



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

---

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

**Direttore Prof. Eusebio Tolu**

**Indirizzo: Epidemiologia molecolare dei tumori**

---

Dipartimento di Medicina Clinica, Sperimentale e di Oncologia

Sezione di Patologia Sperimentale e Oncologia

(Responsabile Prof.ssa Rosa Maria Pascale)

**L'ATTIVAZIONE DEL COMPLESSO MYBL2-LIN9 CONTRIBUISCE  
ALL'EPATOCANCEROGENESI UMANA ED IDENTIFICA UN  
SOTTOGRUPPO DI EPATOCARCINOMI CON p53 MUTATO**

Relatore:

*Chiar.ma Prof.ssa Maria Maddalena Simile*

Tesi di dottorato:

*Dott.ssa Stella Balzani*

**ANNO ACCADEMICO 2010-2011**

# **INDICE**

## **SEZIONE COMPILATIVA**

### **1. Il carcinoma epatocellulare:**

***epidemiologia e meccanismi molecolari*** pag.4

*1.1 La cancerogenesi epatica è un processo multifasico* pag.5

*1.2 Analisi delle lesioni* pag.8

### **2. MYBL2**

*2.1 Funzione* pag.16

*2.2 Struttura* pag.19

*2.3 Regolazione del ciclo cellulare* pag.22

*2.4 MYBL2 e cancro* pag.28

## **SEZIONE SPERIMENTALE**

**3. Scopo della ricerca** pag.29

### **4. Materiali e metodi**

*4.1 Campioni: - tessuto umano*

*- linee cellulari* pag.31

*4.2 Indice di proliferazione e indice apoptotico* pag.32

*4.3 Analisi Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* pag.33

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

<i>4.4 Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)</i>	pag.34
<i>4.5 Immunoblot ed Immunoprecipitazione</i>	pag.34
<i>4.6 Analisi statistica</i>	pag.37
<b><i>5.Risultati</i></b>	
<i>5.1 MYBL2, sviluppo e progressione dell'epatocarcinoma umano</i>	pag.38
<i>5.2 Correlazione dell'attivazione di MYBL2 con parametri clinico-patologici nell'epatocarcinoma umano</i>	pag.43
<i>5.3 Attivazione di MYBL2 e LINC nei tumori epatici con p53 mutato</i>	pag.45
<i>5.4 La soppressione del complesso MYBL2/LINC aumenta la sensibilità delle cellule di epatocarcinoma umano con p53 mutato alla Doxorubicina</i>	pag.48
<b><i>6.Discussione</i></b>	pag.55
<b><i>7.Conclusioni</i></b>	pag.60
<b><i>Bibliografia</i></b>	pag.61

# SEZIONE COMPILATIVA

## *1. Il carcinoma epatocellulare:*

### *epidemiologia e meccanismi molecolari*

Il carcinoma epatocellulare (CE) è il quinto tumore umano più frequente e rappresenta l'80-90% dei tumori primari del fegato (1). Esso presenta una maggiore incidenza nell'Africa sub-Sahariana e nell'Asia orientale, dove le infezioni da virus dell'epatite B (HBV) e virus dell'epatite C (HCV) sono endemiche e i cibi sono contaminati dall'aflatossina B1 (tossina con proprietà mutagene prodotta, come secondo metabolita, dal fungo *Aspergillus Flavus*) (2-4). Esistono anche zone a più bassa incidenza quali l'Europa Nord-Occidentale, il Nord America e l'Australia, dove spesso fa seguito a malattie epatiche da consumo cronico di alcool e infezioni da epatite C.

Nel 70-90% di casi il CE si sviluppa in condizioni di infezione cronica del fegato e di cirrosi.

Oltre alle infezioni da virus dell'epatite B e C, ai cibi contaminati dall'aflatossina B1 e al consumo cronico di alcool, che sono i principali fattori di rischio di insorgenza del CE, esistono altri fattori eziologici che con minor frequenza potrebbero indurre questo tipo di

tumore epatico. Tra questi ultimi si possono citare l'uso a lungo termine nelle donne di contraccettivi orali (5); alcune malattie metaboliche ereditarie come l'emocromatosi, la deficienza di antitripsina  $\alpha$ -1, il morbo di Wilson e alcune porfirie (6); anche il diabete e l'obesità, causando steatoepatite non alcolica, possono contribuire allo sviluppo di fibrosi e cirrosi portando all'insorgenza del CE (7,8,9).

Il sesso può essere un altro fattore di rischio, dal momento che la maggiore incidenza si ha tra la popolazione maschile (10).

Studi epidemiologici hanno dimostrato che il tumore epatico viene solitamente diagnosticato quando è ormai in uno stadio avanzato e di conseguenza frequentemente fatale. Le recenti tecniche diagnostiche consentono un intervento più tempestivo ed efficace. Lo studio a livello molecolare del tessuto epatico prelevato da pazienti affetti da steatosi, cirrosi, epatite B, o epatite C, ha permesso di individuare varie alterazioni molecolari che possono condurre allo sviluppo e alla progressione tumorale.

A livello molecolare, nel CE indotto da HBV, HCV e aflatossina B1, sembra avere un ruolo di rilievo l'inattivazione o la mutazione di p53.

### ***1.1 La cancerogenesi epatica è un processo multifasico***

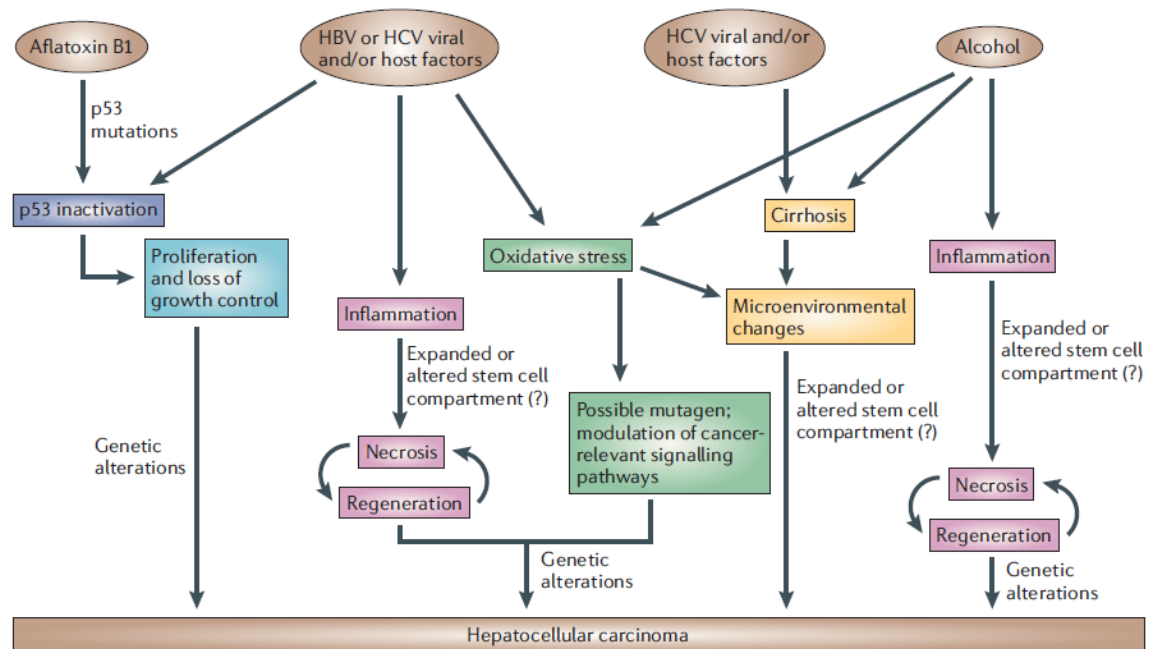
Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

Inflammation, continuous cycles of necrosis and regeneration, and oxidative stress, favoring genomic instability (GI), are characteristic of the process of hepatocarcinogenesis induced by HBV, HCV and alcohol and therefore contribute in a fundamental way to the development of CE (fig.1) (11).



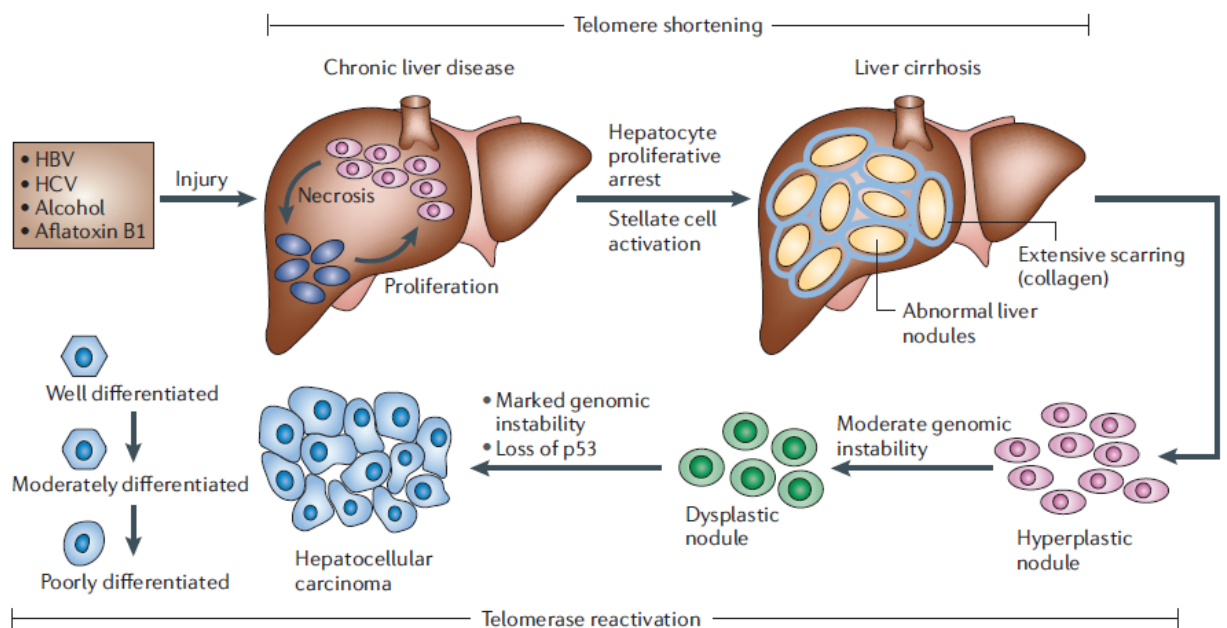
**Fig.1 Epatocancerogenesi multifasica**

L'evoluzione del carcinoma epatocellulare procede attraverso un processo multifasico (fig.2) (11).

Diversi fattori eziologici che inducono questo tipo di tumore, provocano cicli continui di danno e rigenerazione dell'epatocita che possono culminare nella patologia neoplastica. Foci e noduli originati dagli epatociti rigenerati ed alterati, hanno normali caratteristiche

citologiche, ma iniziano a presentare lesioni molecolari, essi rappresentano un primo potenziale passo verso il CE.

Queste lesioni possono progredire a noduli displastici con caratteri istologici ed istologie progressivamente anomali, come la presenza di cellule chiare per l'accumulo di glicogeno e lipidi al loro interno, e aumento della densità nucleare e delle figure mitotiche. Tali lesioni sono associate ad un maggiore ispessimento delle trabecole che è indice di una architettura epatica alterata. I noduli displastici possono a loro volta evolvere a CE che, conservando ed acquistando ulteriori alterazioni molecolari, è capace di invadere il tessuto fibroso circostante e i vasi, manifestando così il suo potere metastatico (12).



**Fig.2 Progressione istopatologica e molecolare del CE**

*In seguito a danno epatico provocato da uno o più fattori (virus dell'epatite B e C, alcool e aflatoxina B1), cicli di necrosi seguono*

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

*cicli di proliferazione riparativa. Cicli continui distruttivo-rigenerativi promuovono una malattia epatica cronica che può culminare in cirrosi epatica. Quest'ultima è caratterizzata da formazione dei noduli epatici circondati da deposizione di collagene. Successivamente, si può osservare la formazione di noduli iperplastici, seguiti da noduli displastici, ed infine da CE che possono essere ulteriormente classificati in tumori ben differenziati, moderatamente differenziati e scarsamente differenziati; questi ultimi rappresentano la forma più maligna dei CE umani.*

Tratto da Farazi PA, De Pinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. Nat.Rev.Cancer 2006; 6: 674-687.

## ***1.2 Analisi delle lesioni molecolari***

L'analisi molecolare del CE umano ha mostrato alterazioni genetiche ed epigenetiche che portano alla sregolazione dell'espressione di oncogeni e geni oncosoppressori quali il gene *p53*, la *β-catenina*, i membri della famiglia del recettore *ErbB*, *MET* e il suo ligando *HGF* (Hepatocyte growth factor), *p16(INK4a)*, *E-caderina* e *COX2* (Cyclooxygenase 2) (11).

All'inizio degli anni Novanta *p53* è stato riconosciuto come gene soppressore tumorale, mutato in circa il 50% dei tumori umani.



Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che p53 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, nella differenziazione, amplificazione genica, ricombinazione del DNA, segregazione cromosomica e senescenza cellulare. La proteina p53 è capace di formare tetrameri (13). Alleli che producono mutanti p53 sono in grado di eterodimerizzare con p53 wild-type e questo determina un cambiamento conformazionale che impedisce il legame di p53 ad elementi regolati da p53. La forma mutante sopprime l'attività di p53 wild-type. Sebbene sia ampiamente riconosciuto che il deficit di p53 partecipi allo sviluppo del CE, sono oggetto di ricerca i meccanismi attraverso i quali le mutazioni di questo gene contribuiscono alla fase di inizio, di progressione o ad entrambe le fasi coinvolte nello sviluppo del CE.

L'analisi di CE umani che si sono sviluppati in seguito ad infezioni da HCV e da HBV, ha mostrato una frequenza di mutazioni più elevata del gene p53 nei tumori maligni in stadio avanzato (43%) piuttosto che nei noduli rigenerativi (~7%) (14). Nel caso di CE provocati dall'Aflatossina B1 si osservano frequenti mutazioni del gene p53 negli stadi iniziali delle lesioni (15). Sulla base di questi dati, è possibile affermare che mutazioni del gene p53 possano operare sia all'inizio che durante la progressione del CE.

