



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

- SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE -

Direttore: Prof. Eusebio Tolu

Indirizzo: Epidemiologia molecolare dei tumori

Dipartimento di Scienze Biomediche

Sezione di Patologia Sperimentale e Oncologia

(Responsabile: Prof.ssa Rosa Maria Pascale)

**CONTROLLO GENETICO DEI REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE
ATTRAVERSO IL COMPLESSO SKP2/CKS1 UBIQUITINA LIGASI NEL
CANCRO EPATICO DEI RODITORI E SUA ASSOCIAZIONE CON LA
PROGNOSI DELL'EPATOCARCINOMA UMANO**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Maddalena Simile

Correlatore:

Chiar.ma Prof.ssa Rosa Maria Pascale

Tesi di Dottorato:

Dott.ssa Maria Iliaria Demartis

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

SEZIONE COMPILATIVA

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari	pag. 1
2. Ciclo cellulare	14
2.1 Ciclo cellulare ed epatocancerogenesi	17
3. Ubiquitinazione e degradazione proteasomica	20
4. Il complesso SCF	24
5. Il complesso SCF nel CE: ruolo di SKP2 e CKS1	26
6. Modelli di ratto nello studio della cancerogenesi epatica	31

SEZIONE SPERIMENTALE

7. SCOPO DELLA RICERCA	38
8. MATERIALI E METODI	
8.1 Animali e trattamenti	39
8.2 Campioni di tessuto umano	41
8.3 Linee cellulari e trattamenti	43
8.4 Istologia e immunoistochimica	44
8.5 Indici di marcatura, di proliferazione e di apoptosi	45
8.6 Estrazione di DNA, isolamento di RNA e sintesi di cDNA	45
8.7 RT-PCR quantitativa	46
8.9 PCR metilazione specifica (msPCR)	47
8.10 Immunoprecipitazione e Western Blot	48
8.11 Saggio dell'attività cinasica di CDK2	50
8.12 Valutazione della densità microvasale (MVD)	51
8.13 Analisi del locus CDC14B	51
8.14 Analisi statistica	52

Maria Iliaria Demartis

Titolo della tesi: Controllo genetico dei regolatori del ciclo cellulare attraverso il complesso SKP2/CKS1 ubiquitina ligasi nel cancro epatico dei roditori e sua associazione con la prognosi dell'epatocarcinoma umano.
Tesi di dottorato in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università di Sassari

9. RISULTATI	
9.1 Sviluppo delle lesioni epatiche nei ratti	53
9.2 Espressione dei regolatori del ciclo cellulare	54
9.3 Ubiquitinazione dei regolatori del ciclo cellulare	56
9.4 Correlazione tra l'espressione dei regolatori del ciclo cellulare e tasso di crescita dei CE umani	59
9.5 Ipermetilazione del promotore dei regolatori del ciclo cellulare nei CE umani	60
9.6 Ubiquitinazione dei regolatori del ciclo cellulare nel CE	64
9.7 La manipolazione in vitro dell'espressione di SKP2 influenza la proliferazione cellulare e la degradazione degli oncosoppressori del ciclo cellulare	68
9.8 La distruzione del sistema CDK2/CDC14B impedisce la degradazione di SKP2 negli HCCP	72
9.9 L'ubiquitinazione di p27 ^{KIP1} non dipende da WNT10B	78
9.10 Correlazione tra livelli di SKP2 e parametri clinico-patologici del CE umano	80
10. DISCUSSIONE	83
BIBLIOGRAFIA	91

SEZIONE COMPILATIVA

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e meccanismi molecolari

Il carcinoma epatocellulare (CE) è uno dei più diffusi tumori maligni al mondo e rappresenta la terza causa di morte per cancro. La sua incidenza è di oltre 500.000 nuovi casi l'anno (1, 2).

La sua distribuzione mondiale risulta variabile, ed è dovuta a fattori ambientali, fattori alimentari ed, in misura minore, anche a fattori genetici e razziali (3, 4). Le aree ad alta incidenza sono rappresentate dall'Africa Subsahariana, l'Est e il Sud-Est asiatico, dove la sola Cina presenta più del 50% dei casi. Le aree a bassa incidenza comprendono l'Europa Settentrionale e Occidentale, il Nord America e l'Australia. Negli ultimi anni si è rilevato comunque un aumento di casi di CE anche in Europa Occidentale e Stati Uniti, presumibilmente in seguito all'incremento dell'incidenza di epatite cronica da virus C.

I principali fattori di rischio che portano all'insorgenza dell'epatocarcinoma, 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 aflatossina B1 prodotta dal fungo *Aspergillus Flavus* (contaminante alimentare), (5) e assunzione di androgeni ad alte dosi. L'abuso di alcool può, a sua volta, essere un fattore promovente in quanto può condurre alla cirrosi, che può frequentemente evolvere a CE. 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 evolvere a cirrosi ed eventualmente a CE. L'obesità e il diabete possono portare ad una condizione di steatoepatite non alcolica, processo morboso considerato un ulteriore fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma epatocellulare (6).

Considerata la maggiore incidenza riscontrata nella popolazione maschile, anche l'attività ormonale potrebbe essere considerata un fattore di rischio (7).

Da studi epidemiologici 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. Le nuove tecniche di 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 e analizzare lesioni precancerose e piccoli tumori, consentendo l'individuazione di alterazioni molecolari sempre più caratteristiche e precoci. I notevoli progressi nella biologia molecolare del carcinoma epatocellulare hanno definito alcuni eventi implicati nella trasformazione maligna del fegato e reso possibile l'identificazione di varie alterazioni molecolari che possono determinare lo sviluppo e la progressione di questa neoplasia.

L'epatocancerogenesi è un processo multifasico lento, meno definito rispetto ai processi evolutivi di altri tipi di tumore, esso è caratterizzato da modificazioni genetiche ed epigenetiche che inducono gli epatociti a sviluppare un fenotipo maligno. Le principali fasi temporali che intercorrono nell'epatocancerogenesi sperimentale sono tre: (i) fase d'inizio, (ii) fase preneoplastica (preclinica), (iii) fase sintomatica (clinica), caratterizzate ciascuna dalla progressiva comparsa di alterazioni molecolari (Figura 1). Una tale successione temporale è confermata da indagini epidemiologiche anche nel carcinoma epatico umano.

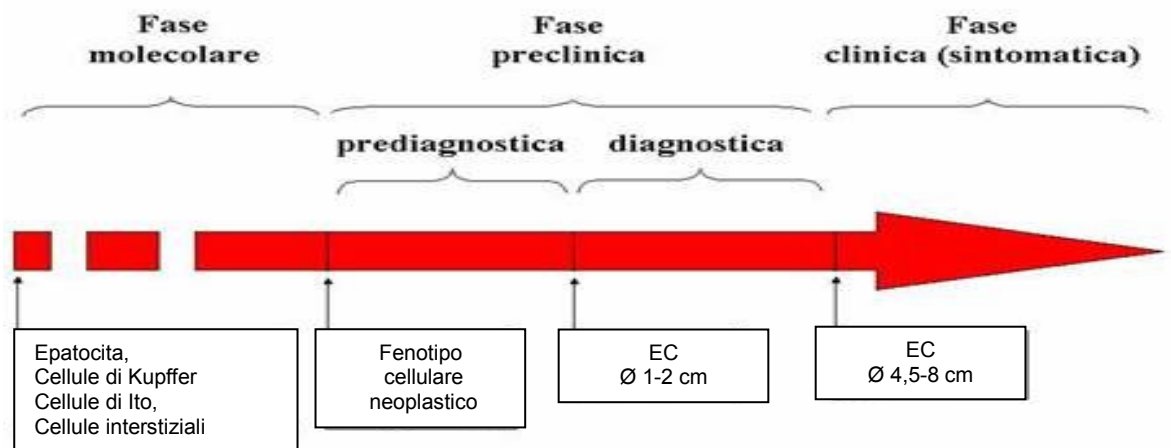


Figura 1: Fasi evolutive del Carcinoma Epatocellulare (EC).

Durante la fase iniziale, i diversi agenti eziologici causano danni al DNA delle cellule epatiche, stimolandone morte e rigenerazione. Il continuo alternarsi di processi distruttivo-rigenerativi potrebbe portare a una crescita cellulare incontrollata e veloce che a sua volta aumenta notevolmente le probabilità di danni a livello genetico e diminuisce l'efficienza della riparazione di eventuali danni al DNA. Questi fenomeni aumentano le possibilità che alcune anomalie non riparate vengano fissate e quindi trasmesse alla progenie cellulare, dando origine a linee di cellule alterate e all'insorgenza di lesioni permanenti che nel tempo possono evolvere in neoplasia. Durante lo stadio preneoplastico, il fegato diventa la sede di epatiti croniche o di cirrosi, o di entrambe, e la proliferazione degli epatociti, ormai modificati, è accelerata dall'elevata induzione delle vie mitogeniche (8, 9). Tali lesioni epatiche, sono caratterizzate dalla formazione di noduli iperplastici con normali caratteristiche istologiche ma circondati da estesi depositi di collagene. Tali lesioni possono andare incontro a reversione fenotipica o evolvere in noduli displastici. Nei noduli displastici, gli epatociti sono caratterizzati da accumulo di lipidi e glicogeno nel citoplasma (cellule chiare), da alterazioni del numero di nuclei per unità d'area e da una marcata e crescente instabilità genomica.

I noduli displastici possono evolvere in epatocarcinoma e acquisire eventualmente la capacità di invadere lo stroma fibroso circostante ed i vasi, estrinsecando il loro elevato potenziale metastatico (Figura 2) (8).

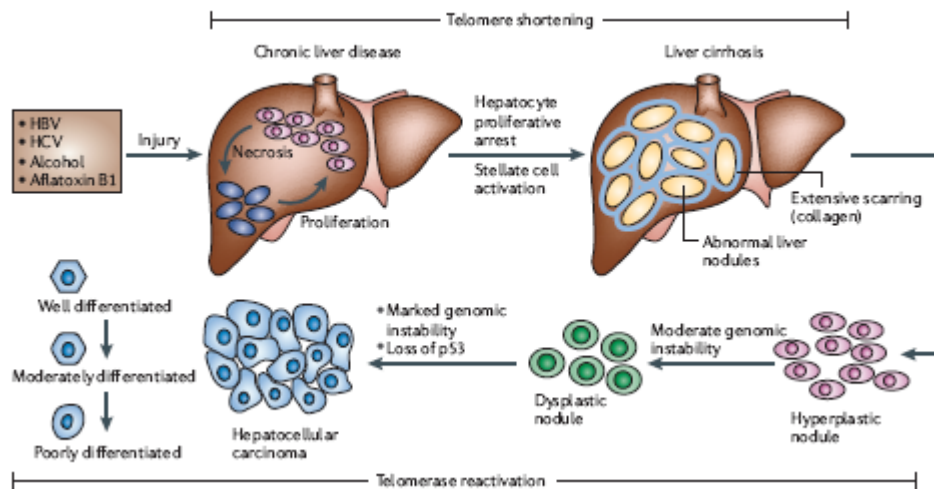


Figura 2. Il danno epatico insorge a causa di uno o più fattori (es. HBV, HCV, etc), si verifica necrosi seguita dalla proliferazione degli epatociti. Cicli continui di processi distruttivo–rigenerativi determinano una condizione di malattia cronica che evolve a cirrosi. La comparsa di noduli iperplastici, rigenerativi ed ad alterata attività enzimatica, può essere seguita dallo sviluppo di noduli displastici che possono evolvere a CE. (Farazi PA, DePinho R. Hepatocellular carcinoma pathogenesis : from gene sto enviroment. Nature Rev Cancer 2006 Sep; 6(9):674-87).

Alcuni studi eseguiti su pazienti positivi per il virus dell’epatite C (HCV) hanno dimostrato che lo sviluppo del CE richiede circa 10 anni dalla diagnosi di cirrosi e circa 30 anni dall’esposizione al virus (10). La sequenza temporale delle alterazioni non è stata ben definita per gli altri fattori di rischio, ma una simile cronologia di eventi potrebbe essere applicabile ai processi degenerativo-tossici provocati dall’alcool.

L’epatocancerogenesi può quindi essere legata all’accumulo di alterazioni genomiche di origine genetica ed epigenetica, che possono poi causare

alterazioni delle vie di trasmissione e quindi la sregolazione di importanti vie metabolico-funzionali degli epatociti.

Mediante analisi effettuate con la tecnica del microarray si è osservato che molti geni, compresi quelli espressi in maniera specifica negli epatociti differenziati, sono espressi a bassi livelli nei CE umani rispetto a campioni di fegato non tumorale. La riduzione dell'espressione di geni epato-specifici è associata ad una perdita della capacità di differenziare delle cellule cancerose durante la progressione tumorale (11, 12). Ciò suggerisce che un'elevata capacità di proliferazione è favorita da una iper-regolazione dei geni responsabili del controllo della crescita cellulare.

Mediante analisi del cariotipo e della perdita di eterozigosi (LOH) si sono osservate amplificazioni del DNA nelle braccia dei cromosomi 1q, 8q e 20q, e perdita di DNA alle braccia 1p, 4q, 8p, 16q e 17p (11).

Le aberrazioni cromosomiche identificate nel CE hanno una diversa componente eziologica e sono più frequenti nei tumori associati a virus dell'epatite B che non a quelli associati a virus dell'epatite C (13), essi comunque rappresentano sempre un evento tardivo.

L'analisi molecolare del CE ha portato all'individuazione di numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico di oncogeni e di soppressori tumorali (4) quali p53, p16^{INK4A}, β-catenina e Rb (8). E' stato dimostrato che i geni c-myc e Ciclina D1 sono frequentemente iper-espressi nei CE umani (15, 16, 17) e ricerche eseguite su topi transgenici "c-myc" e topi doppi

transgenici “c-myc/TGF- α ” confermano il ruolo svolto da questi geni nel promuovere la proliferazione cellulare e lo sviluppo neoplastico (18).

Per quanto riguarda le alterazioni genetiche, l’analisi di epatocarcinomi correlati con HBV ha mostrato un’elevata frequenza di mutazioni a carico dell’oncosoppressore p53 in soggetti caratterizzati da uno stadio avanzato della malattia rispetto a coloro che presentano lesioni negli stadi iniziali (8).

Nei CE associati ad infezione cronica da HBV è stato osservato che la proteina HBx, prodotta dal virus, lega direttamente p53 inibendo la sua attività pro-apoptotica (11, 19, 20). Il potenziale epatocancerogeno di tale proteina è stato dimostrato in topi transgenici HBx, il 90% dei quali sviluppava CE (8). Nel caso di epatocarcinomi correlati ad HCV è stato dimostrato che una proteina non strutturale del virus, NS5A, è in grado di legare p53, impedendo il suo accesso all’interno del nucleo (21). Negli abitanti delle regioni dove la causa principale dell’insorgenza della neoplasia è rappresentata dalla contaminazione del cibo da parte dell’aflatossina B1, l’inibizione di p53 si manifesta invece negli stadi iniziali della malattia. Ciò sta ad indicare l’importanza della soppressione di p53 nello sviluppo del CE in quanto questo meccanismo faciliterebbe il potenziale proliferativo in un contesto più ampio di danno al DNA, contribuendo all’instabilità genomica (4, 8).

Le alterazioni epigenetiche, possono indurre cambiamenti ereditabili o no nella metilazione del DNA e modificazioni degli istoni che modulano

l'espressione dei geni ma che non implicano cambiamenti nella sequenza primaria del DNA (22). E' stato dimostrato che gli epatocarcinomi umani sono caratterizzati da aberranti patterns di metilazione del DNA. Metilazione aberrante è stata osservata sia negli stadi iniziali sia in quelli tardivi del processo di tumorigenesi. Per esempio, è stata osservata ipermetilazione del DNA nell'epatite cronica e nella cirrosi (23). Si osserva ipermetilazione a carico di vari geni tra i quali COX-2 (cicloossigenasi 2), E-caderina e p16^{INK4A} (19). L'inattivazione di p16^{INK4A}, in seguito a ipermetilazione del suo promotore ad esempio, impedisce l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 (19) favorendone un'incontrollata progressione.

Inoltre è stato dimostrato che durante il processo di epatocancerogenesi, numerose vie di segnale risultano alterate. Una delle vie maggiormente studiate e caratterizzate è la via di trasduzione di RAS, implicata nel controllo dell'apoptosi, della crescita cellulare e della differenziazione. 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. Negli epatocarcinomi umani si è osservata iperespressione di Ras associata all'inattivazione degli inibitori dei suoi effettori. E' stata dimostrata ad esempio l'inattivazione di RKIP (Raf kinase inhibitory protein), gene che inibisce la fosforilazione e quindi l'attivazione di Mek 1/2, e DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1), inibitore di Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase). Altri importanti effettori di Ras sono

RASSF1A (Ras associated factor1) e NORE1A (Novel Ras effector1). Tali proteine possono contrastare l'attività di Ras inducendo effetti proapoptotici. Negli epatocarcinomi umani, come nel tumore al polmone, al pancreas e al colon-retto, è stata dimostrata ipermetilazione e perdita di eterozigosi a carico dei promotori dei geni di RASSF1A e NORE1A (11, 24). La perdita dell'espressione degli inibitori di Ras nei CE umani fa sì che venga promossa un'incontrollata crescita cellulare.

La via di segnale Wnt riveste un ruolo importante nel controllo dello sviluppo embrionale e della proliferazione cellulare; in un contesto patologico essa svolge un ruolo chiave nello sviluppo e nella differenziazione tumorale. In assenza del segnale Wnt, la β -catenina, suo principale effettore, viene catturata dal complesso proteico APC (Adenomatous polyposis coli)/Axina1/GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) che ne favorisce la degradazione proteasomica (19). Quando Wnt si lega al suo recettore, la trasmissione del segnale a livello citoplasmatico fa sì che venga soppressa l'attività di GSK3 β , stabilizzando la β -catenina. In questo modo la proteina migra nel nucleo dove lega i fattori di trascrizione LEF1/TCF e attiva i geni bersaglio, quali c-myc e ciclina D1. Essa interagisce a livello citoplasmatico con la E-caderina favorendo l'adesione cellula-cellula. Nei CE umani sono state riscontrate numerose mutazioni a carico dell'esone 3 del gene della β -catenina; tali mutazioni proteggono la β -catenina dalla degradazione e ne favoriscono l'accumulo a livello nucleare, alterando le normali interazioni

cellula-cellula e favorendo la proliferazione e lo sviluppo di fibrosi e cirrosi (11, 19). E' stato inoltre osservato che gli epatocarcinomi umani con elevata instabilità genomica mostrano bassi livelli di mutazioni a carico della β -catenina (8). Inoltre, nel 5-10% dei CE umani sono state osservate mutazioni a carico di Axina 1 e iperespressione del ligando Wnt e del suo recettore.

La via JAK/STAT partecipa alla regolazione delle risposte cellulari alle citochine ed ai fattori di crescita, e gioca un importante ruolo in alcuni processi cellulari come la differenziazione, la proliferazione e l'apoptosi (25).

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

Le proteine STAT 3 e 5, presenti in forma inattiva nel citoplasma, si attivano in seguito alla fosforilazione mediata da JAK o dai recettori ad attività tirosin-cinasi dei fattori di crescita. Una volta attivate, 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 ha una mancata modulazione del segnale che, divenendo attivato in modo costitutivo, provoca uno sbilanciamento di fattori antiapoptotici e pro-apoptotici quali Bcl-x, ciclina D1 e D2, Mcl-1 etc (26).

In base a studi su modelli di topi transgenici TGF- α (Transforming growth factor- α , membro della famiglia EGF) è stato dimostrato il coinvolgimento

della famiglia dei recettori tirosin-cinasi ErbB (ERBB1-4) nell'epatocancerogenesi. L'iperespressione di ERBB1 è stata osservata nel 68% dei CE, ERBB2 nel 21%, ERBB3 nel 84% e ERBB4 nel 61% (9). L'iperespressione di ERBB1 e ERBB3 è correlata a un fenotipo tumorale più aggressivo.

Oltre alle vie sopracitate, nel corso dell'epatocancerogenesi risultano alterate altre vie come la via di segnale della 3-fosfoinositolo cinasi (PI3K) e di mTOR (PI3K/AKT/mTOR), del fattore di crescita degli epatociti e del fattore di transizione mesenchimale-epiteliale, la via Hedgehog e del segnale apoptotico (Figura 3).

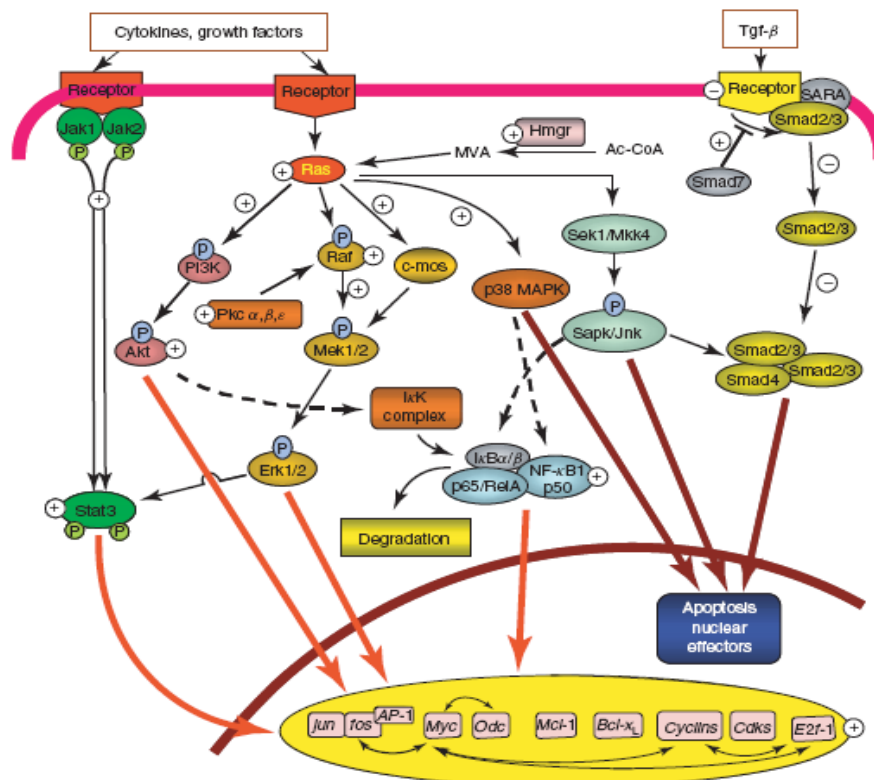


Figura 3: Principali vie di segnale alterate durante l'epatocancerogenesi.

La classificazione degli epatocarcinomi umani è essenziale per la comparazione tra i differenti studi ed i vari trials terapeutici. Esistono, a questo proposito, vari protocolli di classificazione internazionali (tabella 1):

- classificazione di Okuda
- classificazione TNM
- classificazione CLIP
- classificazione BCLC
- classificazione Child-Turcotte-Pugh (CTP)

Okuda Staging ^a			
	Negative:	Positive:	Stage:
Tumor size	<50% of liver	>50% of liver	I: No positive factors
Ascites	Absent	Present	II: 1-2 positive factors
Bilirubin	<3 mg/dL	>3 mg/dL	III: 3-4 positive factors
Serum albumin	>3 g/dL	<3 g/dL	

Child-Turcotte-Pugh (CTP)				
	1 Point:	2 Points:	3 Points:	Class:
Encephalopathy	None	Grade I-II	Grade III-IV	A 5-6 pts
Bilirubin (mg/dL)	<2	2-3	>3	B 7-9 pts
PT/INR	<1.7	1.71-2.20	>2.20	C 10-15 pts
Ascites	None	Controlled	Refractory	
Albumin (g/L)	>35	28-35	<28	

BCLC Staging and correlation with Okuda Staging						
Stage:	PS:	Tumor stage:	Okuda:	pH:	Bilirubin:	Classification:
A1	0	Single	I	No	Normal	Very early
A2	0	Single	I	Yes	Normal	Early
A3	0	Single	I	Yes	Altered	
A4	0	3 × <3 cm	I-II	Yes	Altered	
B	0	>5 cm or multinodular	I-II			Intermediate
C	1-2	Vascular invasion	I-II			Advanced
D	3-4	Any stage	III			Terminal

CLIP Staging ^b				
Points:	CTP:	Tumor morphology:	AFP:	Portal vein thrombosis:
0	A	Uninodular ≤50% of liver	<400 ng/dL	No
1	B	Multinodular ≤50% of liver	≥400 ng/dL	Yes
2	C	Massive >50% of liver		

Tabella 1. Principali protocolli di classificazione dei CE umani. (El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134:1752-1763).

