

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE "G.PATRASSI"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE
E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: EPATOLOGIA CLINICA
CICLO XXIII

IMPLICAZIONI BIOLOGICHE DI SERPINB3 NELLA FIBROSI EPATICA E NELL'EPATOCARCINOMA

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. GAETANO THIENE
Coordinatore di Indirizzo: Ch.mo Prof. ANGELO GATTA
Supervisore: Ch.ma Prof.ssa PATRIZIA PONTISSO

Dottorando: Dr. CRISTIAN TURATO

Alla mia famiglia

INDICE

SOMMARIO	5
1. INTRODUZIONE	11
1.1 La fibrogenesi epatica	11
1.1.1 Storia naturale	11
1.1.2 Diagnosi	12
1.1.3 Aspetti istologici	12
1.1.4 Terapia	13
1.1.5 Il processo di fibrogenesi epatica	13
1.1.6 La matrice extracellulare (ECM)	14
1.1.7 Cellule stellate epatiche	15
1.2 Il carcinoma epatocellulare	18
1.2.1 Classificazione molecolare del carcinoma epatocellulare	18
1.3 Transforming Growth Factor β (TGF- β)	20
1.4 L'invasione tumorale e la transizione epitelio-mesenchimale (EMT)	22
1.4.1 Classificazione di Transizione Epitelio Mesenchimale	22
1.4.2 Eventi chiave dell'EMT	23
1.4.3 Principali meccanismi molecolari coinvolti nella EMT	23
1.4.4 Specie reattive dell'ossigeno e regolazione della EMT redox-sensibile	26
1.4.5 EMT e il processo di invasione tumorale	27
1.4.6 Fattori che promuovono l'EMT	29
1.5 Ipossia e cancro	30
1.6 Serpine	34
1.6.1 Struttura e funzione delle serpine	34
1.6.2 Le isoforme SERPINB3 e SERPINB4	34
1.6.3 Caratteristiche di SERPINB3	35
2. SCOPO DEL LAVORO	38
3. MATERIALI E METODI	40
3.1 Popolazione dello studio	40
3.2 Istologia ed immunoistochimica	41
3.3 Estrazione RNA	42
3.4 Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA	42

3.5 Colture cellulari epatiche e condizioni di coltura	42
3.6 Costruzione del vettore d'espressione SERPINB3	43
3.7 Produzione delle proteine ricombinanti SerpinB3	44
3.8 Trasfezione delle linee cellulari epatiche	44
3.9 Amplificazione genica mediante Real-Time Polymerase Chain Reaction	45
3.10 Valutazione dell'espressione proteica	46
3.10.1 Immunofluorescenza	46
3.10.2 Saggio ELISA	47
3.10.3 Western Blot	47
3.11 Saggio di migrazione/invasione cellulare	48
3.12 Produzione intracellulare di ROS	49
3.13 Silenziamento genico mediante small RNA Interference	49
3.14 Analisi statistica	49
4. RISULTATI	53
4.1 Studio I.	53
4.1.1. Correlazione in vivo tra SERPINB3 e TGF- β	53
4.1.2 Correlazione con la fibrosi epatica	56
4.1.3. SERPINB3 induce l'espressione di TGF- β 1	57
4.1.4 Modulazione del TGF- β 1 mediante SERPINB3 ricombinante	59
4.1.5 Localizzazione di SERPINB3 e TGF- β 1 mediante immunofluorescenza	60
4.1.6 Influenza del sito attivo di SerpinB3 nella modulazione del TGF- β 1	61
4.2 Studio II	63
4.2.1 SERPINB3 induce EMT e invasività	63
4.2.2 SERPINB3 attiva vie di segnale intracellulari redox dipendenti.	67
4.2.3 L'espressione di SERPINB3 è un evento dipendente dall'ipossia	70
4.2.4 L'espressione di SERPINB3 in ipossia è mediata dal gene HIF-2 α	72
4.2.5 Analisi <i>in vivo</i>	75
5. DISCUSSIONE	79
6. BIBLIOGRAFIA	87

IMPLICAZIONI BIOLOGICHE DI SERPINB3 NELLA FIBROSI EPATICA E NELL'EPATOCARCINOMA

INTRODUZIONE

SERPINB3 appartiene alla famiglia delle serpine, inibitori delle proteasi seriniche implicati in molte funzioni biologiche e nei processi di controllo dell'omeostasi cellulare. E' espressa normalmente negli epiteli squamosi, ma si trova iper-espressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale e nell'epatocarcinoma ma anche in noduli cirrotici ad alto grado di displasia.

TGF- β 1 è una citochina multifunzionale, coinvolta nella regolazione della proliferazione, differenziamento e migrazione di molti tipi cellulari ed è il più importante fattore implicato nel processo di fibrogenesi epatica, dove regola la sintesi di collagene nelle cellule stellate epatiche. Recentemente in un'altra patologia fibrosante progressiva, quale la fibrosi polmonare idiopatica, è stata documentata una correlazione diretta tra entità di espressione di TGF- β e della serpina SERPINB3, con co-localizzazione delle due molecole a livello cellulare.

Recenti studi sperimentali condotti nel nostro laboratorio suggeriscono il coinvolgimento in vitro di SERPINB3 in caratteristiche tipiche della transizione epitelio mesenchimale, (EMT) un fenomeno chiave anche nell'epatocarcinoma.

Inoltre, ulteriori risultati descritti in letteratura identificano l'ipossia, una delle condizioni più comuni che si instaurano nel microambiente tumorale, come condizione in grado di indurre in modo indipendente EMT e lo stesso fenomeno di transizione epitelio mesenchimale è indotto anche dalla citochina TGF- β 1.

SCOPO

Studio I

Lo scopo della prima parte della tesi è valutare la potenziale correlazione tra SERPINB3 e TGF- β 1 nel fegato in pazienti con danno epatico cronico e valutare la relazione tra queste due molecole utilizzando modelli in vitro di colture cellulari trasfettate con SERPINB3.

Studio II

Lo scopo della seconda parte della tesi è quello di caratterizzare gli stimoli regolatori e i meccanismi d'induzione di SERPINB3 come fattore solubile in grado di indurre l'invasività e la transizione epitelio mesenchimale. Inoltre, ulteriore scopo è valutare la correlazione tra ipossia e SERPINB3 ed i relativi meccanismi di regolazione sia in modelli *in vitro* che *in vivo*.

MATERIALI E METODI

Per quanto concerne il primo studio sono stati studiati 80 pazienti, di cui 59 con epatite cronica e 21 con cirrosi epatica. L'espressione di SERPINB3 e TGF- β è stata analizzata su biopsie epatiche di pazienti con epatite cronica a livello proteico mediante immunistochemica e a livello trascrizionale mediante PCR quantitativa.

Il modello in vitro prevedeva la trasfezione transiente e stabile di cellule HepG2 con il gene SERPINB3 wild type e con differenti vettori caratterizzati da estensioni diverse di delezione del sito attivo della serpina, responsabile della sua attività antiproteasica, con successiva analisi dell'espressione genica e proteica.

Per quanto riguarda il secondo studio sono stati effettuate analisi di immunofluorescenza e invasività in cellule HepG2 trattate con diverse forme di proteina SERPINB3 ricombinante per valutarne l'effetto di trasformazione epitelio-mesenchimale e la generazione intracellulare di specie reattive all'ossigeno (ROS). Inoltre le cellule sono state mantenute in condizioni di ipossia (3%O₂) per studiare il comportamento di SERPINB3 ed è stato effettuato il silenziamento genico per i fattori inducibili in ipossia (HIF) al fine di determinare il loro coinvolgimento.

L'espressione di SERPINB3 e dei fattori relativi all'EMT e all'ipossia sono stati valutati anche su biopsie epatiche in pazienti con epatocarcinoma.

RISULTATI

Studio I

L'analisi immunistochemica nel fegato ha documentato una significativa correlazione positiva con co-localizzazione di SERPINB3 e TGF- β 1 nelle cellule parenchimali del fegato. Anche a livello trascrizionale l'espressione di mRNA ha confermato un simile andamento, con livelli di espressione genica sostanzialmente sovrapponibili ($r=0,7483$, $p=0,0070$). Inoltre, l'espressione di entrambe le molecole è risultata positivamente correlata con l'entità della fibrosi.

In cellule HepG2 trasfettate con il gene SERPINB3 è stata documentata un'induzione di TGF- β 1 sia dal punto di vista trascrizionale che della produzione proteica.

I risultati ottenuti dalla trasfezione hanno dimostrato che è cruciale l'integrità del sito attivo della serpina per l'induzione di TGF- β 1, in quanto questa citochina è totalmente assente nei vettori con la delezione del sito antiproteasico di SERPINB3, mentre dove la delezione è minore, si riscontra una ridotta induzione, rispetto al controllo.

Studio II

SERPINB3 induce EMT e aumenta l'invasività in cellule HepG2 mediante il coinvolgimento di ROS e la fosforilazione di GSK3 β , indipendentemente dall'attività antiproteasica della serpina.

In condizioni di ipossia si osserva un aumento della trascrizione e sintesi di SERPINB3, modulata dalle vie di segnale Ras/ERK e PI3K e completamente dipendente dal gene HIF-2 α .

Questi dati sono stati confermati nel topo transgenico per SERPINB3, dove è stata dimostrata un'iperespressione della molecola nelle zone ipossiche circostanti le vene centrolobulari.

Inoltre, in biopsie di pazienti con epatocarcinoma è stata confermata una colocalizzazione di SERPINB3 e HIF-2 α

CONCLUSIONI

Studio I

Nella malattia epatica cronica evolutiva esiste una correlazione diretta tra espressione di SERPINB3 e TGF- β . La correlazione di entrambe queste molecole con il grado di fibrosi epatica rafforza l'ipotesi di una loro potenziale interazione nel processo fibrogenetico epatico. In modelli in vitro SERPINB3 è in grado di indurre l'espressione di TGF- β e questo effetto dipende dalla sua attività antiproteasica. Alla luce di queste considerazioni SERPINB3 potrebbe essere considerato un bersaglio terapeutico per contrastare il processo di fibrogenesi.

Studio II

L'ipossia può indurre SERPINB3 e conseguente trasformazione epitelio-mesenchimale mediante la produzione di radicali liberi dell'ossigeno.

L'ipossia inoltre è il primo stimolo di rilevanza fisiopatologica descritto in letteratura capace di modulare la trascrizione e l'espressione di SERPINB3 attraverso un meccanismo dipendente dal gene HIF-2 α .

BACKGROUND

SERPINB3 is a serine protease inhibitor belonging to the serpin family, characterized by pleiotropic functions. TGF- β 1 is the master cytokine in the pathogenesis of liver fibrosis. Inflammatory and mesenchymal cells, including hepatic stellate cells, have been identified as the principal source of this cytokine, however growing evidence also supports the ability of parenchymal hepatocytes to produce TGF- β 1. Recently, a direct correlation between TGF- β 1 and the ov-serpin SERPINB3 has been reported in idiopathic pulmonary fibrosis, whose pathological features recall cirrhosis pathogenesis.

SERPINB3, a serine protease inhibitor up-regulated in cirrhosis, dysplastic nodules and hepatocellular carcinoma (HCC), can trigger epithelial to mesenchymal transition (EMT) in HepG2 cells. EMT is also triggered by hypoxia which is common in HCC and believed to favour selection of more invasive tumour cells and cancer progression.

AIM

Aim of the first study was to assess the potential correlation between SERPINB3 and TGF- β 1 in chronic liver diseases and to determine their relationship using *in vitro* models of cells transfected with SERPINB3.

Aim of the second study was to investigate molecular mechanisms involved in SERPINB3-mediated EMT induction and the relationship between hypoxia and SERPINB3 expression *in vitro*, by employing normal and SERPINB3-transgenic HepG2 cells or *in vivo* by immunohistochemistry (IHC) on specimens from cirrhotic patients carrying HCC.

METHODS

In the first study SERPINB3 and TGF- β 1 expression in liver biopsies from 80 patients with chronic liver disease (59 chronic hepatitis and 21 liver cirrhosis) was evaluated by immunohistochemistry and by Real time PCR. To investigate whether SERPINB3 could affect TGF- β 1 expression, TGF- β 1 was determined in HepG2 cells transfected with SERPINB3 and in control HepG2 cells at transcription and protein level by Real time PCR and ELISA assay.

In the second study SERPINB3 up-regulation, involvement of hypoxia inducible factors (HIFs) and signal transduction pathways, intracellular generation of reactive oxygen species (ROS), EMT and invasiveness were analysed by morphological, molecular and cell biology techniques in HepG2 cells, exposed to hypoxia and/or incubated with wild type and mutated SERPINB3 recombinant proteins.

