hcs 1-4) e sette loci che determinano la resistenza (Hcr 1-7) [16]. Questa differenza genetica è alla base della predisposizione, allo sviluppo di epatocarcinomi, nei ratti Fisher (F344) e della resistenza nei ratti Brown Norway (BN).

I ratti BN sono portatori di geni di resistenza che possono influenzare gli stadi di promozione e progressione, determinando una scarsa capacità delle lesioni preneoplastiche ad evolvere in adenomi e carcinomi, ma apparentemente essi non influenzano la fase d'inizio.

Queste osservazioni suggeriscono che i meccanismi che controllano la crescita cellulare sono coinvolti in maniera differente nella promozione delle lesioni epatiche dei ratti suscettibili e resistenti.

La maggior parte delle lesioni preneoplastiche dei ratti resistenti vanno incontro a rimodellamento e reversione fenotipica e solo poche acquistano la capacità di crescere e progredire in maniera autonoma a noduli displastici o ad adenomi ed a HCC [17-18].

Durante la fase di espansione clonale delle cellule iniziate dal cancerogeno, le lesioni focali epatiche vanno incontro ad una rapida crescita. Con l'avanzare del processo di epatocancerogenesi, circa a 10-12 settimane dall'inizio, si possono individuare alcuni noduli "persistenti" caratterizzati dalla presenza di varie forme displastiche. Il numero di queste è minore rispetto a quello dei foci preneoplastici comparse nella fase di promozione. Questo indica che le lesioni preneoplastiche possono seguire almeno due opzioni biologiche:

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

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

1. Inizio, fase corrispondente alla somministrazione del cancerogeno (DENA) caratterizzata dall'interazione del cancerogeno terminale con macro-molecole bersaglio (ad es. DNA).

2. Promozione, fase durante la quale si osserva l'espansione clonale e lo sviluppo di numerosi foci preneoplastici che possono dar luogo a noduli precoci ed eventualmente a lesioni persistenti.

3. Progressione, fase durante la quale le lesioni preneoplastiche assumono capacità di crescita autonoma e possono evolvere a neoplasia conclamata.

Analisi delle lesioni molecolari

L'analisi molecolare di HCC umani ha portato all'individuazione di alterazioni genetiche ed epigenetiche [19-20]. Le più importanti sono rappresentate da: alterazione funzionale dei punti di restrizione del ciclo cellulare; mancante regolazione di oncogeni chiave e geni soppressori quali p53, membri della famiglia recettoriale ErbB, MET e il suo ligando EGF, il fattore di crescita degli epatociti (HGF), p16INK4A, E-caderina e cicloossigenasi 2 (COX-2), perdita di eterozigosi del locus del gene *insulin-like growth factor 2 receptor* (IGFR2), accorciamento telomerico.

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

un ruolo dello stress ossidativo, nella cancerogenesi epatica, in presenza di mutazioni di p53. La deficienza di p53 determina lo sviluppo di HCC, mentre mutazioni a carico di p53 contribuiscono alla fase di inizio e progressione dei tumori. La proteina p53 può andare incontro a mutazioni capaci di conferire capacità oncogenica [20-21].

Alleli che producono proteine p53 mutate sono in grado di eterodimerizzare con p53 *wild-type*; questo determina un cambiamento conformazionale che impedisce il legame a elementi regolati da p53. Quindi la forma mutante di p53 sopprime l'attività di p53 *wild-type*.

La proteina del retinoblastoma pRb: è anch'essa un soppressore della crescita e rappresenta un'importante barriera cellulare contro lo sviluppo del cancro [22]. Una sua delezione compromette il ruolo di molecola check-point e potrebbe portare, come per la p53, ad una crescita incontrollata di cellule alterate. Negli HCC umani, la via di trasduzione di Rb è alterata in più dell'80% dei casi. Frequente è anche l'inattivazione del gene codificante la proteina p16/INK4a, dovuta alla metilazione del suo promotore p16 che è un regolatore negativo del ciclo cellulare [23].

Nella maggior parte degli HCC umani inoltre, vi è un aumento dell'espressione della ganchirina (un inibitore della funzionalità di p53 e Rb) la quale contribuisce al processo di epatocancerogenesi destabilizzando Rb [24].

Dall'elevato numero di studi condotti nel corso degli anni, è emerso che in ogni tumore si ha spesso attivazione aberrante di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella proliferazione, sopravvivenza, differenziazione cellulare e angiogenesi.

Tra le vie di trasduzione del segnale, mostrate in fig.4 [25], che generalmente mostrano un'alterata attività nell'HCC, troviamo:

- la via del segnale Raf/Ras/Mek/Erk o via delle chinasi attivate da mitogeni (MAPK); questa viene attivata in risposta ad un incremento di segnali a monte dovuto ad un'aumentata espressione di fattori quali il fattore di crescita insulino-simile (IGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), quello epatocitario (HGF);

- la via della Wnt/ β -catenina: questa via è stata originariamente identificata nella *Drosophila Melanogaster*; è altamente conservata nella scala evolutiva partecipa in processi quali omeostasi, proliferazione cellulare, differenziamento, motilità ed apoptosi [8]. Viene finemente regolata durante le fasi precoci dello sviluppo epatico [26]. Sono numerosi gli studi che hanno trovato una deregolazione di questa via del segnale in diversi tipi di tumore umano, incluso l'HCC [27]. L'attivazione di questa via si verifica frequentemente in HCC murini ed umani, dove si hanno frequenti mutazioni somatiche così come una repressione a livello trascrizionale di regolatori negativi [28];

- la via fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K/Akt/mTOR) è un'attivatore del segnale Akt dipendente da una compromissione del suo regolatore negativo PTEN (omologo della fosfatasi e della tensina) ed è stata riportata nel 40-60% degli HCC umani [29].

- la via delle proteine Hedgehog [30]; è un importante regolatore della differenziazione cellulare, polarità cellulare e proliferazione. Nei vertebrati è attivata da tre ligandi extracellulari: Sonic Hedgehog (SHH), Desert hedgehog (Dhh) e

Indian Hedgehog (Ihh). Quando SHH raggiunge la sua cellula bersaglio, si lega al recettore Patched-1 (PTCH1). In assenza di ligando, PTCH1 inibisce Smoothed (SMO), una proteina a valle nella via.

- la via del segnale del fattore di crescita epatocitario (HGF)/cMET [31], è basata sul legame tra il recettore tirosina chinasi c-Met, che è normalmente attivato dal suo ligando HGF ligando. Met è generalmente espresso in cellule epiteliali ed è attivato da HGF prodotto in cellule mesenchimali o rilasciato in circolo.

- La via di segnalazione Hippo, conosciuta anche come la via Salvador/Warts/Hippo (SWH), controlla le dimensioni degli organi negli animali attraverso la regolazione della proliferazione cellulare e l'apoptosi[32]; i dettagli di tale via saranno spiegati nel dettaglio del prossimo paragrafo.

Alcune tra le vie citate coinvolte nell'HCC, sono correlate fisiologicamente alle fasi di sviluppo epatico durante l'embriogenesi. L'attivazione di vie del segnale dell'embriogenesi suggerisce che alcuni HCC possono generare da cellule staminali epatiche. Mentre una normale rigenerazione epatica non necessita di cellule staminali [33], perché gli epatociti residui mantengono la capacità di rientrare nel ciclo cellulare, durante lo stadio cirrotico si crea un ambiente sfavorevole per la crescita che potrebbe portare all'attivazione e alla trasformazione delle cellule staminali [33]. Come si può notare in Fig.4, le vie di trasmissione capaci di attivare la crescita implicate nel processo di cancerogenesi epatica sono molte ed eterogenee se paragonate ad altri tipi tumorali. Esse vengono ampiamente studiate al fine di identificare potenziali biomarcatori e bersagli molecolari.

Tuttavia, nonostante l'elevato numero di studi effettuati, non si è ancora giunti all'individuazione di una via del segnale caratteristica delle fasi di sviluppo e progressione del carcinoma epatocellulare.

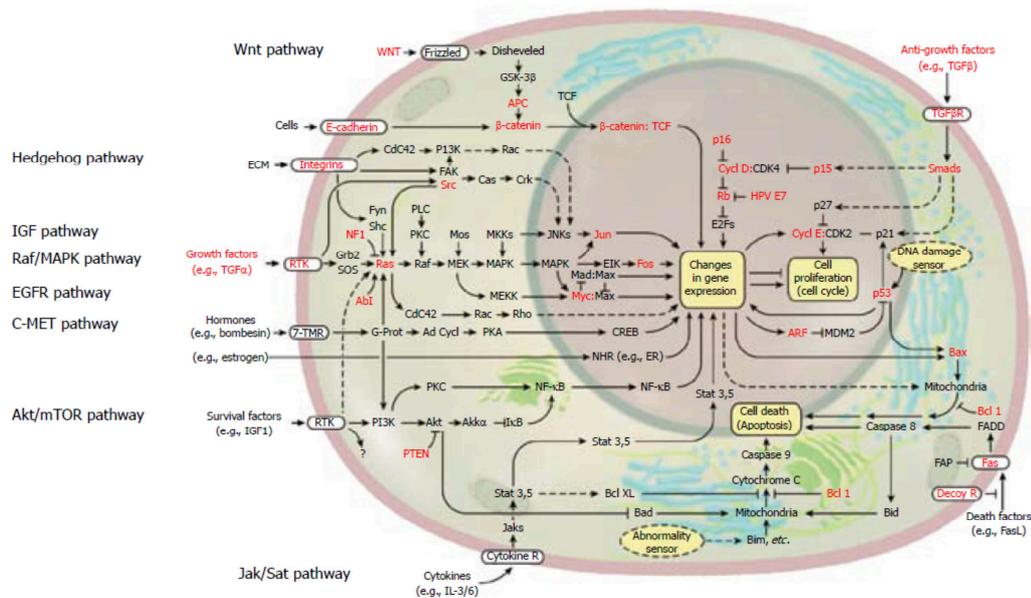


Fig.4: Principali vie di trasduzione del segnale coinvolte nel carcinoma epatocellulare

L'interazione della via Hippo con altre vie di trasduzione del segnale

Diverse vie di trasduzione del segnale interagiscono e regolano il percorso della via Hippo, spesso a livello delle proteine YAP/TAZ. Nella figura 5 sono descritte l'interazione di tale via con la via WNT, con il fattore di crescita trasformante (TGF-β), con Notch, mTOR ed altre vie. Tali vie di trasduzione del segnale sono alterate in diversi tipi di tumori umani[34].

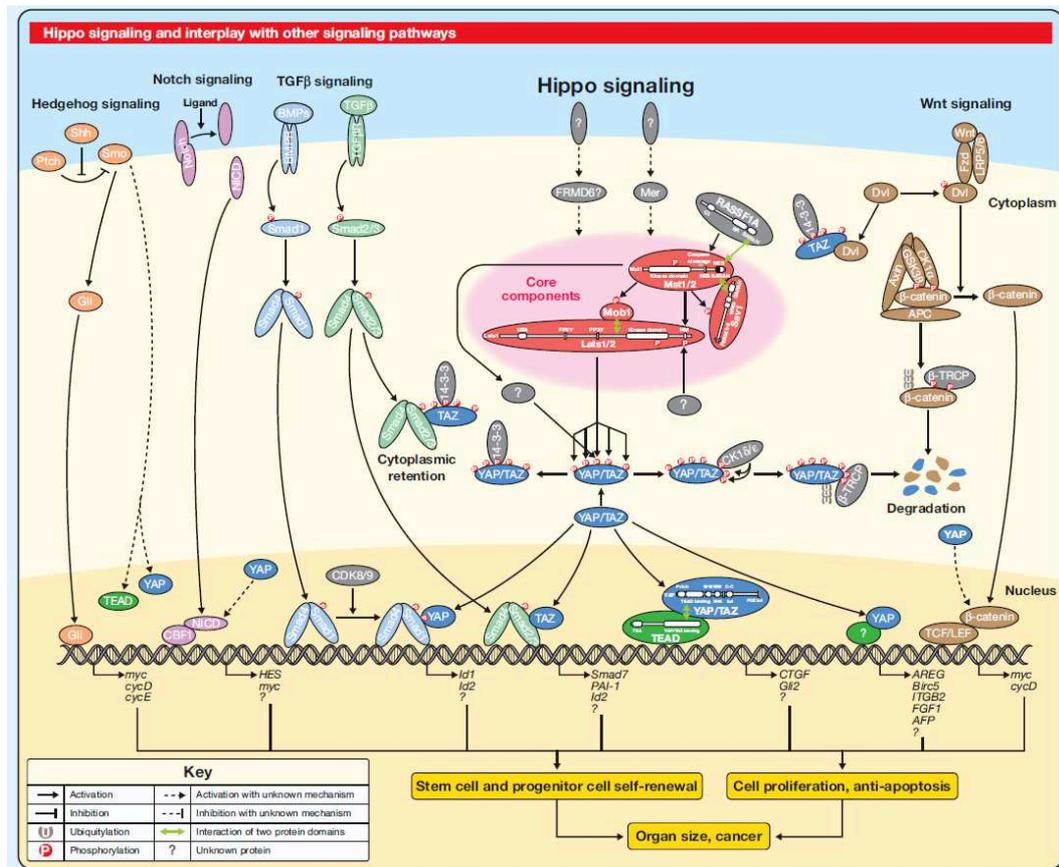


Fig.5 Vie di trasduzione del segnale che interagiscono con la via HIPPO.