Il protocollo raccomandato per la classificazione del grading istologico è lo schema di Edmonson e Steiner (27), che utilizza quattro gradi:

- G1: ben differenziato
- G2: moderatamente differenziato
- G3: scarsamente differenziato
- G4: indifferenziato

D'altra parte, va evidenziato che per il carcinoma epatocellulare, non è stata stabilita alcuna correlazione definitiva tra prognosi e grado istologico. I diversi tipi di modello di crescita dei carcinomi epatocellulari sono stati associati a un rischio variabile di diffusione intraepatica ed extraepatica (28).

2. Ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è un fenomeno che comprende precisi eventi biologici organizzati e regolati da diverse reazioni biochimiche. Nella sua complessità il ciclo cellulare determina, in seguito ad uno stimolo mitogenico, la duplicazione del materiale genetico e l'organizzazione di tutti i fenomeni molecolari e morfologici che portano alla divisione cellulare.

Le cellule eucariotiche hanno evoluto una rete complessa di proteine regolatrici note come “sistema di controllo del ciclo cellulare” che governa la corretta proliferazione cellulare. Il ciclo cellulare è dunque organizzato in fasi ed eventi molecolari cronologicamente determinati e regolati.

Le fasi che caratterizzano il ciclo cellulare sono quattro: *fase G1*, *fase S*, *fase G2* e *fase M*. L'insieme delle fasi G1, S e G2 è collettivamente identificato come interfase. Durante il periodo di tempo denominato *fase S*, affinché l'informazione genetica venga correttamente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie, il genoma deve essere prima duplicato in modo semiconservativo; in seguito i cromosomi devono venire segregati nelle due cellule figlie durante la *fase M*. La fase M è a sua volta composta da due processi, strettamente collegati: la mitosi, durante la quale i cromosomi, ormai duplicati, della cellula madre sono divisi tra le due cellule figlie e la citodieresi, che comporta la divisione del citoplasma della cellula progenitrice con la definitiva separazione delle cellule figlie. Importanti sono i due periodi

di tempo detti "gap" (G): *G1* fra la fine della mitosi (o lo stato *G0*) e l'inizio della fase S e *G2* fra il termine della fase S e l'inizio della fase M. In questi periodi di tempo si ha la maggior parte della sintesi proteica e di cicli metabolici con conseguente aumento della massa cellulare ed è qui che intervengono i principali meccanismi di regolazione in punti precisi definiti *checkpoints*, localizzati a livello delle transizioni *G1/S* e *G2/M*, che impediscono l'inizio della fase successiva se non è stata completata in modo corretto quella precedente. In questi punti il ciclo cellulare è regolato sia da segnali intracellulari che da segnali extracellulari provenienti da altre cellule e che possono favorire o inibire la proliferazione cellulare. Le fasi *G1* e *G2* sono quelle che possono subire la maggior variabilità di durata e in alcuni casi particolari possono anche essere eliminate, contrariamente alle fasi S e M che sono essenziali e che rappresentano due eventi chiave del ciclo cellulare. Le cellule che hanno smesso di dividersi, in modo temporaneo o irreversibile (come le cellule nervose e quelle muscolari striate scheletriche), sono in uno stato di quiescenza definito *fase G0*, in cui la cellula esce dal suo ciclo cellulare (29).

Molti geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare sono stati individuati mediante studi eseguiti sul lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Questo è un microrganismo eucariotico unicellulare che si presta molto bene alle analisi genetiche e che possiede un'altissima omologia molecolare/genetica con gli eucarioti superiori, uomo compreso. Tali studi

hanno permesso l'isolamento e la caratterizzazione di vari mutanti contenenti alterazioni delle diverse fasi del ciclo cellulare.

I principali mediatori biochimici che agiscono sulla regolazione del ciclo cellulare comprendono le cicline, le cinasi ciclina-dipendenti o CDK (cyclin-dependent kinases), gli attivatori nucleari CAK (CDK-activating kinase), gli inibitori delle CDK: famiglia INK4-inhibitors: p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4d} e la famiglia di proteine CIP/KIP: p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}. Queste molecole inibiscono l'attività delle CDK determinando l'arresto del ciclo cellulare, essi agiscono in una rete complessa regolando finemente ogni reazione biochimica e ogni processo della divisione cellulare. Numerosi lavori dimostrano che se i meccanismi di regolazione vengono meno, possono determinare una mancata regolazione del ciclo cellulare causando un evento principale della progressione neoplastica: crescita incontrollata.

Nelle cellule eucariotiche le cinasi ciclina-dipendenti o CDK regolano la progressione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare. L'attività di questa famiglia di protein cinasi dipende dalla loro associazione con delle subunità proteiche regolatrici dette cicline. Queste ultime sono proteine instabili, sintetizzate e degradate periodicamente, che si accumulano in specifiche fasi del ciclo e che non solo attivano le CDK, ma ne determinano anche la specificità di substrato.

Negli eucarioti multicellulari la necessità di rispondere a una maggiore quantità di stimoli esterni ed interni ha permesso l'evoluzione di molteplici e

diverse CDK infatti i vari complessi CDK-ciclina che si formano durante il ciclo cellulare di tali organismi variano in modo discreto sia per quanto riguarda la subunità regolatoria (ciclina) sia per quanto riguarda la subunità catalitica (CDK). In ogni periodo del ciclo cellulare è presente un solo tipo di complesso CDK-ciclina cataliticamente attivo e, a seconda del complesso formatosi, vengono fosforilate molecole bersaglio differenti.

Oltre all'azione regolatoria della ciclina, il complesso CDK-ciclina è anche soggetto all'azione di inibitori in grado di legarsi ad esso e di renderne inattiva la subunità catalitica, questa classe di proteine prende il nome di CKI (CDK Inhibitors). Inoltre, determinati siti della subunità catalitica delle CDK sono bersaglio di molte cinasi e fosfatasi che, determinando lo stato di fosforilazione del complesso, ne modulano in maniera precisa l'attività (30).

2.1 Ciclo cellulare ed epatocancerogenesi

Poiché la deregolazione delle proteine correlate al ciclo cellulare è uno dei principali fattori che contribuiscono allo sviluppo e alla progressione del CE nei ratti e nell'uomo, lo studio del ciclo cellulare e soprattutto dei meccanismi che ne determinano l'andamento è indispensabile per comprendere e descrivere la genesi di questa neoplasia come di altre, partendo dal presupposto che alla base della proliferazione incontrollata del clone neoplastico ci sia un insieme di modificazioni dei sistemi di controllo della proliferazione.

I tumori sono malattie genetiche il che implica, una modificazione della struttura primaria del DNA. Schematicamente gli eventi genetici che si susseguono sono spesso legati ad un evento “iniziale”, ossia il primo evento genetico può innescare una catena di eventi successivi che portano ad alterazioni genetiche multiple. Errori durante la transizione G1-S, e la fase S sono molto critici in quanto possono determinare direttamente aberrazioni genetiche e/o cromosomiche e l’accumulo di mutazioni che favoriscono lo sviluppo di sindromi genetiche e tumori. Episodi biochimici che simulano segnali mitogenici, sono rappresentati da condizioni di elevato stress ossidativo, attivazione costitutiva di oncogeni e condizioni patologiche in grado di alterare funzioni del fegato portando ad infiammazione o degenerazione. Se i sistemi di regolazione e riparazione non funzionano correttamente, si possono determinare danni al DNA di rilevante entità, elevato tasso di mutazione, instabilità genomica e/o cromosomica, come aneuploidia, condizioni che contribuiscono alla genesi dei tumori ed alla progressione tumorale.

Come detto precedentemente, la progressione del ciclo cellulare è regolata dalle CDK e dai loro specifici inibitori. La progressione dalla metà della fase G1 è regolata da CDK4, attivata dalle cicline di tipo D, mentre CDK2 è attivata dalle cicline E ed A, rispettivamente nella tarda fase G1 e nella fase S. La fosforilazione di pRb e di p107 e p130 (correlati a pRb), da parte delle CDK4/6 e CDK2 attive, previene il legame di pRb alla proteina DP1

permettendo la formazione dei complessi E2F1/DP1 che attivano la sintesi di DNA e la conseguente progressione del ciclo cellulare. L'attività di CDK2 è inibita dalla famiglia di proteine WAF/KIP (P21, P27 e P57) e quella di CDK4/6 dalla famiglia INK4A (p16). L'inibizione di CDK4/6, dovuta a p16 favorisce la defosforilazione di Rb che legandosi a E2F1 lo inattiva e blocca il ciclo cellulare in fase G1. Per questo motivo tali proteine funzionano come oncosoppressori. E' stato dimostrato che l'inattivazione di p16^{INK4A}, in seguito a ipermetilazione del suo promotore, impedisce l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 (30).

L'inattivazione di Rb è stata dimostrata in linee cellulari umane di epatocarcinoma (SNU 182, 354, 368, 398, 423, 475) e nel 28% dei CE (20,31). Un altro gene oncosoppressore, *RASSF1A* inibisce il ciclo cellulare attraverso l'iporegolazione della ciclina D1 mentre il complesso APC/C (Anaphase promoting complex/cyclosome) (32) lega il fattore di trascrizione P120 E4F, il quale forma un complesso con pRb e P53 (33), aumenta l'auto-ubiquitinazione di Mdm2 (34) e influisce sulla dinamica dei microtubuli (35). In maniera simile il fattore di trascrizione FOXO1 (Forkhead box O1) promuove l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 attraverso meccanismi multipli, inclusi l'iperregolazione degli oncosoppressori P27^{KIP1} e P130 e l'iporegolazione di Ciclina D1 e D2 (36).

I meccanismi che regolano i livelli degli inibitori del ciclo cellulare rimangono poco delineati nel CE. L'inattivazione del promotore di *p130* mediante la sua

ipermetilazione è stata individuata nel retinoblastoma (37) sporadico e nel cancro al polmone (38), ma non nei tumori ovarici (39), mentre il silenziamento epigenetico di *FOXO1* è stato individuato in linee cellulari di cancro endometriale (40). Altri meccanismi che controllano l'attività degli oncosoppressori includono la formazione dei complessi tra P16^{INK4A} e HSP90/CDC37 e il trasportatore CRM1 (41) e il sequestro di P27^{KIP2} da parte dei complessi Ciclina D1-CDK4 (42).

3. Ubiquitnazione e degradazione proteasomica

La degradazione delle proteine mediata dal sistema ubiquitina-proteasoma ha un ruolo importante nei diversi processi cellulari inclusa la regolazione del ciclo cellulare e la trasduzione del segnale (43). L'ubiquitina è una proteina globulare di 76 residui amminoacidici. Il sistema ubiquitina-proteasoma coinvolge l'attività di tre enzimi o complessi proteici chiamati E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), ed E3 (ubiquitin ligase) (43). La reazione di ubiquitinazione inizia con l'attivazione dell'ubiquitina da parte dell'enzima E1; esso catalizza la formazione di un legame tiolesterico tra la cisteina conservata al suo interno e il residuo di glicina 76 localizzato all'estremità COOH-terminale dell'ubiquitina. L'ubiquitina viene dunque trasferita all'enzima E2 formando un legame tiolesterico con la cisteina di questo enzima. In seguito, l'enzima E3 facilita la

formazione di un isopeptide di collegamento tra l'ubiquitina e la proteina bersaglio. L'aggiunta successiva di monomeri di ubiquitina fa sì che si formi una catena poli-ubiquitinica attraverso un residuo di lisina all'interno della stessa proteina. La catena poli-ubiquitinica è riconosciuta dal proteasoma 26S che catalizza così la degradazione proteolitica delle proteine cellulari e i monomeri di ubiquitina vengono riciclati (Figura 4). Il complesso proteasomico è un complesso proteolitico multi-enzimatico ATP-dipendente localizzato nel citoplasma e nel nucleo delle cellule eucariotiche dove può costituire più dell'1% delle proteine cellulari (44). La funzione proteolitica è attribuita al complesso centrale 20S che presenta una struttura cilindrica, costituita da subunità α e β che formano quattro anelli impilati (44). A entrambe le estremità, il complesso 20S presenta due subunità di regolazione, 19S, che determinano la specificità della funzione del proteosoma. Il dispiegamento ATP-dipendente del substrato proteico poli-ubiquitinato permette la sua traslocazione nel poro catalitico 20S dove avviene la sua degradazione mediante peptidasi; esso viene poi rilasciato in frammenti peptidici (45).

In tutto questo processo, gli enzimi E3 ubiquitina ligasi giocano un ruolo fondamentale nel reclutare gli specifici substrati che andranno poi degradati. Il riconoscimento avviene attraverso il legame a particolari motivi strutturali della proteina bersaglio, identificati come segnali di ubiquitinazione.

Numerosi substrati sono identificati dall'enzima, solo in seguito a

modificazioni post-trascrizionali, solitamente attraverso la fosforilazione in siti specifici (46).

Gli organismi eucariotici contengono un piccolo numero di isoforme E1 con nessuna apparente funzionalità specifica. La famiglia di enzimi E2 è più grande e diversi enzimi di questa famiglia hanno funzioni cellulari specifiche. Nel caso delle ligasi E3 la questione è più complicata. Le E3 del tipo RING (really interesting new gene) finger rappresentano la classe costituita dal maggior numero di ubiquitina ligasi. La famiglia monomerica delle proteine RING finger include Mdm2, Efp, c-cbl e BRCA1 (47). Mdm2, uno dei componenti maggiormente studiati; è il principale regolatore dei livelli dell'oncosoppressore p53. Il RING finger è un dominio strutturale di circa 70 residui amminoacidici, caratterizzato da un residuo di cisteina e uno di istidina conservati che attraverso il legame con due ioni zinco formano una struttura caratteristica che facilita il legame all'enzima E2 e il successivo trasferimento dell'ubiquitina al substrato. Questo gruppo è suddiviso, a sua volta, in due sottogruppi: le E3 a singola subunità e quelle multimeriche.

Nel secondo sottogruppo, diversi complessi multiproteici (CRLs, cullin RING ubiquitin ligases), contengono una subunità nota come cullina. Tra i CRLs, quello maggiormente studiato nei mammiferi (48) è l'ubiquitina ligasi SCF.

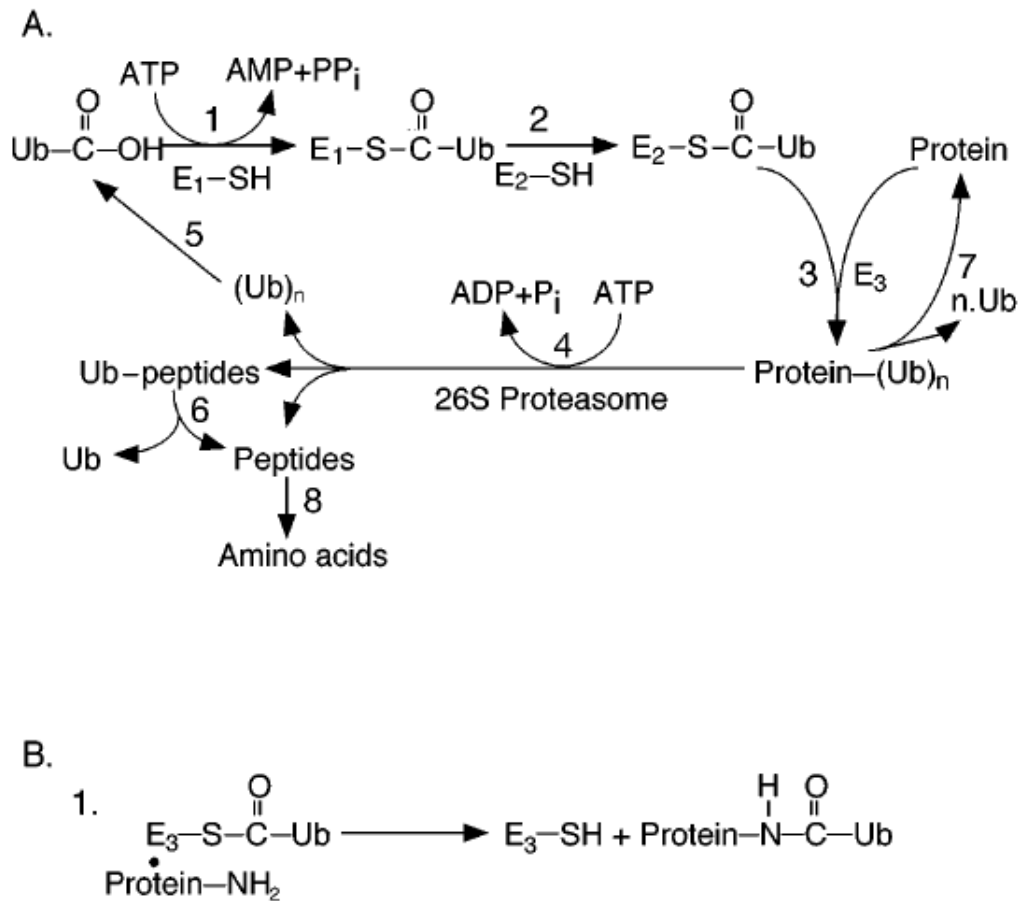


Figura 4: Reazione enzimatica del sistema ubiquitina. A) Sequenza di reazioni nella via proteolitica. B) Possibili meccanismi di trasferimento dell'ubiquitina dai 3 tipi di enzime E3. Ub: ubiquitina (Hershko Ciechanover, 1998).

4. Il complesso SCF

Il complesso SCF è composto da 4 subunità: SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1), cullina, RBX1 (proteina RING finger) e la proteina F-box (49) (Figura 5). Le prime tre proteine formano una comune impalcatura sulla quale possono assemblarsi le differenti proteine F-box, conferendo specificità al complesso. Studi sulla struttura e sulla funzione hanno dimostrato che le sequenze nella regione carbossi-terminale della proteina sono richieste per l'interazione con Cdc34 (un enzima E2). Presumibilmente E2 è richiesto dal complesso per consentire il trasferimento della molecola di ubiquitina ai bersagli (49). Una regione, conservata nella porzione N-terminale della cullina del lievito Cdc53, partecipa all'interazione con la subunità adattatrice Skp1 del complesso SCF (49). Nell'uomo solo la cullina Cul-1 sembra interagire con SKP1. Infine, un terzo dominio situato vicino all'estremità carbossi-terminale, è implicato nell'attaccamento post-traduzionale della proteina Rbx1 alla cullina (50). È stato dimostrato che SKP1 crea un ponte tra cullina e proteine F-box (49). Le proteine F-box sono formate approssimativamente da 40 amminoacidi; esse partecipano all'interazione con SKP1 e agiscono come recettore del substrato attraverso i motivi WD40 o i motivi ricchi in leucina (LRR) implicati specificamente nelle interazioni proteina-proteina. Nell'uomo sono state individuate 69 proteine F-box (51,52, 53) tra queste vi è anche la proteina SKP2 presa specificamente in esame nel nostro studio. RBX1 è l'ultimo componente del

complesso SCF ad esser stato identificato, la sua funzione potrebbe essere quella di reclutare E2 al complesso e promuovere il trasferimento dell'ubiquitina da E2 al bersaglio.

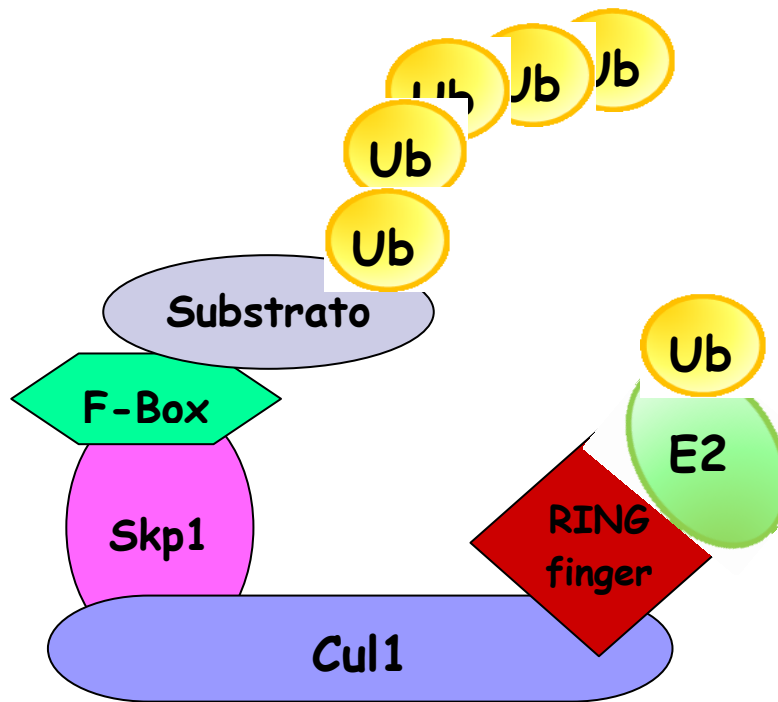


Figura 5: Rappresentazione schematica del complesso SCF

5. Il complesso SCF nel CE: ruolo di SKP2 e CKS1

Un recente studio indica una regolazione post-trascrizionale degli oncosoppressori mediante il complesso proteico SCF, questa ubiquitina ligasi è implicata infatti nella regolazione della transizione G1-S (54, 55). Si è dimostrato che, in diversi tumori, il complesso SKP1/CUL1/F-box proteina SKP2 (SCF^{SKP2}) è coinvolto nell'ubiquitinazione e nella degradazione proteasomica dei regolatori del ciclo cellulare P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P130, Ciclina E, E2F1, RASSF1A e FOXO (54, 56). Tuttavia nel CE, il ruolo di SCF^{SKP2} nella degradazione dei geni che regolano il ciclo cellulare non è stato ancora analizzato in maniera soddisfacente. Il controllo a livello post-trascrizionale di P21^{WAF1} e P27^{KIP1} è stato suggerito sulla base di discrepanze tra i valori dell'RNA messaggero (mRNA) e i livelli proteici in cellule umane di CE (57, 58). Recenti osservazioni effettuate nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la massiva attivazione di ERK (extracellular signal-regulated kinase) nel CE umano promuove la fosforilazione del residuo di serina 296 del suo inibitore specifico DUSP1 (dual-specificity phosphatase 1) favorendone la degradazione da parte del complesso SKP2-CDC28 protein cinasi 1b (CKS1) (59). Altri studi hanno dimostrato che l'espressione di CKS1 e SKP2 è indotta da FOXM1 (forkhead box M1B) gene bersaglio di ERK attivo (54). Successivamente il nostro gruppo di lavoro ha dimostrato che FOXM1 è iper-espresso nel CE di ratto ed umano e, in questo tipo di tumore, la sua iper-espressione influenza l'attività di SKP2 (60). Sulla base di

queste evidenze sperimentali, del suo potere trasformante e del suo potenziale invasivo riscontrato nei sistemi di colture tissutali e in vari tumori, SKP2 è considerato un vero e proprio oncogene (46).

Come detto in precedenza, la proteina F-box nel complesso SCF è primariamente responsabile del reclutamento del substrato (61). La proteina F-box SKP2 contiene dieci motivi ricchi di leucina in aggiunta al motivo F-box. L'analisi cristallografica di SKP2 ha rivelato che essa forma una struttura a forma di falce (62). In un'ansa si trovano le tre eliche che formano il motivo F-box che è responsabile del legame con SKP1. I dieci motivi ricchi di leucina formano l'estremità concava della "falce". I 34 residui amminoacidici nell'estremità carbossi-terminale di SKP2 sono non strutturati e impacchettati contro la superficie concava (62). Non è stato ben determinato se questa struttura ha una rilevanza fisiologica (Figura 6). La stessa struttura di SKP2 offre piccoli suggerimenti su come questa proteina possa reclutare le proteine substrato. Precedenti studi con un'altra proteina F-box, Grr1, indicano che la porzione concava della proteina possa essere coinvolta nel diretto riconoscimento del substrato e come mutazioni degli amminoacidi sulla superficie dei motivi ricchi di leucina aboliscano la capacità di ubiquitinare il substrato (63). Probabilmente SKP2 ha un meccanismo simile.