Moreover, liver specimens from either HCV cirrhotic patients carrying HCC or from transgenic mice over-expressing S-B3 were analyzed by immunohistochemistry.

RESULTS

Study I

In chronic hepatitis and liver cirrhosis a strong positive correlation was observed between SERPINB3 and TGF- β 1 immunoreactivity. At transcription level, cDNA amplification profiles of SERPINB3 and TGF- β 1 were similar in the majority of the cases. A significant correlation was found between the degree of parenchymal TGF- β 1 and SERPINB3 expression and the severity of liver fibrosis. Neither of the two molecules were detectable in 20 normal livers. Time course analysis of TGF- β 1 over time in SERPINB3 transfected cells showed an increase of this cytokine, with a peak value at 48 hours for TGF- β 1 mRNA and at 72 h for protein production.

Study II

EMT and increased invasiveness triggered by wild-type and mutated recombinant SERPINB3 are independent of their anti-protease activity and involve intracellular generation of ROS and redox-dependent, phosphorylation of GSK3 β . SERPINB3 transcription, protein synthesis and release in the medium are up-regulated under hypoxia, almost abolished by specific silencing of HIF-2 α (but not HIF-1 α), significantly modulated by hypoxia-dependent intracellular generation of ROS and involve Ras/Erk and PI3K signalling pathways. In addition, liver specimens revealed co-localization of HIF-2 α and SERPINB3 immunostaining in either HCC cells and in hepatocytes of surrounding cirrhotic liver.

CONCLUSIONS

Study I

SERPINB3 is overexpressed in chronically damaged hepatocytes, where increased TGF- β 1 has also been documented. The positive correlation found between the expression of either TGF- β 1 and SERPINB3 and fibrosis grade supports the dynamic interplay of these molecules, suggesting that SERPINB3 could orchestrate the most peculiar aspects of chronic liver disease by inducing TGF- β 1 production, leading to enhanced collagen synthesis and by increasing the survival capacity of damaged hepatocytes.

Study II

Hypoxia, through a common redox sensitive signalling, can switch on both EMT program and SERPINB3 expression. Hypoxia may then sustain increased invasiveness in cancer cells by a release of HIF2 α -dependent SERPINB3 molecule. This serpin could elicit EMT and invasiveness even in normoxic surrounding cells, then enhancing its putative role in carcinogenesis.

1. INTRODUZIONE

1.1 La fibrogenesi epatica

1.1.1 Storia naturale

La fibrosi epatica è stata storicamente interpretata come un processo passivo ed irreversibile dovuto al collasso del parenchima epatico ed alla sua sostituzione con tessuto ricco in collagene. Attualmente, è considerato un processo patologico progressivo e dinamico derivante dall'attivazione cronica dei meccanismi di riparazione tissutale, in seguito a un danno che si ripresenta ripetutamente a livello del fegato, influenzato da numerosi fattori che contribuiscono, da un lato alla deposizione di matrice extracellulare (ECM) e dall'altro alla sua degradazione, inoltre alcuni dati clinici ne hanno dimostrato la potenziale reversibilità (Bataller *et al*, 2005; Povero *et al*, 2010).

La storia naturale della fibrosi epatica è influenzata da fattori genetici ed ambientali. In generale, è stato dimostrato che le seguenti caratteristiche cliniche possono essere predittive per lo sviluppo di fibrosi significativa:

1. Epatite cronica virale (HBV, HCV e HDV)
2. Epatite da tossici (alcol, farmaci quali amiodarone, arsenico, contraccettivi orali, alcaloidi pirrolidizini)
3. Epatopatie a genesi autoimmune (epatite autoimmune, cirrosi biliare primitiva)
4. Malattie ereditarie e metaboliche (emocromatosi, morbo di Wilson, galattosemia, malattia di Gaucher, malattia da accumulo di glicogeno, tirosinemia ereditaria, deficit di α 1-antitripsina)
5. Malattie parassitarie (Schistosomiasi)
6. Steatoepatite non alcolica
7. Alterazioni vascolari (congenite o acquisite, malattia di Budd- Chiari, cirrosi cardiaca)
8. Malattie delle vie biliari (colangite sclerosante primitiva)
9. Fibrosi epatica congenita.

Tra queste l'infezione cronica da virus dell'epatite C e B, la steatoepatite alcolica e non alcolica (NASH) rappresentano le principali cause di epatopatia cronica progressiva, e portano nel 20% - 40% dei casi all'insorgenza della cirrosi epatica. Dal punto di vista anatomo-patologico, la cirrosi è un avanzato stadio di fibrosi, caratterizzato dalla formazione di noduli rigenerativi di epatociti separati da setti fibrosi (Bataller *et al*, 2005). La formazione di un processo cirrotico è associata alla necrosi degli epatociti, al collasso del sistema reticolare di supporto con conseguente deposizione di tessuto connettivo, al sovvertimento del letto vascolare ed alla rigenerazione

nodulare del rimanente parenchima. Tale processo progressivo può svilupparsi in anni o decenni, perciò una corretta stadiazione della fibrosi risulta estremamente importante non solo per la valutazione prognostica individuale del paziente, ma anche per la prevenzione della progressione della malattia verso la cirrosi. Essa è responsabile di una significativa morbilità e mortalità correlate allo sviluppo delle sue complicanze: ipertensione portale e sue conseguenze come varici esofagee, splenomegalia, ascite, encefalopatia epatica, peritonite batterica spontanea, sindrome epato-renale, sindrome epato-polmonare e il carcinoma epatocellulare.

1.1.2 Diagnosi

La biopsia epatica rappresenta il metodo *gold-standard* per la diagnosi della fibrosi epatica, benché siano disponibili diversi metodi non invasivi, sia a livello bioumorale che strumentale, tra i quali l'elastometria epatica. L'esame istologico è utile sia per identificare l'eziologia della patologia epatica, che per stabilire l'estensione delle lesioni necrotico-infiammatorie (*grading*) e valutare la fase di evoluzione della malattia verso la cirrosi (*staging*). I sistemi di quantificazione più utilizzati per la classificazione della fibrosi sono il Metavir (stadio F0-F4) e l'Ishak score (stadio 0-6) (Ishak *et al*, 2005).

1.1.3 Aspetti istologici

Il processo fibrogenico consegue all'azione di vari agenti eziologici in grado di danneggiare il parenchima epatico. La composizione e la quantità di matrice depositata in corso di fibrosi risultano simili nelle varie forme di patologia epatica, ma la localizzazione del tessuto fibrotico nel lobulo epatico può variare in base alla natura ed al sito dell'insulto. Così in corso di patologia colestatica cronica il processo fibrogenico inizia nella zona periportale, sede dell'infiammazione, e tende ad estendersi tra spazi portali adiacenti, formando ponti fibrosi porto-portali che circoscrivono il lobulo (fibrosi porto-portale o fibrosi perilobulare). Il pattern di fibrosi dell'epatite cronica virale invece è il risultato della necrosi a ponte porto-centrale che dà origine a setti fibrotici porto-centrali. Questa forma d'evoluzione del processo fibrotico è caratterizzata dallo sviluppo di setti porto-portali e dalla rapida disorganizzazione delle connessioni vascolari con il sistema portale. Nell'epatite alcolica e nella NASH invece la deposizione di componenti della matrice extracellulare inizia nella zona pericentrale e si estende tra i sinusoidi e gli epatociti (fibrosi pericellulare e perisinusoidale). Infine, lo sviluppo di fibrosi da una vena centrolobulare ad un'altra adiacente è un evento più raro e generalmente secondario a problemi di flusso venoso (es. insufficienza cardiaca cronica) (Pinzani *et al*, 2004).

1.1.4 Terapia

Attualmente non esiste alcun trattamento standard per la fibrosi epatica. La rimozione della causa dell'epatopatia, quando possibile, è l'intervento più efficace. Per pazienti con cirrosi e complicanze cliniche, invece, il trapianto rappresenta l'unico approccio curativo (Friedman *et al*, 2006). La terapia anti-fibrotica ideale dovrebbe essere epato-specifica, ben tollerata se somministrata per periodi prolungati ed efficace nell'attenuare l'eccessiva deposizione di collagene senza alterare la normale sintesi di matrice extracellulare. Sebbene studi sperimentali condotti su roditori abbiano rivelato bersagli molecolari utili per prevenire la progressione della fibrosi, l'efficacia della maggior parte dei trattamenti non è stata dimostrata nell'uomo. Infatti, il disegno di sperimentazioni cliniche risulta difficile in quanto non solo sono necessari studi di *follow-up* a lungo termine a causa della progressività della malattia, ma anche ripetute biopsie per valutare accuratamente i cambiamenti del quadro istologico (Bataller *et al*, 2005). Le principali strategie terapeutiche attualmente in studio prevedono l'uso di: (a) agenti in grado di ridurre l'infiammazione e la risposta immunitaria (es. corticosteroidi, colchicina, IL-10); (b) agenti in grado di ridurre l'attivazione delle cellule che producono la matrice extracellulare e le loro proprietà pro-fibrogeniche (es. inibitori dell'endotelina-1, del Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) e dell'angiotensina, INFH, antagonisti dei PPARs); (c) agenti antiossidanti (es. vitamina E, silimarina, fosfatidilcolina, S-adenosil-L-metionina); (d) agenti in grado di aumentare la degradazione della ECM fibrillare (es. metalloproteinasi, uPA) (Pinzani *et al*, 2004).

1.1.5 Il processo di fibrogenesi epatica

Il tessuto epatico è costituito da due gruppi cellulari:

- a) le cellule nobili parenchimali o epatociti, le quali svolgono la maggior parte delle funzioni alle quali è deputato il fegato;
- b) le cellule non parenchimali:
 - le cellule endoteliali delimitanti i sinusoidi, le quali contribuiscono a costituire i vasi sanguigni regolando l'afflusso di sangue,
 - le cellule di Kupffer (di derivazione macrofagica) che, dotate di attività fagocitica, partecipano alla difesa da agenti infettivi e fungono da importanti mediatrici della risposta infiammatoria,
 - i fibroblasti portali, presenti nel tessuto connettivo dei tratti portali attorno a vasi e strutture biliari,
 - le cellule di Ito, note anche come cellule stellate o lipociti, ad elevato contenuto lipidico e sede di deposito di vitamina A.

Indipendentemente dai diversi agenti potenzialmente dannosi per il fegato (virus, farmaci, alcool, autoanticorpi, ferro), l'organo risponde con un percorso stereotipato comune: la deposizione di tessuto fibroso (Bedossa *et al*, 2003). In presenza di danno epatico, infatti, si assiste alla neoformazione di proteine della matrice, che sostituiscono le lacune lasciate dalle cellule parenchimali, andate incontro a processi necrotici o apoptotici; tali meccanismi inducendo il reclutamento di cellule del sistema immunitario e l'infiltrazione linfocitaria del fegato, sostengono l'infiammazione cronica epatica. Se il fenomeno ha un'insorgenza acuta, sia la necrosi epatocitaria, che l'accumulo di matrice risultano di modesta entità e una volta neutralizzato l'agente nocivo, si ha rigenerazione degli epatociti e ritorno della matrice alle sue caratteristiche normali (Bedossa *et al*, 2003). Nel caso di danno cronico persistente invece lo squilibrio tra i processi di morte cellulare, infiammazione e deposizione non permette alla matrice di essere riassorbita creando i presupposti per la fibrosi.

1.1.6 La matrice extracellulare (ECM)

Nel fegato fibrotico, il metabolismo dell'ECM è un processo dinamico e il suo accumulo è prevalentemente conseguente all'attivazione delle "cellule stellate" le quali, insieme ad altri tipi cellulari, contribuiscono alla deposizione di molecole collageniche, proteoglicani e glicoproteine. Mentre il danno fibrotico iniziale è localizzato prevalentemente attorno alle triadi portali e non genera un pronunciato aumento dell'ECM totale, la progressione verso la cirrosi è caratterizzata dall'interessamento dell'intero lobulo. Un gran numero di cellule miofibroblastiche si accumula attorno alle vene centro lobulari; il successivo accumulo di collagene di tipo I e III induce la formazione di setti porto-portali e porto-centrali, mentre la sovraespressione di collagene di tipo IV nello spazio perisinusoidale del Disse comporta la formazione *ex novo* di una lamina basale elettrone densa attorno ai sinusoidi. Quest'ultima si associa a cambiamenti nel fenotipo delle cellule sinusoidali con la perdita delle fenestrature; tale processo, detto "capillarizzazione dei sinusoidi", comporta un'importante alterazione dei liberi scambi tra sangue e parenchima (Bedossa *et al*, 2003).