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

Un'elevata espressione e mutazioni a carico della  $\beta$ -catenina sono state rilevate frequentemente nei CE umani (16,17), in alcuni casi nei primi stadi di sviluppo del CE (5,18), in altri durante la progressione tumorale (19). La  $\beta$ -catenina è una componente cruciale della via del segnale Wnt. Quando questa via è attivata, le proteine APC (Adenomatous polyposis coli) e axina non sono in grado di legare la  $\beta$ -catenina, con conseguente sua destabilizzazione e traslocazione dal citoplasma al nucleo dove, associandosi ai fattori di trascrizione Tcf, la  $\beta$ -catenina forma un complesso di trascrizione. Questo comporta un aumento della trascrizione di bersagli genici rilevanti nello sviluppo dei tumori, come MYC, ciclina D1, COX2, e MMP7 (Matrix metalloproteinase 7) (20).

La famiglia ErbB, costituita da recettori tirosina chinasi comprende quattro membri (ERBB1-ERBB4) coinvolti nello sviluppo di differenti tipi di tumori umani. È stato dimostrato che ERBB1 (conosciuto anche come Epidermal growth factor receptor, EGFR) risulta iperespresso nel 68% dei CE, ERBB3 nell'84%, ERBB2 (conosciuto anche come HER2) nel 21%, e ERBB4 nel 61%. L'espressione di ERBB1 e ERBB3 è correlata a forme più aggressive caratterizzate da elevato indice di proliferazione, metastasi intraepatiche e cellule non differenziate (21).

Il recettore MET risulta iperespresso nei CE umani allo stadio avanzato (22) ed il suo ligando HGF, è uno dei più potenti mitogeni epatocitari. L'aumento dell'espressione di MET porta allo sviluppo del CE, mentre la sua diminuzione induce una regressione tumorale mediata dall'apoptosi e dalla compromissione della proliferazione cellulare (23).

Tra le alterazioni epigenetiche che si verificano durante il processo di epatocancerogenesi, la più rappresentativa è la modificazione della metilazione dei geni che hanno un ruolo di rilievo nello sviluppo del tumore. Cambiamenti dello stato di metilazione dei promotori genici, sono capaci di regolare l'espressione genica. La metilazione avviene sulle citosine in corrispondenza dei nucleotidi CpG ad opera di enzimi specifici chiamati metiltransferasi: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. La metilazione dei promotori può interferire con il legame dei fattori di trascrizione alle sequenze genetiche e con altri meccanismi di regolazione dell'espressione.

Nella fase iniziale dell'epatocancerogenesi umana e, in maggiore misura, durante la progressione tumorale, è stata osservata una metilazione aberrante del DNA (5,24-27). Eventi specifici di ipermetilazione si sono osservati nei geni *p16(INK4a)*, E-caderina, COX2, ASC (Apoptosis-associated speck-like protein) e DLC1

(Deleted in liver cancer 1) (28-35). Il trattamento “in vitro” di cellule di epatoma con un agente demetilante, aumenta l’espressione di *p16(INK4a)* e di COX2 portando ad inibizione della proliferazione cellulare (32).

Nell’epatocancerogenesi risultano alterate anche numerose vie di trasduzione del segnale. La via RAS è tra le più studiate ed è coinvolta nel controllo dell’apoptosi, della crescita e della differenziazione cellulare. L’induzione di Ras determina l’attivazione di una serie di effettori a valle ( Raf, Mek 1/2, Erk 1/2 ) con conseguente attivazione trascrizionale di bersagli nucleari quali c-Fos, c-Jun e c-Myc. Nei CE umani Ras risulta iperespresso, tale evento si associa all’inattivazione degli inibitori dei suoi effettori, come l’inattivazione di RKIP (Raf kinase inhibitory protein), gene che inibisce la fosforilazione e quindi l’attivazione di Mek1/2, e DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1), inibitore di Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated Kinase). Tra gli effettori di Ras ci sono anche RASSF1A (Ras associated factor 1) e NORE1A (Novel Ras effector 1) che possono contrastare l’attività di Ras inducendo effetti proapoptotici. Negli epatocarcinomi umani e nei tumori polmonari, pancreatici e del colon-retto, risultano ipermetilati i promotori dei geni di RASSF1A e NORE1A (36,37). La perdita

dell'espressione degli inibitori di Ras nei CE umani contribuisce ad una incontrollata crescita cellulare.

La via JAK/STAT partecipa alla regolazione delle risposte cellulari alle citochine ed ai fattori di crescita, e riveste un importante ruolo nei processi cellulari di differenziazione, proliferazione e apoptosi (38).

La trasduzione del segnale generato dall'attività delle citochine e dei fattori di crescita, e mediato dalle proteine JAK e STAT, induce una risposta intracellulare, modificando l'espressione genica. Le proteine STAT 3 e 5, presenti nel citoplasma in forma inattiva, si attivano in seguito alla fosforilazione mediata da JAK o dai recettori ad attività tirosin-cinasi dei fattori di crescita. In seguito ad attivazione, STAT 3 e 5 entrano nel nucleo dove agiscono come fattori di trascrizione. Nelle cellule normali, l'attivazione delle proteine STAT è transiente e sotto rigoroso controllo; nei tumori, a causa dell'inattivazione di inibitori specifici di STAT (SOCS 1-3), si verifica una mancata modulazione del segnale che, attivandosi in maniera costitutiva, provoca uno sbilanciamento di fattori antiapoptotici e proapoptotici come Bcl-x, ciclina D1 e D2, Mcl-1 etc (39).

Nel corso dell'epatocancerogenesi risultano alterate anche altre vie di trasduzione del segnale come la via della 3-fosfoinositolo cinasi (PI3K) e di mTOR (PI3K/AKT/mTOR), del fattore di crescita degli

epatociti (EGF) e del fattore di transizione mesenchimale-epiteliale, la via Hedgehog e del segnale apoptotico (fig.3).

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

---



## ***2.MYBL2***

### ***2.1 Funzione***

Il gene MYBL2 (v-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2, conosciuto anche come B-MYB) è un fattore di trascrizione che appartiene alla famiglia di geni MYB della quale fanno parte anche i geni A-MYB e C-MYB che sono tessuto specifici. Infatti, A-MYB è espresso nei linfociti B germinali e nei sistemi riproduttivi maschile e femminile (40,41), e l'espressione di C-MYB è principalmente limitata alle cellule della linea ematopoietica con qualche importante eccezione riguardante le cellule epiteliali delle cripte del colon ed il cervello (42,43). Al contrario, MYBL2 è ampiamente espresso nelle cellule in rapida divisione dei mammiferi in fase di sviluppo e adulti, suggerendo che esso ha un ruolo importante durante il ciclo cellulare.

MYBL2 interagisce con i più importanti componenti del ciclo cellulare e del complesso trascrizionale, come E2F e le proteine del retinoblastoma (pRB). Questo spiega la sua essenziale funzione nella formazione e nello sviluppo delle cellule staminali dei mammiferi, che potrebbe essere correlata con la sua capacità di influenzare direttamente o indirettamente l'espressione genica. Oltre al suo ruolo nel ciclo cellulare, MYBL2 promuove la sopravvivenza cellulare

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari



mediante attivazione dei geni antiapoptotici come ApoJ/clusterin e BCL2.

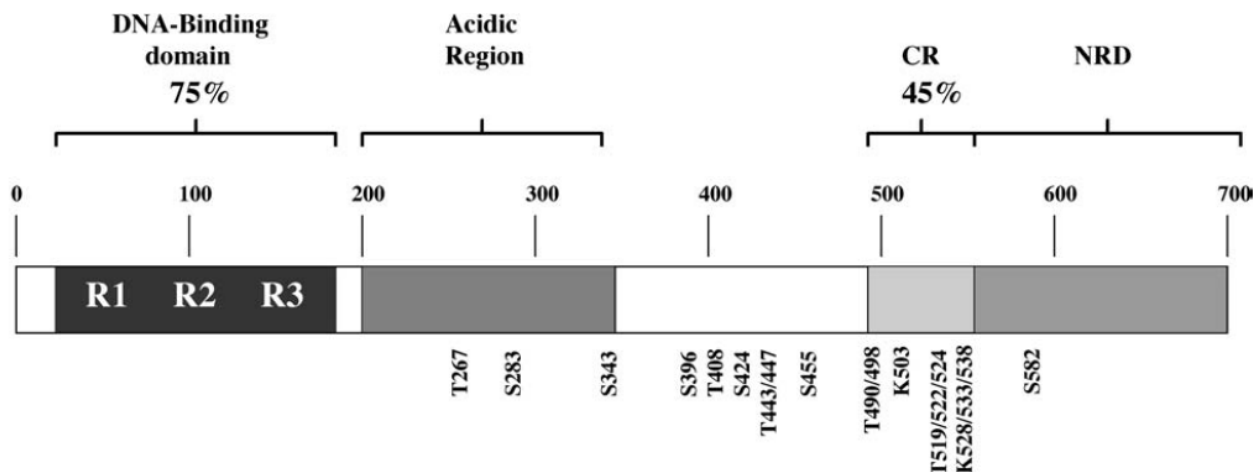
È possibile quindi affermare che MYBL2 risulta implicato nella tumorigenesi tramite un'interferenza complessa nella regolazione dell'espressione genica (44). L'espressione del gene MYBL2 è stata trovata in tutti i tipi di cellule ed il livello della proteina è proporzionale al grado di proliferazione cellulare. Questo spiega la forte espressione di MYBL2 nelle cellule staminali embrionali, nei tessuti di mammiferi in attiva crescita e nei precursori delle cellule ematopoietiche dell'adulto (45-47). L'elevata espressione di MYBL2 nelle cellule in attiva proliferazione spiega, almeno in parte, il fenotipo di topi knockout per B-MYB, che vanno incontro a morte embrionale precoce, dovuta ad alterata formazione della massa cellulare (46).

La delezione di A-MYB e di C-MYB determina, rispettivamente, topi in grado di sopravvivere o morte embrionale ritardata per la mancanza di eritropoiesi (40,48). Il precoce fenotipo letale dei topi che non esprimono MYBL2 indica che gli altri componenti della famiglia MYB non possono vicariare la funzione di MYBL2, favorendo l'ipotesi che quest'ultimo giochi un ruolo unico nell'omeostasi cellulare coinvolta nella crescita (49). Diversamente dai vertebrati, gli

invertebrati quali drosophila, il riccio di mare ed il *Caenorhabditis elegans* contengono, nel loro genoma, soltanto un gene MYB, strettamente collegato a MYBL2. Si ipotizza, quindi, che C-MYB e A-MYB si siano formati dopo le duplicazioni del genoma, avvenute durante i 500 milioni di anni di evoluzione dei vertebrati. MYBL2 della *Drosophila* (dMYB), promuove la replicazione del DNA e l'attivazione trascrizionale di geni, come la ciclina B1, essenziale per la fase di progressione G2/M (50). Mutazioni di dMYB portano all'amplificazione del centrosoma suggerendo che la sua attività è necessaria per mantenere l'integrità del genoma (51). dMYB si trova in un complesso ad alto peso molecolare che comprende, tra le tante proteine, E2F e pRB; questo assemblaggio proteico controlla la trascrizione, la replicazione del DNA e la struttura della cromatina. Nei mammiferi, B-MYB interagisce con vari membri della famiglia E2F e con il componente p107 delle proteine del retinoblastoma, suggerendo che esso è parte di un complesso proteico che è stato conservato durante l'evoluzione (52,53).

## ***2.2 Struttura***

MYBL2 è una proteina multifunzionale, che possiede, oltre alle proprietà trascrizionali, l'abilità di interagire direttamente con altri regolatori del ciclo cellulare. I fattori di trascrizione MYB, nei vertebrati, comprendono una piccola famiglia di importanti proteine regolatrici. Tra queste, il prototipo è C-MYB, progenitore cellulare dell'oncogene trasportato dal retrovirus di pollo AMV e E26, che trasforma le cellule ematopoietiche sia "in vivo" che "in vitro" (54). Gli altri due componenti di questa famiglia, A-MYB e MYBL2, sono stati scoperti successivamente, usando sonde di C-MYB per valutare librerie di cDNA umane (55). Queste tre proteine MYB condividono un'organizzazione strutturale di domini molto simile (fig.4).



**Fig.4 Struttura della proteina B-MYB**

*Il dominio N-terminale, che lega il DNA, è composto da 3 regioni: R1, R2 e R3. L'identità amminoacidica complessiva di questa regione tra le proteine MYB è del 75%. Adiacente a questo dominio, si trova la regione acida alla quale seguono la regione conservata (CR, che presenta una identità amminoacidica tra le proteine MYB del 45%) ed il dominio regolatore negativo (NRD, negative regulatory domain).*

La regione maggiormente conservata è il dominio che lega il DNA, localizzato nella regione N-terminale, che è composta da tre sequenze ripetitive imperfette di 51-52 amminoacidi che riconoscono il sito di legame di MYB (MYB binding site, MBS) C/TAACNG (56-57). Le porzioni centrali di queste proteine comprendono una parte meno conservata, con un dominio acido che è coinvolto nell'attivazione trascrizionale, ed una regione conservata (CR) associata ad effetti positivi e negativi sull'attività trascrizionale (58-62). Il C-terminale comprende un dominio autoregolatorio (si tratta di un dominio regolatorio negativo, negative regulatory domain: NRD) che sopprime la funzione transattivante (59,61,63-67).

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

Le tre proteine MYB possiedono specifiche e distinte funzioni:

- C-MYB è espresso ad alti livelli nella maggior parte dei precursori delle cellule ematopoietiche ed ha un'influenza determinante nello sviluppo delle cellule ematiche (54,68,69).
- A-MYB è ampiamente espresso in cellule in attiva proliferazione durante l'embriogenesi e lo sviluppo del sistema nervoso centrale, nei precursori delle cellule spermatiche, nelle cellule epiteliali mammarie e nei linfociti B (41).
- MYBL2, invece, è particolarmente espresso durante il ciclo cellulare di tutti i tipi cellulari (55,69,70-72). Inoltre, è espresso precocemente durante l'embriogenesi del topo, prima di C-MYB e di A-MYB, e la sua espressione è limitata alle zone di proliferazione cellulare (45).