Tra le principali vie di trasduzione del segnale, che si connettono con il cuore della via Hippo, ve sono alcune evidenziate in figura 7:

- TGF-β: Il fattore di crescita trasformante TGF-β e la proteina morfogenica (BMP), giocano un ruolo cruciale nella morfogenesi e nella tumorigenesi attraverso l'attivazione della proteina Smad ed i loro effettori nucleari a valle.

- WNT: La via WNT gioca un ruolo importante nello sviluppo tissutale. L'attivazione aberrante di tale via si osserva in diversi tipi di tumori, in particolare quelli dell'apparato digerente.
- Noch: La via Noch è coinvolta nello sviluppo dei metazoi ed è implicata in una vasta gamma di patologie umane tra cui il cancro. In condizioni fisiologiche si ha l'attivazione di tale via, attraverso una serie di eventi proteolitici, che rilasciano ed attivano il frammento intracellulare, che trasloca al nucleo ed attiva l'espressione dei suoi geni bersaglio.

La via Hippo

Introduzione

La via Hippo consiste in una rete di proteine che controllano la crescita di differenti tessuti, durante lo sviluppo e la rigenerazione, nonché in condizioni patologiche come il cancro. Il percorso della via Hippo è stato definito inizialmente nella *Drosophila* attraverso studi di mosaicismo genetico [35]; tale via si mantiene altamente conservata anche nei mammiferi.

Il primo componente della via Hippo, Warts (wts) [35-36] codifica per una famiglia di proteine nucleari Dbp (NDR); mutazioni del gene wts possono portare ad una crescita eccessiva del tessuto[37].

Successivamente sono stati identificati gli altri componenti della via [38- 37], che sono:

- Hpo, chinasi del tipo STE 20
- Sav, una proteina contenente il dominio WW
- Mats, una proteina adattatrice

Studi biochimici successivi, hanno evidenziato come queste proteine siano parte di una cascata chinastica: Hpo/Sav1/Mats/Wts Hpo fosforila ed attiva Wts [37-39], in presenza di Sav e Mats che agiscono come proteine di ancoraggio, facilitando l'interazione tra Hpo e Wts. Hpo e Wts sono entrambi Ser/Thr chinasi capaci di autoattivazione per fosforilazione [40-41], benché l'attivazione di Wts sia anche regolata dalla fosforilazione di Hpo. Inoltre Hpo può fosforilare Sav e Mats [41-42], che a loro volta facilita l'attivazione ed il legame di Wts.

Il cuore della via Hippo è costituito dalla cascata chinastica Hpo/Sav/Mats/Wts, la cui funzione è quella di mediare la traduzione dei segnali dalla membrana cellulare al nucleo. Benché non sia del tutto conosciuto quali siano i segnali extracellulari capaci di attivare questa via in condizioni fisiologiche, sono stati identificati alcuni regolatori intracellulari, a monte della cascata Hpo/Sav/mats/Wts, come ad esempio il complesso Mer-Ex-Kibra [40], la proteina di segnalazione Fat [43–44] ed il complesso Lethal Giant Larvae (Lgl) [45].

Tra questi regolatori il più conosciuto è Mer-Ex-Kibra, esso attiva la via Hippo attraverso la fosforilazione sia di Hpo che di Wts. Il complesso Mer, Ex e Kibra ha

un comportamento ridondante nel regolare la via Hippo poiché ciascun componente del complesso può funzionare indipendentemente dall'altro. Ad esempio, nel caso dell'inibizione da contatto intercellulare, la crescita cellulare si arresta quando la via Hippo è attivata da Ex, che a sua volta è attivato dal legame con la proteina transmembrana Crb, mediante la sua omodimerizzazione tra due cellule adiacenti [46].

Benché i componenti della cascata chinasi Hpo/Sav/Mats/Wts abbiano la funzione di sopprimere la crescita tissutale, nessuno di essi è un fattore di trascrizione nucleare. Wts, se attivato, può fosforilare Yorkie (Yki) e tale fosforilazione consente il legame tra Yki e la proteina di ancoraggio 14-3-3, a cui segue la ritenzione di Yki nel citoplasma e la sua soppressione funzionale [47]. Uno dei principali meccanismi regolatori della funzione di Yki è la sua traslocazione dal nucleo al citoplasma, è stato dimostrato che Wts può inibire Yki attraverso una fosforilazione [47].

L'attività di Yki può anche essere soppressa dal legame diretto proteina-proteina tra il proprio dominio WW ed una sequenza ricca in prolina all'interno del motivo PPXY, che si può trovare in Ex, Kibra, Hpo o Warts; infatti questo legame si trova in tutte le interazioni che coinvolgono Yki con tali proteine [48-49].

Sono stati identificati diversi regolatori a monte della Via Hippo, ma Yki è finora l'unico effettore nucleare della via e funge pertanto da ponte tra la componente citoplasmatica Hpo/Sav1/Mats/Wts e la trascrizione dei geni bersaglio. Infatti Yki non ha un sito di legame col DNA: esso deve associarsi ad una sequenza di legame al DNA, presente nei fattori di trascrizione che fanno da ponte, solo in questo modo può adempiere alle sue funzioni di regolatore della trascrizione genica.

Da quanto esposto finora emerge che la cascata chinasi Hpo/Sav/Mats/Wts media la trasduzione del segnale tra gli stimoli extracellulari ed il cofattore di trascrizione nucleare Yki. La capacità di Yki di legarsi ai fattori di trascrizione determina il coinvolgimento della via Hippo in numerosi processi biologici. In figura 6 è mostrato uno schema riassuntivo dei meccanismi regolatori della via Hippo.

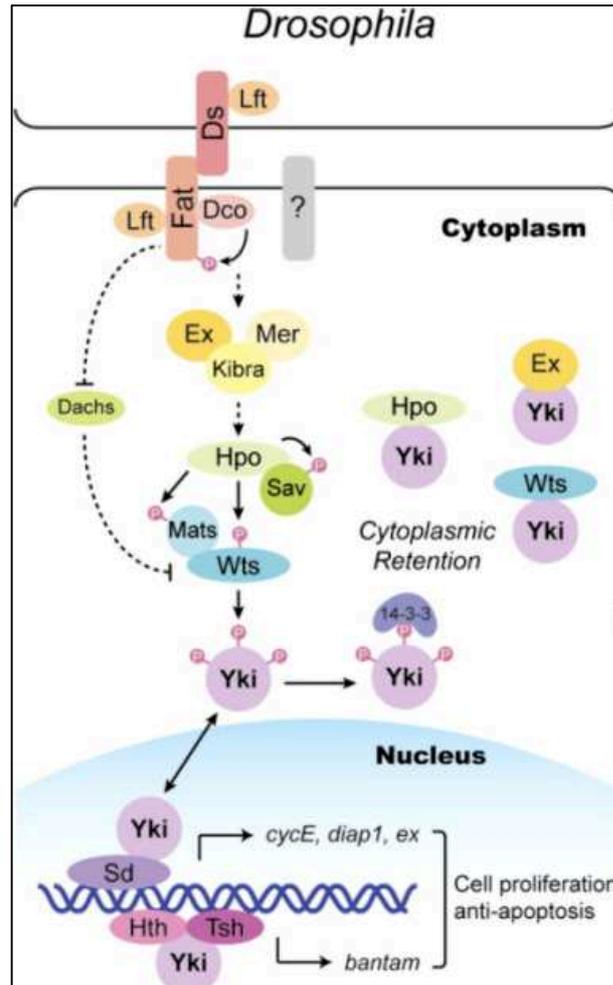


Fig.6 Rappresentazione schematica della via Hippo in Drosophila

La nomenclatura di molti componenti della via Hippo in *Drosophila* e nei mammiferi è diversa; una sintesi di tali componenti è riportata in fig. 7.

Mammalian	<i>Drosophila</i>	Junctional localization	Cytoskeleton interaction
Core components			
MST1/2	Hpo (Hippo)		✓
Sav1	Sav (Salvador)		
Lats1/2	Wts (Warts)		✓
Mob1 (a and b)	Mats		
YAP/TAZ	Yki (Yorki)	✓	
TEAD1-4	Sd (Scalloped)		
Apical-basal polarity (TJs and AJs)			
Crb1-3	Crb (Crumbs)	✓	
Frm6 (?)	Ex (Expanded)	✓	✓
NF2 (Mer)	Mer (Merlin)	✓	✓
Kibra	Kibra	✓	
aPKC	aPKC	✓	
PAR3	Baz (Bazooka)	✓	
PAR6	Par6	✓	
PALS1	Sdt (Stardust)	✓	
Scrib	Scrib (Scribble)		
Dlg	Dlg		
Lgl	Lgl (Discs large)		
AMOT (angiomotin)	?	✓	✓
PTPN14	Pez	✓	✓
Ajuba/LLMD1/WTIP	Jub	✓	✓
α-Catenin	α-Catenin	✓	✓
β-Catenin	β-Catenin	✓	
ZO-1	ZO-1	✓	
ZO-2	ZO-2	✓	
E-cad (E-cadherin)	E-cad	✓	
Planar cell polarity			
Fat1-4	Fat	✓	
Dchs1/2	Ds (Dachsous)	✓	✓?
Fjx1	Fj (four-jointed)		
?	Dachs		
Zyxin/Lpp/Trip6	Zyx (zyxin)		✓
Lix1, Lix1L	Lft (lowfat)		
CK1δ/ε	Dco (Discs overgrowth)		
ZDHHCs	App (approximated)		
Other components			
Taok1-3	Tao		✓
RASSF1-6	RASSF		✓
PP2A (STRIPAK)	STRIPAK (PP2A)		✓?
PP1	PP1		✓
Itch	Su(DX)		
βTRCP	Slimb		
14-3-3	14-3-3		✓

Fig. 7 Componenti della via Hippo nei mammiferi e in *Drosophila*

Via Hippo nei mammiferi

La via Hippo, può essere suddivisa in tre parti interconnesse: i componenti regolatori a monte, i componenti che costituiscono il cuore della via ed il complesso trascrizionale a valle.

Nel percorso della via Hippo non sono noti segnali extracellulari peptidi e recettori; tale via è regolata da una rete di componenti e meccanismi a monte, molti dei quali sono coinvolti nella regolazione dell'adesione e della polarità cellulare.

La via Hippo consiste di un'ampia rete di proteine che controllano la crescita di differenti tessuti, durante lo sviluppo, la rigenerazione e la crescita in condizioni patologiche come il cancro.

Ad oggi sono state identificate più di 20 proteine regolatrici, che si interferiscono con il cuore della via Hippo, a differenti livelli [50-51].

Vediamo il modello di Johnson [52] che descrive la via Hippo; nel modello seguente si può notare una cellula con il nucleo e la rete di proteine, in figura 8.

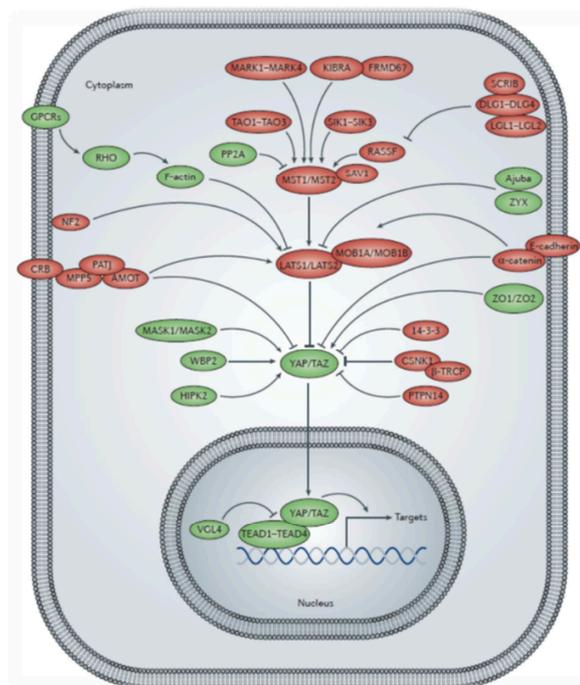


Fig.8 Nei mammiferi i componenti della via Hippo, che promuovono l'attività della proteina (YAP) ed il co-attivatore trascrizionale con il motivo-PDZ vincolante (TAZ), sono mostrati in verde, mentre quelli che inibiscono l'attività di YAP e TAZ sono riportati in rosso.