La stretta correlazione tra cambiamenti nel microambiente ECM, alterazione della funzione epatocitaria e cambiamenti nel fenotipo delle cellule stellate rivelano il ruolo chiave della matrice, non solo come struttura di sostegno, ma anche come luogo di *crosstalking* di segnali tra cellule circostanti.

1.1.7 Cellule stellate epatiche

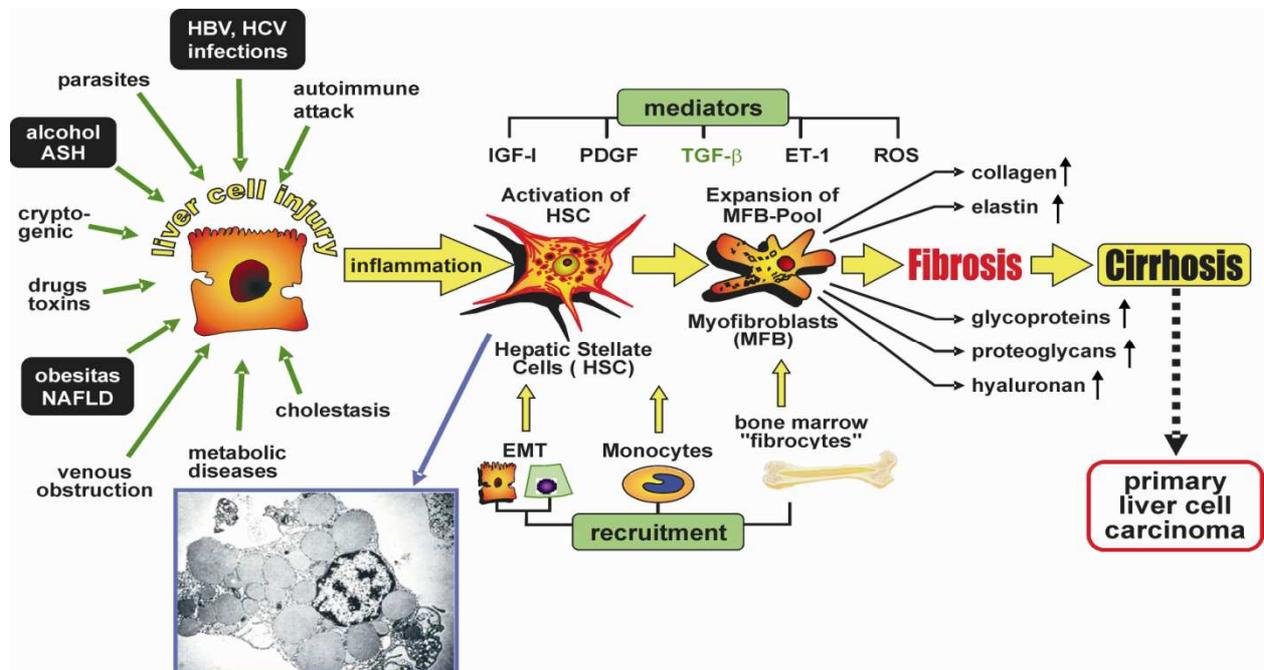
Oltre ai miofibroblasti, come sopra accennato, anche le cellule stellate epatiche (HSC) assumono un ruolo fondamentale nello sviluppo della fibrosi nel fegato. Le HSC si collocano nello spazio di Disse a stretto contatto con gli epatociti e le cellule dell'endotelio sinusoidale. Pur rappresentando soltanto il 5-8% di tutte le cellule epatiche, esse si dispongono regolarmente lungo i sinusoidi mantenendo una distanza internucleare costante assicurando così l'intera copertura dell'albero microvascolare.

Queste cellule perisinusoidali normalmente contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del fegato tramite la secrezione di fattori di crescita, l'immagazzinamento di vitamina A e la produzione di componenti della matrice essenziali per l'integrità strutturale dello spazio di Disse, quali il collagene di tipo IV, la laminina e, in piccole quantità, il collagene di tipo I e III (Geerts *et al*, 2001). Le HSC partecipano inoltre al turnover della ECM epatica mediante la secrezione di metalloproteinasi (MMP-2,-3,-10,-13,-14) e dei loro inibitori (TIMP-1,-2) (Benyon *et al*, 1996; Benyon *et al*, 2001). Inoltre ulteriori studi hanno proposto le HSC come cellule presentanti antigene (APC) intraepatiche professionali, in grado di attivare linfociti T e di modularne la risposta specifica contro antigeni di natura proteica e lipidica (Vinas *et al*, 2003; Winau *et al*, 2007). Altre proprietà di queste cellule sono state scoperte di recente: circa il 20-40% delle HSC sono caratterizzate da un fenotipo di cellule progenitrici CD133+ capaci di differenziarsi in cellule endoteliali ed epatociti suggerendone un importante ruolo nella rigenerazione epatica e nella riparazione (Kordes, *et al*, 2007), sono coinvolte nell'endocitosi delle cellule parenchimali apoptotiche (Zhan *et al*, 2006), favoriscono la rigenerazione epatica stimolando la proliferazione epatocitaria in seguito a differenziazione supportata dal recettore p75NTR (Passino *et al*, 2007), e sono implicate nella regolazione dell'angiogenesi e del rimodellamento vascolare mediante la secrezione di fattori angiogenici (Lee *et al*, 2007). Alcune di queste funzioni, tuttavia, non sono espresse nelle HSC allo stato quiescente ma sono conseguenza della loro attivazione innescata da mediatori infiammatori in seguito a danno epatico.

In condizione di danno epatico cronico, le cellule stellate sono interessate da un fenomeno di attivazione che le porta a passare da un fenotipo quiescente ad uno "similmiofibroblastico" con nuove importanti proprietà. (Gressner *et al*, 1996). L'attivazione delle HSC, documentata in numerosi studi in vivo ed in vitro, è un processo graduale ed è caratterizzata dalla perdita dei granuli di vitamina A e da un aumento dell'espressione di miofilamenti quali l' α -actina del muscolo liscio (α -SMA). Le HSC attivate inoltre acquistano una marcata capacità proliferativa e contrattile ed evidenziano un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso, indice di attivazione dei sistemi di sintesi (Gressner *et al*, 1996). La transdifferenziazione delle HSC comporta, infatti,

un drammatico aumento della sintesi di collagene di tipo I e III, fibronectina e TIMP. L'attivazione in vivo delle HSC viene vista come un meccanismo a cascata in tre fasi finemente regolato. Durante l'iniziazione (o fase pre-infiammatoria) avvengono rapidi cambiamenti nell'espressione genica e nel fenotipo che rendono le HSC responsive alle citochine ed a stimoli locali. Gli epatociti danneggiati rilasciano sostanze ad azione mitogena che agendo in maniera paracrina danno inizio alla proliferazione delle HSC al fine di rimarginare il danno nel parenchima. Nella successiva fase di infiammazione, le HSC preattivate sono ulteriormente stimolate in maniera paracrina dalle cellule di Kupffer e dall'infiltrato infiammatorio, responsabili del rilascio di citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le cellule endoteliali invece producono una variante di splicing della fibronectina cellulare (isoforma EIIIA) che favorisce l'attivazione delle HSC e, attivando la plasmina, convertono il TGF- β 1 latente nella forma fibrogenica. L'attivazione delle HSC viene in seguito perpetuata durante la fase post-infiammatoria (perpetuazione), quando vari fattori di crescita agiscono in maniera autocrina sulle stesse HSC già attivate o in modo paracrino su HSC ancora allo stato quiescente. Durante questa fase anche il continuo rimodellamento della ECM contribuisce significativamente alla progressione dell'attivazione delle HSC (Friedman *et al.*, 2000). L'attivazione e la transdifferenziazione delle HSC è dunque il risultato di molteplici interazioni con diverse popolazioni cellulari, residenti o infiltranti il fegato, che sintetizzano e rilasciano fattori solubili. I mediatori cellulari più rilevanti sono le specie reattive dell'ossigeno (radicali idrossilici, radicali dell'ossigeno, anione superossido, perossido d'idrogeno) prodotte dalle cellule di Kupffer (Nieto *et al.*, 2006), dall'attività della NAD(P)H ossidasi nelle HSC (Adachi *et al.*, 2005), dal metabolismo dell'etanolo mediato dal citocromo P4502E1 (CYP2E1) negli epatociti (Baroni, 1998) e dai leucociti (Casini *et al.*, 1997). Inoltre, anche l'acetaldeide prodotta dal metabolismo dell'etanolo dagli epatociti (Svegliati-Baroni *et al.*, 2001) e l'ipossia tissutale (Corpechot *et al.*, 2002) supportano l'attivazione delle HSC. Tra i mediatori peptidici, il TGF- β 1 è la citochina pro-fibrogenica più importante (Inagaki *et al.*, 2007). Altre citochine e fattori di crescita coinvolti nel processo d'attivazione sono il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), l'endotelina-1 (ET-1), diversi fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-I), il fattore di necrosi tumorale (TNF)-H, le adipochine (leptina, adiponectina) ed altri fattori in parte legati alla ECM (Pinzani *et al.*, 2001). La matrice infatti funge da "spugna" per diversi fattori di crescita fissati in maniera covalente e non alla fibronectina, ai proteoglicani ed al collagene, impedendone così la degradazione e presentandoli per l'interazione con recettori cellulari di membrana, portando alla stimolazione di vie di segnale intracellulare. Queste cascate di segnale essenzialmente controllano l'induzione dell'espressione

genica e della risposta fibrogenica delle HSC durante la fibrosi epatica. Oltre al ruolo chiave del TGF- β , anche le adipochine, che sono citochine derivanti principalmente dal tessuto adiposo, contribuiscono alla regolazione della fibrogenesi epatica. La leptina in particolare potrebbe avere un ruolo diretto nella fibrosi epatica associata a steatosi. Le HSC producono leptina e la sua sintesi aumenta in seguito ad attivazione. Le azioni della leptina sono mediate dal suo recettore Ob-R (Hegy *et al*, 2004). L'espressione del recettore Ob-RL aumenta nelle HSC attivate ed in seguito a legame con la leptina trasmette il segnale attraverso la via JAK-STAT (Saxena *et al*, 2002), inducendo la proliferazione e favorendo la sopravvivenza delle HSC coltivate mediante la sovraespressione del recettore del PDGF e la fosforilazione di ERK1/2 e Akt (Lang *et al*, 2004, Saxena *et al*, 2004).



Patogenesi della fibrosi epatica (tratta da Gressner *et al*. Comp Hepatology 2007).

1.2 Il carcinoma epatocellulare

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più frequente tumore maligno del fegato e rappresenta il sesto tipo di tumore più comune nel mondo. Inoltre, essendo i pazienti diagnosticati a stadi piuttosto avanzati, l'epatocarcinoma rappresenta la terza causa di mortalità associata a tumore, con un'incidenza in aumento (Parkin *et al*, 2005; Bosh *et al*, 2004). Nei paesi occidentali, l'insorgenza di epatocarcinoma è strettamente correlata con la presenza di cirrosi epatica e circa l'80% dei tumori insorgono su di fegato affetto da cirrosi o da epatite cronica. L'epatocarcinoma è un tumore che presenta un'eziologia molto eterogenea: l'HCC risulta infatti associato a differenti fattori di rischio molto ben caratterizzati. I principali fattori di rischio includono il virus dell'epatite B (HBV), il virus dell'epatite C (HCV), l'assunzione cronica di alcol, l'esposizione alimentare prolungata all'aflatossina B1 e l'emocromatosi primaria. Nel 90% dei casi di HCC, almeno uno di questi fattori di rischio può essere identificato, da solo o in combinazione con altri, e l'associazione con i differenti fattori di rischio varia a seconda dell'origine geografica del paziente (Montalto, 2002). Lo sviluppo di HCC in un fegato con una patologia cronica è un processo a fasi successive, noto come epatocarcinogenesi, caratterizzato dall'accumulo progressivo di alterazioni genetiche che possono causare crescita cellulare aberrante, trasformazione maligna del parenchima cellulare epatico, e successivamente invasione vascolare e metastasi. Infezioni da HBV e HCV ed esposizione cronica ad alcol sono tra i più comuni epatocarcinogeni nell'uomo; la loro presenza è causa di danno al DNA degli epatociti, alterato riparo dovuto a necro-infiammazione cronica ed infine rigenerazione tissutale intensiva e fibrogenesi. L'insorgenza di epatocarcinoma è spesso preceduta da lesioni preneoplastiche, le quali includono foci e noduli displastici (Teoh *et al*, 2009).