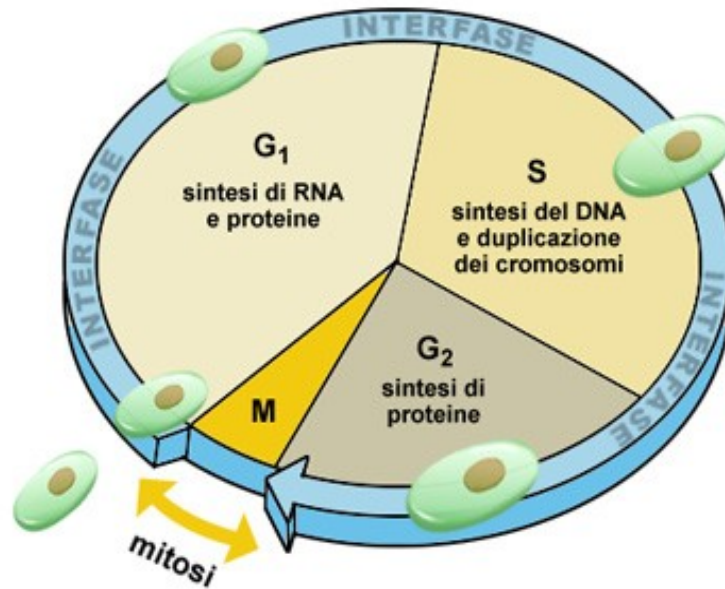
Il fatto che l'espressione di B-MYB sia strettamente associata alla proliferazione cellulare di tutti i tipi cellulari, suggerisce che questo gene possa avere una funzione importante durante il ciclo cellulare. Questa ipotesi è supportata da studi che dimostrano come oligonucleotidi antisenso bloccanti l'attività di MYBL2, inibiscono la proliferazione in linee cellulari mieloidi, linfoidi, di glioblastoma, di fibroblasti e di neuroblastoma (73-76); mentre l'espressione costitutiva del gene permette, a linee di fibroblasti, di crescere in

condizioni di carenza di siero (74), e previene l'arresto del ciclo cellulare nella differenziazione indotta dalla interleuchina 6 nelle cellule mieloidi M1 leucemiche (77).

### ***2.3 Regolazione del ciclo cellulare***

Il ciclo cellulare delle cellule somatiche eucariotiche comprende l'insieme di eventi ordinati che regolano la crescita e la divisione di una cellula eucariotica in relazione a stimoli esterni o endogeni. Esso viene suddiviso in due fasi principali: l'interfase e la fase M. In considerazione del fatto che la fase M comprende la mitosi e la citocinesi, se ne deduce che tutte le cellule che non si stanno dividendo sono in interfase. Quest'ultima include necessariamente altri periodi del ciclo vitale cellulare, normalmente descritti come fasi G1, S e G2. Durante la fase G1, la cellula ha un corredo cromosomico diploide e svolge tutte le normali funzioni vitali. Quando la cellula riceve degli appropriati stimoli proliferativi, entrerà in fase S, dove replicherà interamente il suo patrimonio genetico. Questa fase, moderatamente lunga, è assai delicata poichè buona parte delle funzioni vitali cellulari sono concentrate nella replicazione del DNA. Al termine della fase S, la cellula entrerà in fase G2, dove crescerà di dimensioni, in vista della mitosi, e si preparerà a dividersi. In G2 le

cellule hanno un corredo cromosomico tetraploide. Al termine della fase G<sub>2</sub> la cellula entrerà in mitosi (fig.5).



**Fig.5 Fasi del ciclo cellulare**

Il passaggio da una fase all'altra del ciclo cellulare è strettamente regolato. Questo sia per evitare la proliferazione cellulare incontrollata (come si verifica, ad esempio, nei tumori), che per evitare che la cellula entri in mitosi nel momento o nelle condizioni sbagliate. Per esempio è importante che una cellula che abbia subito dei danni al DNA, possa ripararlo prima che essi vengano trasmessi alla progenie mediante un'incontrollata entrata in fase S.

Il meccanismo molecolare alla base della regolazione del ciclo cellulare è impostato sull'azione di cinasi ciclina-dipendenti (CDK), enzimi che fosforilando substrati differenti nelle diverse fasi, determinano la progressione o l'arresto del ciclo cellulare stesso.

MYBL2 è un gene regolatore della crescita. La sua espressione è indotta durante la fase di transizione G1/S del ciclo cellulare (71,78). Tutti i componenti della famiglia MYB legano il DNA “in vitro” attraverso le sequenze consenso C/TAACNG e ciò riflette l’alto grado di omologia del dominio che lega il DNA (79). In assenza di co-fattori, MYBL2 diventa un attivatore trascrizionale peggiore rispetto a C-MYB e A-MYB, probabilmente a causa dei co-repressori trascrizionali N-CoR e SMRT, che lo mantengono in uno stato represso (80). Durante la fase S del ciclo cellulare, MYBL2 viene fosforilato da una cinasi ciclina-dipendente: CDK2 che ne induce l’attivazione (81-84). La fosforilazione di MYBL2 può interferire con i co-repressori legati ad esso stimolando così la sua attività trascrizionale (80).

Tra i co-fattori trascrizionali che legandosi a MYBL2 possono sia incrementare che sopprimere la sua attività trascrizionale, vi sono: CBP/P300, ciclina D1, PARP1, p107 e p57kip2.



MYBL2 promuove la progressione del ciclo cellulare attenuando gli effetti inibitori indotti da p107 sulle cicline mitotiche, ed insieme ai fattori E2F1-3, regola l'espressione dei geni necessari per la fase G2/M del ciclo cellulare quali cdc2, ciclina A2 e ciclina B1 (85).

Questo è in accordo con recenti esperimenti che mostrano come una ipo-regolazione di MYBL2 in fibroblasti umani, indotta da RNAi, provoca un parziale arresto delle cellule nella fase G2/M ed apoptosi (86).

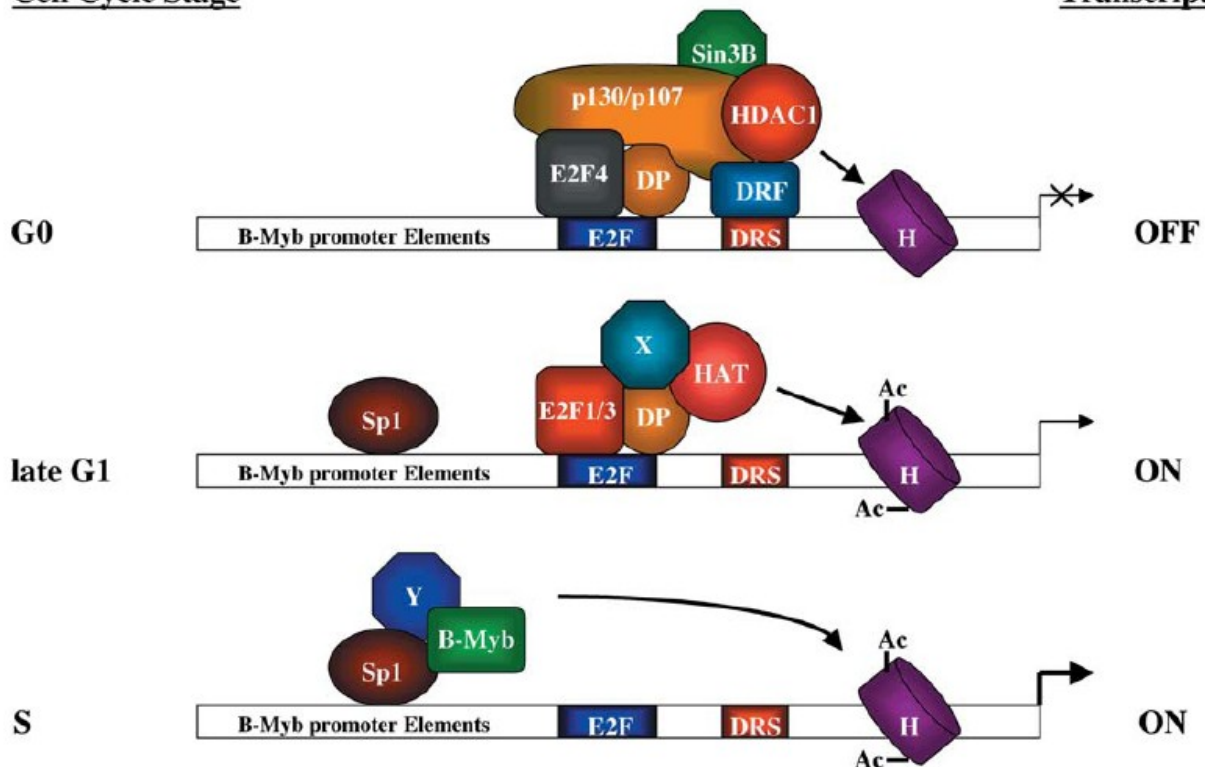
L'attività trascrizionale di MYBL2 risulta notevolmente aumentata nella fase S del ciclo, attraverso modificazioni delle cicline A/CDK2.

MYBL2 è sotto stretta regolazione lungo il ciclo cellulare. Nelle cellule quiescenti e nella fase G0, il promotore di MYBL2 è fortemente represso da un complesso proteico costituito dal sito di legame ad E2F e dal sito di repressione (Downstream repression site, DRS). Fra le proteine coinvolte nella repressione di MYBL2, ci sono E2F4 ed il suo partner DP, le proteine del retinoblastoma p107 e p130, l'istone deacetilasi HDAC1 ed il repressore mSinB3. In questa fase del ciclo, gli istoni sono soprattutto deacetilati. Nel passaggio dalla fase media di G1 a quella avanzata, il complesso repressore viene

rimosso e sostituito da altre proteine, mentre, sempre in questa fase, viene individuato il complesso E2F1/3-DP.

E' inoltre presente l'istone acetilasi (HATs), che potrebbe essere responsabile dell'acetilazione dell'istone. Poiché HATs non è direttamente legato al DNA, potrebbe interagire tramite E2F1/3-DP o attraverso il fattore addizionale X, che deve essere ancora completamente caratterizzato.

Nella fase S del ciclo cellulare, la trascrizione di MYBL2 è fortemente attivata ed il promotore ed il gene raggiungono la loro massima attività. In questa fase, i siti di E2F e DRS sono vuoti e si ha la completa acetilazione dell'istone. La trascrizione potrebbe anche essere guidata dall'attività sinergica di Sp1 e MYBL2, e potrebbe essere possibile il coinvolgimento di proteine sconosciute facenti da ponte tra Sp1 e MYBL2 (fig.6).



**Fig.6** Regolazione del gene MYBL2 durante il ciclo cellulare

Il gene MYBL2 può controllare il ciclo cellulare a due livelli:

1) Trascrizionale, attraverso l'azione di E2F e della famiglia di proteine Rb; questo meccanismo assicura la trascrizione di MYBL2 solo nelle cellule in proliferazione e dirige la sintesi massima delle proteine di MYBL2 nel tardo G1/S del ciclo cellulare.

2) Post-trascrizionale, attraverso l'azione di specifiche chinasi nella fase avanzata G1/S, in particolare delle cicline A/CDK2. Questo meccanismo assicura che l'attività trascrizionale di MYBL2 nel ciclo cellulare ne risulti aumentata specialmente nel tardo G1/S (87).

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

## ***2.4 MYBL2 e cancro***

Benché il ruolo diretto di MYBL2 nell'evoluzione del cancro non sia sempre univoco, ci sono numerose evidenze sperimentali che inducono a considerarlo un fattore di promozione.

L'analisi citogenetica ha rivelato che MYBL2 è amplificato nei tumori della mammella, del fegato, nei carcinomi ovarici e nei linfomi T cutanei (88-91).

Anche in assenza di amplificazione del gene, l'espressione di MYBL2 risulta aumentata nei tumori maligni dei testicoli e della prostata e nelle metastasi localizzate nella prostata. Anche il neuroblastoma avanzato è stato collegato all'aumentata espressione di MYBL2 (92,93).

## SEZIONE SPERIMENTALE

### *3.Scopo della ricerca*

È stato recentemente scoperto che la trascrizione dei geni del ciclo cellulare è regolata da un complesso nucleare chiamato LINC. Questo complesso passa da una forma trascrizionalmente inattiva, nelle fasi G0/G1 del ciclo cellulare, con le proteine p130 o p107 ed E2F4, ad una forma trascrizionalmente attiva, nelle fasi S/G2, contenente MYBL2.

Alcuni studi, eseguiti su cellule indifferenziate del carcinoma embrionale, hanno dimostrato che la soppressione dell'espressione del componente LINC "LIN9" determina arresto della mitosi, e che LIN9 forma complessi con MYBL2. LIN9 e MYBL2 sono entrambi necessari per la trascrizione dei geni delle fasi G2/M, come Ciclina B1 e Survivina.

Scopo di questo studio è stato quello di conoscere il ruolo svolto da MYBL2 in associazione a LIN9 nel complesso LINC, nella progressione dell'epatocarcinoma umano. Inoltre sono state esaminate le interazioni tra lo stato di p53 e l'attività di MYBL2 nel corso dell'epatocancerogenesi umana, visto che recenti osservazioni hanno

dimostrato una correlazione tra livelli elevati di MYBL2 e la presenza di uno stato di p53 mutato nel tumore mammario.

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

---

## ***4. Materiali e metodi***

### ***4.1 Campioni :***

#### ***a) tessuto umano***

Sono stati utilizzati sei fegati normali, 40 carcinomi epatici asportati chirurgicamente, con p53 wildtype, e 14 con p53 mutato, e i corrispondenti tessuti epatici circostanti non tumorali. I carcinomi epatici con p53 wildtype sono stati divisi in due gruppi in base alla durata di sopravvivenza del paziente: carcinomi epatici con prognosi peggiore (HCCP; n=20), e carcinomi epatici con prognosi migliore (HCCB; n=20), rispettivamente caratterizzati da una più breve (< 3 anni) o una più lunga (> 3 anni) sopravvivenza in seguito a resezione epatica parziale (94).

#### ***b) linee cellulari***

Linee cellulari di carcinoma epatico umano Huh6 e HepG2, con il gene p53 wildtype, e Huh7 e Hep3B, con il gene p53 mutato, sono coltivate in monostrato in terreno Eagle di Dulbecco modificato (DMEM) completato con il 10% di siero bovino fetale. Si sono piastrate  $2.0 \times 10^3$  cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti. Dopo 12 ore, le cellule sono state private del siero per 24 ore e trattate con siRNA contro MYBL2, LIN9, p53, o p21 (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA). Per indurre danni al DNA, le cellule sono state trattate per due ore con doxorubicina 2 $\mu$ mol/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), lavate due volte con phosphate-buffered saline (PBS), e addizionate del normale terreno di crescita per i periodi di tempo indicati. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte per ciascuna linea cellulare.

#### ***4.2 Indice di proliferazione e indice apoptotico***

L'indice di proliferazione, nell'epatocarcinoma umano, è stato determinato contando le cellule positive a Ki67 dopo reazione con l'anticorpo monoclonale anti-ki67 di topo (clone MIB-1; Dako Deutschland, Hamburg, Germany). Le immagini apoptotiche sono state colorate *in situ* con l'Apo Tag peroxidase apoptosis kit (Millipore, Billerica, MA). Si sono contati almeno 5000 epatociti per ogni parametro. La densità microvasale (Microvessel density, MVD) è stata valutata in vetrini di epatocarcinoma immunocolorati con l'anticorpo monoclonale anti-CD34 di topo (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La MVD è stata espressa come la percentuale degli spots totali colorati con CD-34 per l'area della sezione (0.94 mm<sup>2</sup>).