Nei mammiferi, vi sono almeno 4 branche interconnesse che regolano la via Hippo a monte: il complesso “crubs” (CRB), i regolatori che agiscono a monte delle MST chinasi, l’azione del citoscheletro e le giunzioni di adesione. Il complesso contiene le proteine CRB, che sono proteine transmembrana localizzate nelle giunzioni apicali. Tali proteine hanno corti domini intracellulari, dotati di siti proteici di ancoraggio, formanti complessi multiproteici che influenzano la polarità cellulare e regolano la via stessa [53-54].

Il complesso CRB, recluta i membri della famiglia angiomontina (AMOT): proteine adattatrici che legano direttamente i componenti della via. Vari studi dimostrano che AMOT inibisce la localizzazione nucleare della proteina YAP [55–56]. Una seconda branca della via consiste di chinasi ed altri regolatori che modulano l’attività delle MST chinasi, tra cui le chinasi TAO e le chinasi MAP che controllano la polarità cellulare e regolano l’affinità della chinasi (MARK1) il quale fosforilano le MST chinasi e ne regolano l’attività. In aggiunta le MST chinasi sono regolate dalla proteina adattatrice KIBRA.

Una terza branca della via è coinvolta in una funzione mediata dal citoscheletro. La proprietà meccanica della matrice extracellulare regola la localizzazione dell’attività di YAP/TAZ, attraverso un processo che richiede l’actina. In aggiunta i recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), che trasmettono i segnali extracellulari quali l’acido lisofosfatidico e la sfingosina 1-fosfato, regolano l’attività di YAP e TAZ tramite l’actina[57-58].

In aggiunta a detti regolatori a monte della via, ci sono proteine diverse che ne modulano l'attività; queste includono le proteine che direttamente interagiscono con YAP e TAZ, come il dominio di legame WW della proteina WBP2, le proteine ZO1, ZO2, le proteine chinasi che interagiscono con l'omodominio HIPK2, la proteina 14-3-3, la proteina tirosina fosfatasi (PTPN14), la casein chinasi (CSNK1) e β -TRCP.

Il cuore della via nei mammiferi è costituito da quattro proteine chinasi, regolate attraverso una serie di fosforilazioni: MST1/2, SAV, LATS 1/2 e MOB.

Le *Large tumor suppressor* (LATS 1/2) sono protein chinasi aventi funzione di soppressore tumorale; la proteina codificata da questo gene è un chinasi serina/treonina ed è localizzata nell'apparato mitotico. Invece le *Mammalian STE 20* (MST 1/2) sono proteine chinasi appartenenti alla famiglia STE 20 e possono fosforilare SAV, LATS e MOB. [57]. L'attività delle protein chinasi MST1/MST2 è maggiore attraverso l'interazione con la proteina adattatrice SAV1; tale interazione è mediata dal dominio SARAH (Sav/Rassf/Hpo), presente in MST1/2 e Sav. Le MST1/2 fosforilano direttamente LATS 1/2 nei domini idrofobici. Questa fosforilazione è il requisito per l'attivazione di LATS 1/2 [59]. Mob, quando viene fosforilato da MST1/2, si lega al motivo autoinibitorio di LATS 1/2 che, a sua volta, porta alla fosforilazione ed all'attivazione di LATS (Lats1 S909 and Lats2 S872) ed a un aumento della sua attività chinasica. Sav1 funziona da proteina ponte per MST1/2 e LATS ed inibisce l'attività di LATS 1/2, in seguito a fosforilazione da MST1/2. In condizioni fisiologiche (quali alta densità cellulare e inibizione da

contatto), la via Hippo è attiva e con le sue fosforilazioni inibiscono YAP. L'inibizione di YAP avviene attraverso due sue fosforilazioni effettuate da LATS sulla serina 127 e sulla serina 381. LATS1/2 interagisce direttamente con YAP e lo fosforila inibendo l'attività di tale proteina. L'interazione è mediata dai motivi di prolina e tirosina (PPxY) su LATS 1/2 ed i domini WW su YAP/TAZ. Tutti e cinque i siti di legame HXRXXS, su YAP, sono direttamente fosforilati da LATS 1/2. La forma fosforilata di YAP viene sequestrata nel citoplasma, attraverso l'interazione con la proteina 14-3-3, portando all'inibizione della trascrizione dei geni bersaglio [60-61]. La fosforilazione sulla serina 381 è riconosciuta dalla casein chinasi CK1 che effettua un'altra fosforilazione; talvolta questa proteina è riconosciuta dalla ubiquitina ligasi 3, che con i suoi motivi SCFb-TRCP E3, porta alla ubiquitinizzazione ed alla degradazione proteasomica di YAP. Questi due meccanismi coordinatamente inibiscono l'attività di YAP.

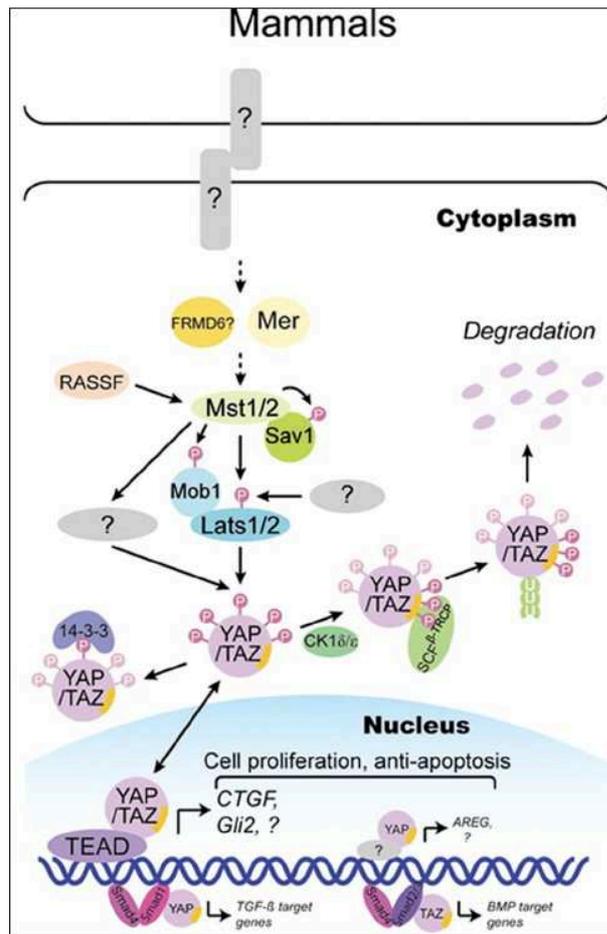


Fig. 9 Via Hippo nei mammiferi

Yes Associated Protein

Introduzione

La *Yes Associated Protein* (YAP) fu identificata nel 1995 da Sudol e la sua funzione biochimica è rimasta sconosciuta fino a quando alcuni studi dimostrarono che la proteina YAP possiede attività di coattivatore trascrizionale [62]; essa è un importante regolatore della dimensione degli organi e della proliferazione cellulare nei vertebrati.

Il gene YAP mappa sul cromosoma 11 nella regione 11q22. Esso codifica la proteina YAP, poiché è in grado di interagire ed associarsi, attraverso un tratto di prolina, con il dominio SH3 della proteina c-yes, una tirosin chinasi non recettoriale, che appartiene a sua volta alla famiglia delle proteine SRC[63].

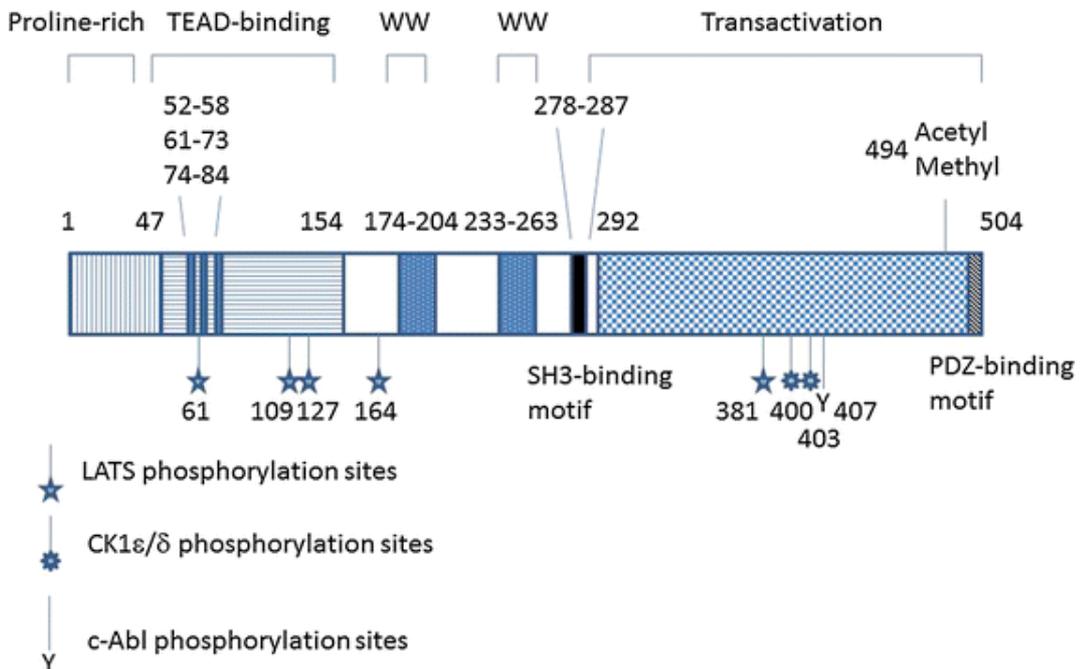


Fig.10 Struttura di YAP

Isoforme di YAP

Il nome ufficiale della proteina è YAP1 mentre YAP, YAP65 sono spesso usati come sinonimi. YAP è una proteina di 65kD (Homo sapiens) avente 8 isoforme, derivate da splicing alternativi [64], che sono classificate in due gruppi principali: YAP1-1 (α , β , γ , e δ) e YAP1-2 (α , β , γ , e δ). Le isoforme denominate con YAP1-1 contengono un dominio WW, mentre le isoforme chiamate YAP1-2 hanno due domini WW.

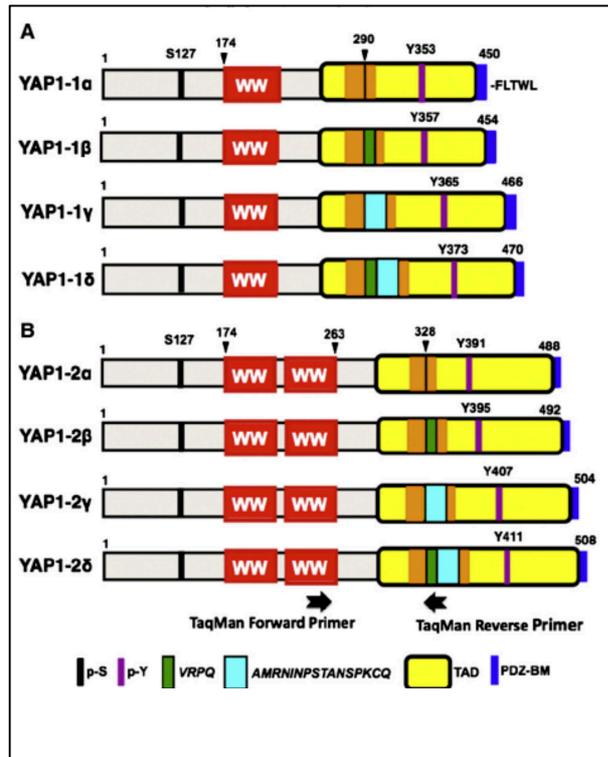


Fig.11 Le otto isoforme di YAP

Sia le isoforme YAP1-1 che YAP1-2 contengono anche un motivo SH3 vincolante [62-65] ed un dominio di attivazione trascrizionale; detto dominio è situato a metà della proteina nella regione carbossi-terminale. Inoltre YAP1-1 e YAP1-2 contengono un motivo-PDZ composto da 5 amminoacidi terminali, -FLTWL; tale motivo PDZ è fondamentale per la traslocazione nucleare e vincolante per domini proteici ZO-1 e ZO-2, che si trovano sull'estremità carbossi-terminali di YAP1-1 e YAP1-2. Un dominio WW è una proteina di 38 amminoacidi, che ha due residui di triptofano conservati (W), distanziati di 20-22 amminoacidi in sequenza. Il dominio WW, ha una funzione simile al domino SH3, in grado di legare brevi peptidi ricchi di prolina. Tale dominio è in grado di legarsi a peptidi ricchi di prolina terminanti con

tirosina (Y), detti PY. Il dominio WW è considerato un modulo di segnalazione, coinvolto nell'interazione proteina-proteina, ed è implicato nella mediazione del segnale attraverso l'interazione con diversi fattori di trascrizione [65]. YAP interagisce con varie proteine di varia funzione e la maggioranza di queste interazioni avvengono tramite i domini WW di YAP.