1.2.1 Classificazione molecolare del carcinoma epatocellulare

Lo sviluppo dell'epatocarcinoma in un fegato affetto da una patologia cronica è un processo multifattoriale caratterizzato dall'accumulo progressivo di alterazioni genetiche ed instabilità cromosomica. Nell'ultima decade numerosi studi sono stati pubblicati nel tentativo di identificare firme molecolari di espressione genica nell'epatocarcinoma. Tali studi risultano però altamente eterogenei dal punto di vista dell'individuazione di un profilo comune di alterazioni genetiche, rendendo difficile la definizione di una firma molecolare '*signature*' di questo tumore. Analizzando contemporaneamente questi studi di profilo di espressione genica, l'elemento più significativo che emerge è la frequente sovraespressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare e nella promozione della mitosi; gli HCC individuati da tale profilo vengono definiti come '*gruppo proliferativo*' e sono caratterizzati da una prognosi più infausta. In tale

raggruppamento spiccano inoltre una serie di consistenti riarrangiamenti genetici, associati ad una diminuita sopravvivenza del paziente indipendentemente dall'eziologia del tumore. Alla luce di queste osservazioni sembra ragionevole dedurre che elementi quali aumentata proliferazione degli epatociti, incrementato indice mitotico e deregolazione di geni modulatori del ciclo cellulare siano sinergicamente coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi (Teoh *et al*, 2009). Lo studio di Laurent-Puig e Zucman-Rossi (Laurent-Puig *et al*, 2006) suddivide in due gruppi principali le alterazioni genetiche identificate in tessuti di HCC. Il primo gruppo di alterazioni è specifico dei fattori di rischio associati al tumore, quali integrazione genomica del virus dell'epatite B, mutazioni nel gene oncosoppressore p53 successive all'esposizione prolungata all'aflatossina, mutazioni nell'oncogene kRAS dovute all'esposizione al cloruro di vinile, e mutazioni della linea germinale predisponenti all'epatoblastoma. Il secondo set di alterazioni genetiche è indipendente dall'eziologia dell'HCC ed include acquisizione o perdita cromosomica, alterazioni di p53, attivazione della via di WNT/ β -catenina, attivazione dei geni RB1, p16 ed IGFR2 (recettore per il fattore di crescita 2 dell'insulina). Un'esauritiva analisi di queste alterazioni genetiche ha consentito di definire due differenti percorsi molecolari di epatocarcinogenesi in accordo alla presenza o meno di instabilità cromosomica. Tumori scarsamente differenziati ed HBV positivi fanno parte del gruppo di tumori ad alta instabilità cromosomica, associati a mutazioni di p53, mentre tumori ben differenziati e HBV negativi sono stati associati ad assenza di instabilità cromosomica ed attivazione della via di β -catenina.

Studi recentissimi condotti dal gruppo di Hoshida *et al*, hanno inoltre dimostrato una sottoclasse molecolare (S1) di HCC particolarmente aggressivi caratterizzati da una alterata attivazione del signaling di Wnt nel quale l'attivazione del segnale di Wnt non è semplicemente il risultato della mutazione di β -catenina ma piuttosto dell'attivazione del gene Transforming Growth factor (TGF β) (Hoshida *et al*, 2101). Questa caratteristica sottoclasse è associata ad una marcata iperespressione dei geni target di TGF β e dei geni associati alla transizione epitelio mesenchimale (EMT), un processo coinvolto nell'invasione tumorale e metastatica (Thiery *et al*, 2006) e regolato a sua volta proprio dal TGF β stesso nell'epatocarcinoma (Franco *et al*, 2010) facendo supporre che l'attivazione di questi processi possano essere l'elemento scatenante dell'elevata proliferazione osservata in questo sottogruppo di tumori. Alla luce di questi studi di espressione, questi dati potrebbero essere utilizzati per la stratificazione dei pazienti nei futuri trials clinici e per l'individuazione di potenziali target per la terapia molecolare. Gli studi di classificazione molecolare possiedono quindi un'importante rilevanza clinica poiché potrebbero portare all'identificazione di marcatori utili per la diagnosi precoce del tumore, per predire la prognosi o per identificare nuovi bersagli terapeutici.

1.3 Transforming Growth Factor β (TGF- β)

Come riportato precedentemente, una delle molecole chiave nel coinvolte nel processo fibrogenico, ma anche nella progressione tumorale è il TGF- β che nello specifico appartiene ad una vasta famiglia di citochine secrete, conservate nell'evoluzione, che si comportano da fattori di crescita con ruoli determinanti in molti processi biologici durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto.

Nei mammiferi sono presenti tre isoforme di TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3); esse sono secrete in forma latente che deve essere attivata prima di legare il recettore per avviare la segnalazione intracellulare (Annes *et al*, 2003). Il processo proteolitico di maturazione comincia nel citoplasma dove il pre-pro-TGF- β perde il proprio peptide segnale; la forma pro- rimasta dimerizza e convertasi furiniche tagliano un peptide all'estremità N-terminale, conosciuto come LAP (Latency Associated Peptide). Dopo il taglio, sia nelle vescicole di secrezione che nello spazio extracellulare, il LAP rimane associato con legami non covalenti al TGF- β maturo e questo complesso è chiamato SLC, Small Latent Complex (Beck *et al*, 2002), incapace di legare i recettori di superficie cellulare (ten Dijke e Arthur, 2007). Lo SLC covalentemente si lega alle LTBP (Latent TGF- β Binding Proteins) per formare il Large Latent Complex (LLC) (Saharinen *et al*, 1996), che interagisce con proteine di matrice, tra cui fibrilline e fibronectine (ten Dijke e Arthur, 2007). Per essere attivato il TGF- β deve essere incorporato sotto forma di LLC nella ECM, dove in seguito a diversi meccanismi è convertito nella forma biologicamente attiva.

TGF- β è attivato quando è rilasciato dal LLC; questo processo può essere dovuto alla degradazione delle proteine di matrice che lo legano (per esempio fibrilline o direttamente le LTBP) oppure a taglio proteolitico o cambio di conformazione del LAP, che può essere indotto anche dall'interazione con altre proteine di matrice (per esempio Trombospondina-1) o con molecole di superficie cellulare (ad esempio integrine α V β 6 e α V β 8) (Hynes, 2009).

I recettori per il TGF- β , di tipo I e di tipo II, (TGF- β RI e TGF- β RII) sono proteine transmembrana con attività serin/treonin chinasi (Schmierer *et al*, 2007). Quando TGF- β lega il proprio recettore induce la formazione di un complesso eteromero in cui il dominio chinasi costitutivamente attivo del recettore di tipo II transfosforila il recettore di tipo I, che viene attivato. Esso propaga il segnale nel citoplasma cellulare attraverso la fosforilazione di proteine trasduttrici del segnale, chiamate *receptorregulated* (R-) Smad2 e Smad3. Le R-Smad attivate formano un complesso eteromero con una Smad comune (Co-Smad4 nei mammiferi) che è accumulato nel nucleo dove può legare elementi promotoriali del DNA e/o agire da fattore di trascrizione, co-attivatore e co-repressore (Moustakas *et al*, 2009). I processi biologici regolati dal TGF- β sono molteplici, perciò le vie di segnalazione attivate dal ligando sono allo stesso

tempo diverse, ma molto specifiche. Per assicurare che ciò avvenga esistono differenti e molteplici meccanismi di regolazione della sua segnalazione (ten Dijke e Arthur, 2007).

Uno dei principali effetti biologici del TGF- β è la regolazione della proliferazione cellulare e della sintesi di matrice extracellulare. In vitro stimola o inibisce la crescita cellulare a seconda del tipo cellulare coinvolto e delle condizioni di coltura. Inibisce la crescita di cheratinociti, epatociti, fibroblasti embrionali, linfociti T e B. Per quanto riguarda il suo ruolo sulle molecole connettivali stimola la sintesi di glicosaminoglicani, collagene di tipo I, II, V, VI, VII, fibronectina, elastina e ne diminuisce la loro degradazione inibendo la sintesi di svariate proteasi ed aumentando la sintesi di inibitori di proteasi. Svolge un'azione di forte induttore del metabolismo connettivale in alcuni processi patologici fibrotici quali la fibrosi polmonare, la fibrosi epatica, la glomerulonefrite e durante le fasi di riparazione cicatriziale sia in condizioni fisiologiche che patologiche. È chemiotattico per fibroblasti, neutrofili e monociti. E anche un potente immunosoppressivo agendo sui linfociti a minime concentrazioni, riduce l'espressione di molecole di classe II dell'MHC e di recettori per IL-1, inibisce l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali.

Il TGF- β è in grado di attivare anche Ras e Raf-1, a cui segue l'attivazione di Erk nelle HSC di ratto con un meccanismo PDGF-indipendente. Il TGF- β può inoltre attivare la via di segnale p38 MAPK, mediata a monte da TGF- β -activated kinase-1 (TAK1) e MKK3/6 (Hanafusa *et al*, 1999). Il TGF- β , che viene secreto in forma inattiva latente dalle HSC attivate, dalle cellule endoteliali sinusoidali, dalle cellule di Kupffer, dagli epatociti e dalle piastrine (Bissel *et al*, 1995, Marra *et al*, 1996) non solo inizia l'attivazione delle HSC, ma aumenta anche l'espressione genica di componenti della ECM, riduce la loro degradazione diminuendo l'espressione di MMP-1 e aumentando quella della TIMP-1, induce l'apoptosi di epatociti (Gressner *et al*, 1996), ed inibisce la proliferazione cellulare epatica (Bissell *et al*, 2001). L'attivazione extracellulare del TGF- β latente da parte di proteasi, radicali dell'ossigeno, trombospondina di tipo I e di integrine $\alpha\beta 6$ è una fase importante nella regolazione della biodisponibilità del TGF- β (Koli *et al*, 2001). Nelle HSC attivate inoltre il TGF- β induce la produzione del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), un peptide in grado di stimolare la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi di matrice extracellulare e sovraespresso nel fegato fibrotico (Williams *et al*, 2000). La produzione di CTGF aumenta durante l'attivazione cellulare delle HSC in vitro e ne influenza la migrazione, la proliferazione e l'adesione (Rachfal *et al*, 2003).

1.4 L'invasione tumorale e la transizione epitelio-mesenchimale

1.4.1 Classificazione di Transizione Epitelio Mesenchimale (EMT)

La transizione epitelio mesenchimale (EMT) è un processo in cui, in seguito ad uno stimolo cronico, le cellule epiteliali perdono il loro fenotipo e acquisiscono le caratteristiche delle cellule mesenchimali (Forino *et al*, 2006; Strutz *et al*, 2002).

L'EMT è coinvolto nella regolazione di tre processi biologici distinti che hanno funzioni differenti. Il primo processo legato a EMT è quello classificato con il termine di “tipo 1”, che è associato a diversi processi embriogenetici, tra cui l'impianto e la formazione embrionale e i meccanismi alla base dell'organizzazione dei diversi tipi cellulari deputati alla formazione di organi e apparati. Il secondo processo, quello di “tipo 2”, è associato con la rigenerazione dei tessuti e la fibrosi. Nell'EMT di tipo 2, il programma viene innescato da un evento di riparazione che induce normalmente la genesi di fibroblasti ed altre cellule deputate alla ricostruzione dei tessuti dopo un trauma o una lesione infiammatoria. Tuttavia, diversamente dall'EMT di tipo 1 che è solo transitoria, l'EMT di tipo 2 termina solo quando l'infiammazione si attenua. Infatti, nella fibrosi tissutale l'EMT di tipo 2 può continuare a rispondere alle infiammazioni in corso fino alla distruzione dell'organo fibrotico, che mima, a causa di un'infiammazione persistente, un segnale senza sosta di “guarigione della ferita”.

L'EMT di tipo 3, è legato alla trasformazione delle cellule neoplastiche che hanno subito in precedenza modifiche genetiche ed epigenetiche, in particolare di geni oncogeni e dei geni oncosoppressori, favorendo lo sviluppo di tumori localizzati. Cellule di carcinoma in fase EMT di tipo 3 possono invadere e metastatizzare, permettendo così la progressione tumorale. Le cellule tumorali possono passare attraverso la fase di EMT in misura parziale o totale. Nel caso di una EMT parziale, alcune cellule epiteliali mantengono molte delle loro caratteristiche, mentre altre acquisiscono il fenotipo mesenchimale; nel caso di una EMT totale, le cellule perdono completamente il loro fenotipo epiteliale d'origine e diventano pienamente mesenchimali.

Ad oggi, non è ancora chiaro quali siano i segnali specifici che permettono alle cellule di carcinoma di entrare in fase EMT di tipo 3. Si pensa che tali segnali possono provenire dallo stroma del tumore, strettamente associato ai carcinomi primari (Kalluri and Weinberg, 2009).