L'attivazione di MYBL2 nei vetrini del tessuto epatico è stata valutata



tramite tecnica immunohistochimica, usando l'anticorpo monoclonale anti-fosfo-MYBL2 di coniglio (Thr487; Abcam, Cambridge, MA) ed è stata espressa come la percentuale dei nuclei positivi a fosfo-MYBL2 su 5000 epatociti. La sopravvivenza cellulare, l'apoptosi ed il danno al DNA di colture cellulari di epatocarcinoma, sono state determinate tramite WST-1 Cell Proliferation Reagent, Cell Death Detection Elisa Plus kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), and Damage Quantification Kit (Biovision, Mountain View, CA).

#### ***4.3 Analisi Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)***

Per mettere in evidenza le alterazioni genomiche negli epatocarcinomi umani, sono stati usati ventidue primers. Nel carcinoma epatico si sono osservate differenze rispetto ai corrispondenti fegati non tumorali, come il cambiamento di intensità, l'assenza di una banda, oppure la comparsa di una nuova banda. La frequenza di profili RAPD alterati è stata calcolata per ogni lesione epatica (95).

#### ***4.4 Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (QRT-PCR)***

I primers per i geni umani MYBL2 e RNR-18 sono stati scelti con l'assistenza del "Assay-on-Demand Products" (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Le reazioni di PCR sono state eseguite con 75 ng di cDNA usando il sistema ABI Prism 7000 e TaqMan 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.

#### ***4.5 Immunoblot e Immunoprecipitazione***

Campioni di tessuto con lesioni epatiche umane sono stati omogenizzati in tampone di lisi (Tris HCl 30 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, NP-40 1%, Na deossicolato 0.5%, SDS 0.1%, Glicerolo 10%, EDTA 2 mM) contenente inibitori di proteasi. Gli omogenati e gli estratti nucleari sono stati centrifugati, e i sopranatanti sono stati purificati con gamma-binding sepharose seguita da centrifugazione e trattamento con immunoglobulina G (IgG) di controllo. Le

concentrazioni delle proteine sono state determinate usando come standard l'albumina sierica bovina (BSA). Le membrane sono state trattate con specifici anticorpi primari (Tabella 1). A ciascun trattamento con anticorpo primario è seguita una incubazione, della durata di 1 ora, con anticorpo secondario ricavato dalla perossidasi di rafano diluito 1:5000; dopodichè le membrane sono state rivelate con il Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate Kit (Pierce Chemical, New York, NY).

La densità delle bande di ciascuna proteina è stata quantizzata con ImageQuANT 5.1 software (GE Healthcare, Piscataway, NJ), e normalizzata sui livelli di  $\beta$ -actina (Chemicon International, Temecula, CA; diluizione 1:20000) di ogni campione.

**Tabella 1:** Lista di anticorpi primari utilizzati per l'analisi immunoblot e immunoprecipitazione.

<b>Proteina</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Epitopo</b>
MYBL2	Rabbit polyclonal	Amino acids 586-700 <sup>†</sup>
MYBL2	Rabbit polyclonal	COOH terminus <sup>†</sup>
MYBL2	Mouse monoclonal	Internal region <sup>†</sup>
p-MYBL2	Rabbit polyclonal	Threonine 487*
E2F1	Mouse monoclonal	Full length <sup>†</sup>
DP1	Rabbit polyclonal	NH2 terminus <sup>†</sup>
pRb	Rabbit polyclonal	COOH terminus <sup>†</sup>
p-pRb	Rabbit polyclonal	Serine 608 <sup>#</sup>
Ciclina B1	Mouse monoclonal	Full length <sup>†</sup>
p130	Rabbit polyclonal	COOH terminus <sup>†</sup>
E2F4	Mouse monoclonal	Full length <sup>†</sup>
LIN9	Mouse monoclonal	Full length <sup>†</sup>
Ubiquitin	Mouse monoclonal	Full length <sup>†</sup>
SKP2	Mouse monoclonal	Full length <sup>†</sup>
p53	Rabbit polyclonal	Full length <sup>†</sup>
p21	Rabbit polyclonal	COOH terminus <sup>†</sup>
β-ACTINA	Rabbit polyclonal	COOH terminus <sup>†</sup>

<sup>†</sup>Fornito dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

\*Fornito dalla Abcam (Cambridge, MA).

<sup>#</sup>Fornito dalla Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA).

#### ***4.6 Analisi Statistica***

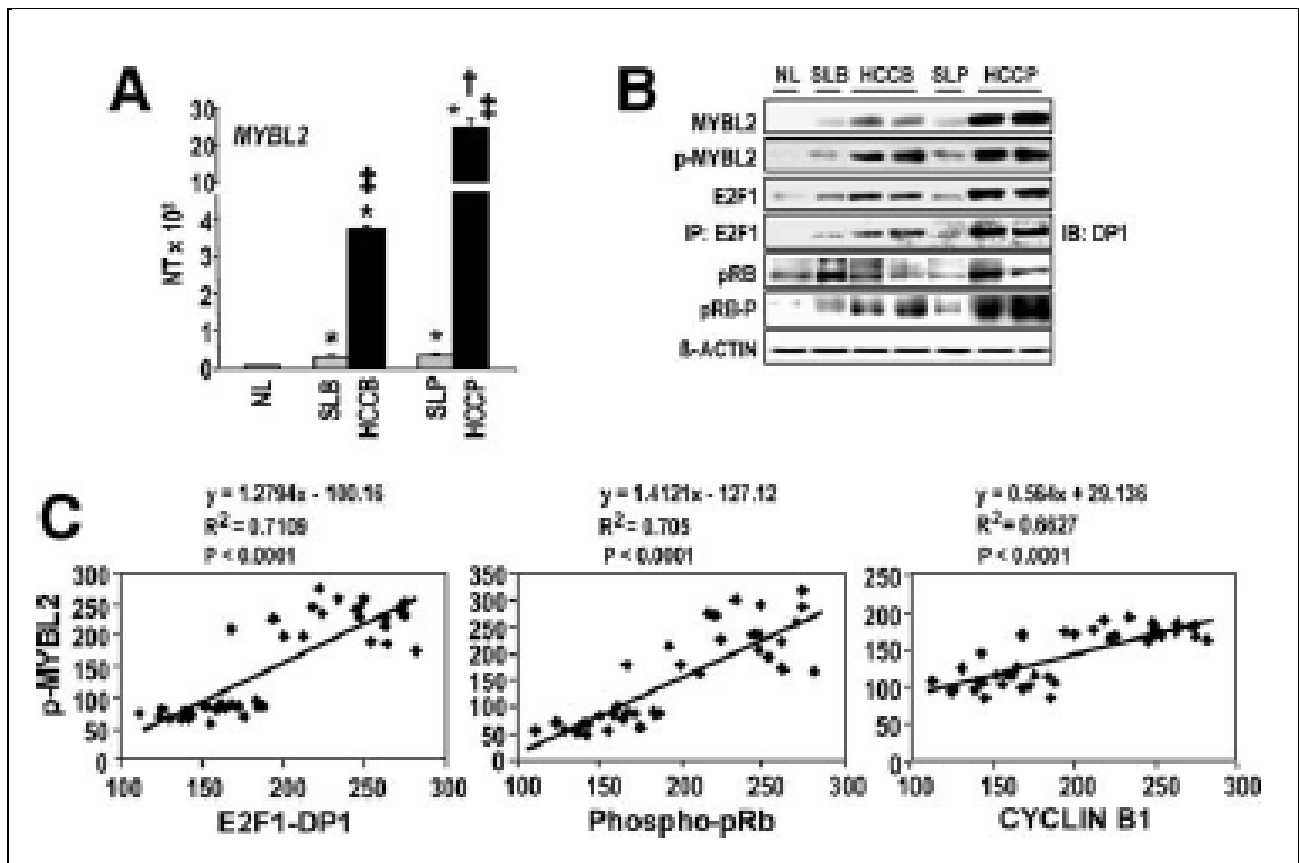
I dati sono stati riportati come medie  $\pm$  deviazione standard (SD). I tests t-Student e Tuckey-Kramer sono stati utilizzati per valutare la significatività statistica delle differenze nell'espressione genica, nel grado di sopravvivenza cellulare, e nell'apoptosi. Il presupposto che i dati sono presi da una popolazione che segue la distribuzione Gaussiana, è stato testato utilizzando i metodi di Kolmogorov, Smirnov, D'Agostino e Pearson. La valutazione statistica della positività nucleare per Ki67 e p-MYBL2 è stata fatta tramite il test Mann-Whitney *U*. L'analisi di regressione multipla di Pearson è stata eseguita per calcolare il coefficiente di correlazione (R), ed il metodo di regressione Cox proportional hazards è stato usato per valutare la predittività della sopravvivenza dei pazienti. Valori di  $P < 0.05$  sono stati ritenuti statisticamente significativi.

## ***5. Risultati***

### ***5.1 MYBL2, sviluppo e progressione dell'epatocarcinoma umano***

Nei tessuti epatici circostanti, indipendentemente dal sottotipo di carcinoma epatocellulare (CE) e, in maggior misura, nel CE è stato rilevato un aumento dei livelli di mRNA (messenger RNA) di MYBL2 rispetto ai fegati normali (fig.7A). Il CE con peggior prognosi (HCCP, HCC with poorer outcome), con un grado di sopravvivenza inferiore a 3 anni, ha mostrato livelli di mRNA 5 volte maggiori del CE con miglior prognosi (HCCB, HCC with better outcome), che invece è caratterizzato da un grado di sopravvivenza superiore a 3 anni. Pertanto, i livelli della proteina MYBL2 totale e fosforilata (forma attiva), sono significativamente più alti nei tessuti epatici circostanti non neoplastici rispetto ai fegati normali (fig.7B). Nei tumori epatici è stata osservata una ulteriore iper-regolazione di MYBL2, con livelli più elevati nel CE a peggior prognosi (fig.7B). Poiché MYBL2 è un bersaglio del fattore di trascrizione E2F1 (96), negli stessi campioni sono stati valutati i livelli di E2F1 e delle molecole che interagiscono con esso. Un comportamento analogo a quello di MYBL2, è stato osservato nei livelli di E2F1 totale e attivo

(legato al fattore di trascrizione DP1) e nei livelli della proteina del retinoblastoma (pRB, retinoblastoma protein) iperfosforilata/inattiva, ma non per la pRB attiva/ipofosforilata. In conclusione, MYBL2 attivo (p-MYBL2) è correlato in maniera significativa con i livelli di E2F1-DP1 e fosfo-pRB, e con la Ciclina B1, bersaglio di MYBL2 (97) (fig.1C).



**Fig.7 Espressione di MYBL2 e dei geni ad esso correlati nelle lesioni neoplastiche epatiche umane**

I tumori epatici sono stati divisi in due categorie distinte, basandosi sulla durata della sopravvivenza del paziente dopo resezione epatica parziale: carcinoma epatocellulare (CE) con miglior prognosi (sopravvivenza > 3 anni in seguito a parziale resezione epatica, HCCB); e CE con peggior prognosi (sopravvivenza < 3 anni, HCCP).

(A) I livelli di mRNA di MYBL2 sono stati determinati attraverso la “quantitative reverse transcription-PCR”.  $N \text{ target} (NT) = 2^{-\Delta CT}$ ;  $\Delta CT = CT \text{ gene target} - CT \text{ RNR18}$ . I dati si riferiscono alla media  $\pm$  (SD) di N target di sei fegati normali (NL), 14 HCCB e HCCP ed i corrispondenti tessuti epatici circostanti (SL) con miglior (SLB) o peggior prognosi (SLP).

(A) e (C), test di Tuckey-Kramer: (\*)sottotipi di carcinomi epatocellulari e rispettivi tessuti epatici circostanti contro NL,  $P < 0.001$ ; (‡) sottotipi di carcinomi epatocellulari contro i corrispondenti tessuti epatici circostanti,  $P < 0.0001$ . (†)Diverso da HCCB per  $P < 0.0001$ .

(B) Analisi western blot di MYBL2, p-MYBL2, e geni correlati a MYBL2, nel carcinoma epatocellulare umano. Il tessuto epatico lisato, è stato sottoposto a western blotting con specifici anticorpi. Il complesso E2F1-DP1 è stato determinato mediante immunoprecipitazione (IP) con l’anticorpo anti-E2F1 e trattando le membrane con l’anticorpo anti-DP1 (immunoblot, IB).

(C) Interazioni tra i livelli di p-MYBL2 ed il complesso E2F1-DP1, la pRB fosforilata, e la Ciclina B1 nell’epatocarcinoma umano.