Il coattivatore trascrizionale (Taz) ha un motivo PDZ vincolante; viene detto motivo WWTR1 e risulta definibile come un dominio WW contenente il regolatore di trascrizione. Il National Center for Biotechnology Information (NCBI) identifica il gene TAZ come una proteina avente 400 residui aminoacidici. Taz ha il 46% di omologia, per sequenza amminoacidica, con l'isoforma di YAP di 488 amminoacidi.

La proteina YAP a seconda del contesto cellulare, può assumere comportamenti differenti (oncogene o oncosoppressore). I domini WW di YAP interagiscono con proteine che hanno entrambi i ruoli di inibizione o di promozione della crescita[62].

La proteina YAP, in qualità di coattivatore trascrizionale, si lega ai promotori dei fattori di trascrizione, come TEAD, Smad, Runx, Erb4 o p73.

YAP oncosoppressore tumorale o oncogene

In caso di danno al DNA, YAP ha il ruolo di indurre apoptosi e questo ruolo è innescato dalla sua fosforilazione, da parte della tirosin chinasi c-Abl, nella tirosina 357. Questa fosforilazione aumenta la stabilità di YAP e la sua affinità per il fattore

di trascrizione p73, con il quale si lega grazie al suo dominio WW, stabilizzandolo ed attivandolo. YAP fosforilato sulla Tyr 357 entra nel nucleo e, contemporaneamente, c-abl effettua un'altra fosforilazione[62].

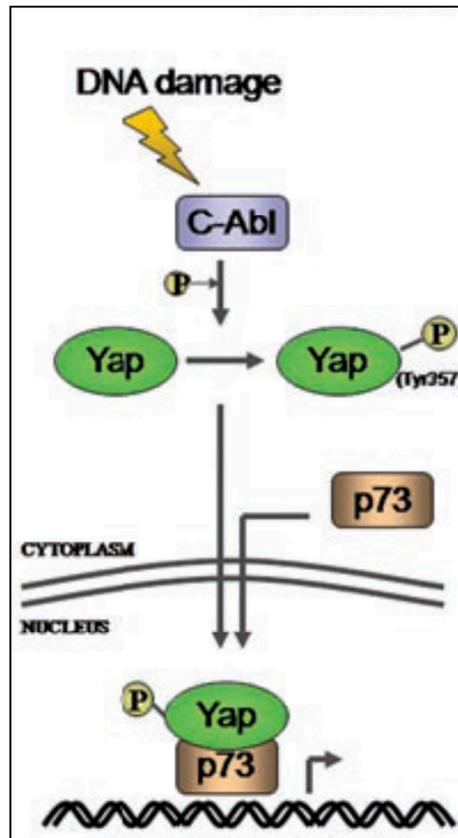


Fig. 12 Fosforilazione di YAP sulla tirosina 357

La proteina YAP può essere fosforilata anche da AKT (serina/treonina chinasi) nella serina 127 e in questo caso YAP viene ritenuto nel citoplasma, ancorato alla proteina 14-3-3. In questo modo YAP non può espletare la sua funzione di soppressore tumorale.

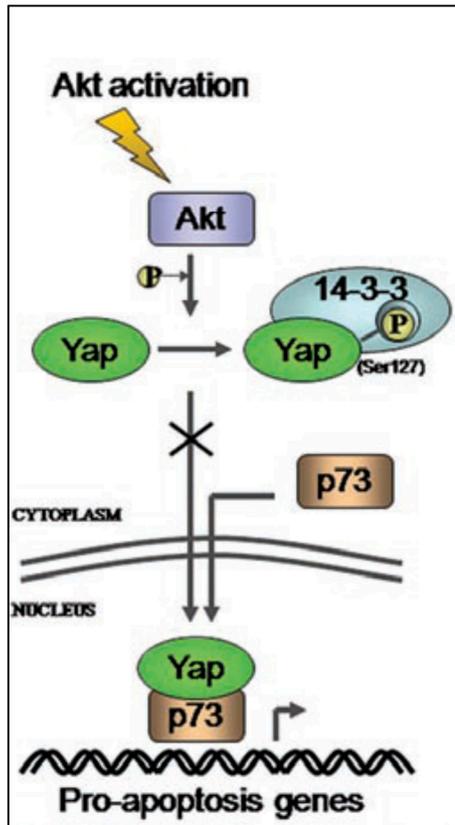


Fig. 13 La fosforilazione da parte di AKT sulla serina 127

Recenti studi genetici e biochimici hanno stabilito un ruolo fondamentale dei fattori di trascrizione della famiglia TEAD, nel mediare l'attività biologica di YAP/TAZ. L'alterazione di questi meccanismi può portare alla trasformazione oncogenica; tale attività si ha quando YAP è destabilizzato. La destabilizzazione è correlata alle mutazioni nella serina 127 e 381. La delezione o mutazione di uno dei componenti della via Hippo, porta all'iper-espressione di YAP. Una mutazione della serina 381 è sufficiente a bloccare l'ubiquitinizzazione di YAP [63]. YAP nella forma attiva

trasloca nel nucleo, si lega al fattore di trascrizione TEAD e porta alla sintesi dei geni pro-apoptotici e quelli attivanti la proliferazione cellulare tra cui CTGF, AREG ed altri.

TEAD

All'interno del nucleo delle cellule, si trova TEAD, un fattore di trascrizione, che lega i coattivatori trascrizionali. Le proteine TEAD sono fattori di trascrizione cruciali per lo sviluppo e giocano un ruolo importante nel cancro.

TEAD furono identificati [67] come proteine nucleari in grado di legare ed attivare la trascrizione dell'*enhancer* SV 40, un virus che si trova nelle scimmie e negli uomini. Successivamente è stato dimostrato che TEAD lega alcuni *enhancer* del papiloma virus umano. Le proteine TEAD si sono conservate con l'evoluzione ed ortologi di TEAD possono essere trovati in tutti i vertebrati, invertebrati ed anche singoli eucarioti unicellulari.

Nei mammiferi ci sono quattro geni che codificano quattro componenti omologhi della famiglia TEAD [64]: TEAD1-TEAD4. Ogni gene TEAD ha dei distinti partner di espressione, ma non si escludono a vicenda. Quasi tutti i tessuti esprimono almeno uno dei geni TEAD ed alcuni tessuti esprimono tutti e quattro i geni. Tutti e quattro i geni hanno la stessa struttura; nella regione N-terminale vi è un dominio di legame TEAD (TEA/AATS) che adotta una struttura piegata. Studi biochimici e funzionali

hanno rivelato che il dominio TEA lega gli elementi di DNA così come le sequenze 5'-GGAATG-3'.

Studi genetici mostrano anche che i fattori TEAD promuovono la proliferazione cellulare e inibiscono l'apoptosi.

TEAD, per poter attivare l'espressione dei geni, richiede l'aiuto di coattivatori trascrizionali e l'interazione tra TEAD e tali coattivatori è importante per i processi fisiologici. Risultano molto importanti le interazioni tra YAP/TAZ, le proteine VGL e TEAD. Le proteine YAP/TAZ e Vgl si possono legare a TEAD, poiché adottano una struttura simile e si inseriscono nella stessa scanalatura della superficie di TEAD, pur avendo una diversa sequenza primaria.

Le proteine Vgl iper-regolano l'espressione dei geni come IGFBP-5, MyHC e VEGFA che giocano un ruolo nella proliferazione, miogenesi e sembrano agire come soppressori tumorali in determinati scenari. Esistono quattro isoforme di Vgl con differente funzione (Vgl 1-Vgl4) che agiscono come soppressori dell'attività di YAP. Molto importante è la Vgl4 che risulta espressa in molti tessuti e non ha il dominio di legame al DNA; un'importante proprietà di Vgl4 è di agire come soppressore dell'attività di TEAD.

YAP/TAZ e Vgl si legano a TEAD ed iper-regolano l'espressione genica. Le figure 14-15 illustrano la struttura ed il meccanismo in forma semplificata. Il fattore di crescita connettivale CTGF è tra i geni che sono iper-regolati dall'attività di

YAP/TAZ, esso gioca un ruolo significativo nella proliferazione cellulare, nel determinare le dimensioni degli organi e nel mantenimento della staminalità.

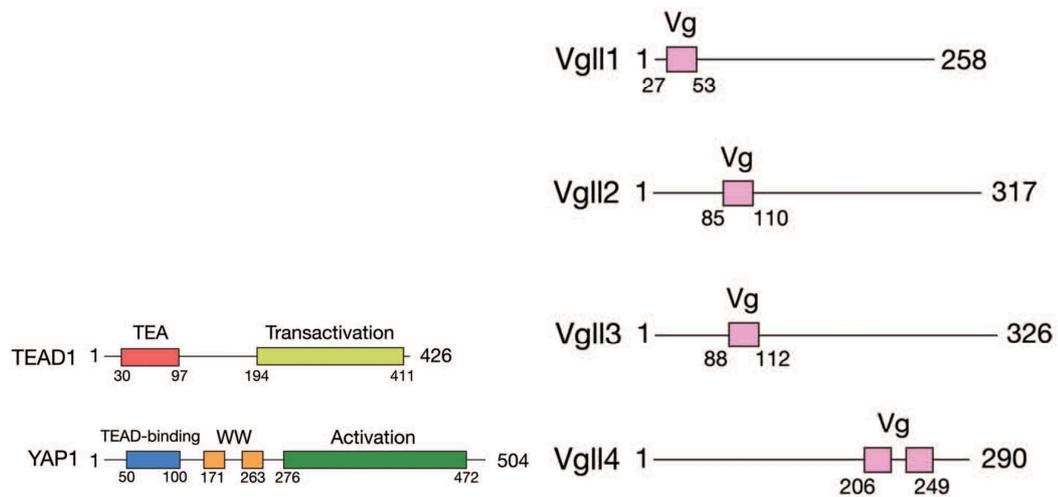


Fig. 14 Architettura del dominio di TEAD e dei suoi coattivatori; essi hanno un dominio N-terminale che lega il DNA ed un dominio di trans-attivazione nella regione C-terminale, che lega i coattivatori trascrizionali.

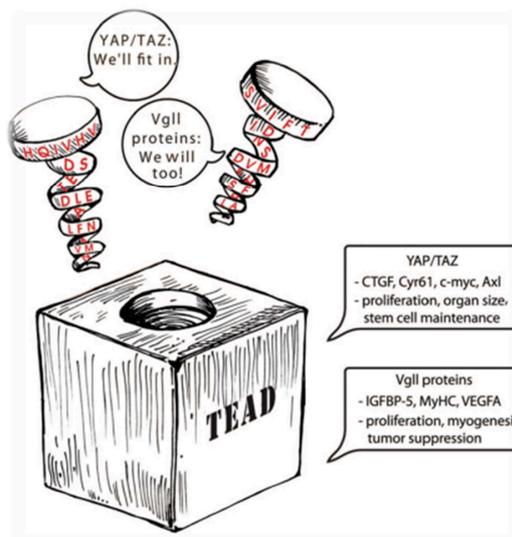


Fig. 15 In questa figura sono rappresentati l'interazione tra le proteine YAP/TAZ, Vgll e TEAD. TEAD si lega a queste proteine; YAP e TAZ e Vgll sono rappresentati come spirali. Adotta una struttura simile e si inserisce nella stessa scanalatura sulla superficie di TEAD avendo una diversa struttura primaria mentre le proteine YAP, TAZ e Vgll si legano a TEAD

CTGF

Il fattore di crescita connettivale (CTGF o CCN2) è una di proteina 36-38 kDa associata alla matrice extracellulare ed è un membro della famiglia di proteine CCN. Tale proteina presenta sequenze omologhe e struttura secondaria simile a quelle di altre proteine come la proteina 61 ricca in cisteina (cyr61, CCN1) e la proteina iper-espressa nel nefroblastoma (NOV, CCN3). Questa famiglia di proteine è coinvolta in un ampio gamma di funzioni fisiologiche tra cui: adesione, mitogenesi, migrazione e chemiotassi, sopravvivenza cellulare, differenziazione, angiogenesi, condrogenesi e tumorigenesi [68].

Domini strutturali e funzioni

Le CCN presentano una struttura simile tra loro. Si tratta di glicoproteine della matrice extracellulare, ricche in cisteina, che contengono un peptide N- terminale, seguito da quattro domini multifunzionali:

1. un dominio che lega il fattore di crescita insulino simile,
2. un dominio fattore di Von Willebrand tipo C,
3. un modulo omologo alla trombospondina, tipo I e IV verso l'estremità carbossi-terminale,
4. un motivo che lega l'eparina.

I domini 1 e 2 si ritiene che comprendano il dominio N- terminale legato al dominio C-terminale dei moduli II e III.