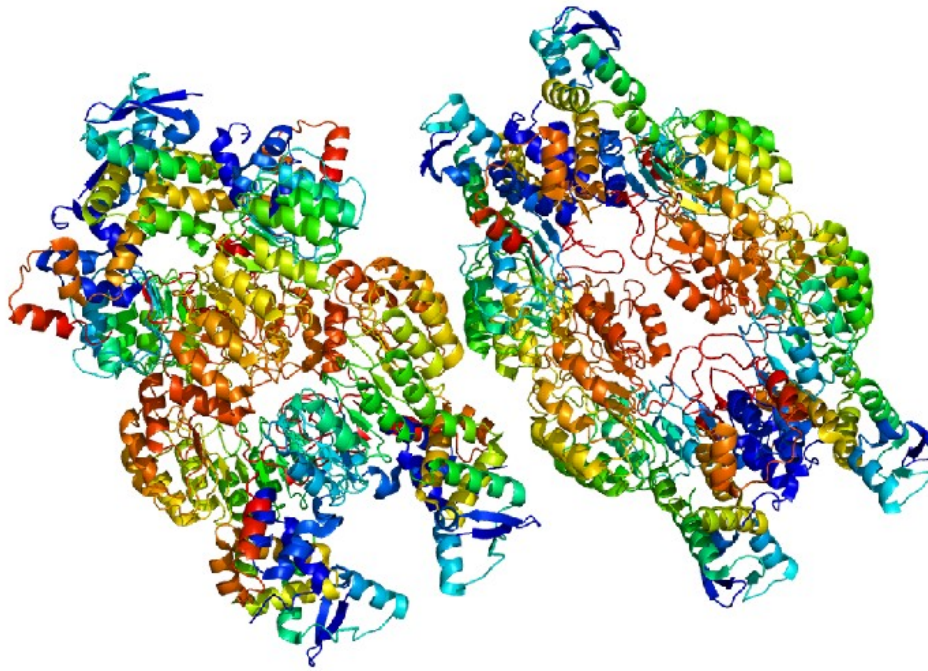


Figura 6: Struttura cristallografica della proteina Skp2.

CKS1 lega direttamente SKP2 e questa interazione è fondamentale per attivare l'ubiquitinazione dei regolatori del ciclo cellulare.

Le proteine Cks (cyclin-dependent kinase subunit) sono molecole adattatrici che coordinano l'assemblaggio di complessi multi proteici. Le proteine Cks sono state dapprima identificate per la funzione di controllo di Cdk2, regolando la sua funzione in alcune vie di segnale (64). Successivamente si è scoperto il loro ruolo nella degradazione di proteine bersaglio mediante la via dell'ubiquitinazione. Quest'ultimo ruolo è stato dapprima osservato come condizionato dalla fosforilazione dell'ubiquitina ligasi APC (anaphase promoting complex) (65, 66). Più recentemente è stato dimostrato che Cks1, uno dei due omologhi umani della famiglia Cks, è essenziale per l'attività del complesso ubiquitina ligasi SCF^{SKP2} (67, 68). Le proteine Cks differiscono tra

loro principalmente per una sequenza addizionale alle estremità N e C terminale e un'ansa più lunga tra le α -eliche. La struttura centrale è formata da 4 strati di β -foglietti. Una faccia del β -foglietto forma il sito di legame per Cdk2, mentre l'altra faccia è un insieme di residui conservati necessari probabilmente per legare proteine fosforilate (69). La regione α -elica meno conservata copre un'estremità del β -foglietto e studi biochimici e di mutagenesi hanno dimostrato che questa regione della proteina lega SKP2 (68) (Figura 7).

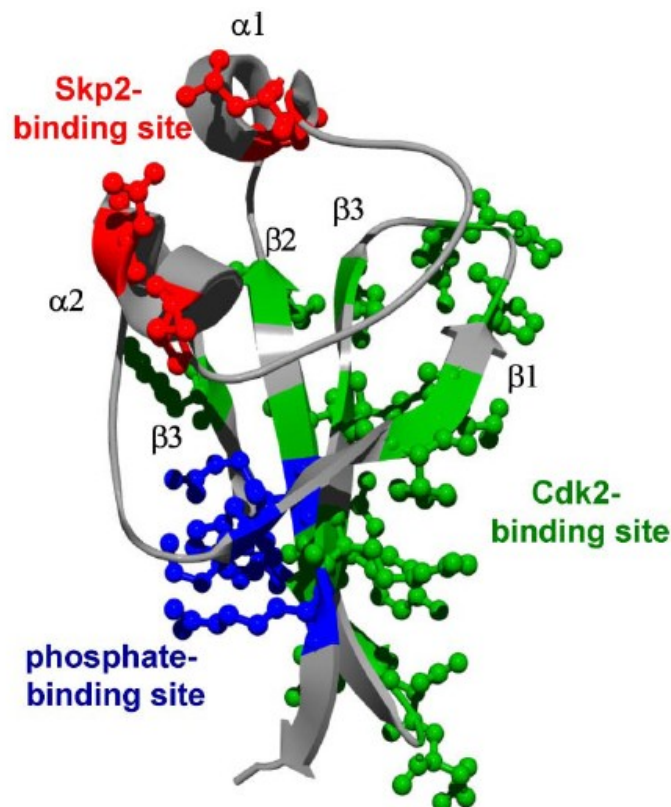


Figura 7: Struttura della proteina Cks1 nella quale si possono notare i siti di legame con Skp2 e Cdk2. (Seeliger et al. 2005).

CKS1 si lega alla regione carbossi-terminale di SKP2 e perché questo legame avvenga è necessaria la presenza di un residuo amminoacidico caricato negativamente, in posizione 331 di SKP2 (70) (Figura 8).

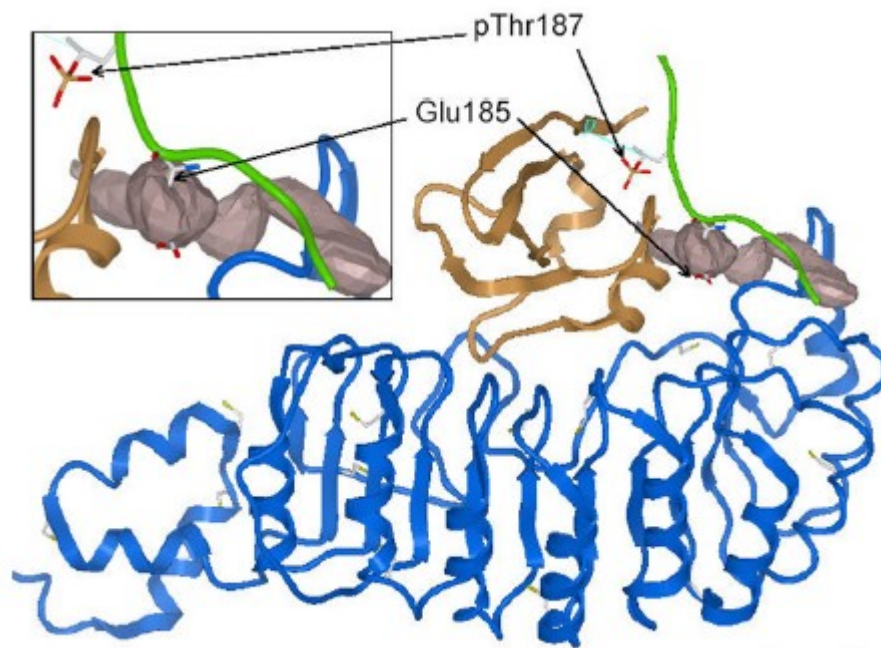


Figura 8: Struttura del complesso Cks1/Skp2/substrato. In blu è rappresentata Skp2, in dorato Cks1 e in verde il peptide substrato (nel caso specifico p27). Nel riquadro a maggior ingrandimento è visibile il sito di fosforilazione sul residuo di treonina (Thr 187) di p27 che favorisce il riconoscimento da parte del complesso SCF (Cardozo e Pagano 2007).

6. Modelli di ratto nello studio della cancerogenesi epatica

Le difficoltà nello studiare la sequenza degli eventi precoci che portano allo sviluppo del CE nell'uomo rendono necessario condurre gran parte degli studi su modelli animali. La difficoltà di una diagnosi precoce e la mancanza di terapie efficaci fanno sì che l'epatocarcinoma umano sia una neoplasia a prognosi infausta con breve sopravvivenza media del paziente, spesso ridotta a meno di tre anni dalla diagnosi. Per una diagnosi più precoce di tale neoplasia e per un trattamento più adeguato, è necessario pertanto lo sviluppo di validi modelli sperimentali di tumore epatico, nei quali possono essere indagati i meccanismi molecolari coinvolti nelle fasi precoci e tardive dell'epatocancerogenesi ed, eventualmente, modificati attraverso l'utilizzo di farmaci antineoplastici.

Per studiare le varie fasi del processo di epatocancerogenesi sono stati utilizzati differenti modelli sperimentali di epatocancerogenesi chimica nei roditori. Essi utilizzano uno schema comune di inizio del processo mediante somministrazione di un cancerogeno (fase di inizio), seguito da trattamenti di stimolazione della crescita (fase di promozione) che inducono l'espansione clonale degli epatociti iniziati dal cancerogeno.

La stimolazione della crescita è essenziale per l'espansione clonale delle cellule iniziate, durante la fase di promozione, e la successiva progressione verso il cancro. Tra i vari agenti promoventi si ha il fenobarbitale, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, idrocarbonio clorinato, proliferatori dei

perossisomi, e altri (71). I promotori presentano numerose caratteristiche in comune quali: la reversibilità dei loro effetti, la sensibilità a fattori ormonali o alla dieta, una soglia dose-risposta misurabile, la capacità di espandere la popolazione delle cellule iniziate, etc. (72). Le cellule iniziate evolvono in foci di epatociti ad alterata attività enzimatica (FAH), che possono formare foci e noduli con un diametro inferiore a 0,2 cm. La maggior parte dei FAH sono positivi per l'isoforma placentale del glutatione-S-transferasi 7-7 (GST 7-7) e meno frequentemente per l'enzima γ -glutamil transpeptidasi. Altre caratteristiche comuni sono un'aumentata espressione di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, una diminuita espressione di glucosio-6-fosfatasi e ATPasi, e una riduzione nel contenuto di ferro.

In seguito alla sospensione del trattamento con i promotori, alcuni FAH e noduli precoci tendono a sparire con un processo chiamato rimodellamento o reversione fenotipica (73). L'apoptosi è in parte responsabile di questo meccanismo, che può anche essere indotto da un ridifferenziamento (presumibilmente non terminale) delle cellule preneoplastiche, con una graduale reversione del loro fenotipo.

La fase successiva: la progressione dell'epatocancerogenesi è irreversibile ed è associata con l'accumulo di danno genomico e maggiore instabilità (71). Questo fenomeno può essere favorito dalla somministrazione di un cosiddetto "progressore" (74), un composto genotossico che induce ulteriori danni al DNA.

Nel nostro laboratorio per indurre l'epatocancerogenesi nei ratti abbiamo utilizzato il protocollo di Solt e Farber o "modello dell'epatocita resistente" (resistant hepatocyte model, RH) (vedi Materiali e metodi: Animali e trattamenti), nel quale i fenomeni precedentemente descritti sono ben caratterizzati.

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

1. *Inizio*, fase indotta dalla somministrazione del cancerogeno e dalla sua interazione con le macromolecole bersaglio.
2. *Promozione*, fase durante la quale si osserva lo sviluppo di numerosi foci preneoplastici e, in seguito, di noduli precoci, grazie all'azione di agenti promuoventi.
3. *Progressione*, fase durante la quale le lesioni preneoplastiche assumono caratteristiche di malignità, come la capacità di crescita autonoma.

L'utilizzo del protocollo di Solt e Farber ha permesso l'individuazione di due ceppi di ratto filogeneticamente distanti tra loro e diversi nella capacità di attivare o disattivare cancerogeni e di formare addotti con il DNA: i ratti Fisher (F344) suscettibili allo sviluppo di epatocarcinomi indotti chimicamente e i ratti Brown Norway (BN) resistenti alla cancerogenesi indotta utilizzando lo stesso protocollo sperimentale (75) (Figura 9).

I ratti BN sono portatori di geni della resistenza, che interferiscono con gli stadi di promozione e di progressione, determinando una scarsa capacità delle lesioni preneoplastiche ad evolvere in adenomi e carcinomi. Da incroci tra i due ceppi di ratto si è osservato che gli alleli resistenti sono trasmessi in maniera dominante alla progenie e modificano l'attività dei loci di suscettibilità (76). Queste osservazioni suggeriscono che i meccanismi che controllano la crescita cellulare sono influenzati in maniera differente nelle lesioni epatiche dei ratti suscettibili e resistenti.

Le lesioni preneoplastiche precoci possono andare incontro a rimodellamento oppure evolvere andando incontro a progressione neoplastica. Durante il rimodellamento si verifica la progressiva scomparsa di almeno alcune anomalie fenotipiche caratteristiche del tessuto preneoplastico e neoplastico, che possono tuttavia riacquistare velocemente capacità di crescita in seguito all'applicazione di un nuovo stimolo promovente. Nei ratti BN, resistenti all'epatocancerogenesi, soltanto alcuni noduli precoci, su centinaia presenti, sono in grado di evolvere lentamente a carcinomi epatocellulari. Questa osservazione sperimentale sottolinea dunque il fatto che una gran parte di noduli va incontro a rimodellamento (76) (Figura 9).

I noduli epatici che sono in grado di procedere nel loro sviluppo, in assenza di stimolo promovente, vanno invece incontro alla fase di progressione e possono evolvere a CE.

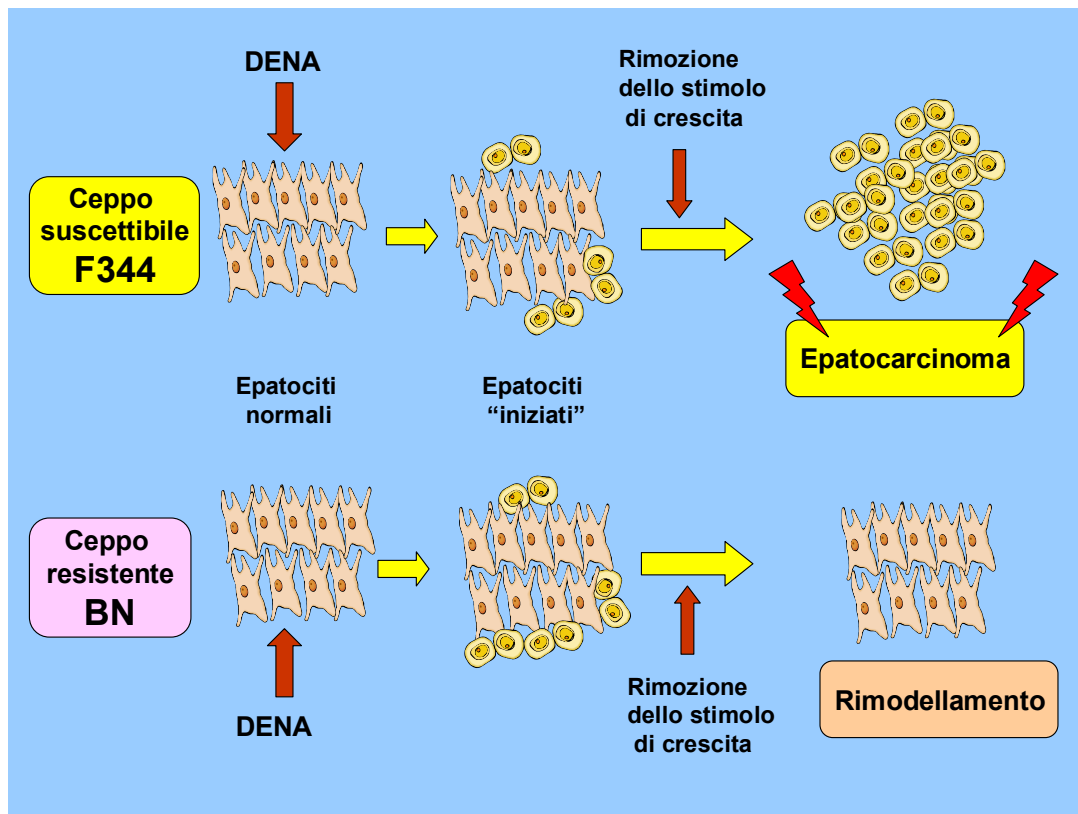


Figura 9: Schema illustrante la differente suscettibilità dei ceppi di ratto BN ed F344 alla cancerogenesi epatica indotta secondo il modello dell'epatocita resistente. La somministrazione del cancerogeno induce la formazione di cellule iniziate in entrambi i ceppi, ed in numero lievemente maggiore nel ceppo resistente BN. Tuttavia, alla sospensione dello stimolo promovente la crescita (rappresentato dall'epatectomia parziale), le cellule iniziate, indotte nel ceppo BN, vanno incontro a rimodellamento, mentre le cellule iniziate del ceppo suscettibile F344 continuano a proliferare e conducono allo sviluppo di lesioni preneoplastiche e neoplastiche.

Diversi studi hanno evidenziato che i meccanismi molecolari alla base della suscettibilità o della resistenza nei due ceppi di ratto, ripercorrono piuttosto fedelmente le alterazioni evidenziate nei CE umani (9, 77). Pertanto l'analisi dei due modelli di tumore epatico di ratto può rappresentare un valido ed utile sistema per lo studio dell'epatocarcinoma umano, esso permette l'identificazione dei geni che potrebbero essere bersaglio della terapia genica nei primi stadi dell'epatocancerogenesi, consente di mappare dei geni di

suscettibilità, per definire il modello genetico responsabile di un maggior rischio di CE, e può permettere di esaminare i meccanismi effettori dei geni di suscettibilità tumorale (76).

La mappatura dei diversi geni della suscettibilità e della resistenza all'epatocancerogenesi, in topi e ratti indica dunque che essi controllano la crescita, la progressione e la ridifferenziazione di lesioni preneoplastiche e neoplastiche e indicano una predisposizione ereditaria al CE (76), come è anche suggerito dall'epidemiologia del CE umano (78). Nei noduli neoplastici e nei CE dei ratti geneticamente suscettibili F344 si ha l'iperespressione dei geni *c-myc*, *Cyclin D1*, *E* ed *A* e di *E2f1* associata all'iper-fosforilazione di pRb, ma questo non si verifica nelle corrispondenti lesioni dei ratti resistenti BN (16). Inoltre Cdc37, Hsp90 e Crm1 che proteggono le cinasi del ciclo cellulare dall'inibizione da parte di p16^{INK4A}, sono iper-regolati nelle lesioni dei ratti F344, ma non in quelle dei BN (41). In maniera interessante, sono stati trovati analoghi cambiamenti anche nei CE umani, con un sottotipo di CE a miglior prognosi (HCCB, con periodo di sopravvivenza del paziente dopo parziale resezione chirurgica superiore a 3 anni) somigliante ai CE dei ratti resistenti e un sottotipo a peggior prognosi (HCCP, con periodo di sopravvivenza del paziente dopo parziale resezione chirurgica inferiore a 3 anni) simile alle lesioni dei ratti suscettibili (16, 41). Inoltre, si è riscontrata una maggior espressione di ERK nei noduli e nel CE dei ratti F344 e dei CE

umani a peggior prognosi, mentre ERK risulta solo leggermente indotto nelle corrispondenti lesioni del ceppo BN e nei CE a miglior prognosi (59, 79).

La diminuzione della capacità di crescita e l'aumento della redifferenziazione delle lesioni preneoplastiche caratterizza il ceppo di ratti resistente all'epatocancerogenesi (16, 41). Conseguentemente, studi sui meccanismi caratterizzanti l'acquisizione di un fenotipo suscettibile o resistente all'epatocancerogenesi nei ceppi di ratto, portando le lesioni preneoplastiche differentemente inclini alla progressione in CE, può condurre alla scoperta di marcatori prognostici e bersagli terapeutici per questa malattia dell'uomo.

SEZIONE SPERIMENTALE

7. SCOPO DELLA RICERCA

Su queste basi, abbiamo ipotizzato che SKP2 sia coinvolto nella crescita incontrollata del CE attraverso la degradazione delle proteine WAF/KIP, RASSF1A e FOXO1. Lo scopo del nostro studio dunque è stato quello di studiare comparativamente, in lesioni epatiche preneoplastiche e neoplastiche di ratti F344 e BN, rispettivamente geneticamente suscettibili e resistenti al CE e nei due sottotipi di CE umano a peggiore (HCCP) o miglior (HCCB) prognosi, il controllo genetico del complesso CKS1-SKP2 ubiquitina ligasi e il ruolo dell'ubiquitinazione dei regolatori negativi del ciclo cellulare, quali p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, pRb/p130 e RASSF1A, sulla determinazione di un fenotipo suscettibile al CE. Abbiamo poi valutato la correlazione dell'espressione dei regolatori del ciclo cellulare, con il tasso di crescita del CE umano con un indice di proliferazione altamente eterogeneo. Inoltre, poiché recenti dati indicano che l'attività di SKP2 è regolata sia dalla degradazione proteasomica attraverso il complesso APC/C con CDH1 (cell division cycle 20 related 1) (80, 81) che dall'iper-regolazione del gene HINT1 (histidine triad nucleotide binding protein 1) (82), abbiamo determinato il comportamento di questi meccanismi di controllo nel CE umano.

Infine, è stato valutato il potenziale ruolo di SKP2 come marcatore prognostico e bersaglio terapeutico nel CE dell'uomo.

8. MATERIALE E METODI

8.1 Animali e trattamenti

Ratti Fisher 344 (F344) e Brown Norway (BN) (Charles-River-Italia, Calco, Italy) sono stati nutriti e trattati in accordo con il protocollo de l'“Epatocita resistente”. Esso comprende un trattamento iniziante con una singola dose necrogenica (150mg/kg per via intraperitoneale) di Dietilnitrosamina (DENa), seguita dopo la riparazione tissutale, dalla somministrazione per 15 giorni di dieta iperproteica contenente il mitoinibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF) allo 0,02%. A metà di tale trattamento si effettua un'epatectomia parziale (PH) per stimolare la rigenerazione epatica (75). I ratti vengono quindi nutriti fino al sacrificio con una dieta standard (75). La somministrazione del mitoinibitore AAF induce soppressione della crescita degli epatociti normali, mentre le cellule iniziate dal cancerogeno non rispondendo all'azione inibitrice dell'AAF continuano a proliferare in seguito allo stimolo di crescita, producendo prima foci, poi noduli epatici precoci ed, infine, lesioni neoplastiche a diversa progressione. Qualche giorno dopo l'epatectomia parziale, iniziano ad essere evidenziabili centri focali di crescita delle cellule preneoplastiche denominati foci. Durante la fase di espansione clonale delle cellule iniziate dal cancerogeno, le lesioni focali epatiche vanno incontro ad una rapida crescita. Con l'avanzare del processo di epatocancerogenesi, a circa 10-12 settimane dall'inizio, si

possono individuare alcuni noduli precoci (displastici) che hanno continuato a crescere anche dopo scomparsa dello stimolo di crescita. Il numero di questi noduli è minore rispetto a quello dei foci preneoplastici formatisi nelle fasi precoci di promozione successive all'epatectomia parziale (Figura 10).

Per i nostri esperimenti sono stati utilizzati fegati preneoplastici, che includevano foci di epatociti alterati di 4-6 settimane dopo inizio dell'epatocancerogenesi, noduli precoci di 12 settimane, noduli displastici di 32 settimane e CE (50-60 settimane). Per l'analisi di espressione sono stati usati fegati preneoplastici, pool di noduli precoci o displastici e CE prelevati da ciascun ratto. Gli animali hanno ricevuto le cure necessarie e i protocolli sono stati applicati in base alle guide del National Institute of Health per l'uso degli animali in laboratorio.

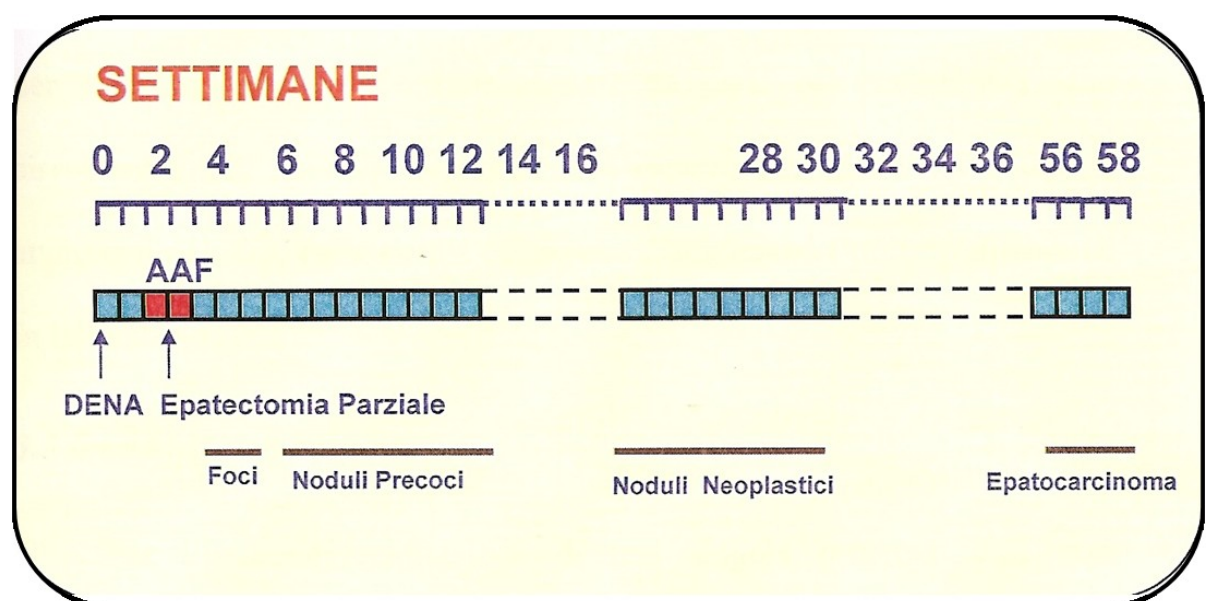


Figura 10: Modello “dell’epatocita resistente” o di Solt e Farber. Le abbreviazioni utilizzate sono: DENA, dietilnitrosamina; AAF, acetilaminofluorene.