1.4.2 Eventi chiave dell'EMT

Le modificazioni della transizione epitelio mesenchimale si verificano attraverso un'orchestrata serie di eventi in cui le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare vengono alterate, le cellule epiteliali sono rilasciate nel tessuto circostante, il citoscheletro di actina si riorganizza in modo da permettere la migrazione attraverso la ECM e viene attivato un nuovo programma trascrizionale che permette alle cellule tumorali di mantenere il fenotipo mesenchimale.

Questa conversione fenotipica è il risultato di cambiamenti nella biochimica cellulare che sono caratterizzati dall'attivazione di particolari cascate del segnale, dall'iper-espressione di determinate molecole di superficie e dalla contemporanea internalizzazione di alcune proteine di membrana (Kalluri and Neilson, 2003). Durante la fase EMT viene diminuita, infatti, l'espressione in membrana o nella sua prossimità, di alcune proteine responsabili dell'adesione tra cellule e tra cellula e substrato, quali E-caderina, β -catenina, Desmoplachina, Mucina-1, ZO-1 (*Zonula Occludens 1*), Sindacano-1 e Citocheratina 18, mentre si attiva la contemporanea *up*-regolazione di proteine e fattori trascrizionali in grado di modificare la morfologia e la biochimica cellulare permettendo alla cellula di perdere adesività ed acquisire capacità invasiva dei tessuti circostanti, tra cui Snail, Slug, Vimentina, α -SMA (*α -Smooth Muscle Actin*), Fibronectina, MMP-2, MMP-9, RhoB, LEF-1, p38MAPK. (Cannito *et al*, 2008)

Si ha inoltre la neo-espressione di N-caderina, assente nei tessuti epiteliali che non hanno subito la EMT (Thiery, 2003). Modelli sperimentali dimostrano che la stimolazione con fattori di crescita, quali EGF (*Epidermal Growth factor*), TGF- β , IGF (*Insulin-like Growth factor II*) o FGF-2 (*fibroblastic Growth factor*), facilita questa transizione tramite l'attivazione di recettori ad attività chinasi indotta dal ligando. Ad esempio, TGF- β agisce sulla traduzione del segnale mediata dalla β -integrina, sulla trascrizione SMAD3-dipendente, sull'attivazione delle chinasi p38-MAP (P38MAPK) e nella cascata del segnale mediata dalle GTPasi (Kuorilehto *et al*, 2004).

1.4.3 Principali meccanismi molecolari coinvolti nella EMT

Nel dettaglio, un ruolo chiave nell'EMT è la diminuzione di E-caderina, una molecola che media l'adesione cellula-cellula e partecipa alle interazioni omotipiche e calcio-dipendenti che determinano la formazione delle giunzioni aderenti epiteliali (Giehl and Menke, 2008). Inoltre la perdita dell'espressione di E-caderina è spesso correlata con il grado e lo stadio tumorale (Erdemir *et al*, 2007).

Tra i diversi repressori del gene della E-caderina, un ruolo cruciale è attribuito al fattore trascrizionale SNAI1, proteina che appartiene alla famiglia delle *zinc fingers*, che viene attivato

da molte delle vie di segnale intracellulare che innescano la EMT. SNAI1 opera la repressione della trascrizione della E-caderina agendo su due siti di legame *E-boxes* presenti sul promotore del gene della E-caderina umana e murina (Batlle *et al*, 2000; Cano *et al*, 2000). Dati di letteratura hanno messo in evidenza come diverse linee cellulari di origine epiteliale in cui veniva iper-espressa la proteina SNAI1 andassero incontro a modificazioni morfologiche verso un fenotipo simil-fibroblastoide contemporaneamente alla scomparsa delle E-caderina, confermando così l'effettiva correlazione tra SNAI1 ed E-caderina (Cano *et al*, 2000). Inoltre SNAI1 è anche capace di modulare positivamente l'espressione di geni coinvolti nell'acquisizione di markers di tipo mesenchimale. Sia la trascrizione di SNAI1 che la sua attività trascrizionale sono negativamente modulate dall'attività della glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3 β) (Bachelder *et al*, 2005), una chinasi ritenuta la molecola chiave nell'induzione della EMT. Dati sperimentali indicano infatti che la GSK-3 β lega e fosforila i residui di serina presenti all'interno di due motivi consenso di SNAI1, regolandone la funzione. La fosforilazione del primo motivo regola la sua ubiquitilazione e la conseguente degradazione via proteosoma, mentre la fosforilazione del secondo motivo controlla la sua localizzazione intracellulare (Zhou *et al*, 2004; Peinado *et al*, 2005). Al contrario, la fosforilazione e quindi l'inattivazione della GSK-3 β determina l'upregolazione di SNAI1 con conseguente down-regolazione dell'espressione della E-caderina, sia *in vivo* che *in vitro* (Zhou *et al*, 2004; Bachelder *et al*, 2005).

Questa correlazione tra GSK-3 β , SNAI1 ed espressione della E-caderina è rilevante per almeno due ragioni: a) le cellule epiteliali in condizioni fisiologiche devono sostenere in modo continuo l'attivazione della GSK-3 β in modo da evitare l'induzione del processo di EMT; b) molte delle vie di trasduzione di segnale intracellulari capaci di innescare la EMT (tra cui i fattori di crescita e i loro recettori, le integrine e le chinasi collegate alle integrine, la via Wnt/ β -catenina), convergono sulla GSK-3 β inibendola e determinando così la traslocazione a livello del nucleo di SNAI1 e la down-regolazione della E-caderina.

Per quanto concerne i fattori di crescita (*Epidermal Growth Factor* o *EGF*, *Fibroblast Growth Factor* o *FGF*, *Hepatocyte Growth Factor* o *HGF*, *Insulin Growth Factor* o *IGF*) e i corrispondenti recettori tirosino chinasi (RTKs) è ben noto come questi RTKs dimerizzano in seguito al legame con il proprio ligando, si auto-fosforilano sui residui di tirosina i quali, a loro volta, agiscono come sito di attacco per il dominio SH2 presente sulle proteine Grb2, fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3K) e Src; queste ultime, una volta reclutate, possono stimolare le rispettive vie di segnale intracellulari a valle. Questo include anche l'attivazione di Ras, che non possiede il dominio SH2, ma viene attivato in seguito al reclutamento, mediato da Grb2, del

fattore Sos. Sos, a sua volta, permette l'attivazione di Ras, convertendo il GDP in GTP, determinando così l'attivazione della cascata Ras-Raf-MEK-MAPK, la traslocazione nucleare delle MAPK e la regolazione genica attraverso la fosforilazione di diversi fattori trascrizionali come Snail e quelli appartenenti alla famiglia degli Ets, inclusi Jun e Fos (Boyer *et al*, 1997; Malumbres e Pellicer, 1998; Takay *et al*, 2001; Conacci-Sorrell *et al*, 2003). Inoltre le MAPK attivate possono direttamente inibire, in seguito a fosforilazione (Montesano *et al*, 1999; Frame e Cohen, 2001; Ding *et al*, 2005), l'attività della GSK-3 β up-regolando così le funzioni di SNAI1.

In seguito all'interazione tra i ligandi e i relativi recettori RTKs, viene attivata la PI-3K che determina la formazione del secondo messaggero fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3), il quale, a sua volta, porta all'attivazione della serina/treonina chinasi Akt (anche definita PKB) ben conosciuta per il suo ruolo nella progressione del ciclo cellulare, nella proliferazione cellulare e nella sopravvivenza. Tuttavia, la PI-3K è anche considerata uno dei maggiori effettori molecolari coinvolti nell'induzione del processo di EMT in quanto attraverso l'attivazione di PKB è possibile ottenere la fosforilazione, e quindi inattivazione, della GSK-3 β . Questo è rilevante in quanto l'inattivazione della GSK-3 β previene la fosforilazione, GSK-3 β -dipendente, di entrambi i fattori trascrizionali SNAI1 e β -catenina, prevenendo così la loro degradazione via proteosoma; SNAI1 e β -catenina possono quindi traslocare all'interno del nucleo, svolgere la loro attività trascrizionale e promuovere la EMT (Bakin *et al*, 2000; Zhou *et al*, 2004).

I fattori di crescita che interagiscono con i recettori RTK, sia attraverso il coinvolgimento dei mediatori Ras e PI-3K, sia tramite altre vie di segnalazione intracellulare che inducono EMT, possono agire anche sull'attività delle piccole GTPasi appartenenti alla famiglia di Rho le quali sembrerebbero svolgere un ruolo cruciale nella regolazione dell'adesione cellulare dipendente dalla E-caderina come anche nei riarrangiamenti dell'actina citoscheletrica, eventi essenziali per le modificazioni morfologiche verso un fenotipo allungato e per l'acquisizione di proprietà migratorie (Keely, 2001; Edme *et al*, 2002)

Un'altra delle principali vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'induzione dell'EMT è rappresentata dalla via Wnt/ β -catenina che è in grado di inviare all'interno del nucleo segnali che di fatto consentono di stabilire una connessione tra i contatti cellula-cellula e l'adesione tra cellule con la risposta cellulare (Nelson e Nusse, 2004). La via Wnt/ β -catenina, questa viene attivata nel momento in cui una delle isoforme di Wnt lega il recettore di membrana Frizzled (Frz); successivamente si ha l'attivazione di Dishevelled che, a sua volta, fosforila e inattiva la GSK-3 β , permettendo così la formazione del complesso trascrizionale β -catenina/TCF/LEF il quale trasloca a livello nucleare dove attiva diversi geni bersaglio che codificano per proteine

coinvolte nel processo di EMT come la vimentina, la fibronectina, la matrilisina, Slug, Ets, e Jun (Conacci-Sorrell *et al*, 2003; Nelson e Nusse, 2004).

1.4.4 Specie reattive dell'ossigeno (ROS) e regolazione della EMT redox-sensibile

Analizzando i meccanismi molecolari alla base dell'EMT recentemente è stato ipotizzato un ruolo dei ROS nell'induzione di questo processo. Le specie reattive dell'ossigeno ed i cambiamenti nell'omeostasi dello stato redox delle cellule possono contribuire, con diverse modalità, alla transizione epitelio-mesenchimale. Sebbene sia stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento dei ROS nello sviluppo di tumori, nella loro progressione e in un numero molto elevato di patologie infiammatorie croniche dall'incidenza particolarmente elevata come la fibrosi epatica (Novo *et al*, 2008), in letteratura sono presenti solo pochi studi che mettono in evidenza possibili correlazioni tra EMT, stress ossidativo e generazione di ROS (Thiery e Sleeman 2006; Polyak e Weinberg 2009, Zeisberg e Kalluri, 2009). Il primo collegamento tra la generazione extra-cellulare di ROS e la EMT è emerso da uno studio effettuato su cellule epiteliali della ghiandola mammaria di topo, le NMuMG. Le cellule sono state esposte in coltura a ripetuti trattamenti con basse dosi di perossido d'idrogeno per quattro giorni in modo da riprodurre condizioni simili a quelle potenzialmente presenti in tessuti in cui siano in corso processi di infiammazione cronica, tipici di molte patologie umane croniche. In queste condizioni sperimentali è stato descritto il cambiamento morfologico delle cellule che assumono aspetto fibroblastoide, in cui si osserva anche la dissoluzione dei contatti cellula-cellula, la redistribuzione della E-caderina nel citoplasma, la up-regolazione di un gruppo di proteine della famiglia delle integrine e l'aumento dell'espressione e dell'attività di molte MMPs tra le quali MMP-2,-3,-9,-10 e -13. Il trattamento cronico con perossido d'idrogeno determina anche l'attivazione persistente di ERK1-2, p38MAPK e della GTPasi Rac1 (Mori *et al*, 2004).

Una seconda linea di ricerca ha proposto che i ROS agiscano alla stregua di mediatori intracellulari in corso di EMT indotta da TGF β 1, meccanismo che potrebbe, ad esempio, contribuire alla patogenesi della fibrosi tubulo-interstiziale nel rene. È stato dimostrato che il TGF- β 1, in cellule MDCK (Madin Darby canine kidney cell), incrementa il livello intra-cellulare di ROS e questo evento è associato all'aumentata fosforilazione di Smad2, all'attivazione di p38MAPK e di ERK1-2, all'aumento di espressione di α -SMA e della fibronectina nonché alla down-regolazione della E-caderina. (Ng *et al*, 1998).