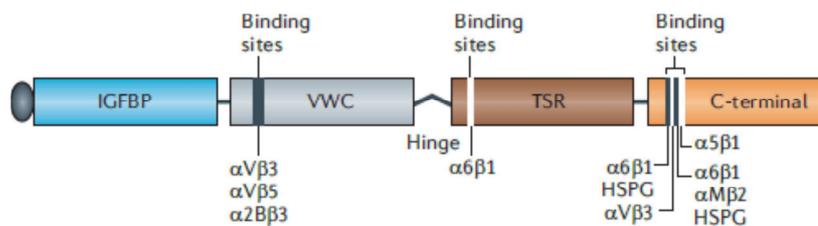


Fig. 16 Struttura del gene umano CTGF

Il gene CTGF mappa sul cromosoma 6q23.1. L'espressione di CTGF è regolata da eventi trascrizionali e post-trascrizionali, in risposta al contesto cellulare. Sul promotore del gene CTGF, vi sono diversi siti di legame sia per YAP/TEAD, che per altri fattori come AP-1, per Sp1, per il fattore inducibile dall'ipossia (HIF), per TATA box, per Ets-1, per il fattore nucleare (NF) κB, TGF-β e Smad [69]. È stato dimostrato che il fattore di crescita connettivale (CTGF) è un bersaglio di YAP/TEAD [70].

Numerosi studi [71] indicano che l'espressione delle proteine, appartenenti alla famiglia CCN, è alterata nei tumori ed in particolare, l'alta espressione di CTGF è correlata con i tumori di vari tessuti e metastasi.

L'espressione di CTGF è regolata da numerose vie di trasduzione del segnale, tra cui le vie TGF-β /Smad, Ras/MEK/ERK, protein-chinasi C (PKC), NF-κB, JAK/STAT, AMP ciclico, GTPasi RhoA, fosfatidil-inositol 3-chinasi e specie reattive dell'ossigeno [71]. Tali vie agiscono di concerto nell'induzione di CTGF guidata da TGF-β ed è verosimile l'esistenza di un'interazione tra le diverse vie, legata a stimoli

extracellulari. I fattori esterni che iper-regolano l'espressione di CTGF comprendono, oltre a TGF- β che è il maggiore induttore, il fattore di risposta del siero, il fattore di crescita vascolare endoteliale, il fattore di crescita epidermico, il fattore di crescita per i fibroblasti, la trombina, i fattori della coagulazione VIIa, Xa, l'endotelina 1, l'acido lisofosfatidico, l'ipossia, lo stress meccanico e lo stress ossidativo [72-73].

La proteina CTGF è localizzata nel citosol e nel nucleo delle cellule mesangiali; la maggior parte di esso è secreto e adempie alle sue funzioni nello spazio extracellulare e nel micro-ambiente circostante le cellule. La proteina è presente nel siero, nel plasma e nelle urine [74-75]. Una frazione significativa è trattenuta nelle piastrine ma viene rilasciata dopo l'attivazione nel processo di coagulazione; questo è un importante meccanismo che spiega l'aumento della concentrazione di CTGF in lesioni fibrotiche e aterosclerotiche.

CTGF è espresso nel fegato ed è stato riconosciuto come fattore profibrogenico; la sua espressione è aumentata nel fegato fibrotico umano e nel fegato del ratto, in seguito a trattamento di ligazione dei dotti biliari o di esposizione a CCL₄ o di somministrazione di N-nitrosidimetilamina [75]. Livelli elevati di CTGF sono associati con la sua entrata in circolo in quanto è dimostrato che maggiori concentrazioni di CTGF, nel siero, si trovano in pazienti con atresia biliare, o epatite virale cronica, e questo risulta correlato con la progressione della fibrosi epatica [76]. Più di recente è stato segnalato che l'espressione CTGF è elevata nei campioni di

HCC umano: pazienti con carcinoma epatico con alti livelli sierici di CTGF mostrano una ridotta sopravvivenza[75].

Anche se TGF- β è considerato il maggior induttore dell'espressione di CTGF, evidenze suggeriscono che CTGF media diversi effetti patologici di TGF- β , nella malattia epatica inclusa lo sviluppo della fibrosi e la progressione dell'HCC [75]. Alla luce di tutto questo, la comprensione della regolazione di CTGF è importante per la caratterizzazione di questo fattore come bersaglio molecolare nell' HCC.

Scopo della ricerca

Lo scopo del presente lavoro è studiare, in lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche di ratti F344 e BN, il ruolo della via Hippo nella progressione tumorale. Si valuterà in particolare il ruolo di YAP sugli effettori, a valle della via Hippo, come il suo bersaglio CTGF. Si valuterà l'espressione genica e proteica di YAP e dei suoi effettori. Di particolare interesse sarà la possibilità di considerare YAP, ed i geni controllati da esso, come possibile bersaglio terapeutico.

Materiali e Metodi

Ratti Fisher 344 (F344) e Brown Norway (BN), del peso di 120-140 g all'inizio del trattamento, sono stati alimentati con una dieta standard e con acqua di fonte ad libitum; sono stati allevati in gabbie singole in un ambiente a temperatura ed umidità costanti, rispettivamente 22 °C e 50% di umidità, con un ciclo sonno-veglia di 12 ore. I ratti F344 e BN, sono stati trattati secondo il "modello dell'epatocita resistente", che include la somministrazione di un agente iniziante, una singola dose necrogenica (150mg/kg per via intraperitoneale) di Dietilnitrosamina (DENa).

Alla cancerogenesi seguono 15 giorni di dieta iperproteica contenente lo 0,02% del mitoinibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF) con un epatectomia parziale (PH) a metà di tale trattamento (protocollo inizio/selezione o IS). Tale trattamento, definito promovente, consente la crescita clonale delle sole cellule iniziate.

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

Gli animali sono stati sacrificati, con dissanguamento attraverso l'aorta toracica, sotto anestesia indotta da etere; il fegato preneoplastico (FP, 6-12 settimane dall'inizio del trattamento), i noduli neoplastici (NN, a 32 settimane) e i carcinomi epatocellulari (HCC, a 57 e 60 settimane), sono stati isolati ed utilizzati per gli esperimenti. Sono state osservate varie lesioni precancerose a livello citologico: i foci di epatociti alterati (FEA) ed i noduli precoci caratterizzati da cellule chiare eosinofile e senza evidenti aspetti atipici. Trentadue settimane dopo l' inizio del trattamento, si sono

isolati nel fegato noduli con aspetto displastico. I noduli mostravano alterazioni nella disposizione laminare, ispessimento delle lamine epatiche, accumuli di epatociti in cordoni o nidi, dilatazioni sinusoidali e atipie nucleari. I carcinomi epatocellulari ottenuti nei 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 etiche che disciplinano l'utilizzo di animali in laboratorio.

Istologia e immunoistochimica

Sono state effettuate sezioni seriali dello spessore di 3 μm , sui tessuti epatici dei ratti fissati in formalina tamponata (pH 7) ed inclusi in paraffina. Le lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche sono state colorate con ematossilina ed eosina, con la colorazione immunoistochimica per la Glutazione S-transferasi di tipo placentare (GST-P), YAP e CTGF.

Nella colorazione per la GST-P, le sezioni deparafinizzate, sono state incubate in perossido d'idrogeno al 30% in metanolo per 20 minuti allo scopo di eliminare le perossidasi endogene. Per lo smascheramento dell'antigene, i vetrini sono stati scaldati a 100 C° in buffer citrato 0.01 M (pH 6). I vetrini sono stati poi incubati overnight a 4 C° con l'anticorpo primario anti 7-7 della Glutazione-S-transferasi isoforma placentare, con diluizione 1:500. L'immunoreattività è stata visualizzata utilizzando il kit

Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ed utilizzando la diaminobenzidina (DAB) come cromogeno. La colorazione dei vetrini ottenuta con il cromogeno è stata poi contrastata utilizzando l'ematossilina di Mayer.

Per le colorazioni dei markers YAP e CTGF si è proceduto come per la metodica della GST-P: le sezioni sono state trattate con una scala alcolica decrescente (alcool assoluto, 90° e 70°) e successivamente sono state incubate per 20 minuti in H₂O₂ e metanolo.

Le sezioni sono state scaldate a 100 C°, in forno a microonde, in tampone Tris EDTA, 10 mM, (pH 8.5) ed incubate overnight a 4 °C con l' anticorpo primario YAP della (Novus) del peso molecolare di 65 kDa con diluizione 1:50. Sezioni seriali corrispondenti sono state incubate con l'anticorpo primario CTGF (Abcam), con diluizione 1:100.

PROTEINA	ANTICORPO	EPITOPO
YAP	Coniglio policlonale	Glutamina 295
CTGF	Coniglio policlonale	150-250 residui CTGF umano

Tab.1 caratteristiche anticorpi utilizzati

-Anticorpo GST-P si è utilizzato l'anticorpo anti-GST-P (MBL, Nagoya, Japan) con diluizione 1:500.

Si è, di seguito, valutata la positività delle cellule per YAP e CTGF contando le cellule positive e negative all'interno delle lesioni GST-P positive, alla 6^a, 12^a e 32^a

settimana, mentre per i controlli sono state effettuate le conte, in aree casuali, per un totale di circa 3000 cellule.

Isolamento di RNA e sintesi di cDNA

L'RNA è stato estratto da campioni di fegato di ratto con Kit "AllPrep DNA/RNA/Protein" (Qiagen, Valencia, CA). Sono stati utilizzati 30 mg di fegato, sminuzzati e omogenati con dounce in soluzione lisante LRT fornita dal Kit "All Prep" completata con β -mercaptoetanolo ed inibitori di fosfatasi e proteasi. L'eluato viene quindi trasferito in colonna "AllPrep DNA spin column". Trasferito l'eluato in "RNeasy spin column" si centrifuga a 10000 rpm. La colonnina viene lavata in soluzione RW1 e successivamente si eseguono due lavaggi con RPE. Si procede infine all'eluizione dell'RNA con 50 ml di H₂O RNAsy free. Dopo l'estrazione, i campioni sono stati trattati con Dnase I (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

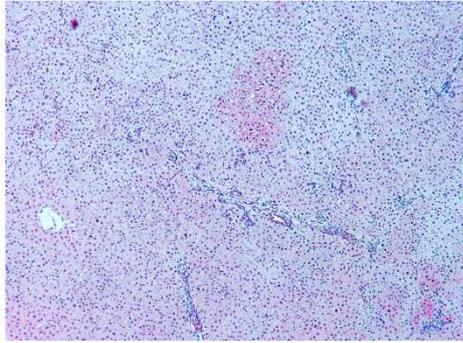
La sintesi del cDNA è stata effettuata usando il kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosciences, Foster City, CA), secondo il protocollo fornito dalla ditta.

q-REAL TIME PCR

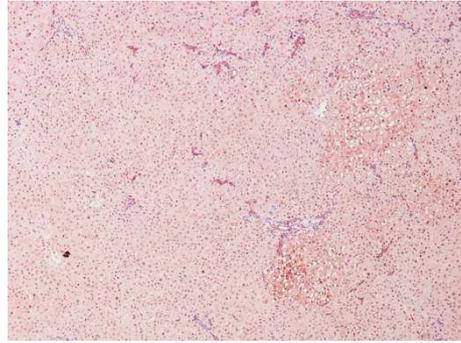
L'RNA totale, estratto da fegato di ratto (controllo, Fi 6, Fi 12, 32N, HCC) con il Kit "AllPrep® DNA/RNA/Protein" (Qiagen, Valencia, CA), è stato convertito in cDNA. I *primers* utilizzati per i geni YAP (Rn_YAP1_SG), CTGF (Rn_CTGF_1_SG) e per il 18 S, Rn_RNR_GS controllo interno sono selezionati mediante la "Quanti Tect primer assay" (Qiagen, Valencia, CA). Le reazioni di PCR sono state eseguite usando 75 ng di cDNA, utilizzando la QuantiTect mix SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA) ed il sistema di determinazione Termociclatore 7500 Fast Real Time PCR System. La PCR è stata condotta con un ciclo iniziale di denaturazione a 95°C, per 10 minuti, seguito da 40 cicli a 95°C, per 15 secondi ed uno a 60°C, per 1 minuto. I valori quantitativi sono stati calcolati usando il software PE Biosystems Analysis ed espressi come N° di target (NT), con $NT=2^{-\Delta Ct}$, dove il valore di ΔCt , per ogni campione, è stato calcolato sottraendo il valore di Ct medio, del gene bersaglio, dal valore di Ct medio del gene RNR-18, di riferimento.

Risultati immunohistochemica per YAP

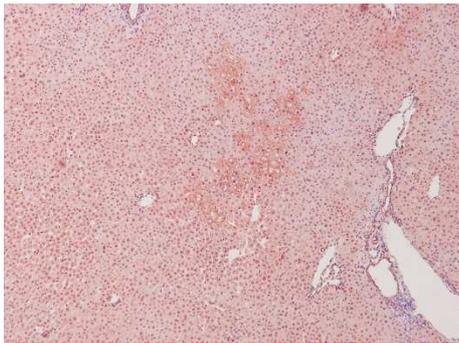
Con l'immunohistochemica, è stata valutata la localizzazione cellulare di YAP; alcune immagini istologiche alle varie settimane di trattamento, per entrambi i ceppi sono mostrate in figura 17.