8.2 Campioni di tessuto umano

Per gli esperimenti su campioni di tessuto umano sono stati usati 6 fegati normali e 60 CE suddivisi, in base al periodo di sopravvivenza del paziente dopo parziale resezione chirurgica e ad altri parametri clinico-patologici (Tabella 2), in due sottotipi: carcinoma epatocellulare a peggior prognosi (hepatocellular carcinoma with poor prognosis, HCCP) e carcinoma epatocellulare a miglior prognosi (hepatocellular carcinoma with better prognosis, HCCB), ciascuno con corrispondente tessuto epatico non tumorale circostante (SL). I tessuti epatici sono stati gentilmente concessi dal Dr. S. S. Thorgeirsson (NCI, Bethesda, MD) con la cortese concessione dell'ospedale e il consenso del paziente e dei parenti.

Variables	Features	
	HCCB	HCCP
No. of patients	30	30
Male	26	25
Female	4	5
Age (mean \pm SD), y	57.8 \pm 12.02	53.0 \pm 12.35
Etiology		
HBV	9	6
HCV	12	13
Ethanol	9	7
Wilson's disease	0	2
Hemochromatosis	0	2
Cirrhosis		
+	26	25
-	4	5
Tumor size, cm		
>5	17	22
<5	13	8
Edmondson and Steiner grade		
I	3	0
II	10	5
III	11	10
IV	6	15
Proliferation index ^a	10.92 \pm 2.30	31.32 \pm 8.47
Apoptotic index ^b	3.79 \pm 1.32	1.20 \pm 0.53
MVD ^c	118.56 \pm 40.94	283.03 \pm 52.48
α -Fetoprotein secretion		
>300 ng/mL of serum	9	8
<300 ng/mL of serum	21	22
Survival after partial liver resection (mo)		
Means \pm SD ^d	102.16 \pm 41.39	9.30 \pm 6.77

Tabella 2: Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con HCC a differente prognosi. HCCB, CE a miglior prognosi; HCCP, CE a peggior prognosi; MVD, densità micro vasale.

^a Percentuale di epatociti positivi all'antigene Ki-67. Media \pm SD; P<0.0001.

^b Percentuale di corpi apoptotici. Media \pm SD; P<0.0001.

^c Densità micro vasale. Media \pm SD; P<0.0001.

^d P<0.0001.

8.3 Linee cellulari e trattamenti

Per l'analisi funzionale *in vitro*, sono state utilizzate linee cellulari di CE umano quali Huh7, HLE e SKI. Le cellule sono state mantenute come colture monostrato in terreno DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e antibiotico all'1%. Su cellule Huh7 ed HLE sono stati effettuati esperimenti di trasfezione con Small Interfering RNA (siRNA Santa Cruz, CA) contro i geni CDK2, CDC14B, WNT10B e SKP2 usando il sistema siPORT NeoFX (Ambion). Su cellule SKI sono stati effettuati esperimenti di trasfezione transiente con cDNA wild-type per SKP2, AKT e STAT5B usando come vettore pCMV6-XL (OriGene Technologies, Rockville, MD), cDNA wild-type per HaRAS in plasmide pUSEamp (Millipore, Billerica MA) e cDNA di β -CATENINA mutata con vettore pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in base ai protocolli della Casa di produzione. Per determinare l'effetto della proteolisi mediata dal proteasoma, sono stati usati gli inibitori proteasomici N-acetil-Leu-Leu-norleucinal (ALLN 10 μ mol/L; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) e carbobenzossi-L-leucil-L-leucil-leucinal (MG132 25 μ mol/L; Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA) dissolti in DMSO e aggiunti al terreno di coltura nelle ultime 3h degli esperimenti di trasfezione. I controlli hanno ricevuto solo DMSO. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno 3 volte in triplicato per ciascuna linea cellulare.

8.4 Istologia e immunoistochimica

I tessuti epatici di ratto sono stati fissati in paraformaldeide e colorati con ematossilina/eosina o con tecnica immunoistochimica per l'evidenziazione della glutatione S trasferasi (GST 7-7) o Ki67. Il numero e il volume delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche dei ratti è stato calcolato mediante analisi morfometrica.

La colorazione immunoistochimica è stata eseguita su sezioni fissate in formalina al 10% e incluse in paraffina. Le sezioni deparaffinate sono state incubate in H₂O₂ al 3%, in PBS 1X per 30 minuti per eliminare la perossidasi endogena. Per smascherare l'antigene, i vetrini sono stati incubati in buffer citrato 10 mmol/L (pH 6) per 14 minuti. Gli anticorpi anti-SKP2 rabbit policlonale e anti-Ki67 mouse monoclonale (clone MIB-1; Dako Deutschland GmbH, Hamburg Germany) sono stati usati con una diluizione 1:50. L'immunoreattività è stata visualizzata con il kit Vectrastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame CA) e 3,3'-diaminobenzidina (Dako Deutschland GmbH) come cromogeno. I vetrini sono stati neutralizzati con ematossilina Mayer.

8.5 Indici di marcatura, di proliferazione e di apoptosi

L'indice di marcatura (LI) delle lesioni dei ratti è stato valutato 2h dopo l'iniezione intraperitoneale di 5mg/100g di 2-bromo-3-desossiuridina (BrdU) determinando l'incorporazione nucleare di BrdU, usando il "Cell proliferation kit" (Amersham Biosciences, Cologno Monzese, Italy) in 3000 epatociti.

Nei CE umani l'indice di proliferazione e apoptosi sono stati determinati rispettivamente contando le cellule Ki-67 positive e le figure apoptotiche su 3000 epatociti (41). La vitalità delle linee cellulari in vitro è stata determinata attraverso "WST-1 Cell Proliferation Reagent" (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

8.6 Estrazione di DNA, isolamento di RNA e sintesi di cDNA

Il DNA ad alto peso molecolare è stato isolato da tessuto congelato come descritto in precedenza (83). Si procede incubando o/n a 55°C in agitazione 30-50 mg di tessuto sminuzzato in 350 µl di lysis buffer [TrisHCl 100 mM (pH 8,5), EDTA 5mM, SDS 0,2%, NaCl 200 mM] e aggiungendo 100µg/ml di proteinasi K. Si centrifuga per 10' a 12000 rpm e si precipita il DNA dal surnatante con 350 µl di isopropanolo. Si procede quindi al recupero del DNA lasciandolo essiccare e successivamente lo si scioglie in 300-350 µl di TE a 37°C.

L'RNA totale è stato isolato e purificato seguendo la procedura QIAGEN Rneasy Total RNA Isolation (Qiagen Inc., Valencia, CA). Dopo l'estrazione, per escludere possibili contaminazioni di DNA genomico, 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.

8.7 RT-PCR quantitativa

Sono state usate sonde di geni per p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, pRb/p130, RASSF1A, FOXO1, SKP2, CKS1 e RNR-18 (controllo interno), selezionate mediante “Assay on-Demand™ Products” (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le reazioni di PCR sono state eseguite usando dai 75 ai 300 ng di cDNA, utilizzando il sistema di determinazione ABI Prism 7000 sequence detection System e la polimerasi 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 a 60°C per 1 minuto. I valori quantitativi sono stati calcolati usando il software PE Biosystems Analysis (82) ed espressi come N 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.

8.9 PCR metilazione specifica (msPCR)

Trenta nanogrammi di DNA genomico prelevato dai tessuti normali, dai CE e dai tessuti non tumorali circostanti sono stati amplificati in un volume di reazione di 15µl consistente in 0.4µmol/L di ciascun primer, 200µmol/L ciascuno dNTP, PCR buffer 10X, soluzione GC-RICH 5X e 0.4 U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals). L'identità dei primers usati è stata confermata dal sequenziamento genomico con bisolfito. I DNA CpGGenome Universal (Millipore) metilati e non metilati sono stati usati come controllo positivo e negativo rispettivamente per ciascuna reazione PCR. Lo stato dei promotori dei geni *P21^{WAF1}*, *P27^{KIP1}*, *P57^{KIP2}*, *P130*, *RASSF1A*, *WNT10B* e *HINT1* è stato studiato con più di un set di primers specifici metilati e non metilati (81, 83-88).

8.10 Immunoprecipitazione e Western Blot

I campioni di tessuti epatici umani, i noduli precoci (12 settimane dopo l'inizio dell'epatocancerogenesi), i noduli neoplastici e i CE dai ratti F344 e BN sono stati omogenati in lysis buffer (composto da Tris 30 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L, NP40 1%, Na-deossicolato 0,5%, SDS 0,1%, glicerolo 10% e EDTA 2 mmol/L) contenente inibitori di proteasi e sonicati. La concentrazione delle proteine è stata determinata con il kit Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) usando albumina serica bovina (BSA) come standard. Gli estratti nucleari sono stati preparati con il kit NE-PER (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). I livelli di proteine nucleari sono stati normalizzati in base all'espressione dell'istone H3 (Santa Cruz Biotechnology). Aliquote di 40µg sono state denaturate a 95°C in Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen) separate mediante SDS-PAGE e trasferite in membrane di nitrocellulosa mediante elettroblotting. Le membrane sono state incubate per 1h in latte al 5% in TBS+Tween20 0,1% per bloccare i siti aspecifici e successivamente incubate con gli anticorpi specifici. Per l'immunoprecipitazione sono stati usati 500µg di proteina totale. I campioni vengono immunoprecipitati con anticorpi specifici. Gli immunocomplessi sono stati separati mediante SDS-PAGE e trattati con anticorpi secondari biotinilati. I complessi tra Skp2 o ubiquitina e Cks1, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130 e RassF1A sono determinati immunoprecipitando SKP2 o Ubiquitina con gli anticorpi anti-SKP2 e anti-

Ubiquitina (Santa Cruz) rispettivamente e marcando le membrane con anticorpi contro Cks1, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130 e RassF1A. La fosforilazione di RassF1A è stata determinata con un anticorpo rabbit anti-RassF1A fosforilato (pSer203) mentre per valutare il complesso RASSF1A-CDK4 abbiamo immunoprecipitato CDK4 con anticorpo specifico, seguito dall'immunoblotting con RASSF1A e per i complessi tra SKP2 e CDK2 e CDC14B abbiamo dapprima immunoprecipitato SKP2 e effettuato l'immunoblotting con CDK2 e CDC14B rispettivamente. Le bande sono state quantificate in unità arbitrarie con il ChemiDoc XRS, usando il programma Quantity One 1D Analysis Software e normalizzate ai livelli di β -actina. Per testare la specificità degli anticorpi primari, i controlli negativi sono stati fatti con gli anticorpi usati per l'immunoprecipitazione incubando 2h a temperatura ambiente con il rispettivo peptide immunogeno, prima dell'immunoprecipitazione. In studi di coimmunoprecipitazione, la specificità della co-immunoprecipitazione è stata valutata preincubando il secondo anticorpo primario, prima dell'immunoblotting con il rispettivo peptide immunogeno.

8.11 Saggio dell'attività cinasica di CDK2

I tessuti epatici sono stati omogenati in ghiaccio in lysis buffer freddo composto da HEPES 50 mmol/L pH7.0, NaCl 250 mmol/L, EDTA 5 mmol/L pH 8.0, NP40 0,5%, PMSF 1 mmol/L, NaF 1 mmol/L, sodio pirofosfato 20 mmol/L, sodio vanadato 1 mmol/L e 10 µg/ml ciascuno di Leupeptina, Aprotinina e Pepstatina. La concentrazione proteica è stata determinata con Bio-Rad Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Un totale di 100µg di proteina è stato incubato con 2µg di anticorpo anti-CDK2 (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C per 1h, l'incubazione è seguita dall'immunoprecipitazione con proteina A agarosio (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C per 1h. Il complesso così formato è stato lavato 3 volte con buffer cinasi contenente HEPES 50mmol/L pH 7.0, MgCl₂ 5mmol/L e DTT 10mmol/L. Il pellet è stato risospeso in 30µl di buffer cinasi contenente 1µg di istone H1 (EMD Chemicals Inc, Gibbstown, NI) come substrato, 2,5mmol/L di EGTA, 10mol/L di β-glicerofosfato, 0,1mmol/L di Na₃VO₄, 1mmol/L di NaF, 20µmol/L di ATP e 10µCi di [³²P]ATP. Dopo l'incubazione di 30 minuti a 30°C mescolando di tanto in tanto, le reazioni sono state bloccate con 10µl di Laemmli buffer 4X, i campioni sottoposti a una temperatura di 95°C per 10 minuti e fatti correre in SDS-PAGE. L'istone H1 fosforilato è stato visualizzato mediante autoradiografia. Il gel è stato esposto al Phosphoimager per l'analisi quantitativa.

8.12 Valutazione della densità microvasale (MVD)

La completa serie di CE è stata sottoposta a colorazione immunochimica con anticorpo anti-CD34 (Vector Laboratories). I CE sono stati vagliati a bassa risoluzione (40X) per identificare le aree di maggiore MVD. Le 4 aree a maggiore MVD per ciascun tumore, sono state fotografate con obiettivo ad alta risoluzione (200X) e la dimensione di ciascuna area è stata standardizzata usando l'ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La densità microvasale è stata espressa come percentuale (media \pm SEM) del totale degli spot marcati con CD34 per sezione di area (0,94 mm²).

8.13 Analisi del locus CDC14B

I campioni di CE umano sono stati analizzati per individuare le alterazioni dei micro satelliti nel locus CDC14B usando le coppie di primers D9S1145 e D9S1011E. La PCR è stata eseguita in un volume di reazione di 15 μ l costituito da 0.4 μ mol/L di ciascun primer, 200 μ mol/L ciascuno dNTP, PCR buffer 10X, 0.4 U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals) e 20ng di DNA con una fase iniziale di 6 minuti a 95°C, seguita da 40 cicli (95°C per 30 secondi, 55°C per 45 secondi, 72°C per 1 minuto) e una fase finale a 72°C per 10 minuti. Dopo la denaturazione in

Sample buffer TBE-Urea (Invitrogen) i campioni sono stati fatti correre in un gel TBE-Urea al 6% (Invitrogen) e visualizzati con SYBR Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen). La perdita di eterozigosi è stata registrata quando si aveva una riduzione del 50% o maggiore nell'intensità delle bande elettroforetiche.

8.14 Analisi statistica

Per valutare la significatività statistica sono stati usati il Test *t* di Student e di Tuckey-Kramer. Per l'analisi comparativa del gene promotore della metilazione e la sopravvivenza dei pazienti è stato usato il test di Fisher. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$. L'analisi di regressione lineare è stata effettuata con il software GraphPad Instant 3 (GraphPad Inc, San Diego, CA). I dati sono stati espressi come media e deviazione standard (DS).

9. RISULTATI

9.1 Sviluppo delle lesioni epatiche nei ratti

Nei ratti trattati secondo il modello di Solt e Farber, quattro settimane dopo la somministrazione di DENA (fase di inizio), i foci di epatociti alterati, positivi al GST 7-7, occupavano circa il 12% del fegato sia nel ceppo suscettibile (F344) che nel ceppo resistente (BN). L'ulteriore evoluzione dei foci a noduli precoci, più grandi dei lobuli epatici e comprendenti anche il parenchima circostante è risultata però più pronunciata nei ratti F344 rispetto ai BN. A 12 settimane infatti le lesioni dei ratti F344 occupavano il 54% del fegato rispetto al 16% occupato dalle lesioni dei BN ($p < 0,0001$, $n=5$). A 32 settimane i noduli displastici occupavano solo il 15% del fegato nei ratti BN contro il 74% negli F344 e a 50-60 settimane, infine, il CE era presente in tutti i ratti F344 ma solo nel 35% dei ratti BN. In entrambi i ceppi di ratto si aveva presenza di foci di epatociti alterati e noduli precoci che consistevano prevalentemente in cellule chiare/eosinofile. Con l'evolvere dell'epatocancerogenesi, le differenze fra i due ceppi si fanno più marcate, ecco dunque che a 32 settimane si riscontra un basso grado di noduli displastici nel fegato dei ratti BN e un alto grado negli F344 e a 50-60 settimane il CE risultava ben o moderatamente differenziato nei ratti BN mentre moderatamente o non differenziato nei ratti F344. Inoltre mentre il 100% di ratti F344 sviluppa CE, solo una bassa percentuale di BN presenta

tumori. A 4 e 6 settimane, nel fegato preneoplastico degli F344, il numero dei foci era $14,08 \pm 2,6$ e $11,44 \pm 1,9$ e nei BN $12,64 \pm 2,2$ e $11,06 \pm 2,0$. Il numero di noduli precoci, noduli displastici e CE invece risultava $9,07 \pm 1,2$, $11,24 \pm 1,09$ e $9,62 \pm 1,3$ rispettivamente nei ratti F344 e $3,2 \pm 0,91$, $5,01 \pm 0,78$ e $6,78 \pm 1,006$ nei BN (media \pm DS, n=5; test di Tuckey-Kramer: F344 su BN $p < 0,005$ per noduli precoci, displastici e CE).

9.2 Espressione dei regolatori del ciclo cellulare

La figura 11a mostra un aumento progressivo nei livelli di mRNA di $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$ e $p130$ nelle lesioni preneoplastiche, nei noduli e nei tumori dei ratti F344. Nei ratti BN invece si nota un più basso o addirittura nessun incremento dei livelli di mRNA degli stessi geni. Un comportamento simile era stato precedentemente riscontrato, nei livelli di mRNA di *RassF1A* nei 2 ceppi di ratto (79). Una differente situazione invece si ha per quanto riguarda i livelli proteici (illustrati nelle figure 11b e 11c); infatti $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$, $p130$ e *RassF1A* non mostrano cambiamenti significativi o un leggero incremento nel fegato preneoplastico comparato con il fegato normale, senza alcuna differenza tra i 2 ceppi. Tuttavia, nei noduli precoci e/o displastici e nei CE dei ratti F344, l'assenza di un ulteriore incremento dei livelli proteici contrasta con il consistente incremento nelle corrispondenti lesioni dei BN; questo suggerisce differenze tra i 2 ceppi nella regolazione

post-trascrizionale dei livelli proteici, infatti i livelli degli inibitori del ciclo cellulare risultano più alti nelle lesioni in crescita di questi ratti.

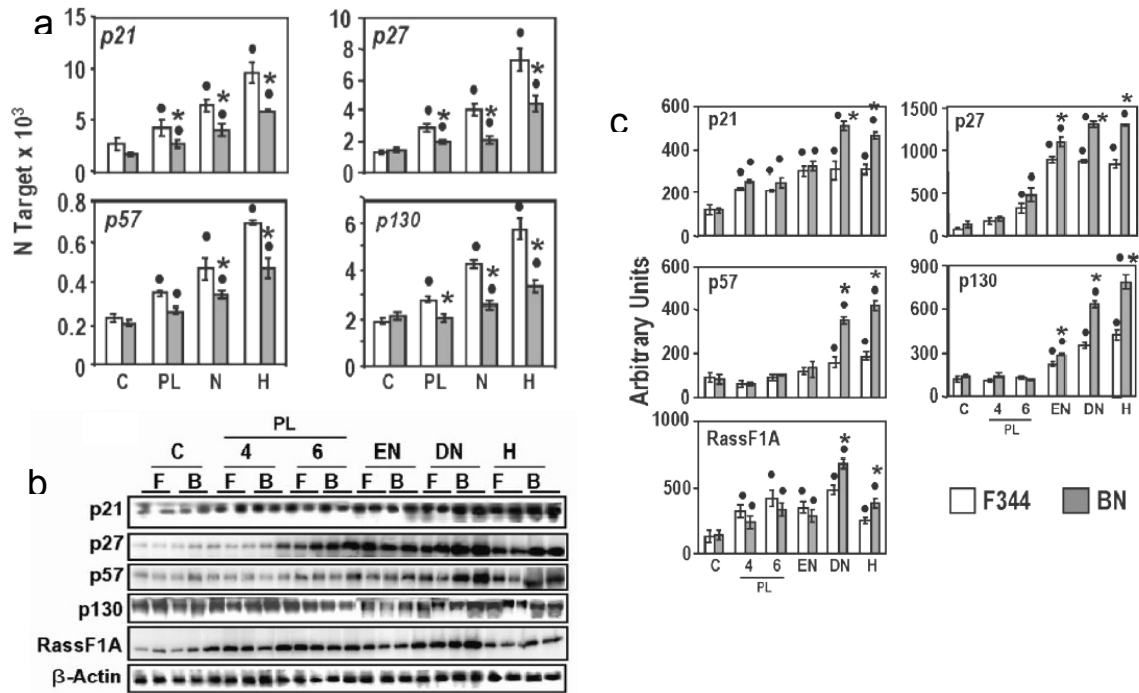


Figura 11: Livelli di $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$, $p130$ e $RassF1A$ nelle lesioni epatiche preneoplastiche (PL), noduli precoci (EN), noduli displastici (DN) ed epatocarcinoma (H) di ratti F344 e BN ottenuti mediante RT-PCR quantitativa (a) e immunoprecipitazione (b, c). Le lesioni epatiche preneoplastiche includono fegati contenenti foci di epatociti alterati a 6 settimane (a) e 4 e 6 settimane (b) dopo l'inizio dell'epatocarcinogenesi. (a) $N\ target = 2^{-\Delta Ct}$, dove il valore ΔCt di ciascun campione è stato calcolato sottraendo la media del valore Ct di determinazioni in triplicato del gene target dalla media del valore Ct di determinazioni in triplicato del gene *RNR-18*. I dati sono medie \pm DS di N target di almeno 5 ratti per il controllo, PL, noduli e CE. (b) Immunoprecipitazione di $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, $p57^{KIP2}$, $p130$ e $RassF1A$. (c) Analisi di chemiluminescenza che mostra la media \pm DS di 5 ratti per il controllo, PL, noduli e CE. Le bande sono state quantificate mediante il Molecular Imager ChemiDoc XRS usando il Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories S.r.l. Segrate, MI); la densità delle bande è stata normalizzata ai livelli di β -actina ed espressa in unità arbitrarie (arbitrary units). Test di Tuckey-Kramer: (a, c) con trattamento con il cancerogeno sul controllo, $p < 0,01$; asterisco, BN su F344, $p < 0,001$.

9.3 Ubiquitinazione dei regolatori del ciclo cellulare

Per studiare il meccanismo post-trascrizionale che determina i livelli proteici dei regolatori del ciclo cellulare nelle lesioni epatiche degli F344 e dei BN, abbiamo valutato l'espressione dei due componenti chiave del complesso SCF^{SKP2}, Skp2 e Cks1 e la loro interazione con i regolatori del ciclo cellulare. I risultati mostrano un progressivo aumento di Cks1 e Skp2, nonché dei complessi tra Skp2-Cks1 e p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} e p130 nelle lesioni preneoplastiche (4-6 settimane), nei noduli e nei CE di entrambi i ceppi. Un significativo aumento del complesso Cdk4-RassF1A, di RassF1A fosforilato (pRassF1A) e del complesso Skp2-RassF1A invece, si ha solo nei noduli precoci (12 settimane) o displastici (32 settimane) e nei CE dei ratti F344. Si riscontrano livelli più alti di tutte le proteine e dei complessi proteici testati nei noduli precoci e/o displastici e nei CE, ma sono stati trovati livelli significativamente più bassi nei noduli e nei CE dei ratti BN rispetto agli F344 (Figura 12). In linea con queste osservazioni si è vista la presenza di una minor percentuale di proteine p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130 e RassF1A ubiquitinate nei noduli di 12 settimane e/o nei noduli displastici e nei tumori dei ratti BN rispetto agli F344 (Figura 13).