Un'altra linea di ricerca ha proposto una correlazione tra azione della MMP-3, genesi intracellulare di ROS ed EMT. (Przybylo and Radisky, 2007). In relazione al meccanismo messo in opera, la MMP-3 parrebbe indurre un aumento nella generazione dei ROS e l'up-regolazione

di SNAIL in modo dipendente dall'aumento di espressione di una forma di Rac1 generata dallo splicing alternativo del gene (Radisky *et al*, 2005). Questa isoforma di Rac1 è coinvolta nella regolazione della generazione dei ROS da parte del complesso della NADPH ossidasi (NOX). Gli autori riportano che un altro modo per prevenire l'induzione di EMT da parte della MMP-3 è quello di trasfettare le cellule con un plasmide che codifica per la proteina superossido dismutasi-2 (SOD2), un enzima capace di dismutare l'anione superossido a sede mitocondriale, e questo suggerisce che i ROS, che aumentano a seguito dell'esposizione delle cellule a MMP-3, siano di derivazione mitocondriale. Questa ipotesi è stata confermata da studi effettuati su cellule HK-2, linea di cellule umane immortalizzate del tubulo prossimale del rene, alle quali è stato somministrato aldosterone. Sia l'espressione di SNAIL che l'EMT indotte da aldosterone sono state prevenute pretrattando le cellule con la NAC o il rotenone, agenti che bloccano selettivamente il rilascio di ROS dal mitocondrio; l'espressione di SNAIL e induzione di EMT non erano invece prevenuti pre-trattando le cellule con apocianina, che è invece un inibitore della NOX (Zhang *et al*, 2007). Altri autori riportano che la GSK-3 β possa anche comportarsi da inibitore della via di segnale di NF-kB (NF-kB è stato il primo fattore di trascrizione ad essere identificato come redox sensibile (Schreck e Baeurle, 1991) ed è noto il suo coinvolgimento nelle reazioni infiammatorie, nel controllo della crescita cellulare e nella sopravvivenza alla morte programmata (Temkin e Karim, 2007) e che quest'ultimo fattore di trascrizione sia in grado di regolare l'espressione di SNAIL e di indurre EMT tramite una via che risulta correlata con la via di segnalazione di Ras/ERK (Barberà *et al*, 2004). Il coinvolgimento di NF-kB è rilevante in quanto tale fattore non viene attivato solo da fattori di crescita e citochine proinfiammatorie ma è considerato come il fattore di trascrizione redox-sensibile per antonomasia, avvalorando ulteriormente l'ipotesi che i livelli intra-cellulari dei ROS possano essere coinvolti nella regolazione della E-caderina mediante meccanismi redox-sensibili che coinvolgono GSK-3 β , NF-kB e SNAIL.

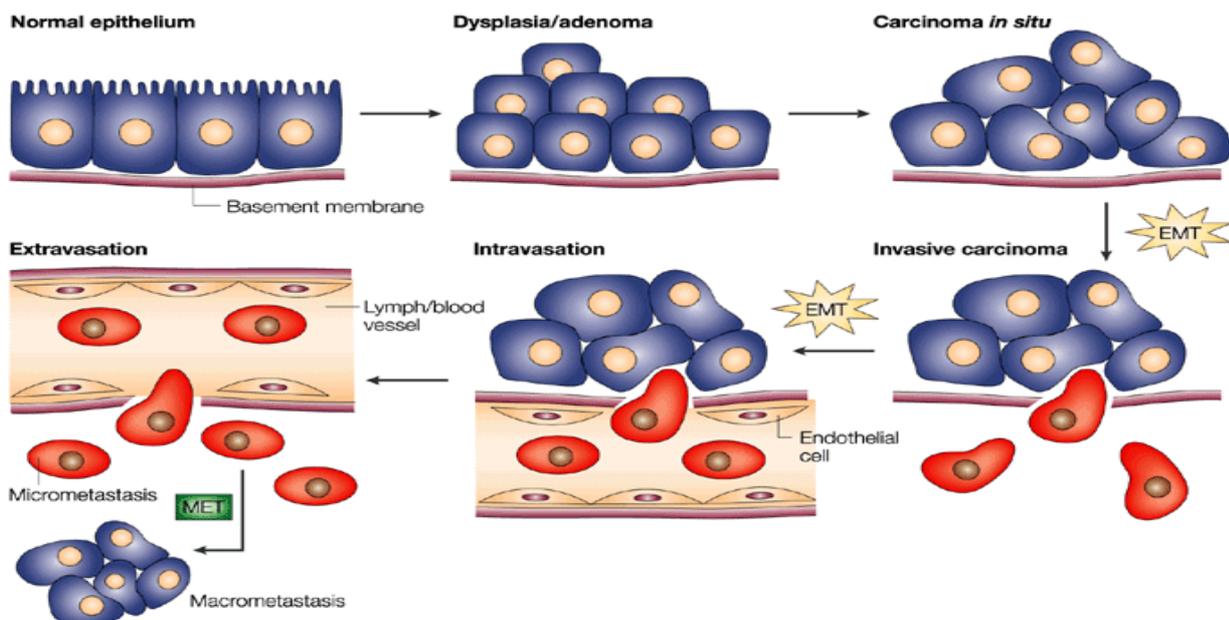
1.4.5 EMT e il processo di invasione tumorale

In molti di questi studi, la fase EMT è stata proposta come marker di malignità mediato dalle cellule tumorali epiteliali (Thiery, 2002). Esperimenti sui topi e con colture cellulari *in vitro* hanno dimostrato che le cellule di carcinoma possono perdere il fenotipo epiteliale e acquisirne uno mesenchimale esprimendo markers tipicamente mesenchimali come α -SMA, vimentina, e desmina (Yang and Weinberg, 2008). Queste cellule, di solito, si trovano sul fronte che interfaccia con lo stroma e sono le stesse cellule che nelle fasi successive invadono e metastatizzano. Gli stadi legati al processo di invasione sono: l'intravasione, il trasporto

attraverso il circolo sanguigno, extravasazione, la formazione di micrometastasi, e in ultimo la colonizzazione (la crescita di piccole colonie in metastasi macroscopiche) (Fidler and Poste, 2008). Le cellule tumorali migratorie una volta superata la fase di EMT e stabilitesi in siti distanti formano colonie secondarie che somigliano, a livello istopatologico, a quelle del tumore primario da cui sono originate. Infatti, queste colonie non conservano per lungo tempo il fenotipo mesenchimale attribuito normalmente alle cellule che invadono ma reversiono nel fenotipo originale.

Questo comportamento è spiegato dal fatto che EMT per facilitare il processo di diffusione metastatica richiede alle cellule tumorali di perdere il fenotipo mesenchimale via MET (*Mesenchymal to Epithelial Transition*) durante la formazione del tumore secondario (Zeisberg *et al*, 2005).

L'induzione di EMT è probabilmente un meccanismo di importanza centrale nella progressione metastatica dei carcinomi e la successiva fase di MET è cruciale per indurre il processo di colonizzazione. Tuttavia, molti aspetti di questo processo meccanicistico non sono stati del tutto chiariti. L'utilizzo di nuovi modelli murini o sonde molecolari potrebbe far luce su vari aspetti legati ad EMT tra i quali, l'identificazione di tutti i segnali microambientali che inducono EMT o scoprire la natura dei cambiamenti a cui vanno incontro le cellule che le rendono sensibili ai segnali innescati da EMT o, in ultimo, chiarire la complessa via di segnalazione all'interno delle cellule epiteliali che orchestra i diversi programmi legati a EMT.



EMT contribuisce alla progressione tumorale. (Tratto da Yhiery, Nat Rev Cancer. 2002)

1.4.6 Fattori che promuovono l'EMT

Riassumendo i fattori di crescita, citochine, molecole di adesione, metalloproteasi, mediatori dell'infiammazione e ipossia sono elementi coinvolti nell'instaurarsi del processo dell'EMT:

- **Transforming growth factor β 1** (TGF- β 1): Come precedentemente illustrato, questa citochina modula l'attività di fibroblasti e miofibroblasti. L'azione del TGF- β 1 si esplica a livello di membrana dove innesca una serie di reazioni che coinvolgono le proteine Smad: queste formano complessi proteici, portandosi a livello intranucleare dove fungono da fattori di trascrizione. Il TGF- β 1 ha anche funzione regolatrice stimolando la sintesi di metalloproteasi 2, caderina 11 (molecola di adesione mesenchimale) e tenascina (proteina coinvolta nella nefrogenesi) (Forino *et al*, 2006). Uno studio su colture di CET umane ha evidenziato che il trattamento con TGF- β 1 induce una modificazione nella morfologia delle cellule, le quali acquisiscono forma allungata e fusata, sebbene dal punto di vista immunohistochimico continuano ad esprimere marker epiteliali (citocheratina ed E-caderina) (Forino *et al*, 2006).

- **Basic fibroblast growth factor** (FGF 2): il suo ruolo nell'EMT è stato analizzato su colture cellulari *in vitro*, comparandoli con gli effetti indotti da TGF- β 1 e da *epidermal growth factor* (EGF): i risultati hanno portato gli autori a riconoscere che FGF 2 può indurre EMT portando effetti simili a quelli di TGF- β 1. Gli è stata attribuita inoltre la capacità di indurre l'espressione delle gelatinasi (MMP 2 e 9) (Strutz *et al*, 2002).

- **Ipossia**: diversi studi inducono a considerare l'ipossia un fattore che promuove lo sviluppo di EMT. Alcuni studi indicano che la sua azione si esplicherebbe attraverso l'attivazione del fattore Twist. Quest'ultimo sembra portare *down expression* delle caderine e innescare l'EMT (Sun *et al*, 2009). Altri studi indicano che l'ipossia possa agire mediante un segnale redox dipendente mediato dalla cascata GSK3 β (Cannito *et al*, 2008).

1.5 Ipossia e cancro

Condizioni di ipossia sono comunemente presenti in numerose neoplasie solide umane, inclusi il carcinoma epatocellulare e tumori di altre sedi che metastatizzano nel parenchima epatico. Le aree di ipossia, che sono abitualmente distribuite in modo eterogeneo nella massa del tumore solido, possono dipendere da una scarsa o alterata vascolarizzazione (*perfusion-limited O₂ delivery*), da un'alterazione della cosiddetta geometria di diffusione (*diffusion-limited O₂ delivery*) o, in misura minore, da specifiche condizioni di anemia, associate alla neoplasia o alla terapia in atto. Si ritiene che le condizioni di ipossia, per quanto teoricamente in grado di indurre anche danno irreversibile e morte di alcune cellule neoplastiche, concorrano di fatto a determinare una rilevante pressione selettiva capace di regolare la crescita tumorale ed in ultimo favorire la sopravvivenza delle cellule maligne a maggiore aggressività. Inoltre, le cellule neoplastiche che sopravvivono ad ipossia mostrano un accresciuto comportamento invasivo e molti autori ritengono che l'ipossia di fatto concorra quindi a favorire la progressione tumorale. La presenza di aree di ipossia in una neoplasia solida è in effetti considerata come un marcatore prognostico indipendente sfavorevole che implica un rischio significativo di sviluppare sia metastasi che resistenza alla terapia. (Vaupel *et al*, 2007; Harrison *et al*, 2004; Harris *et al*, 2002). L'esposizione all'ipossia comporta un marcato aumento dell'espressione di diversi geni regolati da una famiglia di fattori di trascrizione conosciuti come "*hypoxia-inducible factors (HIFs)*".

I geni dei fattori inducibili in ipossia (HIFs) appartengono alla famiglia dei PAS (*PER-ARNT (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator)*) costituiti dal dominio bHLH (basico elica-giro-elica) e il dominio PAS (PERARNT- SIM). Essi sono coinvolti nel legame col DNA e nella dimerizzazione. (Wang *et al*, 1995)

Sono composti da una subunità α sensibile alle variazioni d'ossigeno (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) ed esprimono costitutivamente la subunità β (si conoscono due subunità: ARNT e ARNT2) che eterodimerizzano e legano il DNA agli elementi HREs (hypoxia response elements) in regioni promotoriali o in regioni regolatorie di geni target in grado di incrementare la loro espressione.

Allo stato attuale, tre HIFs sono state descritte (HIF-1, -2, and -3). HIF-1 è il mediatore meglio caratterizzato della risposta cellulare all'ipossia ed è ubiquitariamente espresso nella maggior parte di organi e tessuti.

HIF-2 è più specifico essendo espresso, in condizioni di ipossia, solo in alcuni specifici tipi cellulari tra cui le cellule endoteliali, le cellule gliali, pneumociti di tipo II, cardiomiociti, i fibroblasti del rene, le cellule interstiziali del pancreas e del duodeno, epatociti, e probabilmente, come è stato recentemente suggerito, nelle cellule staminali tumorali. (Hill *et al*, 2009; Qing *et al*, 2009).