Stella Balzani

L’attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all’epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari



Successivamente, sono stati studiati i livelli del complesso LIN (LIN Complex, LINC), che è attivo quando si lega a MYBL2 nella fase S/G<sub>2</sub> del ciclo cellulare (97-100), che coinvolge l'attivazione della Ciclina B1. Un aumento progressivo dei complessi nucleari MYBL2-Ciclina B1 (un segno della Ciclina B1 attivata) e una graduale diminuzione dei complessi p130-Ciclina B1 e E2F4-Ciclina B1 (segni della Ciclina B1 inattivata) sono stati osservati nel tessuto epatico non tumorale circostante al CE, in particolare nel CE a peggior prognosi (fig.8A). Inoltre, i livelli di attivazione di LINC, come dimostrato dai complessi nucleari LIN9-MYBL2, sono risultati più alti nel CE a peggior prognosi. I livelli di LIN9-p130 (un segno di inattivazione di LINC) sono stati invece più bassi nel CE a peggior prognosi, mentre non si sono verificate differenze nei livelli totali di LIN9 (fig.8A). Poiché i livelli di MYBL2 potrebbero essere modulati negativamente dalla degradazione di SKP2 (S-phase Kinase-associated protein 1-dependent) (101), è stato determinato se la compromissione del legame tra MYBL2 e SKP2 potesse influenzare i livelli di proteina MYBL2 nel CE. Il risultato è stato un progressivo aumento dei complessi MYBL2-SKP2 e dei livelli di MYBL2 ubiquitinato nei tessuti epatici non tumorali che circondano il CE (fig.8B,C), raggiungendo i più alti livelli nel CE a peggior prognosi; questo

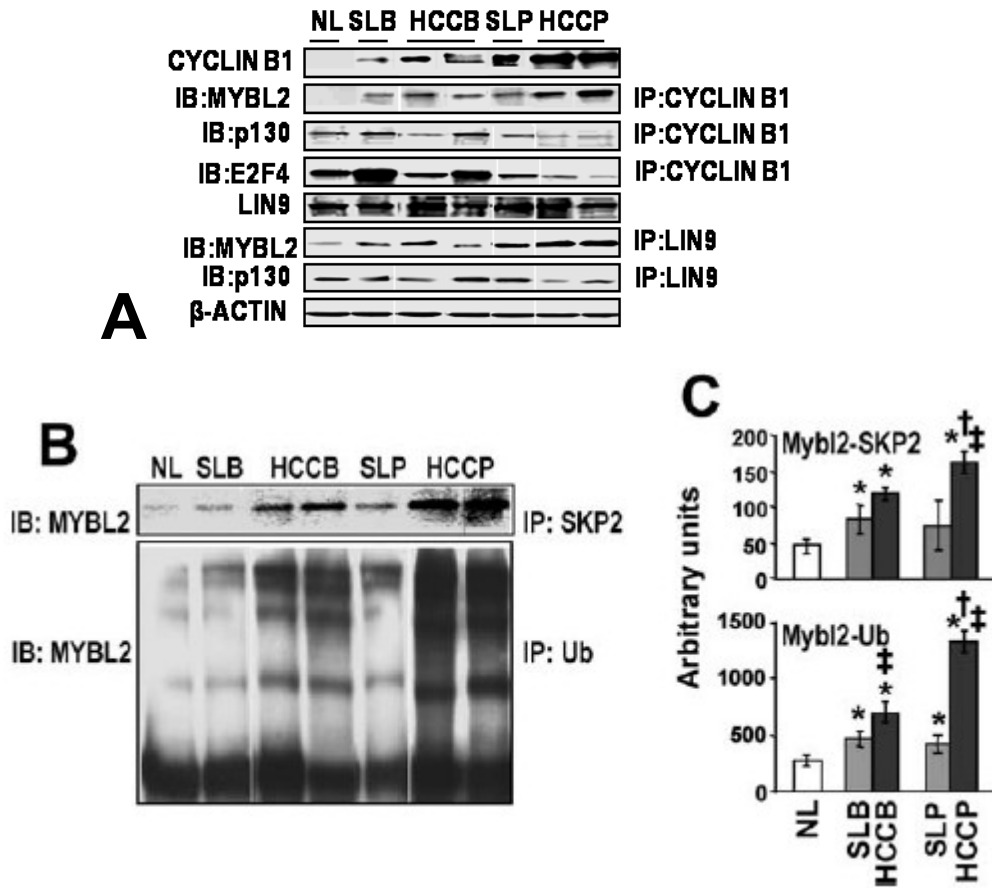
Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

dimostra che una iper-regolazione di MYBL2 non dipende da un'alterazione della sua degradazione nel CE umano.



**Fig. 8 (A)** Analisi western blot della Ciclina B1 e dei suoi complessi con MYBL2, p130, e E2F4; di LIN9 e dei suoi complessi con MYBL2 e p130, nel carcinoma epatocellulare (CE) umano. I tumori epatici sono stati divisi in due categorie distinte basate sulla durata della sopravvivenza del paziente dopo resezione epatica parziale: CE con miglior prognosi (sopravvivenza > 3 anni in seguito a parziale resezione epatica, HCCB); CE con peggior prognosi (sopravvivenza < 3 anni, HCCP). I tessuti epatici lisati sono stati sottoposti a western blotting con specifici anticorpi. I complessi con la Ciclina B1 e quelli con LIN9 sono stati determinati attraverso immunoprecipitazione (IP) di proteine nucleari estratte, rispettivamente, con gli anticorpi anti-Ciclina B1 e anti-LIN9, e trattando le membrane con gli anticorpi anti-MYBL2, anti-p130, o anti-E2F4 (immunoblot; IB). **(B)** Analisi di immunoprecipitazione dei complessi MYBL2/SKP2 e di MYBL2 ubiquitinato nel CE umano. **(C)** Analisi di chemiluminescenza dei complessi MYBL2/SKP2 e di MYBL2 ubiquitinato. Media  $\pm$  SD di sei fegati normali (NL), 20 carcinomi epatocellulari con miglior prognosi (HCCB), e 20 carcinomi epatocellulari con peggior prognosi (HCCP), ed i corrispondenti tessuti epatici circostanti (SL). Test di Tuckey-Kramer: (\*)sottotipi di carcinomi epatocellulari e rispettivi tessuti epatici circostanti contro NL,  $P < 0.001$ ; (‡) sottotipi di carcinomi epatocellulari contro i corrispondenti tessuti epatici circostanti,  $P < 0.05$ . (†)Diverso da HCCB per  $P < 0.0001$ .

Stella Balzani

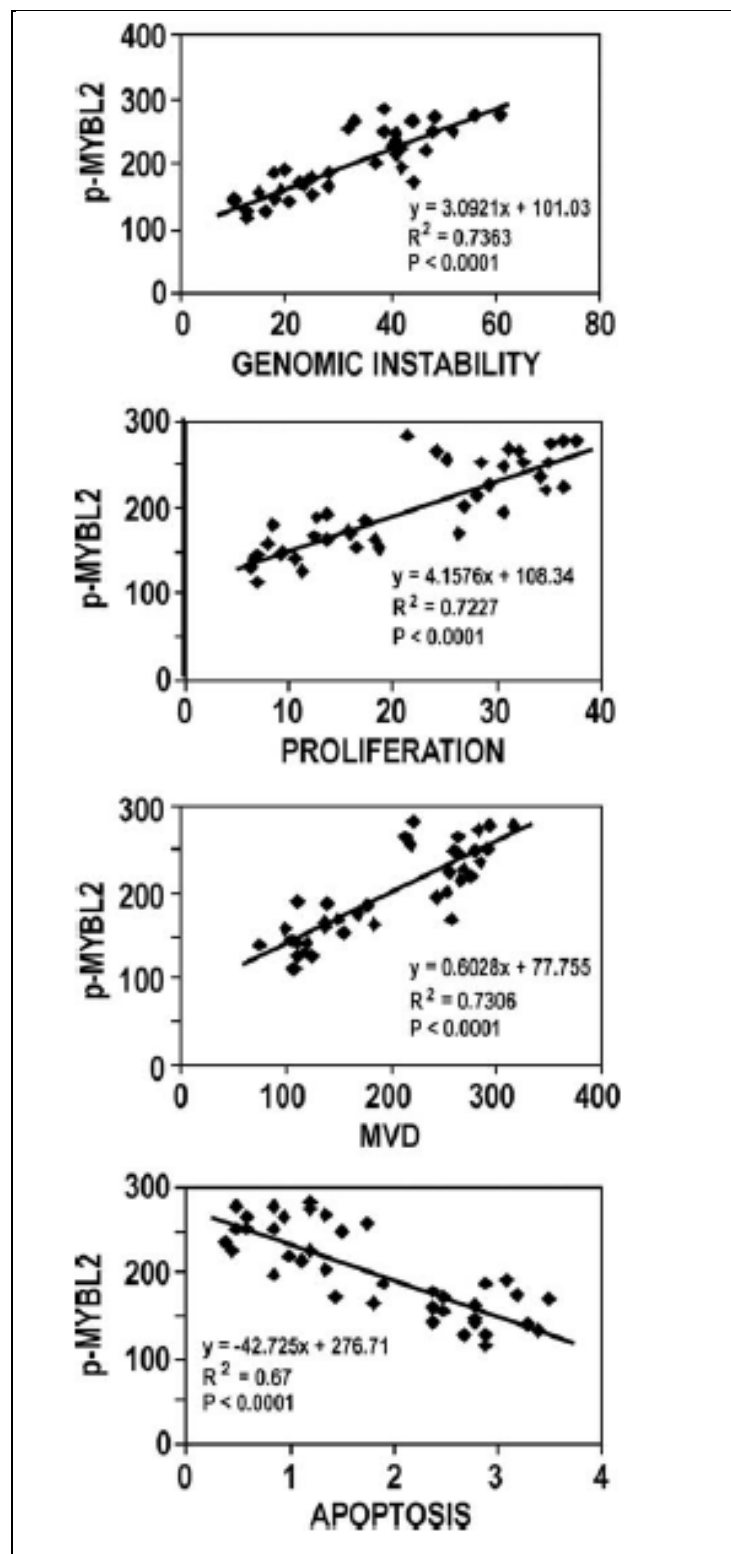
L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

## ***5.2 Correlazione dell'attivazione di MYBL2 con parametri clinico-patologici nell'epatocarcinoma umano***

A causa del differente comportamento dell'espressione di MYBL2 nei carcinomi epatocellulari con diverso grado di sopravvivenza, è stata valutata la relazione tra l'attivazione di MYBL2 e le caratteristiche clinico-patologiche di questi tumori, allo scopo di esaminare il ruolo prognostico di MYBL2 nel CE umano. L'instabilità genomica è stata determinata mediante l'analisi RAPD, l'indice di proliferazione, ed i valori di densità microvasale correlati con l'attivazione/fosforilazione di MYBL2 (fig.9). Questo studio ha mostrato una correlazione inversa tra l'attivazione di MYBL2 e l'apoptosi (fig.9).



**Fig.9** Interazioni tra livelli di p-MYBL2 e instabilità genomica, indice di proliferazione, MVD e indice apoptotico, nei CE umani

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

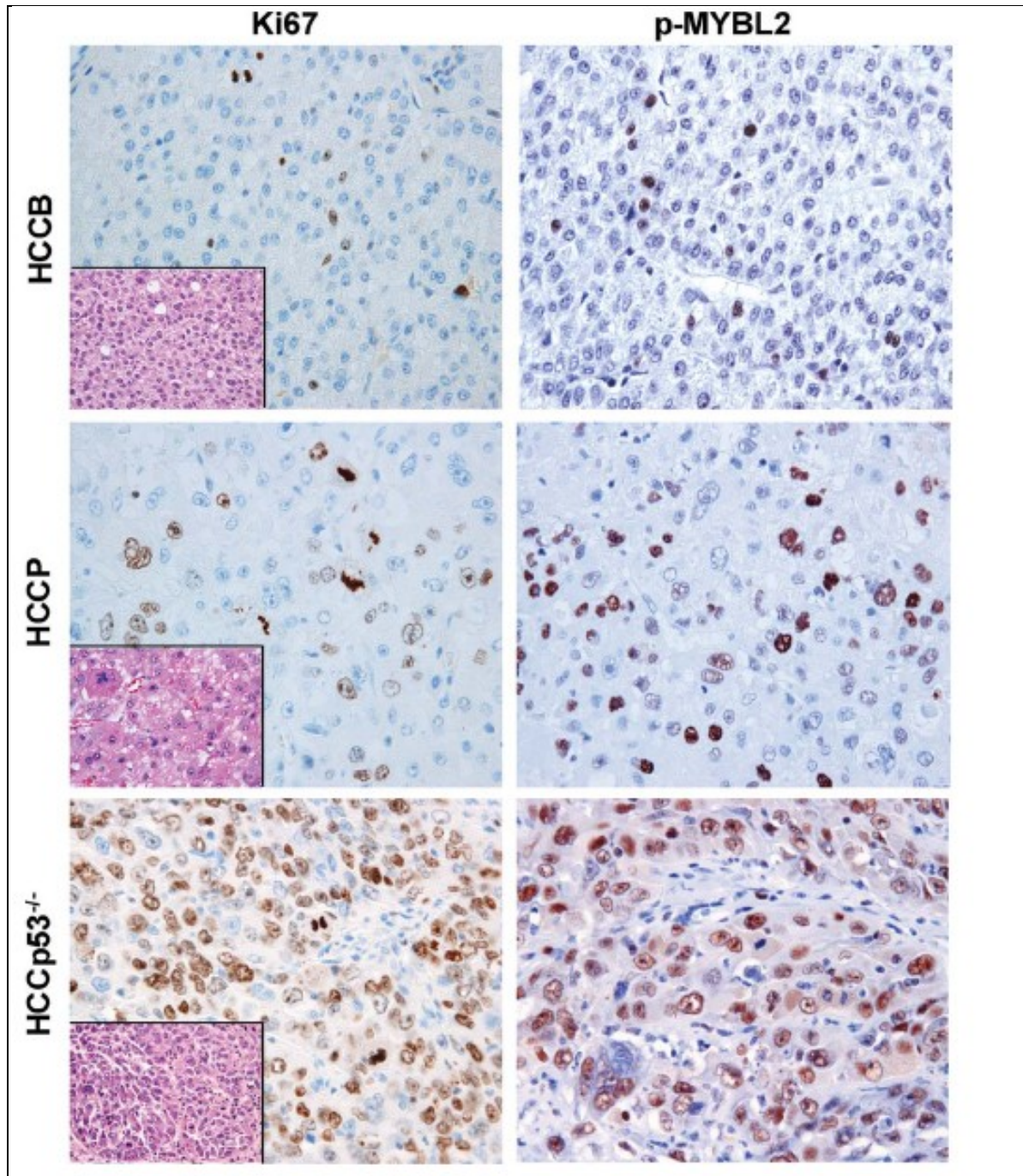
La determinazione della predittività della sopravvivenza dei pazienti in base ai livelli di p-MYBL2, ha mostrato un rapporto di stima del rischio di 1.03 (intervallo di confidenza del 95% [CI]: 1.01-1.06;  $P=0.013$ ,  $n=40$ ), indicando una bassa ma significativa influenza dei livelli di espressione di p-MYBL2 sul rapporto di sopravvivenza. È stata scoperta una correlazione non significativa tra l'attivazione di MYBL2 e altri parametri clinico-patologici, includendo l'eziologia, il sesso, l'età, la presenza di cirrosi, l' $\alpha$ -fetoproteina, la dimensione del tumore, e la qualità.

### ***5.3 Attivazione di MYBL2 e LINC nei tumori epatici con p53 mutato***

Poiché nel tumore mammario è stato recentemente dimostrato che elevati livelli di MYBL2 sono positivamente correlati con uno stato di p53 mutato (98), abbiamo studiato se questo avviene anche nell'epatocarcinoma. L'analisi immunohistochimica di Ki67 e di p-MYBL2 ha mostrato che MYBL2 aumenta nel nucleo, contemporaneamente a Ki67, nei sottotipi di CE ed in tutto il tessuto epatico circostante (fig.10), rispetto al fegato normale. Non ci sono differenze tra tessuti epatici che circondano diversi sottotipi di CE, mentre le percentuali di p-MYBL2 e di nuclei positivi a Ki67 sono



significativamente più alti nel CE che nel tessuto epatico circostante, e aumentano progressivamente dai CE a miglior prognosi ai CE a peggior prognosi e CE con p53<sup>-/-</sup>.