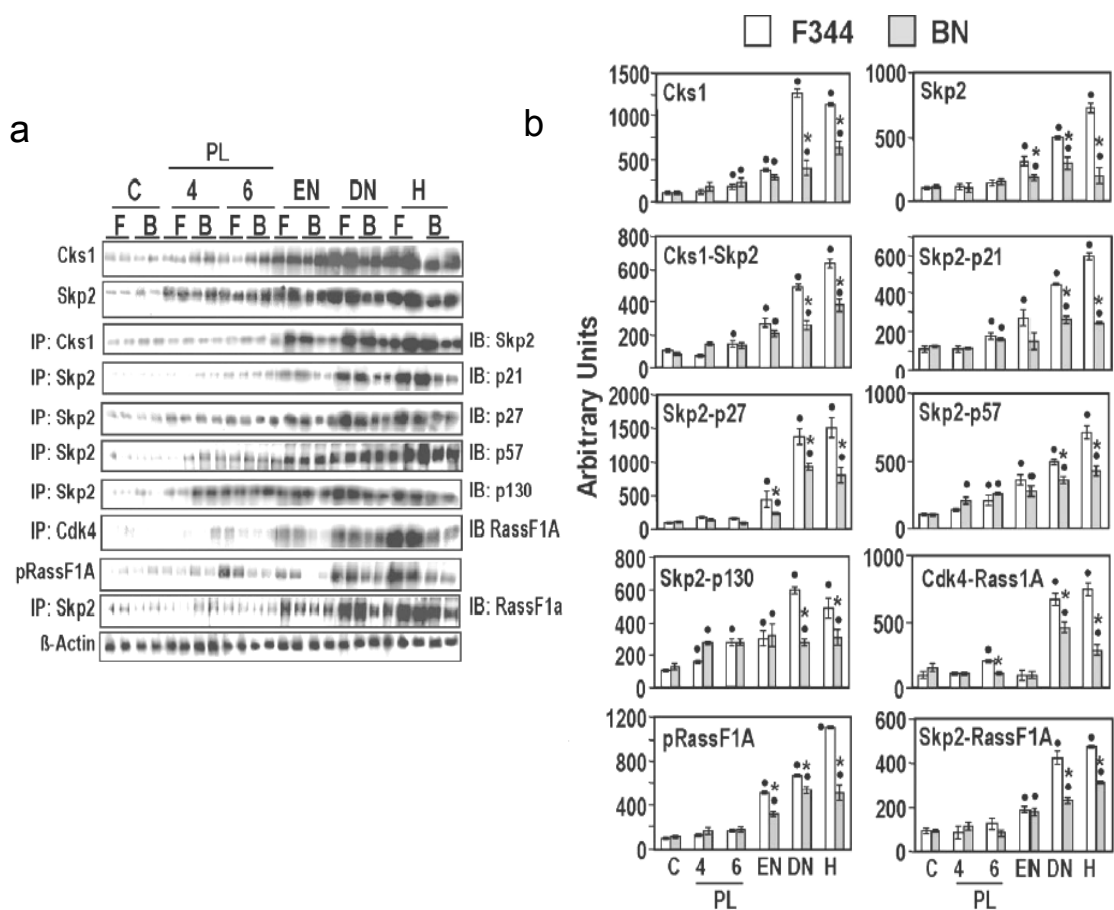


Figura 12: Immunoprecipitazione di CKS1, SKP2 e delle proteine regolatrici del ciclo cellulare in lesioni epatiche preneoplastiche (PL), noduli precoci (EN), noduli displastici (DN) ed epatocarcinoma (H) di ratti F344 e BN. (a) Immunoprecipitazione rappresentativa di CKS1, SKP2 e delle proteine regolatrici del ciclo cellulare. Le proteine lisate sono state sottoposte a Western blot con anticorpi specifici. Gli immunocomplessi sono stati determinati mediante immunoprecipitazione (IP) di uno dei due componenti seguita dall'immunoblot (IB) con anticorpi contro il secondo componente, come indicato. (b) Analisi di chemiluminescenza che mostra la media \pm DS di 5 ratti per il controllo, PL, noduli e CE. La densità delle bande è stata normalizzata ai livelli di β -actina ed espressa in unità arbitrarie (arbitrary units). Test di Tuckey-Kramer: CE, noduli precoci e displastici e PL su fegato normale, $p < 0,001$; asterisco, BN su F344, $p < 0,001$.

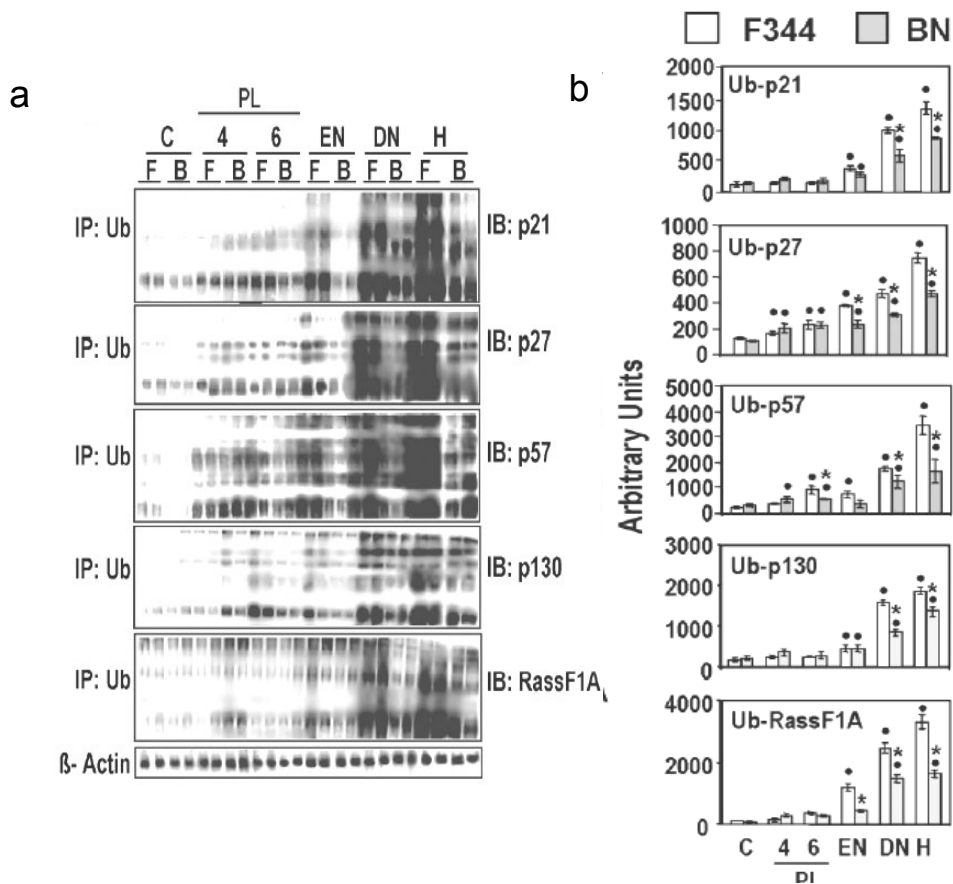


Figura 13: Analisi rappresentativa degli immunocomplessi tra ubiquitina (Ub) e proteine regolatrici del ciclo cellulare in lesioni epatiche preneoplastiche (PL), noduli precoci (EN), noduli displastici (DN) ed epatocarcinoma (H) di ratti F344 e BN. (a) Analisi degli immunocomplessi determinati mediante immunoprecipitazione (IP) di uno dei due componenti seguita dall'immunoblot (IB) con anticorpi contro il secondo componente, come indicato. (b) Analisi di chemiluminescenza che mostra la media \pm DS di 5 ratti per il controllo, PL, noduli e CE. La densità delle bande è stata normalizzata ai livelli di β -actina ed espressa in unità arbitrarie (arbitrary units). Test di Tuckey-Kramer: asterisco, CE, noduli displastici e PL su fegato normale, $p < 0,001$; BN su F344, $p < 0,001$.

9.4 Correlazione tra l'espressione dei regolatori del ciclo cellulare e tasso di crescita dei CE umani

I risultati sopramenzionati indicano chiaramente che la regolazione post-trascrizionale degli inibitori del ciclo cellulare è associata con una rapida crescita e progressione del CE nei ratti. Per avvalorare ulteriormente il ruolo di questo fenomeno nella progressione del CE, abbiamo valutato comparativamente la correlazione dell'espressione degli inibitori, sia a livello proteico che di mRNA, con il tasso di crescita di un gruppo di CE umani con un indice di proliferazione altamente eterogeneo (proteina Ki67, $21,12 \pm 12,03$; mRNA, $158,62 \pm 131,65$, media \pm DS, $n=60$). L'analisi di regressione lineare (tabella 3) indica l'esistenza di una forte e altamente significativa correlazione negativa tra i livelli della proteina Ki67 e i livelli delle proteine p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} e p130. Per contro, è stata riscontrata una correlazione molto debole (p21^{WAF1}) o nessuna correlazione con i livelli di mRNA.

Gene	Expression		Correlation with proliferation index			
	Protein	mRNA	Protein		mRNA	
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	R ²	P	R ²	p
P21	158.61 \pm 131.65	0.0041 \pm 0.0031	0.6066	<0.0001	0.0830	0.0256
P27	130.45 \pm 109.30	0.0056 \pm 0.0044	0.5419	<0.0001	0.0020	0.7339
P57	136.92 \pm 132.36	0.0053 \pm 0.0042	0.3625	<0.0001	0.0562	0.0681
P130	115.65 \pm 79.14	0.0025 \pm 0.0019	0.4668	<0.0001	0.0356	0.10487
RassF1A	59.43 \pm 58.36	0.0036 \pm 0.0029	0.0356	0.1487	0.0568	0.0666

Tabella 3: Espressione dei livelli proteici e di mRNA dei regolatori del ciclo cellulare determinata mediante immunoprecipitazione e RT-PCR quantitativa, rispettivamente. I dati sono medie \pm DS di 60 CE umani. L'analisi di regressione lineare e di correlazione dell'indice di proliferazione (percentuale cellule Ki-67 positive) con i livelli di proteine ed mRNA dei regolatori del ciclo cellulare danno valori negativi di *R*, indicando una correlazione negativa.

9.5 Ipermetilazione del promotore dei regolatori del ciclo cellulare nei CE umani

Nei campioni umani sono stati dapprima analizzati i livelli proteici basali dei principali regolatori del ciclo cellulare mediante Western blot (Figura 14). Negli HCCB, è stata individuata iper-regolazione di p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130 e FOXO1, in comparazione al controllo e al tessuto non tumorale circostante (SL). Per contro, negli HCCP, si ha una significativa diminuzione dei regolatori del ciclo in comparazione a controllo e tessuto non tumorale circostante. I livelli di RASSF1A diminuiscono nel controllo e nel surrounding (SL) in entrambi i sottogruppi di CE. Sulla base di questi dati siamo andati a studiare i meccanismi di regolazione dei soppressori del ciclo cellulare e poiché i meccanismi epigenetici possono indurre l'inibizione trascrizionale di p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130, RASSF1A e FOXO1 (37, 38, 40, 90-93), è stata studiata la frequenza di ipermetilazione del promotore di questi geni nei 2 sottogruppi di CE mediante PCR metilazione specifica (msPCR) (Figura 15A). Attraverso questo studio si è constatato che la metilazione aberrante di p21^{WAF1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2} si ha nel 23%, 37% e 33% degli HCCP rispettivamente e nel 5%, 10% e 20% degli HCCB, suggerendo che l'inattivazione di questi geni è coinvolta nella progressione del CE (Figura 15A). Non sono state individuate differenze significative tra HCCB e HCCP nella frequenza della metilazione del promotore di P130, RASSF1A e FOXO1 (Figura 15A).

Successivamente suddividendo i due sottotipi di tumore in due sottogruppi in base allo stato di metilazione del promotore, è stato possibile osservare nei tumori non metilati (Figura 15B), l'atteso aumento dei livelli di mRNA di p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130, RASSF1A e FOXO1, senza differenze tra i sottogruppi di tumore. I livelli delle proteine dei regolatori del ciclo cellulare, negli HCCB, riflettono il pattern dell'mRNA. Per contro, si ha una bassa espressione proteica degli inibitori del ciclo cellulare che caratterizza tutti gli HCCP indipendentemente dallo stato di metilazione del tumore (Figura 15B), questo suggerisce l'esistenza di meccanismi post-trascrizionali che riducono fortemente la loro attività nei CE più aggressivi.

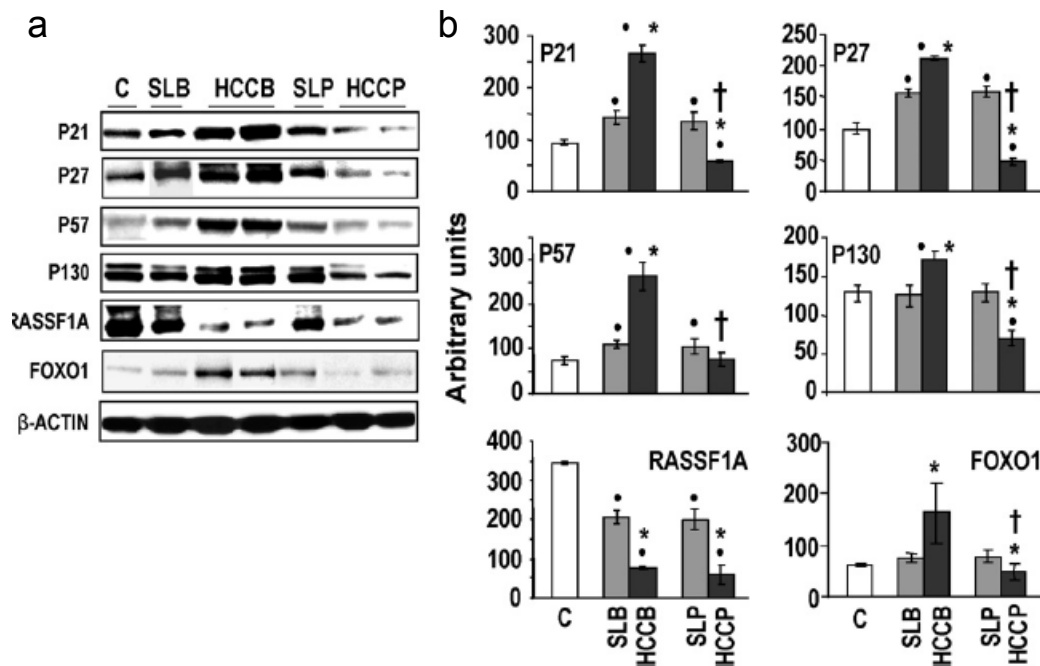


Figura 14: Livelli proteici di P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P130, RASSF1A e FOXO1 nel CE umano. (a) Western blot. I lisati di tessuti epatici sono stati sottoposti a Western blotting con anticorpi specifici. (b) Analisi di chemiluminescenza che mostra la media \pm DS di 6 fegati normali, 30 HCCB e 30 HCCP e corrispondenti tessuti non tumorali circostanti con migliore o peggior prognosi. Le bande sono state quantificate mediante il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β -Actina ed espresse in unità arbitrarie. Test di Tuckey-Kramer: HCCB e HCCP su fegato normale, $p < 0,001$; asterisco: sottotipi di CE su corrispondenti tessuti non tumorali, $p < 0,001$; croce: differente da HCCB per $p < 0,001$. Abbreviazioni: HCCB e HCCP, CE con migliore e peggior prognosi; SLB e SLP, tessuto non tumorale circostante con migliore e peggior prognosi.

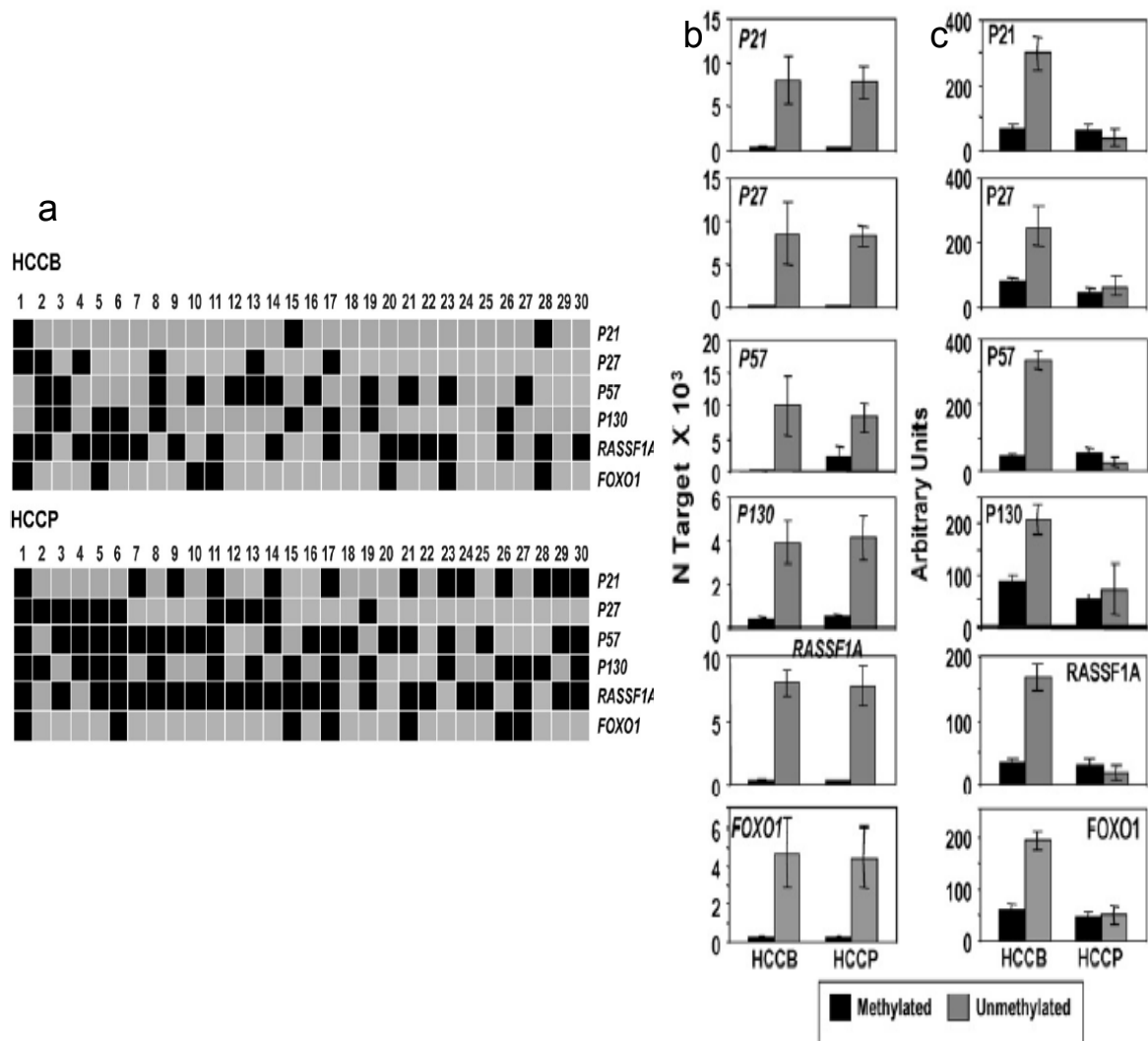


Figura 15: Effetto della metilazione dei promotori sull'espressione di P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P130, RASSF1A e FOXO1 nel CE umano. (a) la metilazione dei promotori è stata determinata mediante PCR metilazione specifica (msPCR). I promotori metilati e non metilati sono indicati dai quadratini neri e grigi rispettivamente. (b) Determinazione mediante RT-PCR quantitativa dell'effetto della metilazione del promotore sui livelli di mRNA dei regolatori del ciclo cellulare negli HCCB e HCCP. $N \text{ target} = 2^{-\Delta C_t}$, dove il valore ΔC_t di ciascun campione è stato calcolato sottraendo il valore C_t del gene target dal valore C_t del gene *RNR-18*. I dati sono medie \pm DS. (c) Determinazione, mediante Western blot, dell'effetto della metilazione del promotore sui livelli proteici dei regolatori del ciclo in HCCB e HCCP. I lisati di tessuti epatici sono stati sottoposti a Western blotting con anticorpi specifici. Le bande sono state quantificate mediante il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β -Actina ed espresse in unità arbitrarie. (a) Test di Fisher: metilati su non metilati, $p < 0,05$ per P21^{WAF1}, P27^{KIP1} e P57^{KIP2}. (b, c) Test t di Student: metilati su non metilati, $p < 0,001$ per i livelli di mRNA e proteine di HCCB e HCCP.

9.6 Ubiquitinazione dei regolatori del ciclo cellulare nel CE

Per valutare la regolazione degli inibitori del ciclo cellulare, abbiamo determinato l'espressione dei due componenti chiave del complesso SCF^{SKP2}, SKP2 e CKS1 e l'ubiquitinazione degli stessi inibitori. I nostri dati dimostrano un progressivo incremento nei livelli di mRNA di SKP2 dal tessuto circostante non tumorale al CE, senza differenze tra i due sottogruppi (Figura 16A). I livelli della proteina SKP2 invece risultano più alti negli HCCP (Figura 16B). Per quanto riguarda CKS1 invece, i suoi livelli di mRNA e proteici aumentano significativamente negli HCCP, e meno negli HCCB (Figure 16A e 16B). In maniera interessante, i livelli citoplasmatici e nucleari di SKP2 negli HCCB sono risultati circa 3 volte più alti dei corrispondenti nel fegato normale, mentre negli HCCP l'espressione a livello nucleare e citoplasmatico di SKP2 è risultata 4,8 e 15,8 volte più alta rispetto al fegato normale (Figura 16B); questo indica che l'accumulo nucleare di SKP2 è una caratteristica predominante negli HCCP. Questo dato è stato confermato dall'immunoistochimica di SKP2 (Figura 18), che ha mostrato una bassa colorazione Ki67 e la localizzazione citoplasmatica di SKP2 negli HCCB, nonché una localizzazione nucleare di SKP2 negli HCCP a rapida crescita (alta positività alla colorazione Ki67). Inoltre, negli HCCP sono stati riscontrati valori più elevati dei complessi tra SKP2 e p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130, RASSF1A e FOXO1, di RASSF1A fosforilato e degli oncosoppressori ubiquitinati (Figura 16C e 17).

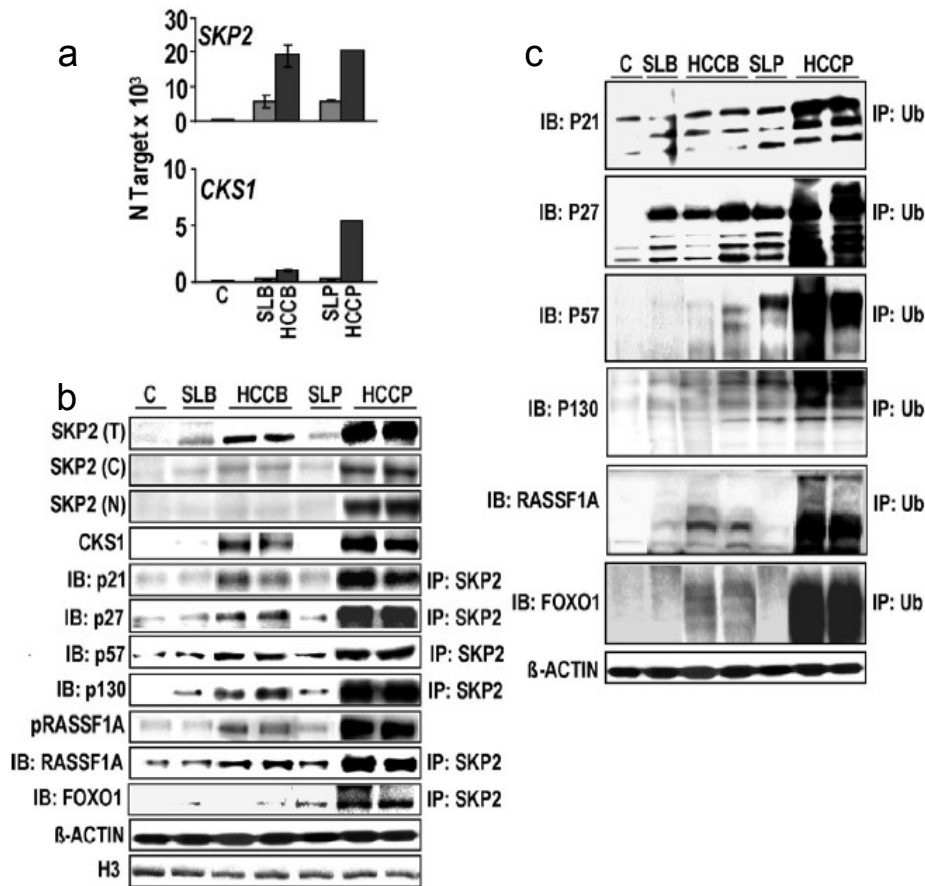


Figura 16: (a) Determinazione dei livelli di mRNA di SKP2 e CKS1 e (b, c) dei livelli proteici di SKP2, CKS1 e dei regolatori del ciclo cellulare in fegato normale, lesioni neoplastiche con migliore o peggior prognosi (HCCB e HCCP) e rispettivi tessuti non tumorali circostanti (SLB e SLP). (a) $N \text{ target} = 2^{-\Delta C_t}$, dove il valore ΔC_t di ciascun campione è stato calcolato sottraendo il valore C_t del gene target dal valore C_t del gene *RNR-18*. I dati sono medie \pm DS. Test Tuckey-Kramer: CE ed SL su controllo, e CE su SL, $p < 0,001$. (b) Determinazione mediante Western blot dei livelli di SKP2 totale (T), citoplasmatico (C) e nucleare (N) e di CKS1 totale; determinazione degli immunocomplessi mediante immunoprecipitazione (IP) di un componente seguita da immunoblot con anticorpi contro il secondo componente (IB), come indicato. (c) Determinazione degli immunocomplessi mediante immunoprecipitazione dell'ubiquitina (Ub) seguita da immunoblot con anticorpi contro il secondo componente.