In condizioni normossiche, l'espressione di HIF-1 α e in maniera analoga HIF-2 α è continuamente modificata da una serie di enzimi la cui attività, dipendente dai livelli di ossigeno, è in grado di impedire la formazione di complessi trascrizionali in grado di traslocare nel nucleo e legare le sequenze HRE:

a) HIF-1 α viene regolato a livello post-traduzionale da pVHL (proteina von Hippel–Lindau che appartiene ad un complesso ubiquitina ligasi) che riconoscendo due proline idrossilate si lega e induce l'ubiquitinizzazione e quindi degradazione per via proteosomica.

b) In presenza di ossigeno gli enzimi PHDs (enzimi prolina idrossilasi la cui attività dipende dalla presenza di O₂, 2-oxoglutarato, Fe (2+)) possono idrossilare alcune proline di HIF-1 α (PHD1, PHD2), e di HIF-2 α (PHD3) permettendo così il riconoscimento da parte di pVHL. (Berra *et al*, 2003)

c) Alternativamente HIF1AN, una asparagina idrossilasi sensibile a O₂, 2-oxoglutarato e Fe, blocca il legame con CBP/p300 (un cofattore che permette l'attivazione della trascrizione da parte di HIF) impedendo così la formazione del complesso finale di trascrizione.

In condizioni di ipossia, HIF-1 α /HIF-2 α possono formare un eterodimero con ARNT; HIF viene fosforilato/stabilizzato mediante chinasi e può quindi formare il complesso trascrizionale in grado di legare le sequenze HRE. (Gordan *et al*, 2007)

Inoltre in condizioni ipossiche, gli enzimi HIF1AN e/o PHDs sono invece progressivamente inattivati a causa della ridotta disponibilità di ossigeno e, quindi, la concentrazione intracitoplasmatica di HIF aumenta e si formano di conseguenza un maggior numero di eterodimeri HIF1 α /HIF1 β capaci di entrare nel nucleo, di legare HRE e di promuovere la trascrizione di geni a valle di quest'ultimo. (Klimova *et al*, 2008)

Questi fattori HIFs sono tipicamente iper-espressi in tumori solidi e la loro azione di induzione e/o repressione di un numero molto elevato di geni concorre a determinare e/o regolare alcuni processi ed eventi di fondamentale rilevanza:

l'induzione dei processi di angiogenesi (membri della famiglia VEGF, angiopoietina, uPA-R, PAI-1); l'induzione di eventi che possono determinare sia sopravvivenza che morte delle cellule neoplastiche; l'induzione di eventi (espressione di enzimi glicolitici e di trasportatori del glucosio, controllo della respirazione mitocondriale, etc.) in grado di favorire uno *shift* del metabolismo glucidico verso le vie glicolitiche (trasportatori di glucosio come GLUT-1 e GLUT-3 e diversi enzimi glicolitici); il controllo della proliferazione cellulare, (CMET: recettore tirosina chinasi in grado di promuovere la proliferazione e la migrazione); l'induzione di eventi capaci di favorire un'augmentata invasività e capacità di metastatizzare in cellule neoplastiche; l'induzione di resistenza a chemioterapici e a radioterapia; regola l'eritropoiesi (eritropoietina);

regola il controllo vasomotorio (recettore adrenergico $\alpha 1\beta$, iNOS-inducibile NO synthase, endotelina 1, emossigenasi); inoltre il gene HIF viene attivato da molte vie di segnale pro-oncogeniche come quelle di PI3K o RAS e recenti studi hanno dimostrato che l'ipossia aumenta la sintesi non solo di HIF-1 α ma anche di altri fattori legati al processo EMT, quali HGF, NF- κ B, Notch signaling, Twist1 e l'ipometilazione di DNA (Gort *et al*, 2008).

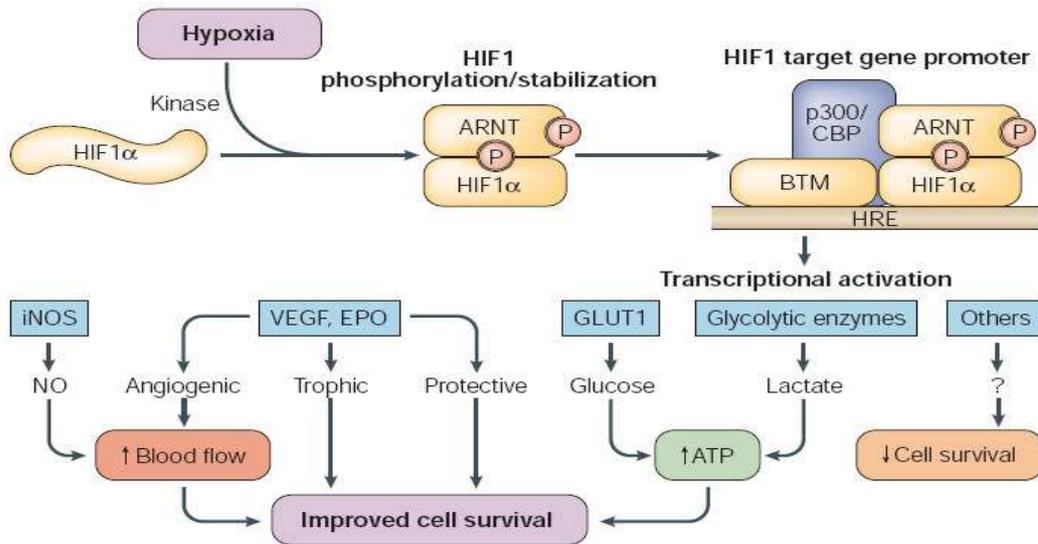
Sebbene in ipossia l'attivazione di HIF-1 α avviene mediante meccanismi post traduzionali, ci sono stimoli che permettono l'aumento della trascrizione dell'mRNA dei geni HIF (citochine, fattori di crescita, oncogeni, stress metabolico e ROS) operando attraverso l'attivazione del signaling di PI3K e Ras/Erk, o in alternativa HIF-1 può aumentare la sua stabilità attraverso l'interazione diretta con i ROS.

Queste modalità con le quali HIF-1 α può agire in maniera indipendente in condizioni ipossiche, potrebbero dare un contributo addizionale in caso danno cronico, nella fibrosi (Higgins *et al*, 2008) e nella progressione tumorale. (Hill *et al*, 2009).

Come già descritto, l'EMT può favorire/indurre la generazione di cellule tumorali con caratteristiche staminali (Moustakas *et al*, 2007), infatti recenti risultati (Simon *et al*, 2008) , suggeriscono che l'ipossia, presente in aree cruciali, definite come nicchie ipossiche, non solo promuove la persistenza di cellule staminali durante l'embriogenesi e nell'adulto ma può contribuire al fenotipo staminale.

Come recentemente dimostrato da Hill *et al* (Hill *et al*, 2009), le cellule con caratteristiche staminali possono essere mantenute sia attraverso la via HIF-1 α , sia la via HIF-2 α dipendente. Sebbene i due geni abbiano simili modalità di risposte all'ipossia, nello specifico HIF-1 α è correlato all'attivazione di Notch-1, all'aumento di espressione di CXCR4, MMPs, uPAR e di geni VEGF.

HIF-2 α è invece principalmente coinvolto nell'induzione di geni correlati alla staminalità embrionale (Octamer-4, Oct-4, uno dei più importanti fattori di trascrizione, in grado di regolare il mantenimento dell'identità staminale) o alla proliferazione (c-myc, gene iper-espresso nel 70% dei tumori umani) (Qing *et al*, 2009).



Regolazione dell'induzione dei geni target di HIF in condizioni di ipossia (Figura tratta da Sharp and Bernaudin. Nat Rev Neuroscience, 2004)

1.6 Serpine

1.6.1 Struttura e funzione delle serpine

Le serpine sono una famiglia di inibitori delle proteasi seriniche implicate in molte funzioni biologiche e nei processi di controllo dell'omeostasi cellulare (Silverman *et al*, 2001). Presentano caratteristiche comuni nella loro struttura, localizzazioni extra ed intra cellulari e meccanismi di inibizione che hanno come bersaglio proteasi specifiche (Gettins 2002; Silverman *et al*, 2004). Filogeneticamente le serpine si dividono in nove gruppi ed in particolare la famiglia delle ov-serpine, inclusa nel gruppo B, è caratterizzata da un'omologia di sequenza aminoacidica dei suoi membri (39-50%), da caratteristiche strutturali comuni (assenza di regioni N- e C-terminali comuni nelle altre serpine) e da una analoga organizzazione genica (Remold-O'Donnell *et al*, 1993).

Dal punto di vista evolutivo le serpine sono considerate molecole antiche in quanto le si ritrova nei batteri, nei virus e negli invertebrati, mentre le ov-serpine sono state identificate nei vertebrati a partire dai pesci fino ai mammiferi (Benarafa *et al*, 2005), dove durante la loro evoluzione, i geni ancestrali, localizzati su un singolo locus, si sarebbero suddivisi in due loci.

Le serpine sono caratterizzate da una struttura ternaria che alterna 9 α eliche e 3 foglietti β tra i quali, all'estremità più alta della molecola, è posizionata l'ansa del sito di reazione (RSL, reactive-site loop), costituito da una sequenza conservata di aminoacidi, caratteristica di ogni singola proteina (Silverman 2001, 2004).

La specificità per le proteasi bersaglio, dimostrata dalle serpine, dipende principalmente dalle loro differenze proprio nella sequenza del sito di reazione, *reactive site loop* (RSL).

Quando il sito viene riconosciuto dalla proteasi, questa si lega (formando un complesso) e lo taglia in un punto specifico determinando come conseguenza un cambiamento nella conformazione della serpine che conduce all'inibizione della proteasi (Izuhara *et al*, 2008).

1.6.2 Le isoforme SERPINB3 e SERPINB4

Anche se la maggior parte delle serpine ha come bersaglio le proteasi seriniche, alcune serpine si sono evolute acquisendo attività inibitorie contro altre proteasi, come ad esempio SERPINB3 (chiamata anche Squamous Cell Carcinoma Antigen 1, SCCA1) e SERPINB4 (chiamata anche Squamous Cell Carcinoma Antigen 2, SCCA2) che hanno come bersaglio le cistein-proteasi (Takeda *et al*, 1995; Schick *et al*, 1998). Nel loro caso le due serpine non formano un complesso

con le cistein-proteasi bersaglio, ma l'interazione con il loro substrato determina l'inibizione dell'attività catalitica della proteasi (Masumoto *et al*, 2003; Sakata *et al*, 2004).

Le due isoforme (SERPINB3 e SERPINB4) sono state originariamente purificate da tessuto di carcinoma a cellule squamose della cervice uterina (Kato *et al*, 1977) ed il clonaggio del cDNA di SERPINB3 (1190 nucleotidi per una sequenza di 390 amminoacidi) da parte di Suminami nel 1990 ha permesso di evidenziare che la sequenza amminoacidica di SERPINB3 è omologa a quella delle altre serpine appartenenti alla sottofamiglia delle ov-serpine, così chiamate per la loro omologia con l'ovoalbumina (Suminami *et al*, 1991).

I due geni codificanti le due isoforme di serpina sono localizzati sul cromosoma 18, nella regione q21.3 di 600 kb (Kuwano *et al*, 1995), assieme ad almeno altri quattro geni codificanti varianti serpiniche.

Questi due geni, quasi identici, sono distribuiti in tandem sul cromosoma (appaiamento testa-coda): il gene più vicino al centromero codifica SERPINB3, quello più vicino alla regione telomerica codifica SERPINB4; probabilmente essi derivano da eventi di duplicazione di un gene ancestrale comune (Schneider *et al*, 1995). L'elevata omologia nella sequenza nucleotidica dei due geni (98%) si traduce in un'altrettanto elevata omologia di sequenza amminoacidica delle due proteine, stimata intorno al 92% (Suminami *et al*, 1991), ma mostrano proprietà e substrati distinti (Izuhara *et al*, 2008) in quanto SERPINB3 inibisce cistein-proteasi (papaina, catepsina S, K e L), mentre SERPINB4 inibisce sia serin-proteasi (catepsina G) sia cistein-proteasi (Der p1 e Der f1) (Schick *et al*, 1997; Luke *et al*, 2000).

La specificità di SERPINB3 e SERPINB4 è dovuta alle differenze nel loro sito di reazione (RSL) nel quale solo 7 residui amminoacidici su 13 (54%) sono identici (Luke *et al*, 2000).

Il loro ruolo, a livello fisiologico, non è ancora stato del tutto chiarito.