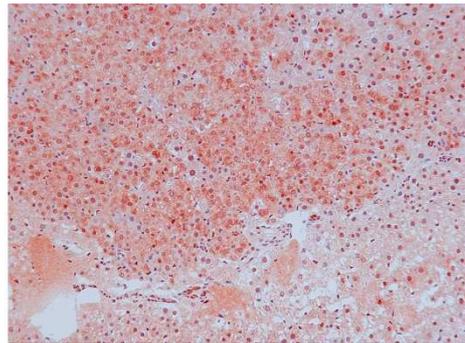
A) 6 BN



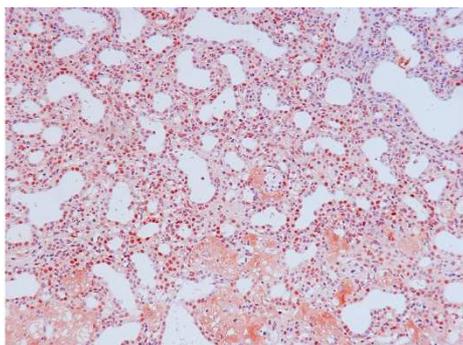
B) 12 BN



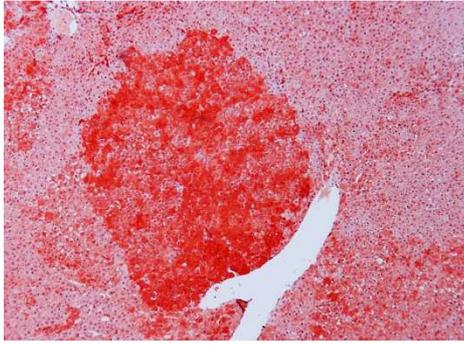
C) 32 BN



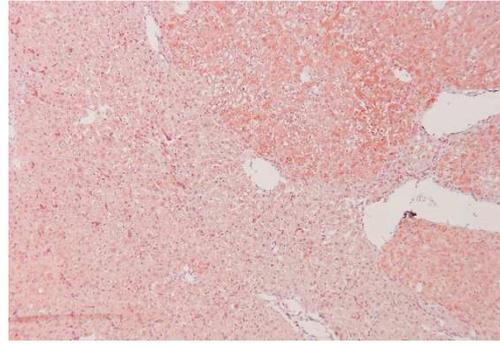
D) HCC BN



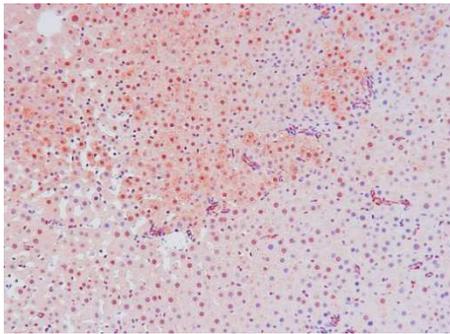
E) CC BN



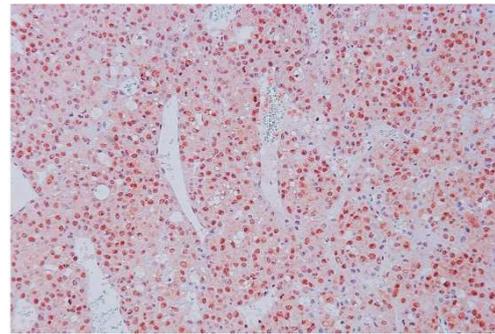
F) 6 F344



G) 12 F344



H) 32 F344



I) HCC F344

Fig. 17 Immagini di immunohistochimica anti-YAP, ottenute attraverso microscopio avente ingrandimento ottico 40x per A,B,C e F,G,H mentre 100x per D,E,I

Si è valutata l'espressione di YAP e CTGF valutando la positività e normalizzando (riportandoli in percentuale) i risultati delle conte rispetto a 3000 cellule. E' stata calcolata la percentuale di epatociti positivi all'interno delle lesioni, alle diverse settimane; i risultati per YAP sono riportati in grafico di figura 18 per gli F344 e per i BN mentre, in figura 19, sono riportati per gli stessi campioni i risultati relativi a CTGF.

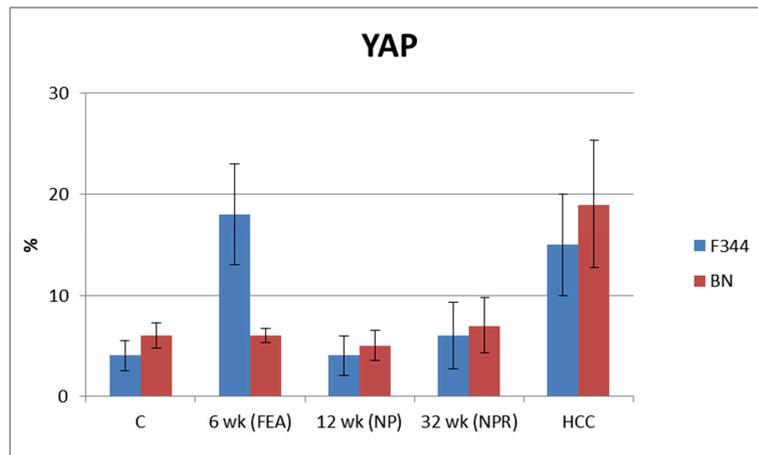


Fig. 18 Comparazione dei risultati, tra i due ceppi studiati, per l'espressione di YAP normalizzati su 3000 cellule.

Si può notare dalla figura come l'espressione di YAP, per il ceppo F344 alla sesta settimana, sia significativamente maggiore rispetto al controllo e rispetto alle altre settimane. Inoltre il valore alla sesta settimana per gli F344, relativo alle prime foci di epatociti alterati, è maggiore anche rispetto ai BN. Entrambi i ceppi non mostrano differenze significative alle settimane 12 e 32 rispetto al controllo.

Si deve considerare che alla 6^a settimana c'è la proliferazione-rigenerazione, dove si trova il valore più alto, mentre alla 12^a c'è il rimodellamento ed alla 32^a si hanno i noduli persistenti. Nell'HCC come previsto l'espressione di YAP è significativamente più elevata rispetto al controllo per entrambi i ceppi. In figura 19 sono mostrati i valori relativi all'espressione di CTGF. L'espressione di CTGF alla sesta settimana, risulta ancora più marcata di quella di YAP (figura 18). Infatti l'espressione è molto maggiore alla sesta settimana, per il ceppo F344, rispetto al controllo ma anche per il ceppo BN, l'espressione di YAP è significativamente

maggior comparata al controllo. Inoltre come per YAP, si evidenzia una differenza significativa tra i due ceppi, poiché ancora una volta CTGF è iper-espresso nel ceppo F344. Alle 12^a e 32^a settimane, si evidenzia un valore di CTGF più alto rispetto ai controlli, per entrambi i ceppi.

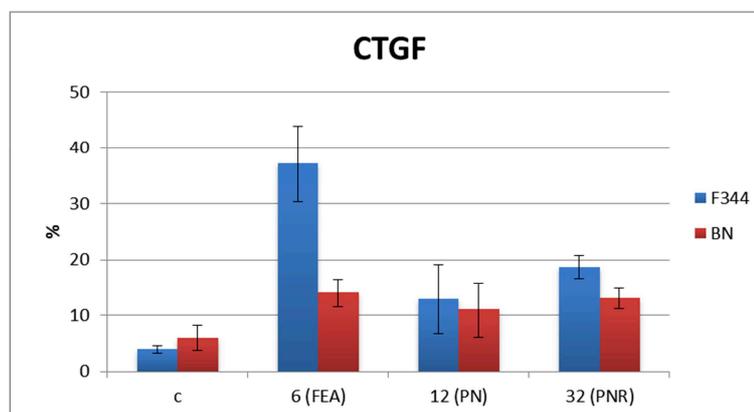


Fig. 19 Comparazione dei risultati, tra i due ceppi studiati, per l'espressione di CTGF normalizzati su 3000 cellule.

Il nostro studio su CTGF deriva dal fatto che nel fegato esso è stato riconosciuto come un fattore profibrogenico chiave ed è stato osservato un aumento della sua espressione nel fegato fibrotico, sia umano che del ratto. Per CTGF si è trovato un valore sempre maggiore rispetto ai controlli per i due ceppi, con un iper-espressione di CTGF proprio nelle settimane dove YAP è più espresso.

Nella figura 20 sono espressi i valori percentuali relativi alla conta delle lesioni rimodellanti, per gli stessi campioni dei ceppi F344 e BN. Nel grafico emerge un maggiore numero di lesioni rimodellanti, nel ceppo BN rispetto al ceppo F344, a tutti i tempi valutati e si osserva che si ha un maggiore numero di lesioni non rimodellanti nel ceppo F344, rispetto ai BN evidenziato in fig.21.

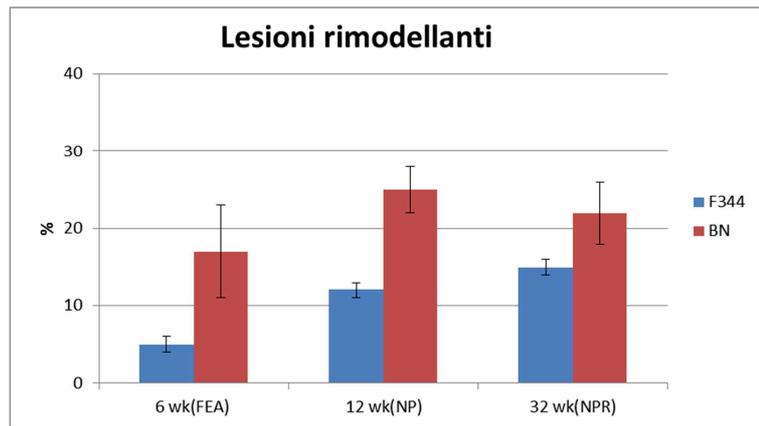


Fig. 20 Percentuale di lesioni rimodellanti in entrambi i ceppi.

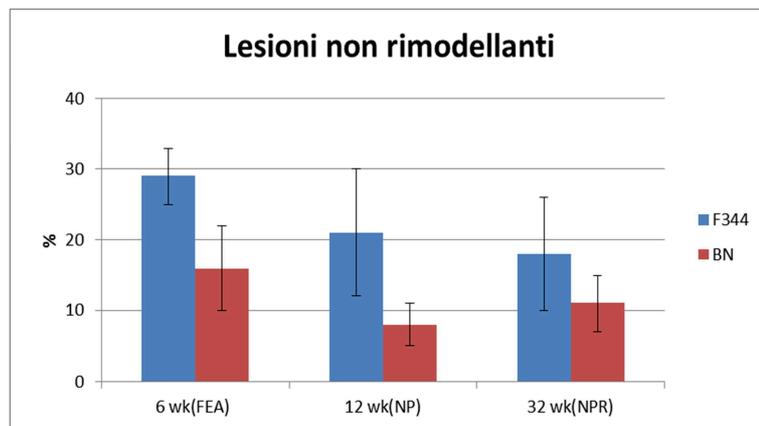


Fig. 21 Percentuale di lesioni non rimodellanti in entrambi i ceppi.

Durante il rimodellamento si verifica la progressiva scomparsa di almeno alcune anomalie fenotipiche, caratteristiche del tessuto preneoplastico e neoplastico. Tuttavia, molto probabilmente tali lesioni preneoplastiche non scompaiono completamente, ma rimangono in uno stato di quiescenza. E' stato infatti dimostrato che gli epatociti componenti le lesioni preneoplastiche, andate incontro a rimodellamento, possono spesso riacquistare elevata capacità di crescita, in seguito all'applicazione di un nuovo stimolo promotore.

Nei ratti BN, resistenti all'epatocancerogenesi, soltanto alcuni noduli precoci, su centinaia presenti, sono in grado di evolvere a carcinomi epatocellulari. Quest'osservazione sperimentale sottolinea dunque il fatto che una larga parte di noduli va incontro a reversione fenotipica nel ceppo resistente [49].

Dai dati ottenuti sull'espressione di YAP all'interno delle lesioni, per entrambi i ceppi, si sono calcolate le aree delle lesioni in termini di valore assoluto (mm^2) e percentuale (rapportando la superficie delle lesioni a quella del pezzo corrispondente); dai risultati emerge un valore maggiore delle aree delle lesioni nel ceppo F344 rispetto al BN; come illustrato in figura 22 in termini di valore assoluto ed in figura 23 in percentuale. Questo conferma che l'espressione di YAP è maggiore nei ceppi aventi lesioni con superfici maggiori e non rimodellanti (F344).