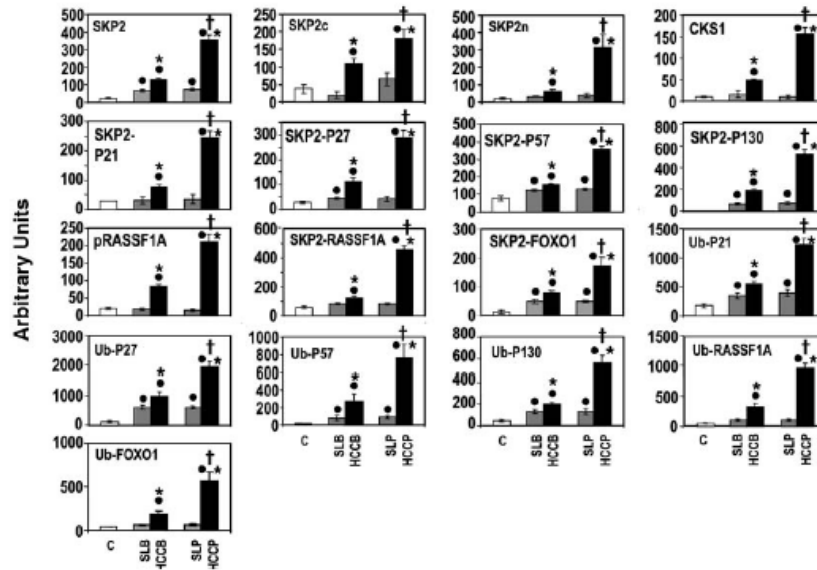


Figura 17: Analisi quantitativa di immunoprecipitazione e Western blot dell'espressione dei regolatori del ciclo cellulare nel fegato normale (C), lesioni neoplastiche HCCB e HCCP e corrispondenti tessuti non tumorali circostanti (SL). I lisati proteici sono stati immunoprecipitati con anticorpi specifici e separati mediante SDS-PAGE. Gli immunocomplessi sono stati determinati mediante immunoprecipitazione di un componente seguita dall'immunoblot con anticorpi contro il secondo componente, come indicato. Le bande sono state quantificate mediante il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β -Actina ed espresse in unità arbitrarie. La densità delle proteine ubiquitinate è data dalla somma delle densità delle forme mono- e poli-ubiquitinate. I dati sono medie \pm DS di 6 fegati normali e 30 HCCB con SLB e 30 HCCP con SLP. Test di Tuckey-Kramer: CE ed SL su fegato normale, $p < 0,001$; asterisco: sottotipi di CE su corrispondenti SL, $p < 0,001$; croce: differente da HCCB per $p < 0,001$.

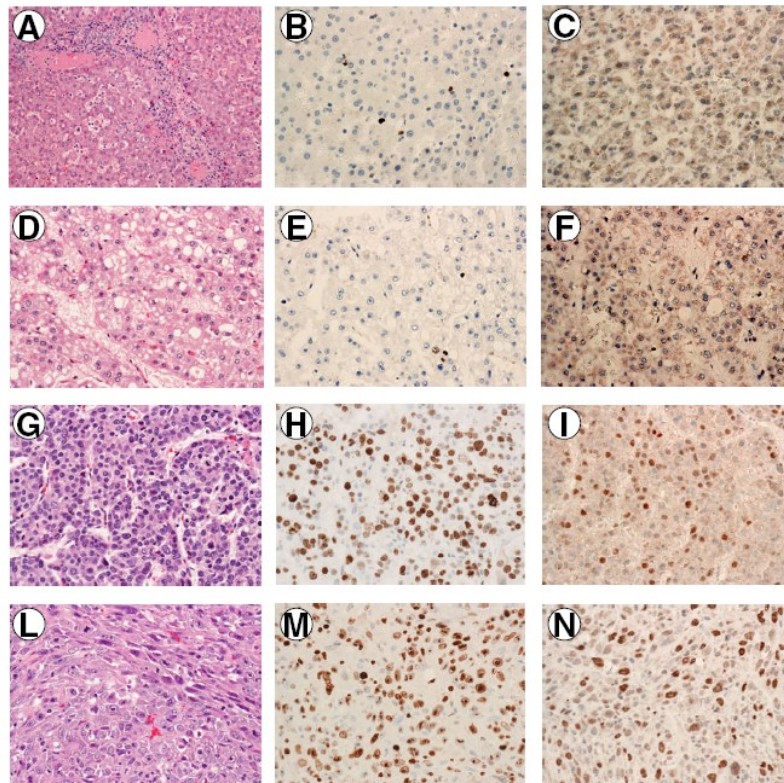


Figura 18: Colorazione con ematossilina/eosina (A, D, G, L) e immuno-colorazione con Ki67 (B, E, H, M) e SKP2 (C, F, I, N) di tessuti non tumorali circostanti (A-C), HCCB (D-F), HCCP di grado G2 (G-I) e HCCP di grado G3 (L-N). Notare la bassa attività proliferativa (Ki67) e la localizzazione prevalentemente citoplasmatica di SKP2 negli HCCB ben differenziati e l'elevato Ki67 e localizzazione nucleare di SKP2 negli HCCP moderatamente e scarsamente differenziati. I gradi G2 e G3 sono in accordo alla classificazione di Edmonson-Steiner. Ingrandimento: A-C, 100x e D-N, 200x.

9.7 La manipolazione in vitro dell'espressione di SKP2 influenza la proliferazione cellulare e la degradazione degli oncosoppressori del ciclo cellulare

Per sostenere ulteriormente il ruolo di SKP2 nella modulazione dei regolatori del ciclo cellulare, abbiamo trasfettato in vitro cellule SKI (esprimenti bassi livelli basali di SKP2) con cDNA wild-type di SKP2. L'iperespressione forzata di SKP2 ha causato un aumento del tasso di crescita, proporzionale all'espressione di SKP2, (Figura 19A) e l'iperregolazione di ciclina D1 e ciclina D2 (Figura 19B). Inoltre l'iperregolazione di SKP2 attiva una significativa iporegolazione di p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}, p130, RASSF1A e FOXO1 (Figura 19C e 20), la quale è stata però abolita dall'ulteriore aggiunta nel terreno di coltura degli inibitori proteasomici (N-acetil-Leu-Leu-norleucinal (ALLN) o carbobenzossi-L-leucil-L-leucil-leucinal (MG132)) (Figura 19C e 20). Inoltre l'elevata quantità di SKP2 fa sì che aumenti l'attività cinasica di CDK2 (Figura 21A). Per contro, a conferma dei nostri risultati in cellule SKI, in cellule Huh7 (che esprimono alti livelli basali di SKP2) l'inibizione di SKP2 mediante siRNA induce una riduzione della crescita cellulare, proporzionale alla diminuzione del livello di SKP2, l'incremento degli inibitori del ciclo cellulare (Figura 19D) e il declino dell'attività cinasica di CDK2 (Figura 21B).

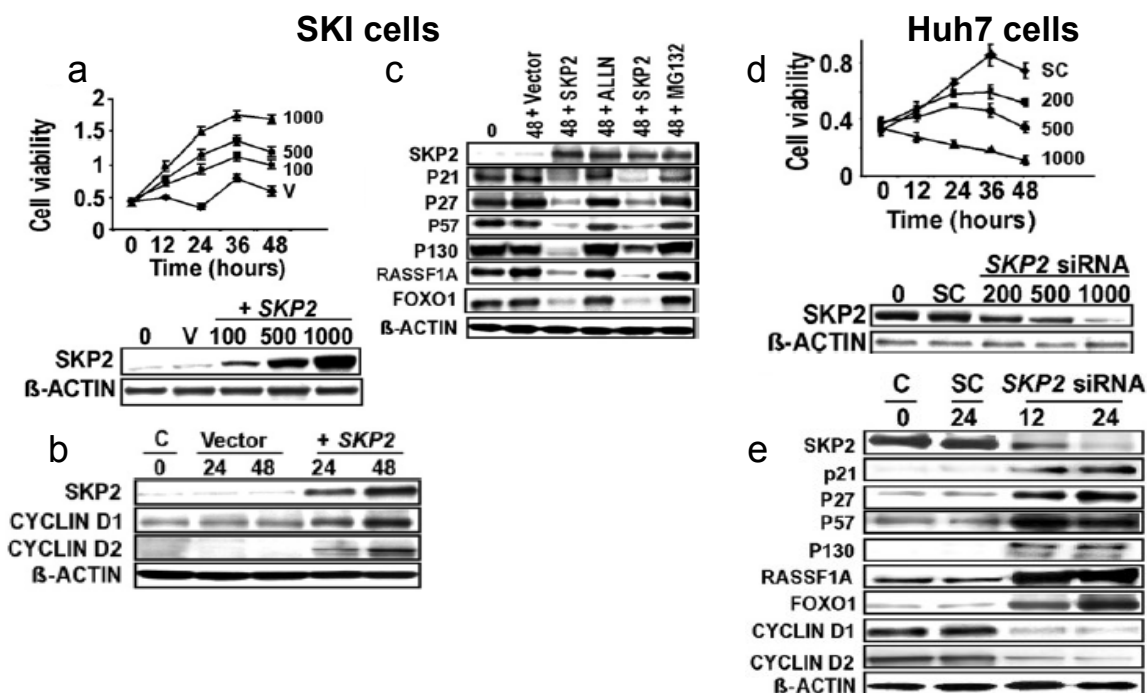


Figura 19: Effetto della variazione dell'espressione di SKP2 sulla vitalità cellulare e i livelli proteici dei regolatori del ciclo cellulare in cellule di epatocarcinoma umano. (a) Le cellule SKI sono state trasfettate in maniera transiente con cDNA di SKP2 in un vettore pCMV6-XL o con un vettore vuoto (V). I dati sono medie \pm DS di 3 differenti esperimenti condotti in triplicato. Test di Tuckey-Kramer: cDNA di SKP2 su vettore vuoto, $p < 0,05$ a 12-24h. (b, c) Le cellule SKI sono state trasfettate in maniera transiente con 100ng di cDNA di SKP2 in un vettore pCMV6-XL o con un vettore vuoto (V). Le cellule sono state raccolte 24 e 48h (b) o 48h (c) dopo la trasfezione. Dove indicato sono stati aggiunti gli inibitori proteasomici ALLN ed MG132 alle concentrazioni di 10 e 25 μ M rispettivamente e lasciati incubare per almeno 3h. I controlli sono cellule non trasfettate (0). (d) Cellule Huh7 trasfettate con i nanogrammi indicati di siRNA contro SKP2 o dell'oligonucleotide scramble (SC). I dati sono medie \pm DS di 3 differenti esperimenti condotti in triplicato. Test di Tuckey-Kramer: siRNA di SKP2 su scramble, $p < 0,05$ a 12-24h. (e) Le cellule Huh7 sono state trasfettate con 200ng di siRNA SKP2 o scramble e raccolte 12 e 24h dopo la trasfezione. I lisati proteici sono stati sottoposti a Western blot con specifici anticorpi.

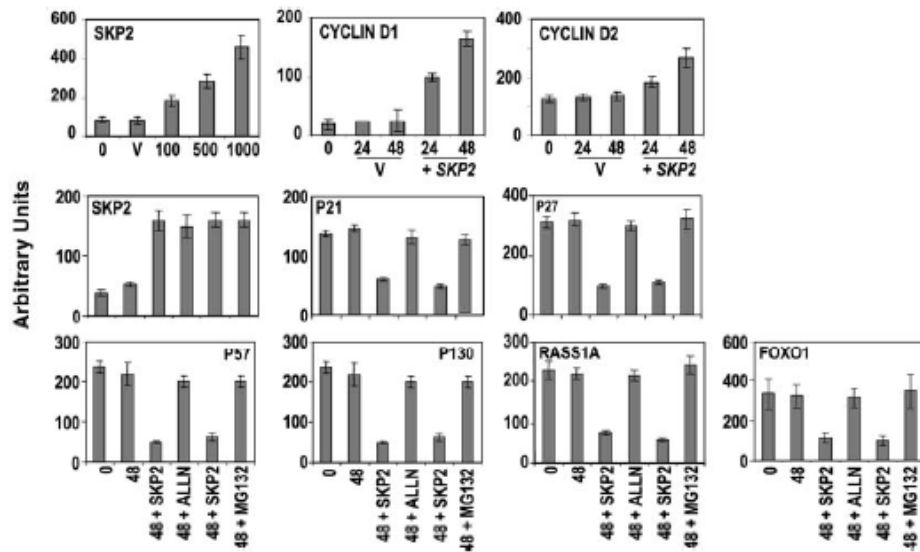


Figura 20: Analisi di chemiluminescenza sull'effetto della trasfezione transiente con cDNA SKP2 wild-type in cellule SKI. Quando non indicato, sono stati usati 100ng di cDNA SKP2 in un vettore pCMV6-XL o vettore vuoto. Quando indicato, sono stati aggiunti gli inibitori proteasomoci ALLN ed MG132 alla concentrazione di 10 e 25 μ M rispettivamente. Le cellule sono state raccolte 48h dopo la trasfezione. I controlli sono cellule non trasfettate (C) e cellule trasfettate solo con il vettore (V). I lisati di proteine sono state sottoposte a Western blot con specifici anticorpi. Le bande sono state quantificate mediante il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β -Actina ed espresse in unit  arbitrarie. I dati sono medie \pm DS di 3 diversi esperimenti eseguiti in triplicato. Test di Tuckey-Kramer: 48+SKP2 su 48 e 48+ ALLN o MG132 su 48+SKP2, $p < 0,0001$.

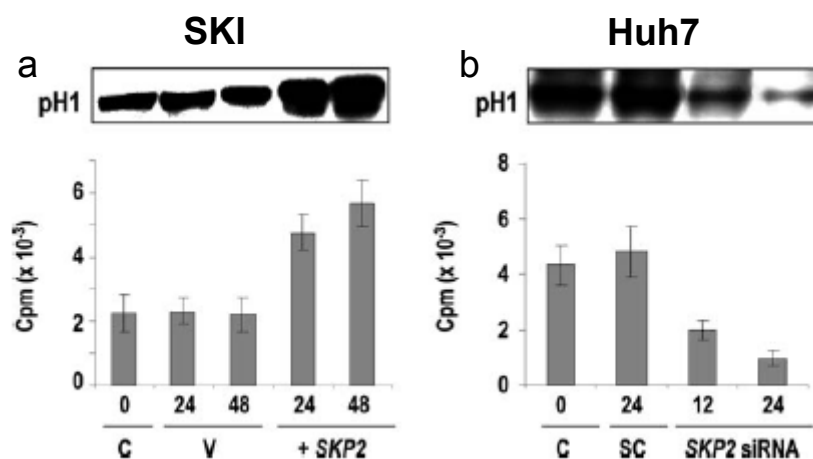


Figura 21: Effetto della variazione di SKP2 sull'attività della cinasi CDK2 in cellule umane di CE. Per la valutazione di CDK2 sono stati incubati 100 μ g di lisati proteici con anticorpo anti-CDK2, seguito da immunoprecipitazione con proteina A (agarose conjugate). La proteina è stata poi separata mediante SDS-PAGE. L'istone fosforilato H1 è stato visualizzato mediante autoradiografia. I gel sono stati fatti seccare ed esposti al Phosphoimager per l'analisi quantitativa. (a) Le cellule SKI sono state trasfettate in maniera transiente con 100ng di cDNA SKP2 wild-type in vettore pCMV6-XL o vettore vuoto. I controlli sono cellule non trasfettate (0). I dati sono medie \pm DS di 3 diversi esperimenti eseguiti in triplicato. Test di Tuckey-Kramer: cDNA SKP2 su vettore vuoto, $p < 0,001$ a 24 e 48h. (b) Le Huh7 sono state trasfettate con 200ng di siRNA contro SKP2 o oligonucleotide scramble. I controlli sono cellule non trasfettate (0). I dati sono medie \pm DS di 3 diversi esperimenti eseguiti in triplicato. Test di Tuckey-Kramer: siRNA SKP2 su scramble, $p < 0,001$ a 12 e 24h.

9.8 La distruzione del sistema CDK2/CDC14B impedisce la degradazione di SKP2 negli HCCP

Recenti studi indicano che i livelli di SKP2 potrebbero essere regolati negativamente dalla degradazione mediata dal complesso APC/C-CDH1 dipendente (94, 95) e dall'iper-regolazione di HINT1, che interferisce con l'attività proteasomica mediata da SKP2 (82). CDH1, legandosi specificamente all'ubiquitin-ligasi APC, attiva la proteolisi delle cicline della fase M e G1 ed è indispensabile per la corretta transizione della fase G1/S. Questo suggerisce che la deregolazione della proteolisi di questi substrati, mediata da APC/CDH1, potrebbe essere coinvolta nell'inizio del processo di cancerogenesi. Poiché è stato osservato che l'iperregolazione di CDH1 contribuisce all'induzione di SKP2 nel tumore colon-rettale e mammario (94, 95), abbiamo valutato se anche nel CE dell'uomo esistesse lo stesso meccanismo. Dai nostri risultati emerge che i livelli di SKP2 ubiquitinato aumentano progressivamente dal tessuto non tumorale circostante all'HCCB, mentre negli HCCP è stata riscontrata una ridotta quantità di SKP2 ubiquitinato (Figura 22A e B). Una sorta di iper-regolazione di CDH1 si ha dai fegati non neoplastici al CE, con più alti livelli negli HCCP (Figura 22A e B), questo fa escludere che la perdita di CDH1 sia responsabile degli elevati livelli di SKP2. D'altro lato però, dai nostri dati si evince che SKP2 si sottrae alla proteolisi dipendente da APC/C attraverso la fosforilazione della serina condotta da CDK2, mentre la defosforilazione di SKP2 da parte di CDC14B

promuove la sua degradazione mediata da APC/C (96). Perciò, abbiamo determinato che in ogni caso il sistema CDK2–CDC14B è deregolato negli HCCP. In questo tipo di tumore infatti, sono stati trovati livelli più alti di CDK2, dei complessi CDK2-SKP2 e di SKP2 fosforilato (Figura 22A e B), associati ad una bassa espressione di mRNA e proteina CDC14B (Figura 22A e C). Questo suggerisce un'interferenza tra l'iper-regolazione di CDK2 e la bassa espressione di CDC14B sulla degradazione di SKP2 dipendente da CDH1. Per contro, negli HCCB, la minor induzione di CDK2 e dei complessi CDK2-SKP2 nonché la forte iper-regolazione di CDC14B e dei complessi CDC14B-SKP2 è stata associata ad una minor fosforilazione di SKP2 (Figura 22A e C). In accordo con queste osservazioni, il legame di SKP2 a CDH1, richiesto per la sua degradazione, è risultato molto basso negli HCCP e alto negli HCCB (Figura 22A e B); questo spiega dunque l'elevata ubiquitinazione di SKP2 nei tumori meno maligni. Inoltre, abbiamo osservato che la soppressione di CDK2 mediante trasfezione con siRNA in cellule Huh7 ed HLE causa ipo-regolazione di SKP2, la sua fosforilazione, l'incremento dei complessi SKP2-CDH1 e di SKP2 ubiquitinato (Figura 23A). Gli effetti opposti sui livelli di SKP2 si hanno quando nello stesso tipo di cellule viene inibito, mediante siRNA, CDC14B (Figura 23B). Mentre né l'inattivazione di CDK2 né la soppressione di CDC14B mediante siRNA ha avuto un effetto apprezzabile sull'ubiquitinazione di CKS1, implicando l'esistenza di diversi

meccanismi regolatori responsabili per la degradazione di SKP2 e CKS1 nelle cellule di epatocarcinoma.

Studi preliminari per capire i meccanismi che caratterizzano il differente comportamento di CDC14B nei due sottotipi di CE indicano che l'agente ipometilante 5-Aza-citidina, solo o in combinazione con l'inibitore dell'istone deacetilasi Tricostatina A, non iper-regola CDC14B in cellule HepG2, (come in Hep3B e PLC) (Figura 24C), questo esclude una repressione del promotore di CDC14B mediante metilazione negli HCCP a rapida crescita. In maniera interessante, si osserva perdita di eterozigosi nel locus CDC14B nel 6,6% e 36,6% degli HCCB e HCCP rispettivamente (Figure 24A e B).

Infine, per quanto riguarda la regolazione di SKP2 mediata da HINT1, i nostri dati dimostrano che l'ipermetilazione del gene promotore di HINT1, significativamente più frequente negli HCCP che negli HCCB (70% e 16,6% rispettivamente, $p < 0,0001$, Figura 25A), era associata con un'espressione di HINT1 molto bassa, mentre HINT1 risulta iper-regolato negli HCCB (Figura 25B) dove modula negativamente l'espressione di SKP2. Complessivamente, questi dati, indicano che alterazioni multiple nei meccanismi responsabili del controllo di SKP2 e la sua soppressione sono persi negli HCCP, portando a un'incontrollata attività di SKP2 stesso.

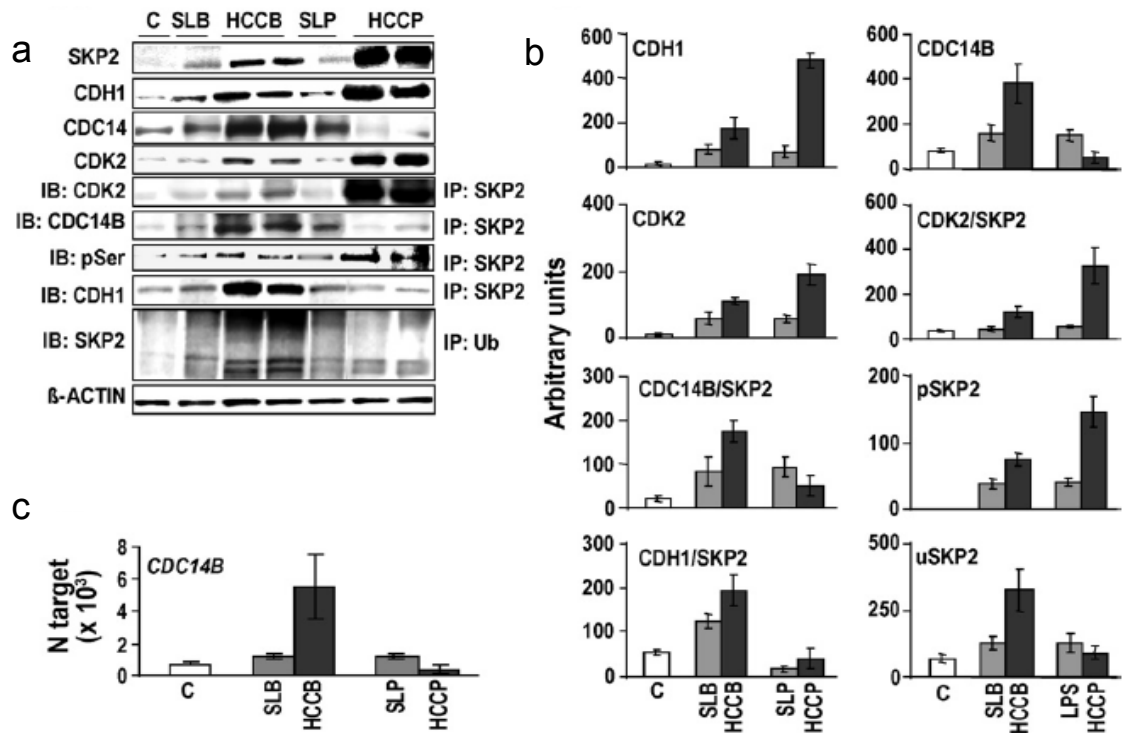


Figura 22: Livelli di SKP2, CDH1, CDC14B, CDK2 e pSKP2 in fegato normale, lesioni neoplastiche con migliore (HCCB) o peggior (HCCP) prognosi e corrispondenti tessuti non tumorali circostanti (SL). (a) Western blot e immunoprecipitazione. (b) analisi di chemiluminescenza che mostra la media \pm DS di 6 fegati normali, 30 HCCB e 30 HCCP e corrispondenti SL. Gli immunocomplessi sono stati determinati mediante immunoprecipitazione (IP) di un componente eseguita da immunoblot con anticorpi contro il secondo componente (IB), come indicato. Le bande sono state quantificate con il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β -Actina ed espresse in unit  arbitrarie. Test di Tuckey-Kramer: HCCB, HCCP e SL su fegato normale, $p < 0,001$; HCCB e HCCP su SL corrispondenti, $p < 0,05$. HCCB su HCCP, $p < 0,001$. (c) determinazione del gene CDC14B mediante RT-PCR quantitativa. $N \text{ target} = 2^{-\Delta C_t}$, dove il valore ΔC_t di ciascun campione   stato calcolato sottraendo il valore C_t del gene target dal valore C_t del gene *RNR-18*. I dati sono medie \pm DS di 6 fegati normali, 30 HCCB e 30 HCCP con corrispondenti SL. Test di Tuckey-Kramer: CE su SL, $p < 0,01$ e HCCB su controllo, $p < 0,001$.