**Fig.10** Modelli immunoistochimici di Ki67 e MYBL2 fosforilato (pMYBL2) nei sottotipi di epatocarcinoma con p53 wildtype, con miglior (HCCB) e peggior prognosi (HCCP), e di epatocarcinoma con p53 mutato (HCC p53<sup>-/-</sup>)

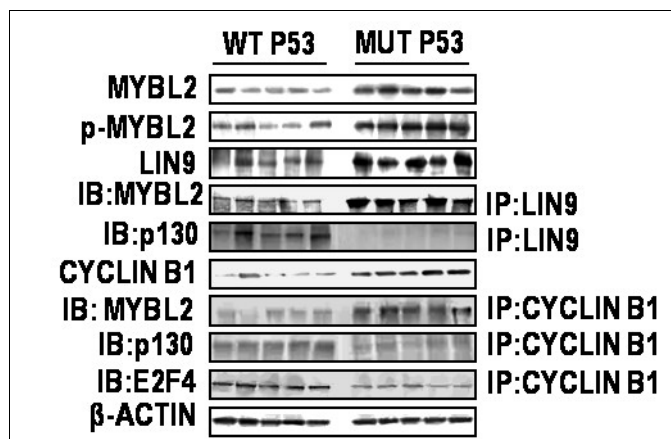
Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

Successivamente, sono stati comparati i livelli di MYBL2 e di LINC tra CE con il gene p53 wildtype (n=40) o mutato (n=14) tramite immunoblotting o immunoprecipitazione. Dieci di 14 CE con p53 mutato (71.4%) si sono comportati come il gruppo di pazienti con CE con peggior prognosi. Sorprendentemente, l'intera serie di marcatori di MYBL2 e attivazione di LINC (livelli totali e attivati di MYBL2, Cyclina B1, complessi LIN9-MYBL2, e MYBL2-Cyclina B1) sono stati significativamente più alti in CE con il gene p53 mutato (fig.11). D'altro canto, i marcatori dell'inattivazione di LINC (complessi LIN9-p130, p130-Cyclina B1, e E2F4-Cyclina B1) sono risultati significativamente più alti in CE con il gene p53 wildtype (fig.11). Queste osservazioni indicano che una più intensa iperegolazione dell'espressione di MYBL2 e LINC è caratteristica dei CE con p53 mutato.



**Fig.11** Analisi western blot di MYBL2, p-MYBL2, LIN9 ed i suoi complessi con MYBL2 e p130, Ciclina B1 ed i suoi complessi con MYBL2, p130, e E2F4, nei CE umani con il gene p53 wildtype (WT) o p53 mutato (MUT)

I tessuti epatici lisati sono stati sottoposti a western blotting con specifici anticorpi. I complessi con la Ciclina B1 e quelli con LIN9 sono stati determinati attraverso immunoprecipitazione (IP) di proteine nucleari estratte, rispettivamente, con gli anticorpi anti-Ciclina B1 e anti-LIN9, e trattando le membrane con gli anticorpi anti-MYBL2, anti-p130, o anti-E2F4 (immunoblot; IB).

#### ***5.4 La soppressione del complesso MYBL2/LINC aumenta la sensibilità delle cellule di CE umano con p53 mutato alla Doxorubicina***

É stato studiato il ruolo di MYBL2 e di LINC in linee cellulari di CE umano valutando le conseguenze dell'inattivazione di MYBL2 e LIN9 mediante siRNA. Per questo scopo, sono state selezionate quattro linee cellulari di CE che esprimono i geni MYBL2 e LIN9: Huh6 e HepG2 con p53 wildtype, Huh7 e Hep3B con p53 mutato. In condizioni basali, i livelli più elevati dell'espressione di MYBL2 si sono rilevati nelle cellule HepG2 e Hep3B, mentre non sono state

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

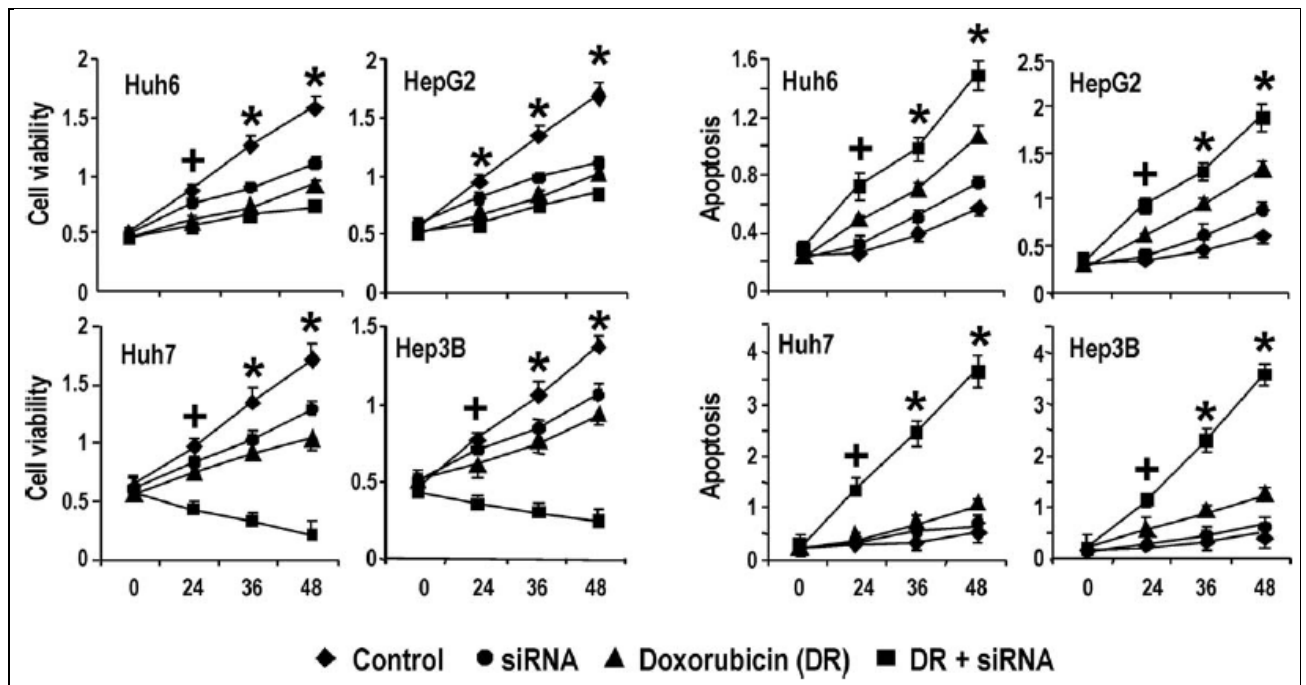
Università degli Studi di Sassari



trovate differenze significative nei livelli di LIN9 tra le quattro linee cellulari. Tuttavia i livelli di MYBL2 attivato/fosforilato e l'attivazione di LINC (come mostrato dai complessi MYBL2-LIN9) sono più elevati nelle cellule Huh7 e Hep3B e, di conseguenza, l'inattivazione di LINC (come mostrato dai complessi LIN9-p130) è stata più elevata nelle cellule HepG2 e Huh6. Uno specifico siRNA ha mostrato la stessa efficienza nell'inibizione di MYBL2 e LIN9 nelle quattro linee cellulari indipendentemente dallo stato di p53. La soppressione di MYBL2 non ha avuto effetto sui livelli di LIN9, mentre il silenziamento di LIN9 ha portato ad una diminuzione dell'espressione di MYBL2 nelle cellule Huh6 (p53 wildtype) e Huh7 (p53 mutato). Risultati analoghi sono stati ottenuti con siRNA-MYBL2 e LIN9 in cellule HepG2 (p53 wildtype) e Hep3B (p53 mutato).

La soppressione di MYBL2 ha ridotto la proliferazione, indotto l'apoptosi (fig.12), e aumentato il danno al DNA a livelli simili nelle quattro linee cellulari. Tuttavia, quando il silenziamento di MYBL2 è stato associato al trattamento con doxorubicina, un agente che danneggia il DNA, si sono osservate una intensa diminuzione della crescita, una elevata apoptosi (fig.12), ed un massivo danno al DNA, solo nelle linee cellulari con p53 mutato. Un effetto simile e sinergico,

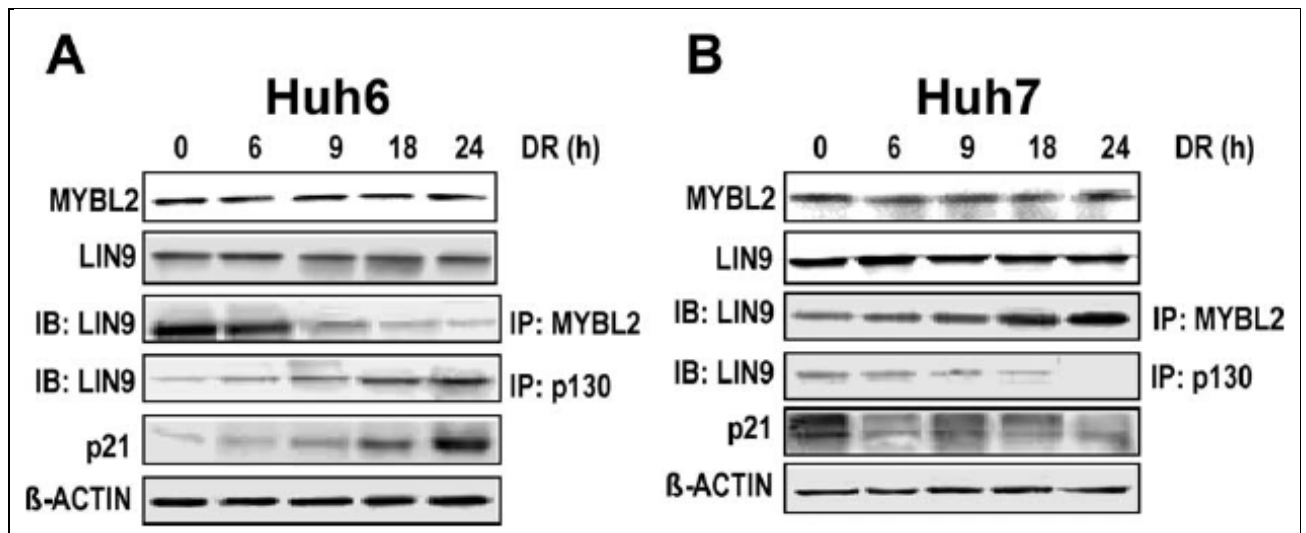
che riduce per lo più la crescita delle linee cellulari di CE con p53 mutato, si è ottenuto quando il trattamento con doxorubicina è stato accoppiato al silenziamento del gene LIN9.



**Fig.12** Effetto della modulazione dell'espressione di MYBL2 sulla sopravvivenza cellulare e sull'apoptosi delle linee cellulari del CE umano Huh6 e HepG2, con p53 wildtype, e Huh7 e Hep3B, con p53 mutato

Le cellule sono state trasfettate con 500ng di siRNA di MYBL2 o LIN9 o scramble oligonucleotidico (SC), e raccolte 24, 36, e 48 ore dopo la trasfezione. I dati sono espressi come media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti condotti in triplo. Test di Tuckey-Kramer: \*siRNA, doxorubicina, e siRNA piú doxorubicina contro controllo (SC),  $P < 0.01$ ; +doxorubicina e siRNA piú doxorubicina contro controllo,  $P < 0.05$ . Doxorubicina contro siRNA piú doxorubicina,  $P < 0.001$  alle 24, 36, e 48 ore.

A livello molecolare, il trattamento con doxorubicina, non ha pregiudicato i livelli di MYBL2 e LIN9 in ciascuna linea cellulare, indipendentemente dallo stato di p53 (fig.13). La doxorubicina ha indotto il legame tra p130 e LIN9 e una graduale dissociazione di MYBL2 da LIN9 nelle cellule con p53 wildtype, Huh6 (fig.13) e HepG2. Tuttavia, il legame MYBL2-LIN9 non è stato ridotto, ma paradossalmente aumentato, dalla somministrazione di doxorubicina in cellule con p53 mutato, Huh7 (fig.13) e Hep3B. In particolare, la dissociazione di MYBL2 da LIN9, indotta dal trattamento con doxorubicina, procede in parallelo alla iper-regolazione del bersaglio p53 e di p21<sup>WAF1</sup>, nelle linee cellulari con p53 wildtype, ma non in quelle con p53 mutato (fig.13); questo indica che il trattamento con doxorubicina induce un programma di riparazione del DNA attraverso il sistema p53/p21<sup>WAF1</sup> in linee cellulari con p53 wildtype.



**Fig.13 Livelli del complesso LINC in linee cellulari di epatoma umano, con p53 wildtype (A) o mutato (B), in seguito al trattamento con doxorubicina che induce danno al DNA**

Analisi western blot di MYBL2, LIN9 ed i suoi complessi con le proteine MYBL2 o p130, e di p21, dopo trattamento con doxorubicina in cellule Huh6 (p53 wildtype: A), e cellule Huh7 (p53 mutato: B). Risultati equivalenti sono stati ottenuti in cellule HepG2 ed Hep3B. Le cellule di CE sono state trattate con 2 $\mu$ mol/L di doxorubicina (DR) per 2 ore. A 6, 9, 18, e 24 ore dopo trattamento, gli estratti nucleari sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione (IP) rispettivamente con anticorpi anti-MYBL2 e p130, e le membrane sono state trattate con l'anticorpo anti-LIN9 (immunoblot, IB), oppure sono state sottoposte a western blotting con l'anticorpo anti-p21.

Per verificare direttamente se la cascata di p53/p21<sup>WAF1</sup> fosse necessaria per la risposta al danno del DNA e per l'associazione di p130 con LIN9 nelle linee cellulari con p53 wildtype, le cellule HepG2 e Huh6, trattate con doxorubicina, sono state sottoposte a silenziamento con p21<sup>WAF1</sup> e p53 (fig.14).