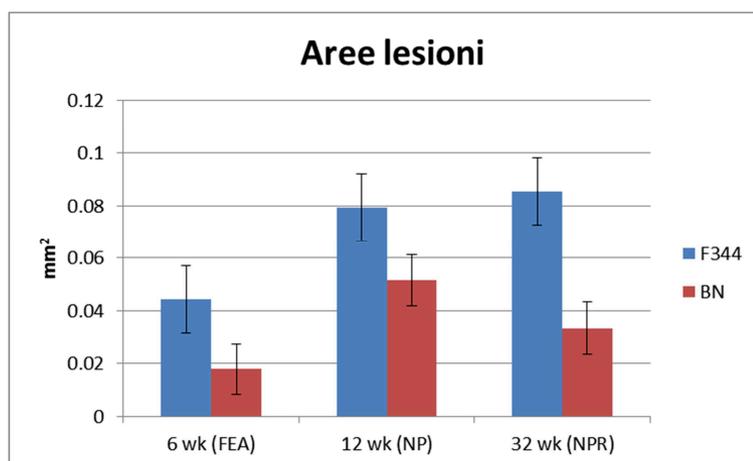


Fig. 22 Aree delle lesioni in valore assoluto per entrambi i ceppi.

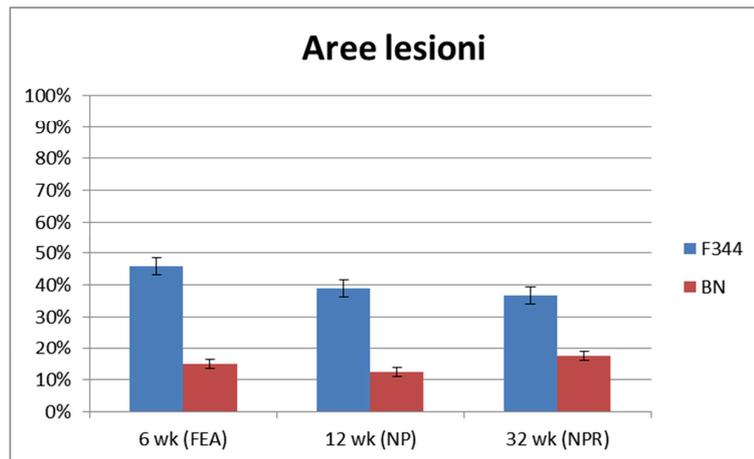


Fig. 23 Aree delle lesioni in valore % per entrambi i ceppi.

Le lesioni inizialmente sono più numerose nei ratti BN, ma la superficie delle lesioni è molto più piccola nei ratti BN rispetto agli F344. I noduli displastici (adenomi) e gli HCC scarsamente differenziati sono presenti alle settimane 32 e 57 solo nei ratti F344. HCC moderatamente differenziati si sviluppavano nel 85-95% dei ratti F344.

In figura 24, viene mostrata la densità delle cellule positive all'anticorpo YAP nelle lesioni ovvero il numero di cellule positive a YAP per cm^2 ; possiamo notare una densità maggiore alla sesta settimana nel ceppo F344 rispetto al ceppo BN, osservazioni confermate anche alle altre settimane.

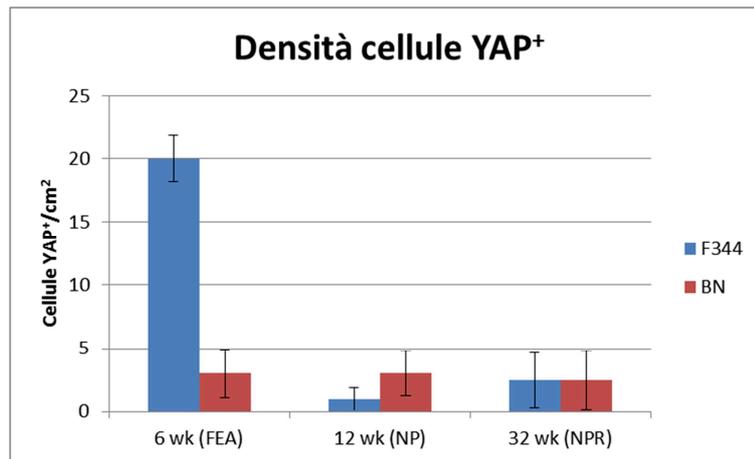


Fig. 24 Positività di YAP per cm² nelle lesioni delle cellule positive per entrambi i ceppi.

Nel grafico di Figura 25, vediamo la densità delle cellule totali per YAP nelle lesioni per cm² ovvero il numero di cellule positive e negative a YAP per cm². Notiamo che anche in questo caso alla sesta settimana si ha una densità maggiore per gli F344.

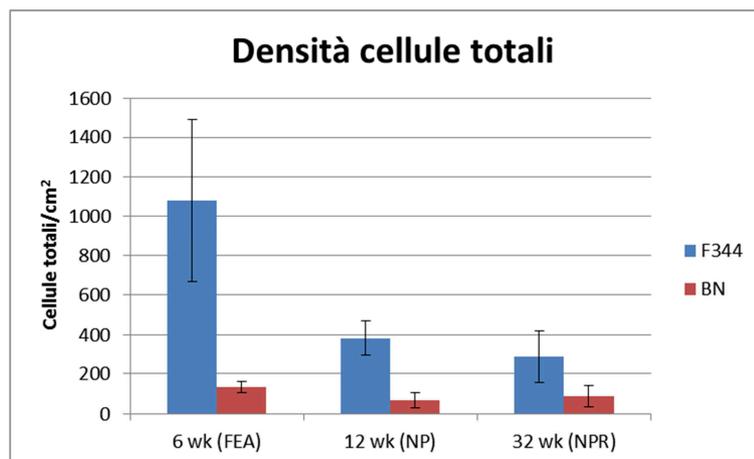


Fig. 25 Cellule totali per cm² in entrambi i ceppi.

La figura 26 rappresenta l'espressione di YAP nei tumori e distingue cellule positive per YAP nel nucleo rispetto al citoplasma. Possiamo notare che YAP, non presenta differenze significative tra citoplasma e nuclei per entrambi i ceppi.

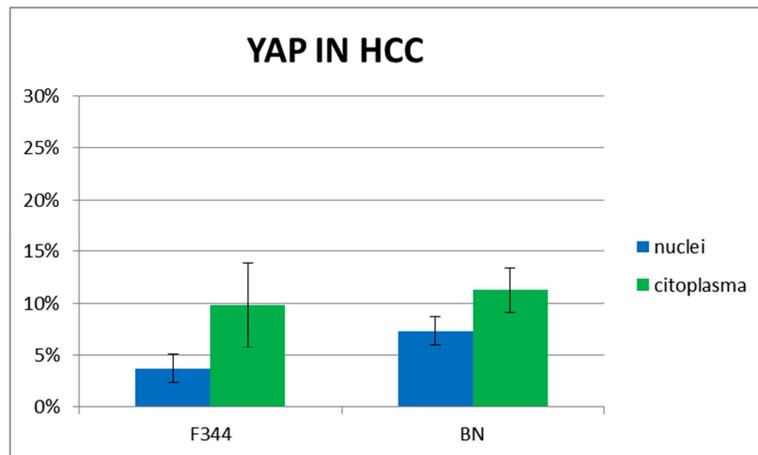


Fig 26 Espressione di YAP, in HCC, nei ceppi F344 e BN.

Di seguito vengono riportati i risultati relativi all'espressione di YAP valutata nel surrounding. La colorazione d'immunoistochimica risulta positiva a livello citoplasmatico piuttosto che nucleare. I risultati delle conte cellulari sono riportati nella figura 27 per i due ceppi. Si può notare come l'espressione di YAP nel surrounding per gli F344 sia sempre maggiore di quella del controllo e dei BN alle varie settimane, con un valore massimo in corrispondenza della sesta settimana ed un andamento simile a quello di YAP nelle lesioni.

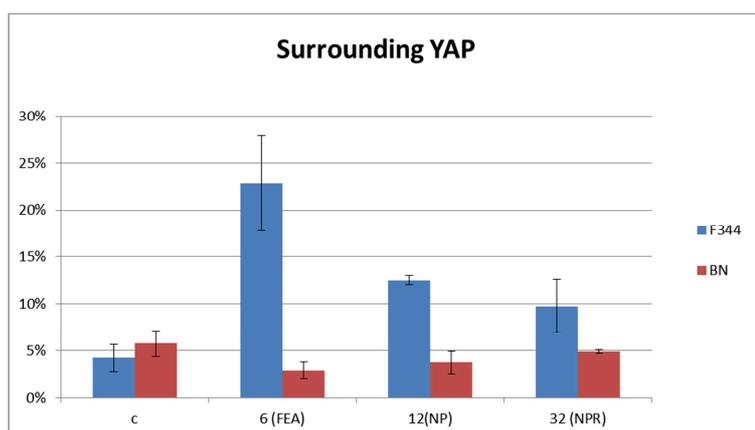


Fig. 27 Espressione di YAP nel surrounding nei ceppi F344 e BN.

In fig. 28 vediamo il grafico delle aree percentuali relative al surrounding (vengono rapportate per ogni campione l'area delle lesioni rispetto all'area totale della fettina). Possiamo vedere come l'area delle lesioni nei BN sia sempre maggiore di quella degli F344 alla 6^a e 12^a settimana, per risultare equivalente nei due ceppi alla 32^a.

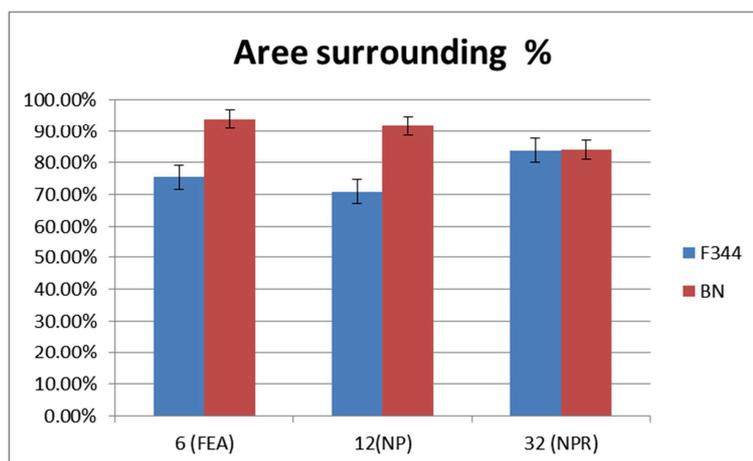


Fig. 28 Aree nel surrounding nei ceppi F344 e BN.

Per quanto riguarda i risultati della q-Real Time PCR, possiamo vedere i valori comparativi delle espressioni di YAP e CTGF per gli F344 e BN alle varie settimane del trattamento, riportati anche nei grafici di fig. 29 e 30.

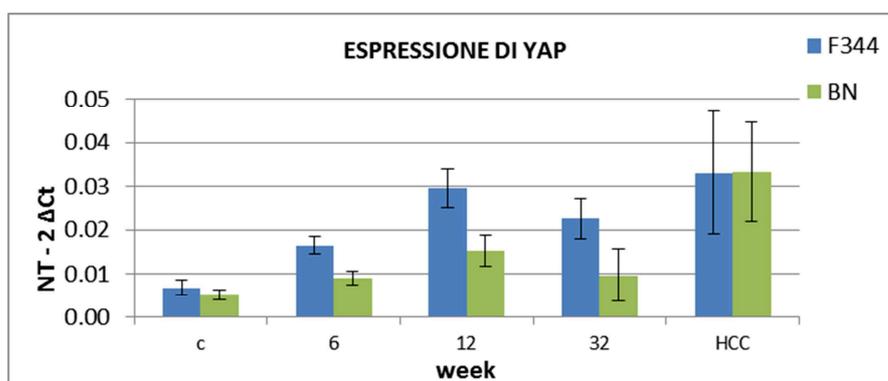


Fig. 29 q-Real Time PCR per YAP in entrambi i ceppi.

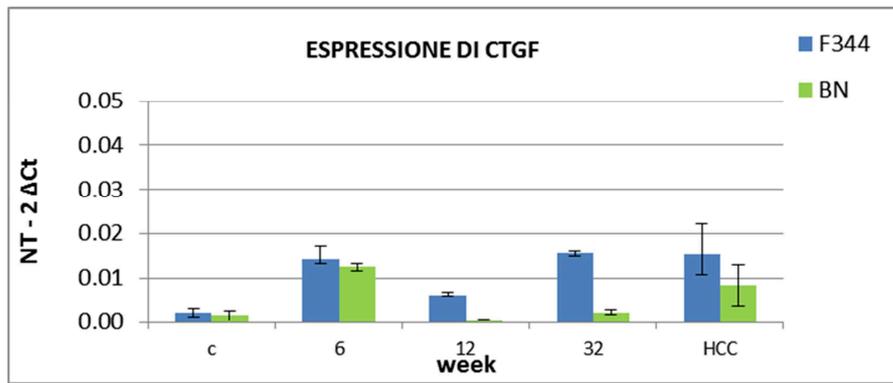


Fig. 30 q-Real Time PCR per CTGF in entrambi i ceppi.