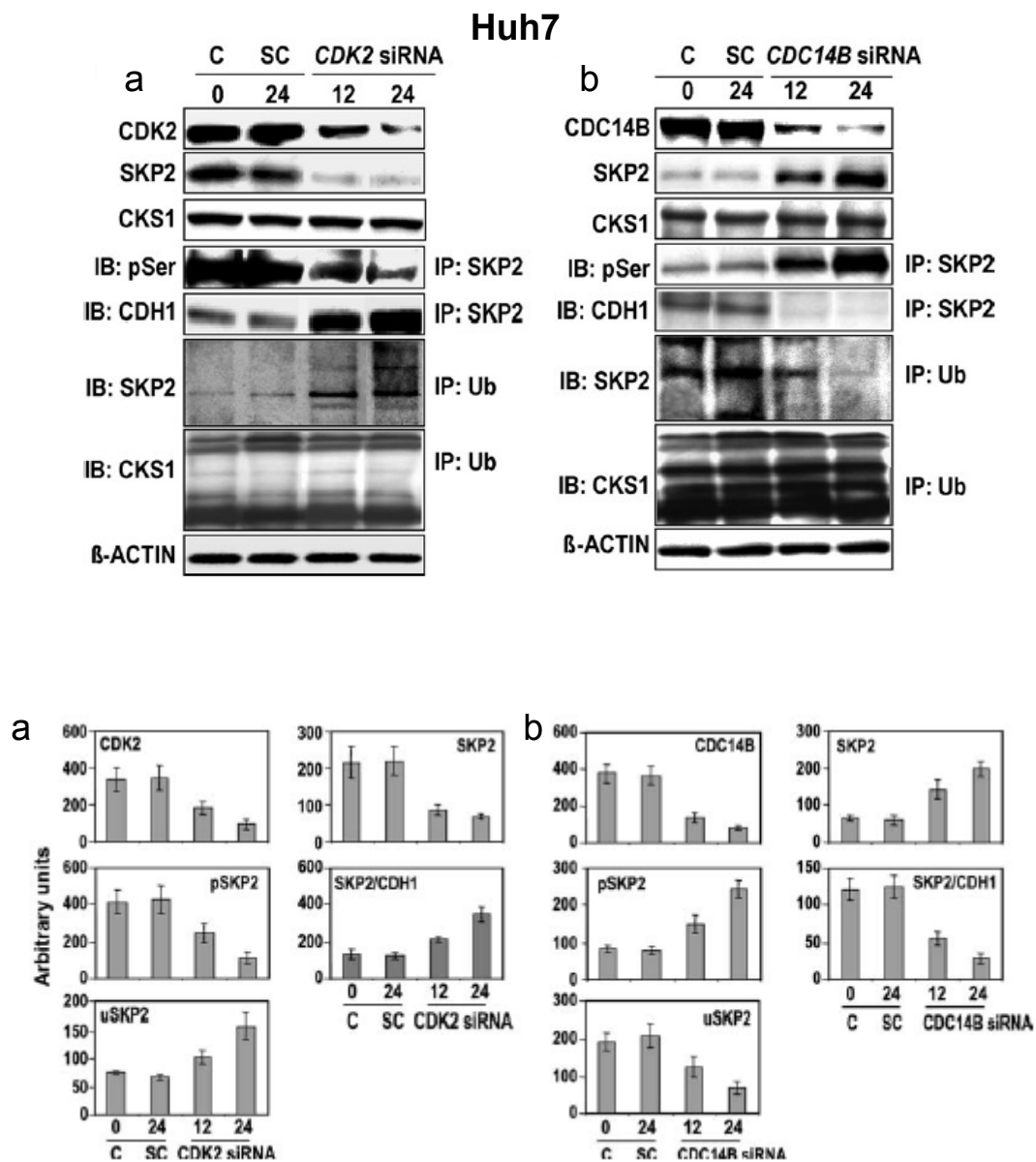


Figura 23: Effetto della variazione di CDK2 (a) e CDC14B (b) sui livelli proteici di SKP2 e sulla sua fosforilazione e ubiquitinazione e sulla formazione del complesso SKP2-CDH1 in linee cellulari umane Huh7. Le cellule sono state trattate con siRNA contro CDK2 (a) e CDC14B (b) rispettivamente, per 12 e 24h. Risultati equivalenti sono stati ottenuti in cellule HLE. I controlli (C) sono cellule non trattate (0) o che hanno ricevuto l'oligonucleotide scramble per 24h. I livelli proteici sono stati osservati mediante Western blot e immunoprecipitazione. Gli immunocomplessi sono stati determinati mediante immunoprecipitazione (IP) di un componente seguita da immunoblot con anticorpi contro il secondo componente (IB), come indicato. Le bande sono state quantificate mediante il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β-Actina ed espresse in unità arbitrarie. Le unità arbitrarie di SKP2 ubiquitinato (uSKP2) sono calcolate sulla base della somma delle densità delle forme mono- e poli-ubiquitinate. I controlli (C) sono cellule non trattate (0) o trattate con oligonucleotide scramble (SC) per 24h. I dati sono medie ± DS di 3 diversi esperimenti eseguiti in triplicato. Test di Tuckey-Kramer siRNA su C (0) o SC, $p < 0,001$ per tutte le proteine testate.

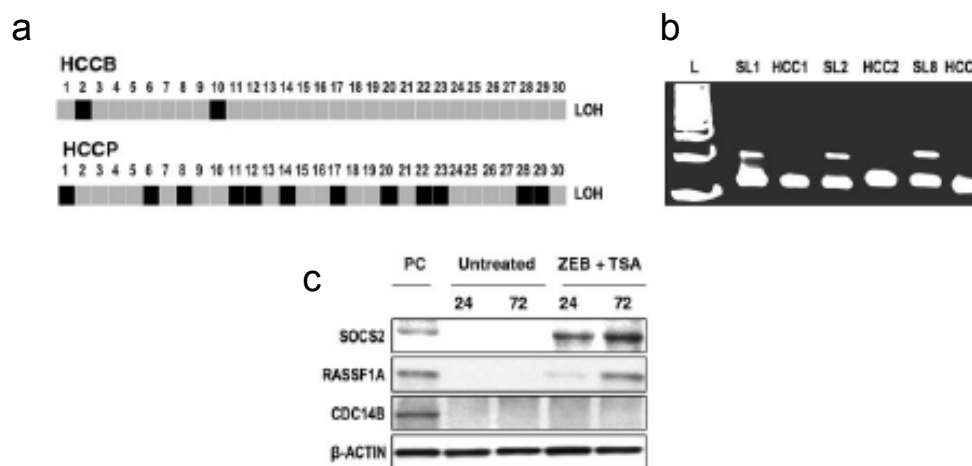


Figura 24: L'ipo-regolazione di CDC14B è associata, nel CE, con alterazioni genomiche. a) Il locus di CDC14B è stato studiato mediante l'analisi dei microsatelliti in 30 HCCB e 30 HCCP. Ciascun CE è stato comparato con il rispettivo tessuto non tumorale circostante (SL). I campioni affetti da perdita di eterozigosi (LOH) o meno sono indicati rispettivamente con i quadratini neri e grigi. b) Analisi rappresentativa dei microsatelliti sul locus di CDC14B mostra LOH in HCC1, HCC2 e HCC8 come rilevato dal microsatellite primers D9S1145. c) Le cellule HepG2 sono state lasciate crescere 24h prima dell'aggiunta di Zebularina (ZEB) o dell'inibitore dell'istone deacetilasi Tricostatina A (TSA). Qui è mostrato solo l'uso concomitante dei due farmaci poiché tale trattamento si traduce in un effetto più evidente sulla riattivazione dell'espressione genica. La combinazione di ZEB+TSA inoltre attiva la ri-espressione dei soppressori tumorali SOCS2 e RASSF1A ma non di CDC14B. Tutti gli esperimenti sono ripetuti 3 volte in triplicato. Risultati simili sono stati ottenuti in Hep3B e PLC. Abbreviazioni L, DNA controllo; PC, controllo positivo.

9.9 L'ubiquitinazione di p27^{KIP1} non dipende da WNT10B

Un recente articolo indica che la degradazione di p27^{KIP1} nei tumori mammari attraverso l'ubiquitinazione indipendente da SKP2, dipende dall'iper-espressione di WNT10B, un membro della via Wingless/Wnt (97). Per questo motivo abbiamo studiato lo status di WNT10B nei nostri campioni ed è risultato che WNT10B è ipo-regolato negli HCCP a causa dell'ipermetilazione del suo promotore (20/30; 66,6%; Figura 25A e B). Per contro, WNT10B ha mostrato una maggiore iper-regolazione negli HCCB, nei quali era iper-regolato dal silenziamento epigenetico solo in 3 di 30 (10%) CE (Figura 25B). Inoltre, la soppressione di WNT10B in cellule Huh7 ed HLE non induce l'iper-regolazione di p27^{KIP1}, questo indica che la degradazione dei regolatori del ciclo cellulare nel CE umano è indipendente dall'espressione di WNT10B.

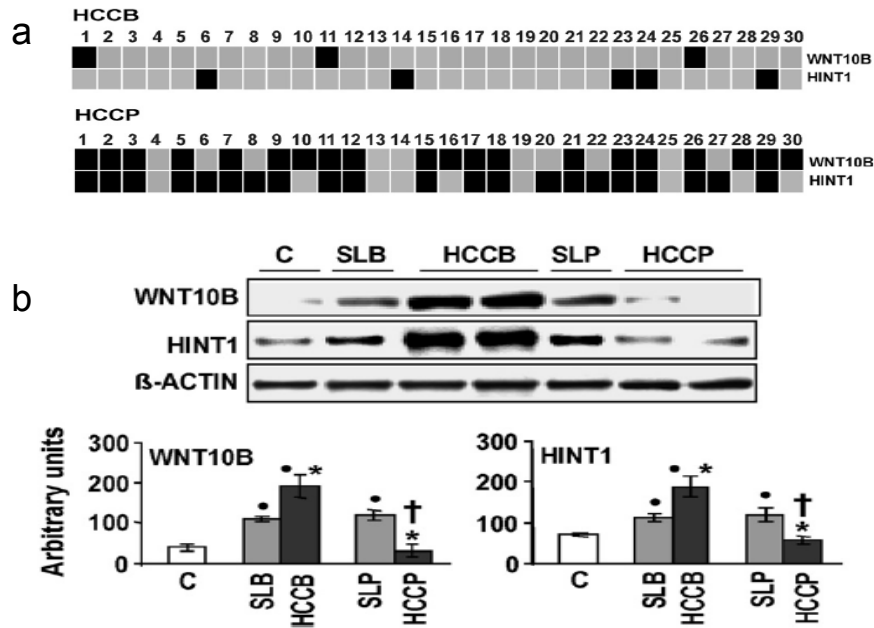


Figura 25: Effetto della metilazione del promotore sull'espressione di WNT10B e HINT1 nel CE umano. (a) la metilazione del promotore è stata determinata mediante msPCR in 30 HCCB e HCCP. I promotori metilati e non metilati sono indicati dai quadrati neri e grigi rispettivamente. (b) Western blot e analisi quantitativa dei livelli proteici di WNT10B e HINT1 in fegato normale (C), HCCB e HCCP e corrispondenti tessuti non tumorali circostanti (SL). I lisati di tessuti epatici sono stati sottoposti a Western blot con anticorpi specifici. Le bande sono state quantificate mediante il Quantity One 1-D Analysis Software, normalizzate ai livelli di β -Actina ed espresse in unità arbitrarie. (a) Test di Fisher: metilati su non metilati, $p < 0,0001$ per WNT10B e HINT1. (b) Test di Tuckey-Kramer: sottotipi di CE e SL su fegato normale, $p < 0,001$; asterisco: sottotipi di CE su SL, $p < 0,001$; croce: differente da HCCB per $p < 0,001$.

9.10 Correlazione tra livelli di SKP2 e parametri clinico-patologici del CE umano

Per studiare il ruolo prognostico di SKP2 nel CE dell'uomo, abbiamo valutato la correlazione tra i livelli di SKP2 ed alcune caratteristiche clinico-patologiche tipiche del tumore quali indice di proliferazione, densità microvasale e apoptosi. Abbiamo così potuto osservare che negli HCCB, l'indice di proliferazione e la densità microvasale era 2,36 volte più bassa ($p < 0,0001$) e l'indice apoptotico era 3,15 volte più alto ($p < 0,0001$) che negli HCCP. Abbiamo inoltre individuato una correlazione positiva tra SKP2 e l'indice di proliferazione ($r^2 = 0,939$, $p < 0,0001$) e tra SKP2 e la densità microvasale (MVD) ($r^2 = 0,767$, $p < 0,0001$) mentre si ha una correlazione inversa con l'apoptosi ($r^2 = 0,497$, $p < 0,0001$) e il tempo di sopravvivenza dei pazienti ($r^2 = 0,543$, $p < 0,0001$) (Figura 26). Non è stata individuata nessun'altra correlazione con altri parametri clinico-patologici, che includono eziologia, presenza di cirrosi, livelli di α -fetoproteina, e grado del tumore.

Inoltre per capire meglio la correlazione tra la crescita cellulare nel CE e l'espressione di SKP2, abbiamo trasfettato cellule di epatocarcinoma umano quali cellule SKI (che esprimono bassi livelli basali di SKP2) con geni chiave delle vie Ha-RAS, JAK/STAT, AKT e WNT/ β -CATENINA, che sono fortemente coinvolti nella proliferazione del CE (9, 98). Dai nostri dati emerge che, l'espressione forzata di *Ha-RAS*, *STAT5b*, *AKT* e *β -CATENINA* porta ad una iper-regolazione (Figura 27) e alla proliferazione cellulare,

suggerendo che SKP2 abbia un ruolo nella trasmissione dei segnali di proliferazione da parte di una cascata di molteplici oncogeni.

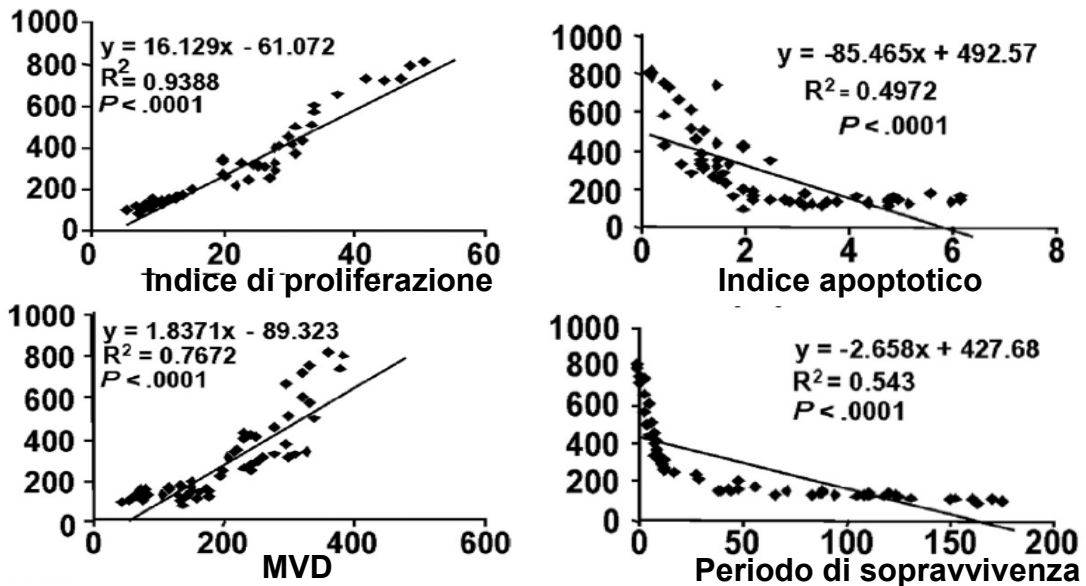


Figura 26: Correlazione tra i livelli proteici di SKP2 (in ordinate) e indice di proliferazione, densità microvasale (MVD), indice apoptotico e periodo di sopravvivenza in 30 HCCB e 30 HCCP. L'indice di proliferazione e apoptotico dei CE sono dati dal numero di cellule e corpi apoptotici positivi alla colorazione Ki-67 rispettivamente, espressi come percentuale degli epatociti totali. MVD indica la percentuale di porzioni colorate con anticorpo anti-CD34 per sezione di area.

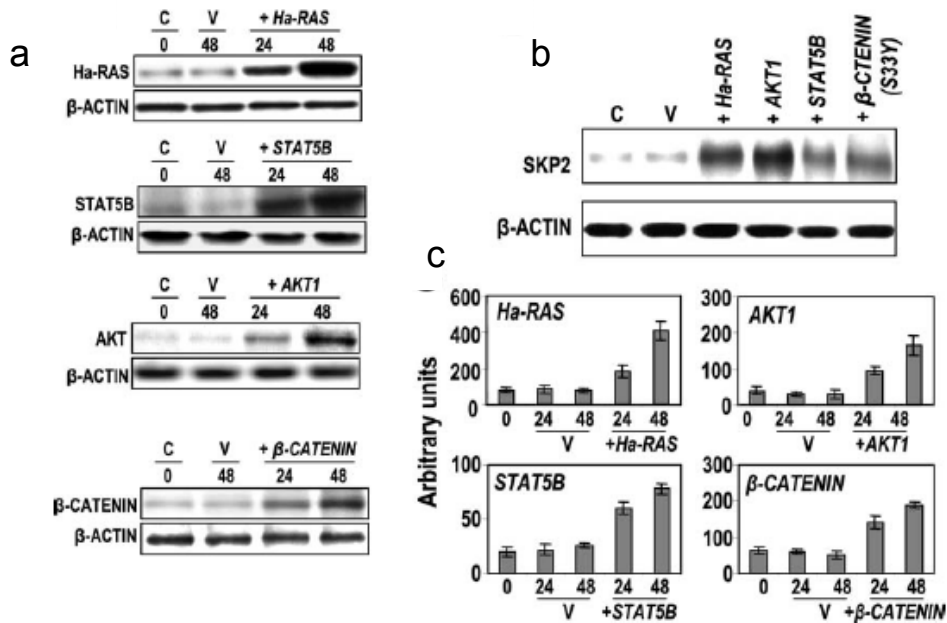


Figura 27: Analisi Western blot che mostra l'iper-regolazione di *Ha-RAS*, *AKT1*, *STAT5B* e β -*CATENINA* dopo trasfezione con cDNA degli stessi geni in cellule SKI. La trasfezione transiente è stata eseguita con 1000ng di cDNA di *Ha-RAS* (wild-type) in un plasmide pUSEamp (Millipore), *AKT1* e *STAT5B* in un plasmide pCMV6-XL (Origene Technologies) e il cDNA della β -*CATENINA* mutata in vettore pcDNA3 (Invitrogen). I livelli delle proteine Ha_RAS, AKT1, STAT5B e β -CATENINA sono stati mostrati 24 e 48h dopo la trasfezione. C, controllo a tempo 0, V, vettore, (b) Esperimento rappresentativo dell'iper-regolazione di SKP2 48h dopo la trasfezione con Ha-RAS, AKT1, STAT5B e β -CATENINA mutata in cellule SKI; non si hanno differenze sull'espressione di SKP2 in cellule trasfettate con i diversi plasmidi vuoti perciò sono mostrati solo i risultati con pUSEamp. (c) Analisi densitometrica rappresentante i dati del punto (a). Test di Tuckey-Kramer cellule trasfettate su vettore, $p < 0,001$ per tutti i geni.

10. DISCUSSIONE

Numerosi dati dimostrano un controllo epigenetico dei geni oncosoppressori nelle cellule tumorali (99). Diversi studi indicano che l'espressione dei regolatori del ciclo cellulare influenza la progressione del CE (100-102).

In cellule di mammifero la progressione della fase G1 è principalmente controllata dalla via regolatoria della ciclina-cinasi ciclina-dipendente (CDK)-proteina inibitrice del retinoblastoma (pRb).

Nel CE l'ipo-regolazione degli inibitori delle CDK codificate da p16^{INK4}, della famiglia di geni WAF/KIP, p130 e RASSF1A può dipendere dall'inibizione trascrizionale causata dall'ipermetilazione dei promotori (91, 92). Tuttavia, in numerosi uomini e ratti con CE i regolatori del ciclo cellulare sono iperespressi e predominantemente inattivati da una regolazione post-trascrizionale (41, 42, 103). Numerosi studi sottolineano il ruolo del complesso SKP2-CKS1 ligasi nell'ubiquitinazione e nella degradazione proteasomica di P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2} e RASSF1A in diversi tipi di tumore (46, 56, 57, 104), incluso il CE.

I nostri risultati suggeriscono fortemente che l'espressione dei componenti del complesso CKS1-SKP2 ligasi e l'ubiquitinazione e degradazione proteasomica dei regolatori del ciclo cellulare WAF/KIP così come di p130 e RASSF1A siano sotto il controllo della suscettibilità genica al cancro. Le scarse conoscenze sulla natura dei geni che predispongono all'epatocancerogenesi ci

preclude la possibilità di identificare le interazioni epistatiche che regolano l'attività dell'ubiquitina ligasi e del proteasoma. Si potrebbe inoltre considerare la possibilità che l'influenza della suscettibilità genica possa essere indiretta. Infatti, il gene FOXM1 la cui espressione è sotto il controllo dell'espressione genica nel CE, può attivare il complesso Cks1-Skp2 ligasi. Inoltre Skp2 è un bersaglio di E2F e, conseguentemente, nel CE, la sua iper-regolazione potrebbe semplicemente riflettere la deregolazione della via Rb. Qualunque sia il meccanismo poligenico che controlla Cks1-Skp2, i nostri dati indicano che l'iper-regolazione di Cks1 e Skp2 è associata con l'acquisizione di un fenotipo suscettibile nei ratti. Infatti, l'attività di questo complesso aumenta significativamente 6/12 settimane dopo l'inizio dell'epatocancerogenesi nei ratti F344, cioè nel periodo di tempo in cui le lesioni preneoplastiche acquisiscono la capacità di crescere autonomamente. Per contro, l'attività di Cks1-Skp2 ligasi è relativamente bassa e l'espressione degli inibitori del ciclo cellulare relativamente alta nelle lesioni dei ratti BN dopo la 6^a settimana cioè in coincidenza con l'acquisizione del fenotipo resistente in questi ratti.

In particolar modo i nostri dati dimostrano che, nei CE, esiste una correlazione inversa tra proliferazione cellulare e i livelli proteici dei regolatori del ciclo cellulare ma non tra proliferazione e livelli di mRNA di questi. Questo indica un ruolo rilevante delle modificazioni post-traduzionali subite dagli inibitori del ciclo cellulare nel controllo della proliferazione del

CE umano e suggerisce che tali modificazioni possono avere un ruolo prognostico e diagnostico. Questo è in linea con le successive osservazioni che indicano che in maniera simile al CE dei ratti F344, il CE umano a peggior prognosi esibisce l'attiva ubiquitinazione e la degradazione delle proteine regolatrici negative del ciclo cellulare, mentre nei CE umani a miglior prognosi i regolatori del ciclo cellulare subiscono piccole variazioni, come nelle lesioni dei ratti BN, rispetto al fegato circostante.