La soppressione dei geni p53 e p21<sup>WAF1</sup> ha abolito la risposta al danno del DNA nelle due linee cellulari (come indicato dall'aumentato danno al DNA) ed ha aumentato l'apoptosi, portando ad una notevole

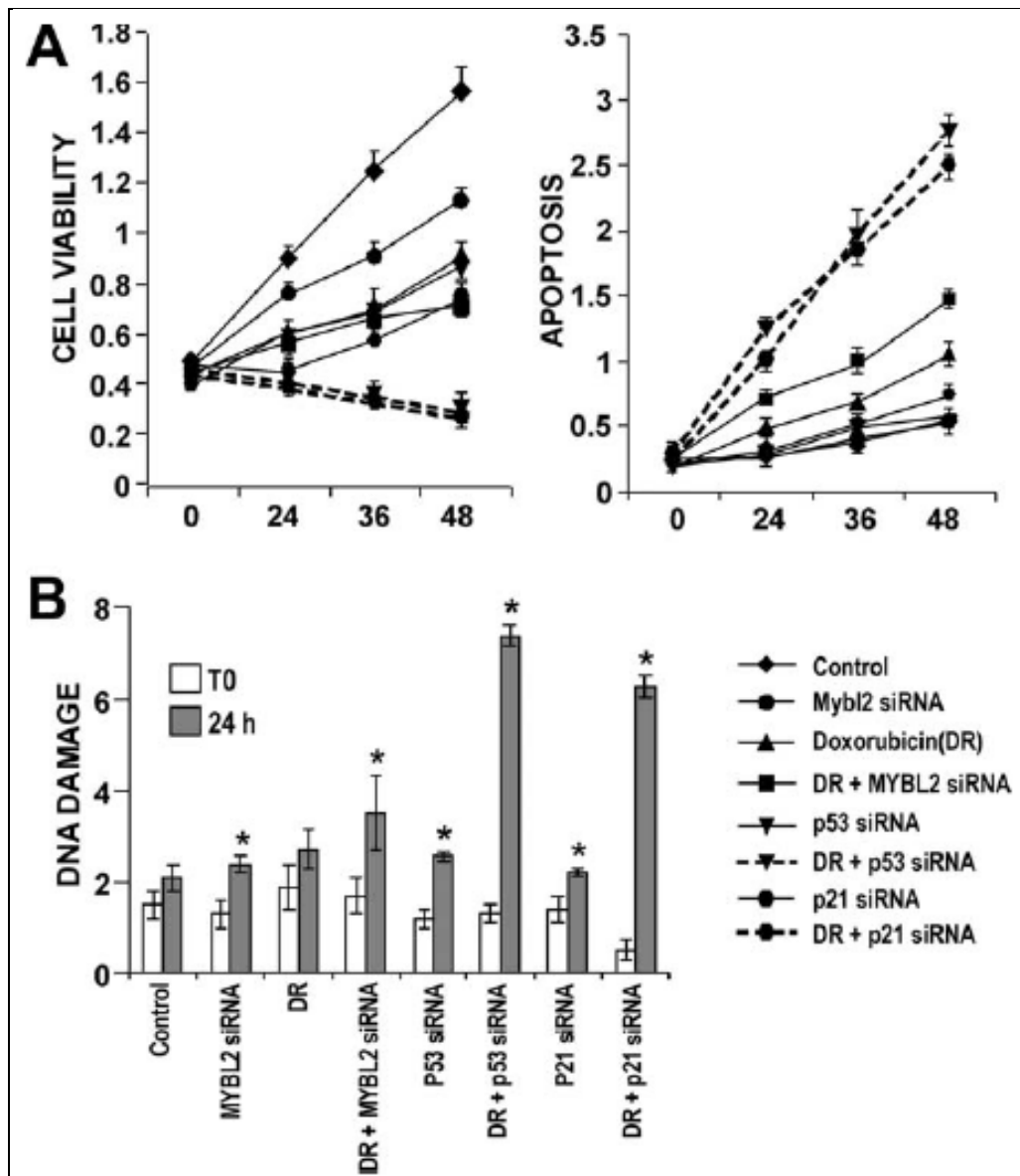
Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

riduzione della crescita (fig.14). Complessivamente, questi risultati suggeriscono che l'integrità del complesso MYBL2-LIN9 è richiesta per la sopravvivenza delle cellule di CE con p53 mutato, in presenza di danno al DNA. L'impossibilità di andare incontro a morte programmata, nelle cellule con p53 mutato, favorirebbe la selezione di cellule capaci di crescere anche con danno genomico e di conseguenza la progressione verso una maggiore malignità.



**Fig.14** Effetto della soppressione dei geni p21<sup>WAF1</sup> e p53 su sopravvivenza, apoptosi (A), e danno al DNA (B), nelle linee cellulari HepG2 e Huh6 di CE umano, trattate con doxorubicina

Le cellule HepG2 sono state trattate per 2 ore con 2 $\mu$ mol/L di doxorubicina (DR), e trasfettate con 500 ng di siRNA silenziante p21, p53, o scramble oligonucleotidico (SC). Il danno al DNA è espresso come numero assoluto di siti apurinici (AP) per 10<sup>5</sup> paia di basi. I dati sono espressi come media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti, condotti in triplo. Risultati equivalenti sono stati ottenuti in cellule Huh6. Test di Tuckey-Kramer: sopravvivenza cellulare, siRNA silenziante MYBL2, p53 e p21, e DR contro controllo (SC), P<0.001 alle 24-48 ore. SiRNA silenziante MYBL2, p53 e p21 contro DR+siRNA silenziante MYBL2, DR+siRNA silenziante p53, e DR+siRNA silenziante p21, P<0.001 alle 24-48 ore. Apoptosi, siRNA silenziante MYBL2 contro controllo, P<0.001 alle 36 e 48 ore. DR contro controllo, P<0.001 alle 24-36 ore. SiRNA silenziante MYBL2, p53 e p21 contro DR+siRNA silenziante MYBL2, DR+siRNA silenziante p53, e DR+siRNA silenziante p21, P<0.001 alle 24-48 ore. Danno al DNA, \*24 ore contro T0, P<0.001.

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocarcinogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

## ***6. Discussione***

Tutti i dati presentati indicano che MYBL2 gioca un ruolo critico nell'epatocancerogenesi umana. Infatti, nei campioni di fegato umano, MYBL2 progressivamente indotto procedendo dal tessuto epatico non tumorale circostante al CE, presenta un aumento maggiore nel CE più aggressivo e con peggior prognosi. Inoltre, in accordo con la recente osservazione, un'iper-regolazione forzata di MYBL2 nelle linee cellulari di CE umano, porta ad un aumento della transizione di G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M (102). Nell'epatocarcinoma sono state scoperte correlazioni significative dei livelli di p-MYBL2 con il suo bersaglio Ciclina B1 (97), coinvolto nella fase G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare, e con E2F1 attivo e pRB iperfosforilato/inattivo, coinvolti nella transizione G<sub>1</sub>/S. Queste scoperte suggeriscono un chiaro contributo di MYBL2 alla crescita e alla progressione del CE. Una funzione cruciale di MYBL2 nel tumore epatico è anche supportata dall'osservazione che i livelli di p-MYBL2 nel CE sono direttamente correlati con l'instabilità genomica, l'indice di proliferazione, e la densità microvasale, e inversamente correlati con l'indice apoptotico. Queste scoperte prevedono la possibilità che p-MYBL2 possa essere un marcatore prognostico per il CE.

L'attività funzionale di MYBL2 è mediata dal suo complesso con LIN9 (LINC). Si è osservato che LINC risulta essere importante nella regolazione della trascrizione dei geni G<sub>2</sub>/M (99-101,103,104), ed essere coinvolto nell'arresto del ciclo cellulare prodotto dal danno al DNA (105-106). Il danno al DNA è associato al passaggio di LIN9 da un complesso attivo con MYBL2 ad un complesso repressivo con p130, p107, o E2F4 (104), questo contribuisce alla repressione della trascrizione dei geni G<sub>2</sub>/M. In accordo con i nostri risultati, i livelli di MYBL2 totale e attivato/fosforilato, di Ciclina B1, dei complessi LIN9-MYBL2, e MYBL2-Ciclina B1, sono significativamente più alti nei CE con il gene p53 mutato, mentre nei CE con il gene p53 wildtype si verifica l'inattivazione di LINC. Questa osservazione indica l'esistenza di una iper-regolazione maggiore di MYBL2 e di LINC in CE con p53 mutato. In accordo con i nostri risultati, si è osservato che MYBL2 non riesce a dissociarsi da LINC nelle cellule di tumore mammario con p53 mutato (98). La presenza di p53 mutato induce solo un lieve aumento della proliferazione nel CE rispetto alla crescita rapida osservata nel CE a peggior prognosi con p53 wildtype. Di conseguenza, in condizioni basali, il complesso MYBL2-LIN9 (attivazione di LINC) è solo lievemente più elevato, ed il complesso LIN9-p130 (inattivazione di LINC) leggermente minore, nelle cellule



Huh7 e Hep3B (con p53 mutato), rispetto alle cellule HepG2 e Huh6 (con p53 wildtype). D'altro canto, il silenziamento di MYBL2 e LIN9 mediante trattamento con specifici siRNA, ha avuto più o meno lo stesso effetto inibitorio sul grado di sopravvivenza, e un effetto maggiore sull'apoptosi nelle cellule di CE, indipendentemente dallo stato di p53. Questo indica che elevati livelli di MYBL2, Ciclina B1, dei complessi LIN9-MYBL2 e MYBL2-Ciclina B1, caratteristici del CE a peggior prognosi con p53 wildtype, consentono una massima attivazione della transizione G<sub>2</sub>/M e del livello di proliferazione. Uno dei maggiori ruoli di p53 è la preservazione della stabilità genetica attraverso la prevenzione della mutazione genomica. Una volta attivato, in risposta allo stress cellulare o al danno del DNA, p53 prova ad impedire un ulteriore danno inducendo l'arresto del ciclo cellulare per consentire la riparazione del DNA o l'apoptosi (13,106). Nelle cellule con p53 wildtype, l'inibizione di G<sub>1</sub> chinasi tramite p21<sup>WAF1</sup>, porta ad un accumulo di p130 defosforilato, una condizione necessaria per la formazione del complesso LIN9-p130. Il controllo del ciclo cellulare mediante p21<sup>WAF1</sup> non può avvenire in cellule con p53 mutato e, conseguentemente, il complesso LIN9-p130 non si può formare in risposta al danno del DNA di queste cellule. Quest'ultimo invece mostra livelli più elevati di MYBL2-LIN9 (fig.11). Le cellule

con mutazioni del gene p53 non si possono arrestare nella fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare. In conseguenza della necessità di p53 e p21<sup>WAF1</sup> per sostenere l'arresto di G<sub>2</sub>, dopo danno al DNA (98,107), le cellule p53<sup>-/-</sup> possono entrare in mitosi. In effetti, quando è stato indotto danno al DNA tramite doxorubicina, il silenziamento di MYBL2 o LIN9 ha portato ad una più elevata inibizione della proliferazione e stimolazione dell'apoptosi in linee cellulari con p53 mutato rispetto a linee cellulari con p53 wildtype (fig.12). Inoltre, l'osservazione che il trattamento con doxorubicina induce il legame di LIN9 a p130 (portando alla dissociazione del complesso MYBL2-LIN9) e una iperregolazione del bersaglio di p53, p21<sup>WAF1</sup>, solamente in linee cellulari con p53 wildtype, suggerisce che il trattamento con doxorubicina induce un programma di riparazione del DNA attraverso il sistema p53/p21<sup>WAF1</sup> in linee cellulari con p53 wildtype. D'altro canto, questi dati indicano che, in presenza di danno al DNA, l'integrità del complesso MYBL2-LIN9 è richiesta per la sopravvivenza delle cellule di CE con p53 mutato. In accordo con questa ipotesi, l'inibizione dell'espressione dei geni p53 o p21<sup>WAF1</sup> ha aumentato il danno al DNA e l'apoptosi, portando ad una notevole crescita controllata, in linee cellulari con p53 wildtype (fig.14). Complessivamente, queste scoperte indicano che MYBL2 promuove la sopravvivenza di cellule

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

di CE con p53 mutato quando trattate con un agente danneggiante il DNA. In cellule con p53 mutato, l'iper-regolazione di MYBL2 potrebbe consentire la ripresa del ciclo cellulare e la proliferazione delle cellule con DNA danneggiato, contribuendo così all'instabilità genomica e alla progressione del CE. Una serie di studi recenti ha mostrato che il gene p53 possiede un ruolo maggiore nell'epatocancerogenesi (94,108,109). p53 è "all'incrocio" della via dei segnali di risposta allo stress cellulare (108,109). La mutazione di p53 è stata osservata nel 23%-26% dei CE umani correlati alle infezioni da virus dell'epatite B o dell'epatite C (110,111), mentre si verifica una elevata quantità di mutazioni puntiformi di p53, come evento iniziale, nei CE correlati con l'esposizione all'aflatossina B1 (109). Inoltre, p53 è il gene più frequentemente mutato nel tumore umano, con un grado di mutazione al di sopra del 50%. Pertanto, le nostre scoperte sottolineano l'importanza dell'analisi dello stato di p53 per approcci terapeutici volti ad inibire l'espressione o la funzione di MYBL2 nel cancro, non limitatamente ai tumori epatici.

## ***7. Conclusioni***

Le nostre scoperte dimostrano l'importante ruolo di MYBL2 nello sviluppo e nella progressione del CE umano, e la possibilità che MYBL2 agisca come un marcatore prognostico putativo per il CE. Un duplice ruolo è svolto da MYBL2, sul danno al DNA, in cellule di CE con un p53 wildtype o un p53 mutato. Nelle cellule di CE con p53 wildtype, MYBL2 induce un programma di riparazione del DNA attraverso il sistema p53/p21<sup>WAF1</sup>. Invece, in cellule di CE con p53 mutato, è necessaria l'integrità del complesso MYBL2-LIN9, per la sopravvivenza cellulare in presenza di danno al DNA, e l'inibizione di MYBL2 e/o LIN9 porta alla morte cellulare. I nostri risultati sottolineano l'importanza di valutare lo stato di p53 per approcci terapeutici combinati in cui, l'inibizione dell'espressione o della funzione di MYBL2, in cellule con p53 mutato, potrebbe rappresentare un valido adiuvante.

## ***Bibliografia***

1. ***El-Serag HB, Rudolph L.*** Hepatocellular carcinoma. Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576.
2. ***Bosh FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R.*** Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16.
3. ***Calvisi DF, Pascale RM, Feo F.*** Dissection of signal trasduction pathways as a tool for the development of targeted therapies of hepatocellular carcinoma. *Rev Recent Clin Trials* 2007; 2: 217-236.
4. ***Llovet JM, Bruix J.*** Molecular targeted therapies of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-1327.
5. ***Thorgeirsson SS, Grisham JW.*** Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genet.* 2002; 31: 339-346.
6. ***Badvie S.*** Hepatocellular carcinoma. *Postgrad.Med.J.* 2000; 76: 4-11.
7. ***El-Serag HB, Tran T, Everhart JE.*** Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-468.
8. ***Farrell GC, Larter CZ.*** Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112.