Come trovato in immunohistochemical è possibile notare che alla 6^a settimana l'espressione di YAP, per entrambi i ceppi, risulta significativamente maggiore del controllo e si ha una differenza marcata a favore degli F344 rispetto ai BN.

La differenza tra i due ceppi, alla stessa settimana, è la stessa riscontrata negli esperimenti di immunohistochemical (figura 18 per YAP). Tali espressioni hanno un andamento diverso, alle successive settimane, tra i due ceppi, in quanto gli F344 presentano sempre un'espressione più alta. Nell'HCC, come ci si aspetta, entrambi i ceppi presentano un'espressione equivalente e comunque più alta rispetto al controllo.

L'espressione di CTGF (figura 30) mostra un andamento alla sesta settimana che conferma quanto osservato per YAP, ma con un'espressione ancora più marcata per entrambi i ceppi. I valori dell'espressione di CTGF si abbassano alle settimane successive e si mantengono negli HCC significativamente più alte del controllo, per entrambi i ceppi.

Conclusioni

Lo scopo della tesi è stato quello di valutare il ruolo di YAP e del suo bersaglio CTGF nelle fasi precoci dell'epatocarcinoma, focalizzando l'attenzione nei foci di epatociti alterati della sesta settimana, per le proteine YAP e CTGF.

Si è osservato che l'espressione, di YAP e CTGF è significativamente più alta negli HCC rispetto al controllo ed abbiamo trovato dei valori significativamente più alti per queste proteine, già nelle fasi precoci rispetto al controllo, per i ceppi studiati sia resistenti che suscettibili.

Dai risultati ottenuti con l'immunoistochimica si osserva che l'espressione citoplasmatica di YAP nelle lesioni precoci è significativamente più alta, rispetto al controllo, per il ceppo F344 mentre CTGF, alla stessa settimana ha un'espressione significativamente più alta del controllo, per entrambi i ceppi.

Si trova inoltre che l'espressione di YAP è maggiore nei ceppi F344 aventi lesioni con superfici maggiori e non rimodellanti.

Nell'HCC l'espressione di YAP e CTGF è sempre significativamente più alta del controllo.

La q-RT PCR conferma i risultati dell'immunoistochimica per le prime foci di epatociti alterati negli HCC per entrambi i ceppi studiati. L'aumento dell'espressione di YAP porta ad un aumento dell'espressione del suo bersaglio CTGF.

In definitiva possiamo ipotizzare per YAP e CTGF un possibile loro utilizzo come marcatori prognostici e diagnostici sin dalla fase più precoce della malattia.

Queste osservazioni richiedono ulteriori esperimenti allo scopo di:

1. individuare geni bersaglio la cui attività può essere influenzata dalle variazioni di espressioni di YAP.
2. Verificare il ruolo di questi geni nel corso della cancerogenesi e come eventuali bersagli (ad esempio mediante esami di microarray).
3. Verificare queste osservazioni in tumori epatici di uomo per considerare la possibilità di stendere il loro utilizzo come geni marcatori di diagnosi e/o terapia.

Bibliografia

1. Parkin, D. Maxwell. Global cancer statistics in the year 2000. *The lancet oncology*, 2001, 2.9: 533-543.
2. Hertl M, Cosimi AB, Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. *Seminar Liver Dis.* 2005, 25.143-154.
3. El-Serag, H.B, Rudolph L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis *Gastroenterology* 2007, 132. 2557-76.
4. Mcclynn, Katherine A., et al. International trends and patterns of primary liver cancer. *International Journal of Cancer*, 2001, 94.2: 290-296.
5. Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. *Seminar Liver Dis.*; 2005, 25.143-15.
6. Feitelson M.A, Sun B, Tufan N.L.S, Liu J, Lian Z. Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*; 2002, 21.2593-2604.
7. Hertl M, Cosimi AB. Liver transplantation for malignancy *Oncologist*; 2005, 10:269-281.
8. Aravalli, Rajagopal N, Steer, Clifford J. CRESSMAN, Erik NK. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 48.6: 2047-2063.
9. Ming, Lihua, et al. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology*, 2002, 36.5: 1214-1220.
10. Yu, Mimi C, Yuan, Jian-Min. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004, 127.5: S72-S78.
11. Farazi, Paraskevi A. Depinho, Ronald A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6.9: 674-687.
12. Wood G.A, Sarma D.R.S, Archer M.C. Resistente to promotion of glutathione S-transferasi 7-7 liver lesions in Copenhagen. *Carcinogenesis* 1999, 20:1169-1175.
13. Yoshimoto F, Masuda S, Higashi T, Nishii T. Comparison of drug-metabolizing activities in the livers of carcinogens-sensitive parent rats and carcinogen resistant descendants. *Canc Res* 1985, 45. 6155-6159
14. Solt D.B, Medline A, Farber E. Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis for liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977, 88. 595-618.
15. 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* 2007, 2. 217-236.
16. Feo F, Pascale R.M, Simile M.M, De Miglio M.R, Muroli R.M, Calvisi D.F. Genetic alteration in liver carcinogenesis: implication for new preventive and therapeutic strategies. *Critic Rev Oncogen* 2000, 11. 19-62.
17. Feo F, De Miglio M.R, Simile M.M, Muroli M.R, Calvisi D.F, Frau M, Pascale R.M. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent development on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006, 1765. 126-147.
18. Pascale R.M, Simile M.M, De Miglio M.R, Muroli M.R, Calvisi D.F, Asara G, Casabona D, Frau M, Seddaiu M.A, Feo. F. Cell cycle deregulation in liver lesions of rats with and without genetic predisposition to hepatocarcinogenesis. *Hepatology*; 2002, 35: 1341-50.
19. Goodman, Zachary D. Neoplasms of the liver. *Modern Pathology*, 2007, 20: S49-S60.
20. Thorgeirsson, Snorri S. Grisham, Joe W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 2002, 31.4: 339-346.
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.

22. Plentz, Ruben Raphael, et al. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2007, 45.4: 968-976.
23. Azechi, Hidemasa, et al. Disruption of the p16 cyclin D1 retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology*, 2001, 60.4: 346-354.
24. Higashitsuji, Hiroaki, et al. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nature medicine*, 2000, 6.1: 96-99.
25. Kudo, Masatoshi. Signaling pathway molecular targets and new targeted agents under development in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2012, 18.42: 6005.
26. Micsenyi A., Tan X., Sneddon T., Luo J.H., Michalopoulos G.K., Monga S.P. *Gastroenterology*; 2004, 126:1134–1146.
27. Herbst A, Kolligs FT. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol* ; 2007, 361: 63–91.
28. Chan DW, Chan CY, Yam JW, Ching YP, Ng IO Prickle-1 negatively regulates Wnt/beta-catenin pathway by promoting Dishevelled ubiquitination/degradation in liver cancer. *Gastroenterology*; 2006, 131: 1218–1227.
29. Hu, Tsung-Hui, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2003, 97.8: 1929-1940.
30. Sicklick, Jason K., et al. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2006, 27.4: 748-757.
31. Kaposi-Novak, Pal, et al. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *The Journal of clinical investigation*, 2006, 116.6: 1582-1595.
32. Yu, Fa-Xing; Guan, Kun-Liang. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*, 2013, 27.4: 355-371.
33. El-Serag, Hashem B.; Rudolph, K. Lenhard. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007, 132.7: 2557-2576.
34. Harvey, Kieran F.; Zhang, Xiaomeng; THOMAS, David M. The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13.4: 246-257.
35. Justice, Robin W., et al. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & development*, 1995, 9.5: 534-546.
36. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 1995, 121: 1053-1063.
37. Wei X, Shimizu T, Lai ZC *Mob* as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J* 2007, 26: 1772-1781.
38. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol* 2003, 5: 914-920.
39. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D *hippo* encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003, 114: 445-456.
40. Lee, Kyung-Kwon; Yonehara, Shin. Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST). *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277.14: 12351-12358.
41. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 27-36.
42. Yu, Jianzhong, et al. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Developmental cell*, 2010, 18.2: 288-299.

43. Tyler, David M.; Baker, Nicholas E. Expanded and fat regulate growth and differentiation in the *Drosophila* eye through multiple signaling pathways. *Developmental biology*, 2007, 305.1: 187-201.
44. Bennett FC, Harvey KF Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr Biol* 2006, 16: 2101-2110.
45. Enomoto, Masato; IGAKI, Tatsushi. Deciphering tumor-suppressor signaling in flies: genetic link between Scribble/Dlg/Lgl and the Hippo pathways. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38.10: 461-470.
46. Grusche, Felix A.; Richardson, Helena E.; Harvey, Kieran F. Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Current Biology*, 2010, 20.13: R574-R582.
47. Huang, Jianbin, et al. The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell*, 2005, 122.3: 421-434.
48. Badouel, Caroline, et al. The FERM-domain protein Expanded regulates Hippo pathway activity via direct interactions with the transcriptional activator Yorkie. *Developmental cell*, 2009, 16.3: 411-420.
49. Oh, Hyangye; Reddy, B. V. V. G.; Irvine, Kenneth D. Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Developmental biology*, 2009, 335.1: 188-197.
50. Yu, Fa-Xing; GUAN, Kun-Liang. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*, 2013, 27.4: 355-371.
51. Randy Johnson & Georg Halder. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews Drug Discovery* 13(2014), 63–79.
52. Varelas, X. et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev. Cell* 2010, 19.6: 831–844.
53. Ling, C. et al. The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2010, 107.23: 10532–10537.
54. Poon, C. L., Lin, J. I., Zhang, X. & Harvey, K. F. The sterile 20-like kinase Tao-1 controls tissue growth by regulating the Salvador-Warts-Hippo pathway. *Dev. Cell* 2011, 21.5: 896–906.
55. Huang, H. L, et al. Par-1 regulates tissue growth by influencing Hippo phosphorylation status and Hippo-salvador association. *PLoS Biol.* 2013, 11.8 e1001620.
56. Sansores Garcia, Leticia, et al. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *The Embo journal*, 2011, 30.12: 2325-2335.
57. Zhao, Bin, et al. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & development*, 2012, 26.1: 54-68.
58. YU, Fa-Xing; Guan, Kun-Liang. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & development*, 2013, 27.4: 355-371.
59. Hong, Wanjin, Guan, Kun-Liang. The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2012. p. 785-793.
60. Yagi R, Chen LF, Shigesada K, Murakami Y, Ito Y. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *Embo Journal* 1999;18:2551–62.
61. Strano, Sabrina, et al. PML surfs into HIPPO tumor suppressor pathway. *Frontiers in oncology*, 2013; 3: 36.
62. Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* 1994; 9: 2145–2152.
63. Gaffney, C. J, Oka, T, Mazack, V, Hilman, D, Gat, U., Muramatsu, T, et al. Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene* 509, 2012, 215–222.
64. Sudol, Marius, Harvey, Kieran F. Modularity in the Hippo signaling pathway. *Trends in biochemical sciences*, 2010, 35.11: 627-633.

65. Kay, Brian K.; Williamson, Michael P, Sudol, Marius. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal*, 2000, 14.2: 231-241.
66. Pobbati, Ajaybabu V, Hong, Wanjin. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer biology & therapy*, 2013, 14.5: 390.
67. Holbourn, Kenneth P, Acharya, K. Ravi; Perbal, Bernard. The CCN family of proteins: structure–function relationships. *Trends in biochemical sciences*, 2008, 33.10: 461-473.
68. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy. *Matrix Biol* 2002, 21: 473–82.
69. Leask, Andrew. CCN2 YAPs at cancer. *Journal of cell communication and signaling*, 2008, 2.1-2: 47-48.
70. Park S-K, Kim J, Seomun Y, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 966–71.
71. Schild C, Trueb B. Mechanical stress is required for high level expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res* 2002; 274: 83–91.
72. Abraham DJ, Xu SW, Black CM, et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 15220–5.
73. Roestenberg P, Van Nieuwenhoven FA, Joles JA, et al. Temporal expression profile and distribution pattern indicate a role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2) in diabetic nephropathy in mice. *Am J Physiol-Renal Physiol* 2006; 290: F1344–54.
74. Riser BL, Cortes P, Denichilo M, et al. Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int* 2003; 64: 451–8.
75. Urtasun, Raquel, et al. Connective tissue growth factor autocriny in human hepatocellular carcinoma: Oncogenic role and regulation by epidermal growth factor receptor yes associated protein–mediated activation. *Hepatology*, 2011, 54.6: 2149-2158.
76. Tong, ZhenYue, et al. Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes. *Hepatology*, 2009, 50.3: 939-947.