Gli studi effettuati su campioni di CE umano, inoltre, hanno confermato un'ipermetilazione dei promotori di $P21^{WAF1}$, $P27^{KIP1}$, $P57^{KIP2}$, $P130$, $RASSF1A$ e $FOXO1$ nel CE e indicano che la frequenza di silenziamento genico per $P21^{WAF1}$, $P27^{KIP1}$ e $P57^{KIP2}$, è significativamente più alta negli HCCP rispetto agli HCCB. Inoltre i nostri risultati mostrano il ruolo della degradazione proteasomica di $P21^{WAF1}$, $P27^{KIP1}$, $P57^{KIP2}$, $P130$, $RASSF1A$ e $FOXO1$ nella determinazione del tasso di crescita e progressione delle lesioni epatiche umane. Infatti, negli HCCB i livelli di queste proteine aumentano significativamente rispetto ai livelli del fegato normale, mentre negli HCCP hanno un basso o nessun incremento. I livelli di $RASSF1A$ sono risultati più bassi in entrambi i tipi di tumore rispetto al fegato normale, suggerendo che la perdita di $RASSF1A$ è implicata nelle fasi precoci del tumore. Questo comportamento non può essere spiegato dalle differenze nella metilazione del promotore poiché una maggior quantità di mRNA è stata ugualmente prodotta da $P21^{WAF1}$, $P27^{KIP1}$, $P57^{KIP2}$, $P130$, $RASSF1A$ e $FOXO1$ non metilati sia negli

HCCB che negli HCCP; mentre i livelli di proteine aumentano solo negli HCCB non metilati e non negli HCCP indipendentemente dal loro stato di metilazione. Negli HCCP inoltre, abbiamo riscontrato una più elevata localizzazione nucleare di SKP2, sito in cui agiscono anche i regolatori del ciclo cellulare; si ha così una maggior formazione dei complessi tra SKP2 e P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P130, RASSF1A e FOXO1 e conseguentemente l'aumento dell'ubiquitinazione di queste proteine.

Inoltre, i nostri risultati indicano una regolazione trascrizionale dell'espressione di CKS1 e una regolazione post-trascrizionale di SKP2 e supportano fortemente il ruolo della ridotta proteolisi di SKP2 nel sostenere i suoi elevati livelli nell'HCCP dell'uomo. Precedenti studi in tumori mammari e colon-rettali umani hanno dimostrato una ipo-regolazione di CDH1 e una correlazione inversa tra SKP2 e i livelli di CDH1, suggerendo che l'iporegolazione di CDH1 potrebbe contribuire all'incontrollata proliferazione in questi tipi di tumore. Tuttavia, in contrasto con questa scoperta, CDH1 è iper-regolato nei CE, specialmente negli HCCP, implicando che altri meccanismi oltre alla sua ipo-regolazione sono responsabili dell'aumento di stabilità di SKP2 nei CE più aggressivi. Abbiamo dunque dimostrato che, negli HCCP, SKP2 è protetto dalla proteolisi, malgrado la forte iper-regolazione di CDH1, attraverso l'ipo-regolazione della fosfatasi CDC14B e la fosforilazione della serina 64 e 72 dipendente da CDK2, che impedisce l'interazione tra CDH1 e SKP2 (Figura 28). Questi dati sono anche

confermati in studi in vitro su cellule HeLa (97). Inoltre i livelli di HINT1, che neutralizzano l'attività di degradazione di SKP2 (82), sono estremamente bassi negli HCCP. Dunque, insieme alla recente scoperta che FOXM1 iper-regola SKP2 nel CE umano (60), i presenti dati indicano che i CE più aggressivi elaborano un complesso programma genetico che porta all'incontrollata iper-regolazione di SKP2. E' interessante notare che CDK2 è un bersaglio di FOXM1 nel fegato (54), questo indica che FOXM1 influenza fortemente i livelli di SKP2 sia per quanto riguarda l'induzione trascrizionale sia inibendo la sua degradazione. D'altro lato i presenti risultati implicano l'esistenza di un controllo efficiente della stabilità di SKP2 negli HCCB che interagisce con l'attività di CDH1 e CDC14B e l'iper-espressione di HINT1 (Figura 28). I meccanismi che sottolineano il differente comportamento di CDC14B nei due sottotipi di CE non sono chiari. I presenti dati indicano una regolazione trascrizionale di CDC14B. Tuttavia, la nostra osservazione che l'agente ipometilante 5-Aza-citidina, solo o in combinazione con l'inibitore dell'istone deacetilasi Tricostatina A, non iper-regola CDC14B nelle linee cellulari di CE prese in esame, esclude una repressione del promotore di CDC14B mediante metilazione negli HCCP a rapida crescita. In maniera interessante, si osserva perdita di eterozigosi nel locus CDC14B significativamente maggiore negli HCCP rispetto agli HCCB. Sono dunque necessari ulteriori studi per chiarire la relazione tra queste scoperte e i livelli di CDC14B nel CE. Abbiamo così identificato un meccanismo alternativo

secondo il quale SKP2 sfugge la degradazione mediata da APC/C anche in presenza di alti livelli di CDH1 (Figura 28).

Inoltre abbiamo osservato che i livelli di SKP2 sono direttamente correlati con il tasso di proliferazione e la densità microvasale (MVD) del CE e inversamente correlati con l'indice apoptotico e il periodo di sopravvivenza. In linea con queste scoperte, l'iper-espressione indotta di SKP2 in cellule di CE umano quali le SKI, attiva un forte incremento del tasso di proliferazione e favorisce la diminuzione dei livelli proteici dei regolatori del ciclo cellulare mentre aumenta l'espressione di CICLINA D1 e D2, che sono ipo-regolati da *RASSF1A* e *FOXO1* (32, 36). L'ipo-regolazione degli inibitori del ciclo cellulare risulta però abolita dagli inibitori proteasomici. Per contro, l'inibizione di SKP2 mediante siRNA in cellule Huh7 porta a una forte riduzione della proliferazione, aumento dell'apoptosi, e un aumento nei livelli proteici degli inibitori del ciclo cellulare con conseguente diminuzione della loro ubiquitinazione. Queste osservazioni, accompagnate all'osservazione della maggiore attività del complesso CKS1-SKP2 ligasi negli HCCP umani, suggeriscono una maggiore degradazione post-trascrizionale delle proteine P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P130 RASSF1A e FOXO1 nel CE con prognosi più sfavorevole e supportano l'ipotesi che la distruzione di queste proteine attraverso tale complesso ha un potenziale ruolo prognostico.

Il ruolo di SKP2 nella regolazione della proliferazione cellulare del CE è sostenuto anche dall'osservazione che l'iper-regolazione di SKP2 aumenta

l'attività cinasica di CDK2, che a sua volta neutralizza la defosforilazione di SKP2 da parte di CDC14B e favorisce la transizione G1-S (96), mentre effetti opposti seguono l'ipo-regolazione di SKP2. Infine, in accordo con i nostri risultati, SKP2 è un comune, effettore a valle di multiple cascate mitogeniche, incluse Ha-RAS, AKT, JAK/STAT e WNT/ β -CATENINA che sono implicate nell'epatocancerogenesi umana (59, 60, 98). Ulteriori studi dovrebbero focalizzarsi sullo sviluppo di piccole molecole che inibiscono allostericamente SKP2 o bloccano la sua interazione con molecole substrato. Basandoci sui nostri risultati, questi inibitori dovrebbero ostacolare la progressione dei CE più aggressivi colpendo diverse vie oncogeniche e riattivando gli inibitori del ciclo cellulare.

Complessivamente, i nostri risultati indicano che la predominanza di geni di suscettibilità o resistenza negli individui influenza largamente il controllo molecolare della proliferazione cellulare e della progressione del CE. Gli individui suscettibili sviluppano diversi meccanismi adattativi per la protezione contro i soppressori tumorali inibitori del ciclo cellulare, quali p16^{INK4A} (41) e la famiglia di geni WAF/KIP, p130 e RassF1A. Questo conferisce alle cellule di CE la capacità di proliferare e progredire anche sotto condizioni di stress.

Inoltre abbiamo dimostrato che l'ubiquitinazione e la degradazione proteasomica degli inibitori chiave del ciclo cellulare attraverso CKS1-SKP2 ligasi, e i meccanismi che proteggono SKP2 dalla degradazione mediata da

APC/C-CDH1, contribuiscono all'aggressività del tumore e allo sviluppo di un fenotipo suscettibile nei ratti.

Questi risultati suggeriscono che la valutazione dell'attività del complesso CKS1-SKP2 ligasi potrebbe essere un promettente marcatore diagnostico per l'identificazione di pazienti ad alto rischio che potrebbero beneficiare di farmaci antitumorali che colpiscono CKS1-SKP2 (105).

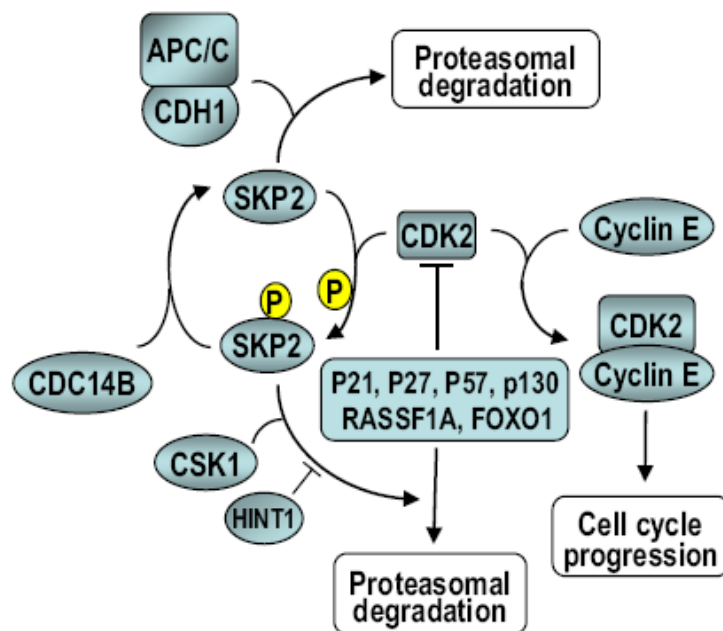


Figura 28: Rappresentazione schematica dell'effetto di SKP2 sulla regolazione del ciclo cellulare. SKP2, in complesso con CKS1 induce la degradazione proteasomica dei regolatori del ciclo cellulare (P21^{WAF1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2}, P130, RASSF1A e FOXO1), che inibiscono CDK2. CDK2 fosforilando SKP2 nella serina 64 e 72 impedisce la sua degradazione proteasomica da parte del complesso APC/C-CDH1. l'azione di CDK2 su SKP2 è neutralizzata da CDC14B. Una proteina addizionale, HINT1 blocca l'attività di degradazione di SKP2.

BIBLIOGRAFIA

1. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., Estimating the world cancer burden: globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-6.
2. Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad. Med. J.* 2000; 76,4-11.
3. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. *Seminar Liver Dis.* 2005; 25,143-154.
4. Feitelson M.A., Sun B., Tufan N.L.S., Liu J., Lian Z. Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21, 2593-2604.
5. Yu M.C., Yuan J.M. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127 (1); s72-8.
6. Calle E.E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun M.J. Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospectively studies cohort of U.S. adults. *New Engl J Med* 2003; 348: 1625-38.
7. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factor, and screening. *Seminar Liver Dis.* 2005; 25,143-154.
8. Teufel A., Staib F., Kanzler S., Weinmann A., Sculze-Bergkamen H., Galle P.. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13(16): 2271-2282.
9. Farazi P.A., DePinho R.. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Rev. Cancer* 2006; 6(9): 674-687.
10. Kiyosawa K., Sodeyama T., Tanaka E., Gibo Y., Yoshizawa K., Nakano Y., Furuta S., Akahane Y., Nishioka K., Purcell R.H., et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 12, 671-675.
11. McGlynn K.A., London W.T. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Prac Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19(1): 3-23.
12. Chen X., Cheung S.T., So S., Fan S.T., Barry C., Higgins J., Lai K.M., Ji J., Ng I.O.L., Van de Rijn M., Botstein D. and Brown P.O. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002; 13(6): 1929-1939.
13. Zoondervan P.E., Wink J., Alers J.C. et al. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathhol* 2000; 192: 207-15.

14. Santoni-Rugiu E., Jensen M.R., Thorgeirsson S.S.. Disruption of the pRb/E2F pathway and inhibition of apoptosis are major oncogenic events in liver constitutively expressing c-myc and transforming growth factor α . *Cancer Res* 1998; 58(1): 123-134.
15. Santoni-Rugiu E., Nagy P., Jensen M.R., Factor V.M. and Thorgeirsson S.S.. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing c-myc and transforming growth factor- α . *Am J Pathol* 1996; 149(2): 407-427.
16. 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. and Feo F.. Cell cycle deregulation in liver lesions of rats with and without genetic predisposition to hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2002; 35(6): 1341-1350.
17. Simile M.M., De Miglio M.R., Muroli M.R., Frau M., Asara G., Serra S., Muntoni M.D., Seddaiu M.A., Daino L., Feo F. and Pascale R.M.. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxynucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of Hep G2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25(3): 333-341.
18. Santoni-Rugiu E., Nagy P., Jensen M.R., Factor V.M. and Thorgeirsson S.S.. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing c-myc and transforming growth factor- α . *Am J Pathol* 1996; 149(2): 407-427.
19. Wong C.M., Ng I.O.L.. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2008; 28(2): 160-174.
20. Feitelson M.A., Sun B., Satiroglu Tufan N.L., Liu J., Pan J. and Lian Z.. Genetic mechanism of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604.
21. Majumder M., Ghosh A.K., Steele R., Ray R. and Ray R.B.. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75(3): 1401-1407.
22. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-8.
23. Kondo Y., Kanai Y., Sakamoto M., Mizokami M., Ueda R., Hirohashi S. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis-A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and cDNA hypermethylation on 8 CpG island in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 32; 979-9.

24. Calvisi D.F., Ladu S., Gorden A., Farina M., Conner E.A., Lee J.S., Factor V.M. and Thorgeirsson S.S.. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130(4): 1117-1128.
25. Bromberg J., Darnell J. E. Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19; 2468-2473.
26. Browmann T., Garcia R., Turkson J., Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19; 2474-2488.
27. Edmonson H.A., Steiner P.E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necroscopies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
28. Yuki K., Hirohashi S., Sakamoto M., Kanai T., Shimosato Y. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer* 1990; 66: 2174-2179
29. Baserga R. *The biology of Cell Reproduction*. Cambridge, MA: Harvard University Press 1985.
30. Hartwell L.H., Culotti J., Pringle J.R., Reid B.J. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science*. 1974; 11;183(120): 46-51.
31. Suh S.I., Pyun H.Y., Cho J.W., Baek W.K., Park J.B., Kwon T.K., Park J.W., Suh M.H., Carson D.A.. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2000; 160(1): 81-88.
32. Whitehurst A.W., Ram R., Shivakumar L., et al. The RASSF1A tumor suppressor restrains anaphase-promoting complex/cyclosome activity during the G1/S phase transition to promote cell cycle progression in human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 3190-3197.
33. Fenton S.L., Dallol A., Agathangelou A., et al. Identification of the E1A-regulated transcription factor p120 E4F as an interacting partner of the RASSF1A candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res* 2004; 64:102-107
34. Song M.S., Song S.J., Kim S.Y. et al. The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J* 2008; 27: 1863-1874.
35. Dallol A., Agathangelou A., Fenton S.L., et al. RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res* 2004; 64: 4112-4116.

36. Huang H., Tindall D.J. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007; 120: 2479-2487.
37. Tosi G.M., Trimarchi C., Macaluso M., et al. Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach. *Oncogene* 2005; 24: 5827-5836.
38. Cinti C., Macaluso M., Giordano A. Tumor-specific exon 1 mutations could be the 'hit event' predisposing Rb2/p130 gene to epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene* 2005; 24: 5821-5826.
39. D'Andrilli G., Masciullo V., Bagella L. et al. Frequent loss of pRb2/p130 in human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3098-3103.
40. Goto T., Takano M., Albergaria A., et al. Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. *Oncogene* 200; 27: 9-19.
41. Pascale R.M., Simile M.M., Calvisi D.F., et al. Role of HSP90, CDC37, and CRM1 as modulators of p16(INK4A) activity in rat liver carcinogenesis and human liver cancer. *Hepatology* 2005; 42. 1310-1319.
42. Matsuda Y. Molecular mechanisms underlying the functional loss of cyclin dependent kinase inhibitors p16 and p27 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1734-1740.
43. Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 425-479.
44. Gerards W.L., de Jong W.W., Boelens W., Bloemendal H. Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell Mol Life Sci* 1999; 54: 253-262.
45. Burger A.M., Seth A.K. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications *European Journal of Cancer* 2004; 40: 2217-2229.
46. Frescas D., Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: tipping the scales of cancer. *Nature reviews cancer* 2008; 8: 438-449.
47. Nalepa G., Harper W. Therapeutic anti-cancer targets upstream of the proteasome. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 49-57.
48. Cardozo T., Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 2004; 5: 739-751.
49. Patton E.E., Willems A.R., et al. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* 1998; 14: 236-243.

50. Del Pozo J.C., and Estelle M. The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96 15342-15347.
51. Jin A. et al. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* 2004; 18: 2573–2580.
52. Cenciarelli C. et al. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol* 1999; 9: 1177–1179.
53. Winston J., Koepp T., Zhu D.M., Elledge C., Harper S.J., Harper J.W. A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.* 1999; 9: 1180–1182.
54. Wang I.C., Chen Y.J., Hughes D., et al. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25:10875-10894.
55. Sutterlüty H., Chatelain E., Marti A. et al. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat. Cell Biol.* 1999; 1: 207-214.
56. Song M.S., Song S.J., Kim S.J., et al. Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSf1A via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene* 2008; 27: 3176-3185.
57. Qin L.F., Ng I.O. Expression of p27(KIP1) and p21(WAF1/CIP1) in primary hepatocellular carcinoma: clinicopathologic correlation and survival analysis. *Hum Pathol* 2001;32:778–784.
58. Klausen P., Pedersen L., Jurlander J., et al. Oncostatin M and interleukin 6 inhibit cell cycle progression by prevention of p27kip1 degradation in HepG2 cells. *Oncogene* 2000; 19: 3675–3683.
59. Calvisi D.F., Pinna F., Meloni F., et al. Dual-specificity phosphatase1 ubiquitination in extracellular signal-regulated kinase-mediated control of growth in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*2008; 68: 4192–4200.
60. Calvisi D.F., Pinna F., Ladu S., et al. Forkhead box M1B is a determinant of rat susceptibility to hepatocarcinogenesis and sustains ERK activity in human HCC. *GUT* 2009;58:679–687.
61. Harper J.W. Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr. Biol.* 2001; 11: R431-435.
62. Schulman B.A., Carrano A.C., Jeffrey P.D., Bowen Z., Kinnucan E.R., Finnin M.S., Elledge SJ, Harper J.W., Pagano M., Pavletich N.P. Insights into SCF

- ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 2000; 408: 381-386.
63. Hsiung Y.G., Chang H.C., Pellequer J.L., La Valle R., Lanker S., Wittenberg C. F-box protein Grr1 interacts with phosphorylated targets via the cationic surface of its leucine-rich repeat. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 2506-2520.
 64. Pines J. Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr. Biol.* 1996; 6: 1399-1402.
 65. Patra D., and Dunphy W.G. Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev.* 1998; 12: 2549-2559.
 66. Shteinberg M., and Hershko A. Role of Suc1 in the activation of the cyclosome by protein kinase Cdk1/cyclin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 257: 12-18.
 67. Spruck C., Strohmaier H., Watson M., Smith A.P., Ryan A., Krek T.W., and Reed, S.I. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol. Cell* 2001; 7: 639-650.
 68. Sitry D., Seeliger M.A., Ko T.K., Ganoth D., Breward S.E., Itzhaki L.S., Pagano M., and Hershko A.J. Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *Biol. Chem.* 2002; 277: 42233-42240.
 69. Bourne Y., Watson M.H., Hickey M.J., Holmes W., Rocque W., Reed S.I., and Tainer J.A. Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 1996; 84: 863-874.
 70. Wang W., Ungermannova D., Chen L., Liu X. A negatively charged amino acid in Skp2 is required for Skp2-Cks1 interaction and ubiquitination of p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 32390-32396.
 71. Feo F., et al. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 2000; 11: 19-62.
 72. Feo F., Pascale R.M., Calvisi D.F. Models for liver cancer. 2007.
 73. Enomoto K., Farber E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 1982; 42: 2330-5.
 74. Dragan Y.P., et al. Focal and non-focal hepatic expression of placental glutathione S-transferase in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 2587-2591.

75. 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.
76. Feo F., De Miglio M.R., Simile M.M., Muroli M.R., Calvisi D.F., Frau M., Pascale R.M. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretative analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1765: 126-147.
77. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2000; 32: 225-237.
78. Hemminki K., Li X. Familial risks of cancer as a guide to gene identification and mode of inheritance. *Int J Cancer* 2004; 110: 291–294.
79. Calvisi D.F., Pinna F., Ladu S., Pellegrino R., Sanna V., Sini M., Daino L., Simile M.M., De Miglio M.R., Frau M., Tomasi M.L., Seddaiu M.A., et al. Ras-driven proliferation and apoptosis signaling during rat liver carcinogenesis is under genetic control. *Int J Cancer*, 2008; 123:2057–64.
80. Bashir T., Dorrello N.V., Amador V., et al. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 2004; 428: 190–193.
81. Wei W., Ayad N.G., Wan Y., et al. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 2004; 428: 194–198.
82. Cen B., Li H., Weinstein I.B. HINT1 up-regulates cellular levels of p27KIP1 by targeting SCFSKP2 ubiquitin ligase and SRC. *J Biol Chem* 2009; 284: 5265-5276.
83. Pascale R.M., Marras V., Simile M.M., Daino L., Pinna G., Bennati S., Carta M., Seddaiu M.A., Massarelli G., Feo F. Chemoprevention of rat liver carcinogenesis by S-adenosyl-L-methionine: a long-term study. *Cancer Res.* 1992; 52: 4979-86.
84. Yu J., Zhang H.Y., Ma Z.Z., 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.
85. Xu X.L., Yu J., Zhang H.Y., et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3441–3454.
86. Li Y., Nagai H., Ohno T., et al. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* 2002; 100: 2572–2577.

87. Burbee D.G., Forgacs E., Zöchbauer-Müller S., et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 691–699.
88. Wang L., Zhang Y., Li H., et al. Hint1 inhibits growth and activatorprotein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 4700–4708.
89. Yoshikawa H., Matsubara K., Zhou X., et al. WNT10B functional dualism: β -catenin/Tcf-dependent growth promotion or independent suppression with deregulated expression in cancer. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4292–4303.
90. Nishida N., Nagasaka T., Nishimura T., et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 908–918.
91. Lee S., Lee H.J., Kim J.H., et al. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1371–1378.
92. Zhang C., Guo X., Jiang G., et al. CpG island methylator phenotype association with up-regulated telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 998–1004.
93. Lei P.P., Zhang Z.J., Shen L.J., et al. Expression and hypermethylation of p27kip1 in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4587–4591.
94. Fujita T., Liu W., Doihara H., et al. Regulation of Skp2-p27 axis by the Cdh1/anaphase-promoting complex pathway in colorectal tumorigenesis. *Am J Pathol* 2008; 173: 217–228.
95. Fujita T., Liu W., Doihara H., et al. Dissection of the APCCdh1-Skp2 cascade in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1966–1975.
96. Rodier G., Coulombe P., Tanguay P.L., et al. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *EMBO J* 2008; 27: 679–691.
97. Miranda-Carboni G.A., Krum S.A., Yee K., et al. A functional link between Wnt signaling and SKP2-independent p27 turnover in mammary tumors. *Genes Dev* 2008; 22: 3121–3134.
98. Thorgeirsson S.S., Grisham J.W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339–346.
99. Baylin S.B., Herma J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16: 168–174.

100. Hui A.M., Makuuchi M., Li X. Cell cycle regulators and human hepatocarcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1635–1642.
101. Ito Y., Matsuura N., Sakon M., et al. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology* 1999; 30: 90–99.
102. Claudio P.P., Russo G., Kumar C.A., et al. pRb2/p130, vascular endothelial growth factor, p27(KIP1), and proliferating cell nuclear antigen expression in hepatocellular carcinoma: their clinical significance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3509–3517.
103. Park Y.N., Chae K.J., Kwon K.W., Oh B.K., Lee K.S., Lee W.J., Park C. p53 and p21WAF1/CIP1 in hepatitis B virus related hepatocarcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1292–6.
104. Nakayama K., Nagahama H., Minamishima Y.A., Matsumoto M., Nakamichi I., Kitagawa K., Shirane M., Tsunematsu R., Tsukiyama T., Ishida N., Kitagawa M., Nakayama K., et al. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 2000; 19: 2069–81.
105. Hershko D.D. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer* 2008; 112: 1415–1424.