9. **Adams LA, Angulo P.** Recent concept in nonalcoholic fatty liver disease. *Diabet.Med.* 2005; 22: 1129-1133.
10. **Sherman M.** Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. *Seminar Liver Dis.* 2005; 25: 143-154.
11. **Farazi PA, De Pinho R.** Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat.Rew.Cancer* 2006; 6: 674-687.
12. **Okuda K.** Hepatocellular carcinoma. *J.Hepatol.* 2000; 32: 225-237.
13. **Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR.** Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol* 2007; 13: 2271-2282.
14. **Minouchi K, Kaneko S & Kobayashi K.** Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. *J. Hepatol.* 2002; 37: 231-239.
15. **Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M & Cerrutti P.** Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 1994; 264: 1317-1319.
16. **Ishizaki Y, et al.** Immunohistochemical analysis and mutational analyses of  $\beta$ -catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.* 2004; 24: 1077-1083.

17. **Edamoto Y, et al.** Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int. J. Cancer* 2003; 106: 334-341.
18. **Peng SY, et al.** High  $\alpha$ -fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and  $\beta$ -catenin mutations. *Int. J. Cancer* (2004); 112: 44-50.
19. **An FQ, et al.** Tumor heterogeneity in small hepatocellular carcinoma: analysis of tumor cell proliferation, expression and mutation of p53 and  $\beta$ -catenin. *Int. J. Cancer* (2001); 93: 468-474.
20. **Gregorieff A & Clevers H.** Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 2005; 19: 877-890.
21. **Ito Y, et al.** Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 2001; 84: 1377-1383.
22. **Daveau M et al.** Hepatocyte growth factor, transforming growth factor- $\alpha$ , and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.* 2003; 36: 130-141.
23. **Wang R, Ferrel LD, Faouzi S, Maher JJ & Bishop JM.** Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains

- hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 2001; 153: 1023-1034.
24. **Kanai Y, Ushijima S, Tsuda H, Sakamoto M & Hirohashi S.** Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett.* 2000; 148: 73-80.
25. **Kanai Y et al.** DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1999; 29: 703-709.
26. **Kanai Y et al.** Aberrant DNA methylation on chromosome 16 is an early event in hepatocarcinogenesis. *Jpn J. Cancer Res.* 1996; 87: 1210-1217.
27. **Yu J et al.** Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *Cell Res.* 2003; 13: 319-333.
28. **Feitelson MA et al.** Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604.
29. **Wong IH et al.** Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 1999; 59: 71-73.



30. **Matsuda Y, Ichida T, Matsuzawa J, Sugimura K & Asakura H.** p16(INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1999; 116: 394-400.
31. **Liew CT et al.** High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 789-795.
32. **Murata H et al.** Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Lab. Invest.* 2004; 84: 1050-1059.
33. **Kubo T et al.** Apoptotic speck protein-like, a highly homologous protein to apoptotic speck protein in the pyrin domain, is silenced by DNA methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 5172-5177.
34. **Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY & Ng IO.** Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 7646-7651.
35. **Maeta Y, Shiota G, Okano J & Murawaki Y.** Effect of promoter methylation of the p16 gene on phosphorylation of retinoblastoma gene product and growth of hepatocellular carcinoma cells. *Tumour Biol.* 2005; 26: 300-305.

36. **McGlynn KA, London WT.** Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Prac Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19(1): 3-23.
37. **Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM and Thorgeirsson SS.** Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130(4): 1117-1128.
38. **Bromberg J, Darnell JE Jr.** The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19: 2468-2473.
39. **Browmann T, Garcia R, Turkson J, Jove R.** STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-2488.
40. **Toscani A, Mettus RV, Coupland R , et al.** Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature* 1997; 386: 713-717.
41. **Trauth K, Mutschler B, Jenkins NA, et al.** Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13: 5994-6005.
42. **Shin DH, Lee HV, Jeon GS, et al.** Constitutive expression of c-myb mRNA in the adult rat brain. *Brain Res* 2001; 892: 203-207.

43. **Zorbas M, Sicurella C, Bertoncello I, et al.** c-Myb is critical for murine colon development. *Oncogene* 1999; 18: 5821-5830.
44. **Sala A.** B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *European Journal of Cancer* 2005; 41: 2479-2485.
45. **Sitzmann J, Noben-Trauth K, Kamano H, et al.** Expression of B-Myb during mouse embryogenesis. *Oncogene* 1996; 12: 1889-1894.
46. **Tanaka Y, Pateston NP, Maekawa T, et al.** B-Myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J Biol Chem* 1999; 274: 28067-28070.
47. **Sala A, Watson R.** B-Myb protein in cellular proliferation, transcription control, and cancer: latest developments. *J Cell Physiol* 1999; 179: 245-250.
48. **Mucenski ML, McLain K, Kier AB, et al.** A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 1991; 65: 677-689.
49. **Davidson CJ, Tirouvanziam R, Herzenberg LA, et al.** Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements drosophila Myb in hemocytes. *Genetics* 2005; 169: 215-229.

50. **Okada M, Akimaru H, Hou DX, et al.** Myb controls G2/M progression by inducing cyclin B expression in the *Drosophila* eye imaginal disc. *EMBO J* 2002; 21: 675-684.
51. **Fung SM, Ramsay G, Katzen AL.** Mutations in *Drosophila* myb lead to centrosome amplification and genomic instability. *Development* 2002; 129: 347-359.
52. **Lewis PW, Beall EL, Fleischer TC, et al.** Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes Dev* 2004; 18: 2929-2940.
53. **Korenjak M, Taylor-Harding B, Binne UK, et al.** Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 2004; 119: 181-193.
54. **Graf T.** Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1992; 2: 249-255.
55. **Nomura N, Takahashi M, Matsui M, Ishii S, Date T, Sasamoto S, et al.** Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 11075-11089.

56. **Biedenkapp H, Borgmeyer U, Sippel AE and Klempnauer KH.** Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding. *Nature* 1988; 335: 835-837.
57. **Howe KM and Watson RJ.** Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res.*:1991; 19: 3913-3919.
58. **Weston K and Bishop JM.** Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell* 1989; 58: 85-93.
59. **Sakura H, Kanei-Ishii C, Nagase T, Nakagoshi H, Gonda TJ and Ishii S.** Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 1989; 86: 5758-5762.
60. **Nakagoshi T, Takemoto Y and Ishii S.** Functional domains of the human B-myb gene product. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 14161-14167.
61. **Ansieau S, Kowenz-Leutz E, Dechend R, and Leutz A.** B-Myb, a repressed trans-activating protein. *J. Mol. Med.* 1997; 75: 815-819.
62. **Golay J, Loffarelli L, Luppi M, Castellano M and Introna M.** The human A-myb protein is a strong activator of transcription. *Oncogene* 1994; 9: 2469-2479.

63. **Dubendorff JW, Whittaker LJ, Eltman JT and Lipsick JS.** Carboxy-terminal elements of c-Myb negatively regulate transcriptional activation in cis and in trans. *Genes Dev.* 1992; 6: 2524-2535.
64. **Lane S, Farlie P and Watson R.** B-Myb function can be markedly enhanced by cyclin A-dependent kinase and protein truncation. *Oncogene* 1997; 14: 2445-2453.
65. **Ziebold U, Bartsch O, Marais R, Ferrari S and Klempnauer KH.** Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr. Biol.* 1997; 7: 253-260.
66. **Facchinetti V, Loffarelli L, Schreek S, Oelgeschlager M, Luscher B, Introna M, et al.** Regulatory domains of the A-Myb transcription factor and its interaction with the CPB/p300 adaptor molecules. *Biochem. J.* 1997; 324: 729-736.
67. **Takahashi T, Nakagoshi H, Sarai A, Nomura N, Yamamoto T and Ishii S.** Human A-myb gene encodes a transcriptional activator containing the negative regulatory domains. *FEBS Lett.* 1995; 358: 89-96.
68. **Westin EH, Gallo RC, Arya SK, Souza LM, Baluda M, Aaronson SA et al.** Differential expression of the amv gene in human

- hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 2194-2198.
69. **Golay J, Capucci A, Arsura M, Castellano M, Rizzo V and Introna M.** Expression of c-Myb and B-Myb, but not A-MYB, correlates with proliferation in human hematopoietic cells. *Blood* 1991; 77: 149-158.
70. **Reiss K, Travali S, Calabretta B and Baserga R.** Growth regulated expression of B-Myb in fibroblasts and hematopoietic cells. *J. Cell. Sci.* 1991; 148: 338-343.
71. **Lam EWF, Robinson C and Watson RJ.** Characterization and cell-cycle regulated expression of mouse B-Myb. *Oncogene* 1992; 7: 1885-1890.
72. **Kamano H, Burk B, Noben-Trauth K and Klempnauer KH.** Differential splicing of the mouse B-Myb gene. *Oncogene* 1995; 11: 2719-2725.
73. **Arsura M, Introna M, Passerini F, Montovani A, and Golay J.** B-Myb antisense oligonucleotides inhibit proliferation of human hematopoietic cell lines. *Blood* 1992; 79: 2708-2716.
74. **Sala A and Calabretta B.** Regulation of BALB/c3T3 fibroblast proliferation by B-Myb is accompanied by selective activation of

- cdc2 and cyclin D1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 10415-10419.
75. **Lin D, Fiscella M, O'Connor PM, Joany J, Chen M, Luo LL et al.** Constitutive expression of B-myb can by-pass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 10079-10083.
76. **Raschellà G, Negroni A, Sala A, Pucci S, Romeo A and Calabretta B.** Requirement of B-Myb function for survival and differentiative potential of human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 8540-8545.
77. **Bies J, Hoffmann B, Amanullah A, Giese T and Wolff L.** B-Myb prevents growth arrest associated with terminal differentiation of monocytic cells. *Oncogene* 1996; 12: 355-363.
78. **Lam EW, Bennett JD, Watson RJ.** Cell-cycle regulation of human B-Myb transcription. *Gene* 1995; 160: 277-281.
79. **Oh IH, Reddy EP.** The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 1999; 18: 3017-3033.
80. **Li X, McDonnell DP.** The transcription factor B-Myb is maintained in an inhibited state in target cells through its interaction with the nuclear corepressors N-CoR and SMRT. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3663-3673.



81. **Robinson C, Light Y, Groves R, et al.** Cell-cycle regulation of B-Myb protein expression: specific phosphorylation during the S phase of the cell cycle. *Oncogene* 1996; 12:1855-1864.
82. **Sala A, Kundu M, Casella I, et al.** Activation of human B-MYB by cyclins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 532-536.
83. **Ziebold U, Bartsch O, Marais R, et al.** Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr Biol* 1997; 7: 253-260.
84. **Johnson TK, Schweppe RE, Septer J, et al.** Phosphorylation of B-Myb regulates its transactivation potential and DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 36741-36749.
85. **Zhu W, Giangrande PH, Nevins JR.** E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J* 2004; 23: 4615-4626.
86. **Santilli G, Schwab R, Watson R, et al.** Temperature-dependent modification and activation of B-MYB: implications for cell survival. *J Biol Chem* 2005; 280: 15628-15634.
87. **Joaquin M, Watson RJ.** Cell cycle regulation by the B-MYB transcription factor. *CMLS* 2003; 60: 2389-2401.
88. **Zondervann PE, Wink J, Alers JC, et al .** Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non viral hepatocellular

- carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol* 2000; 192: 207-215.
89. **Mao X, Orchard G, Lillington DM, et al.** Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 2003; 101: 1513-1519.
90. **Tanner MM, Grenman S, Koul A, et al.** Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1833-1839.
91. **Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, et al.** Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000; 60: 4519-4525.
92. **Skotheim RI, Monni O, Mousses S, et al.** New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res* 2002; 62:2359-2364.
93. **Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, et al.** Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res* 2002; 62: 6803-6807.
94. **Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al.** Classification and prediction of survival in hepatocellular

- carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004; 40: 667-678.
95. **Luceri C, De Filippo C, Caderni G, Salvadori M, Giannini A, Biggeri A, et al.** Detection of somatic DNA alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1753-1756.
96. **DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR.** Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4215-4224.
97. **Knight AS, Notaridou M, Watson RJ.** A Lin-9 complex is recruited by MYBL2 to activate transcription of G2/M genes in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Oncogene* 2009; 28: 1737-1747.
98. **Mannefeld M, Klassen E, Gaubatz S.** B-MYB is required for recovery from the DNA damage-induced G2 checkpoint in p53 mutant cells. *Cancer Res* 2009; 69: 4073-4080.
99. **Pilkinton M, Sandoval R, Colamonici OR.** Mammalian Mip/LIN-9 interacts with either the p107, p130/E2F4 repressor complex or B-Myb in a cell cycle-phase-dependent context distinct from the *Drosophila* dREAM complex. *Oncogene* 2007; 26: 7535-7543.

100. **Schmit F, Korenjak M, Mannefeld M, Schmitt K, Franke C, von Eyss B, et al.** LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. *Cell Cycle* 2007; 6: 1903-1913.
101. **Charrasse S, Carena I, Brondani V, Klempnauer KH, Ferrari S.** Degradation of B-Myb by ubiquitin-mediated proteolysis: involvement of the Cdc34-SCF(p45Skp2) pathway. *Oncogene* 2000; 19: 2986-2995.
102. **Frau M, Ladu S, Calvisi DF, Simile MM, Bonelli P, Daino L, et al.** MYBL2 expression is under genetic control and contributes to determine a hepatocellular carcinoma susceptible phenotype. *J Hepatol* 2010.
103. **Osterloh L, von Eyss B, Schmit F, Rein L, Hübner D, Samans B, et al.** The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2-M genes and for entry into mitosis. *EMBO J* 2007; 26: 144-157.
104. **Taylor WR, Schonthal AH, Galante J, Stark GR.** p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J Biol Chem* 2001; 276: 1998-2006.

105. **Polager S, Ginsberg D.** E2F mediates sustained G2 arrest and down-regulation of Stathmin and AIM-1 expression in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* 2003; 278: 1443-1449.
106. **Sengupta S, Harris CC.** p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 44-55.
107. **Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, et al.** Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-1501.
108. **Edamoto Y, Hara A, Biernat W, Terracciano L, Cathomas G, Riehle HM, et al.** Alterations of RB1, p53, and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer* 2003; 106: 334-341.
109. **Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC.** p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 177-181.
110. **Guan XY, Sham JS, Tai LS, Fang Y, Li H, Liang Q.** Evidence for another tumor suppressor gene at 17p13.3 distal to TP53 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 45-48.
111. **Yumoto Y, Hanafusa T, Hada H, Morita T, Ooguchi S, Shinji N, et al.** Loss of heterozygosity and analysis of mutation of p53 in

hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 179-185.

Stella Balzani

L'attivazione del complesso MYBL2-LIN9 contribuisce all'epatocancerogenesi umana ed identifica un sottogruppo di epatocarcinomi con p53 mutato

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia Molecolare dei tumori

Università degli Studi di Sassari

---