1.6.3 Caratteristiche di SERPINB3

SERPINB3 viene espressa normalmente negli epitelii squamosi (epidermide, cervice uterina, esofago, tonsille, vie aeree), ma si trova iper-espressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale (Takeshima *et al*, 1992; Cataltepe *et al*, 2000) ed è stata descritta nell'epatocarcinoma (Pontisso *et al*, 2004, Giannelli *et al*, 2005).

SERPINB3 è una proteina nota dal 1977, anno in cui fu isolata per la prima volta da Kato e Torigoe ed ha un peso molecolare di circa 45kDa (Schneider *et al*, 1995).

Il coinvolgimento di SERPINB3 nella regolazione dei processi proteolitici può avere delle importanti implicazioni a livello dei processi neoplastici, dal momento che l'equilibrio tra le proteasi ed i loro inibitori è in grado di influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione, e la morte cellulare stessa (Hamada *et al*, 2001).

SERPINB3 è di fatto aumentata nei tessuti tumorali, rispetto agli epiteli normali ed esistono alcune evidenze di un legame tra livello di espressione di proteina e il grado di sviluppo tumorale (Silverman *et al*, 1998).

Dati recenti indicano che SERPINB3 è in grado di proteggere le cellule neoplastiche dall'apoptosi cellulare indotta da diversi tipi di stimoli (Suminami *et al*, 2000; Murakami *et al*, 2001) e, in cheratinociti sovraesposti a raggi ultravioletti, trasloca nel nucleo legandosi a JNK1 fosforilato inibendo il processo apoptotico indotto da UV (Katagiri *et al*, 2006). Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che SERPINB3 può promuovere la crescita tumorale anche bloccando l'infiltrazione intratumorale delle cellule NK (Natural Killer) (Katagiri *et al*, 2006).

Il meccanismo attraverso cui SERPINB3 risulta in grado di proteggere le cellule tumorali dall'apoptosi coinvolge l'inibizione dell'attività della caspasi-3, una proteasi coinvolta nella cascata dei segnali intracellulari che inducono apoptosi (Suminami *et al*, 2000). E' stato infatti dimostrato che cellule epiteliali (293T) esprimenti SERPINB3 hanno livelli più bassi di espressione della caspasi-3, rispetto ai controlli (Suminami *et al*, 2000; Murakami *et al*, 2001). Inoltre, ulteriori dati sperimentali hanno documentato come questa serpina inibisca il rilascio di citocromo c dal mitocondrio, suggerendo pertanto una sua influenza a monte, presumibilmente a livello dell'attivazione di bid o bcl2 (Hashimoto *et al*, 2005).

Dati recenti indicano inoltre che questa serpina può indurre *in vitro* proliferazione cellulare, invasività e promuovere inoltre la trasformazione epitelio mesenchimale sia attraverso un meccanismo autocrino, sia mediante un meccanismo paracrino (Quarta *et al*, 2010).

Oltre alla localizzazione citoplasmatica e nucleare, SERPINB3 è stata individuata a livelli elevati nel siero di pazienti affetti da tumori di origine squamocellulare e più di recente è stata dimostrata la sua presenza in immunocomplessi circolanti composti con immunoglobuline di isotipo IgM nel siero di pazienti affetti da epatocarcinoma. In questi ultimi le concentrazioni sono più elevate rispetto a quelle presenti nei pazienti affetti da epatite cronica e cirrosi epatica e, data la sua assenza nei controlli sani, suggerisce che possa essere utilizzata come nuovo marcatore diagnostico tumorale (Beneduce *et al*, 2005). Inoltre nei pazienti con epatite cronica, i livelli sierici dell'immunocomplesso, se seguiti nel tempo sono significativamente aumentati solamente nei pazienti con documentata progressione istologica della fibrosi (Biasiolo *et al*, 2008).

Uno studio recente conferma l'espressione elevata di SERPINB3 nei noduli displastici e nel tessuto cirrotico circostante suggerendo quindi che la sua espressione potrebbe rappresentare un evento relativamente precoce nell'epatocarcinoma e gli autori ipotizzano un possibile utilizzo di questa proteina come marker per individuare l'aggressività del tumore (Guido *et al*, 2008)

Recenti studi hanno inoltre dimostrato come in un'altra patologia fibrosante progressiva quale la fibrosi idiopatica polmonare (IPF) ci sia una iper-espressione di SERPINB3 (Calabrese *et al*, 2008), e una correlazione diretta tra entità di espressione di TGF- β e della serpina SERPINB3, con co-localizzazione delle due molecole a livello cellulare. Inoltre gli stessi autori documentano che l'espressione della serpina risulta correlata positivamente all'andamento clinico-patologico della malattia.

La fibrosi polmonare idiopatica è una patologia progressiva dall'infausta prognosi e fase cruciale del processo di sviluppo e progressione della malattia è l'instabilità epiteliale portando nei casi più gravi alla trasformazione neoplastica. (Calabrese *et al*, 2008). Molte delle caratteristiche della fibrosi idiopatica polmonare rendono tale patologia paragonabile alla fibrosi epatica.

Partendo da questa considerazione è risultato plausibile ipotizzare una correlazione tra l'iper-espressione di SERPINB3 e TGF- β anche nella fibrosi epatica.

2. SCOPO

Studio I

La recente scoperta di una correlazione positiva tra SERPINB3 e TGF- β nella fibrosi polmonare idiopatica (Calabrese *et al*, 2008) ha permesso di ipotizzare l'esistenza di una correlazione di queste due molecole anche nella malattia epatica cronica e nella cirrosi, la cui patogenesi è, per alcuni aspetti, simile a quella polmonare.

Scopo della prima parte della tesi è stato pertanto l'analisi dell'espressione di SERPINB3 e TGF- β nel fegato di pazienti con epatite cronica e cirrosi epatica e la loro correlazione con il grado di fibrosi epatica.

Un ulteriore obiettivo è stato lo studio *in vitro* della correlazione tra le due molecole, utilizzando modelli di colture cellulari trasfettate con SERPINB3 ricombinante. Attenzione particolare è stata riservata al ruolo del sito attivo di SERPINB3, regione responsabile dell'attività antiproteasica, valutata mediante l'impiego di costrutti plasmidici contenenti delezioni di diversa entità nella sequenza codificante la regione ad attività antiproteasica.

Studio II

Recenti studi sperimentali condotti nel nostro laboratorio suggeriscono il coinvolgimento di SERPINB3 nella deregolazione della E-caderina, della vimentina e nell'aumento della capacità invasiva in linee cellulari, caratteristiche tipiche della trasformazione epitelio-mesenchimale. (Quarta *et al*, 2010).

Lo scopo della seconda parte della tesi è quello di caratterizzare gli stimoli regolatori e i meccanismi d'induzione della serpina come fattore solubile in grado di indurre l'invasività e la transizione epitelio mesenchimale.

Inoltre, dato che l'ipossia, una delle condizioni più comuni che si instaurano nel microambiente tumorale, è in grado di indurre transizione epitelio-mesenchimale (Cannito *et al*, 2008) e lo stesso fenomeno è anche mediato da TGF- β 1 (Xu *et al*, 2009) e SERPINB3 (Quarta *et al*, 2010), un ulteriore obiettivo è stato lo studio della potenziale correlazione tra ipossia e SERPINB3 e dei relativi meccanismi di regolazione sia in modelli *in vitro* che *in vivo*.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione dello studio

La prima parte dello studio relativo alla correlazione tra SERPINB3 e TGF- β è stato condotto in 94 pazienti con varie forme di epatopatia cronica così suddivisi: 63 soggetti affetti da infezione cronica HCV, 17 con infezione cronica HBV e 14 pazienti con epatopatia alcolica. I pazienti sono stati sottoposti a biopsia epatica percutanea per finalità diagnostiche, dopo ottenimento del consenso informato.

L'analisi istologica delle biopsie ha documentato la presenza di epatite cronica in 65 pazienti e cirrosi epatica nei restanti 29.

Come gruppo di controllo sono stati inclusi 20 soggetti sottoposti a colecistectomia o biopsia epatica per lo staging di una malattia linfoproliferativa.

Le caratteristiche epidemiologiche dei pazienti arruolati sono riportate nella seguente tabella:

	Epatite cronica	Cirrosi	p value
Numero dei pazienti	65	29	
Età (anni, media \pm s.d.)	52.05 \pm 9.14	55.50 \pm 11.81	0.127
Sesso	43/22	19/10	0.952
Eziologia della malattia			
HCV (%)	45 (66.15)	18 (62.0)	
HBV (%)	14 (21.53)	3 (10.30)	0.13
Alcohol (%)	6 (9.23)	8 (27.6)	
ALT (U/L media \pm s.d.)	104.40 \pm 84.60	131.80 \pm 90.50	0.159
HAI score (media \pm s.d.)	5.90 \pm 77	8.11 \pm 4.20	0.032

Nella seconda parte dello studio relativo alla relazione tra SERPINB3 e ipossia sono state considerate 19 resezioni chirurgiche di fegati di pazienti con cirrosi HCV ed epatocarcinoma (n=9 G1 e n=10 G2) (Edmondson grading system, AFIP).

Sono state inoltre utilizzate biopsie epatiche derivanti da topi transgenici (TG) per SERPINB3 (iperesprimenti la serpina) e da topi wild type (WT) dello stesso ceppo (B57/B16J).

3.2 Istologia ed immunoistochimica

Per la valutazione istologica epatica sono state preparate delle sezioni biottiche epatiche di 4-8 μm e fissate in formaldeide al 10%, quindi incluse in paraffina. Successivamente il pezzo biottico è stato colorato con colorazione di routine Ematossilina Eosina.

Per la valutazione istologica delle sezioni epatiche, in particolare per la quantificazione dell'attività necro-infiammatoria e lo stadio della fibrosi, è stata utilizzata la classificazione di Ishak (Ishak *et al*, 1995).

L'analisi immunoistochimica della biopsia epatica è stata condotta in sezioni istologiche consecutive di fegato. Le sezioni sono state sottoposte a smascheramento antigenico in Buffer Citrato (0.01 mol/L, pH 6.0), successivamente le sezioni sono state trattate con biotina blocking kit (Vector Peterborough, UK) in modo da inibire la biotina endogena e quindi incubate con appropriato anticorpo primario. La successiva marcatura è stata effettuata utilizzando il kit Vectastain ABC (Vector Peterborough) con 3.3-diaminobenzidina tetraidoclorato come substrato cromogenico.

In parallelo è stato allestito un controllo negativo per ciascun esperimento, incubando le sezioni senza anticorpo primario o secondario, oppure con un siero normale.

L'immunoreattività valutata nelle cellule parenchimali epatiche, intesa come il valore medio percentile di immunoreattività cellulare, ottenuta indipendentemente da due patologi, è stata semiquantitativamente valutata così:

- 0 = assenza di immunoreattività cellulare
- 1 = 1-10% di immunoreattività cellulare
- 2 = 11-50% di immunoreattività cellulare
- 3 = > 50% di immunoreattività cellulare

3.3 Estrazione RNA

L'estrazione dell'RNA da tessuto epatico e da cellule è stata eseguita mediante l'uso di Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il campione è stato incubato con 1 ml di Trizol per 5 minuti a temperatura ambiente (fase di omogenizzazione) seguiti dall'incubazione con 0.2 ml di cloroformio per 15 minuti (fase di separazione). Dopo aver centrifugato il campione a 12.000 x g per 15 minuti a +4°C, l'RNA è stato precipitato in 0.5 ml di alcol isopropilico per 10 minuti (fase di precipitazione), seguita dalla centrifugazione a 12.000 x g per 10 minuti a + 4°C. Il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di etanolo al 70% freddo e centrifugato a 7.500 x g per 5 minuti a +4°C (fase di lavaggio). L'RNA è stato risospeso in acqua DEPC e la purezza ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$) è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica (Beckman DU530).

3.4 Retrotrascrizione dell'RNA a cDNA

L'RNA estratto e quantificato è stato retrotrascritto a DNA complementare (cDNA). Successivamente è stato digerito il DNA residuo trattando 1 μ g di RNA/campione con 1 μ l Deoxyribonuclease I Amplification Grade, 1 μ l Dnase I Reaction Buffer 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in acqua DEPC a temperatura ambiente per 15 minuti. I campioni sono stati poi incubati con 1 μ l di EDTA 25 mM per 10 minuti a 65°C. Sono stati aggiunti 1 μ l di Oligo dT (500 μ g/ml) e 1 μ l di DNTP 10 mM e la soluzione è stata mantenuta a 65°C per 5 minuti. Il cDNA è stato dunque sintetizzato a partire dal RNA utilizzando 4 μ l di First-Strand Buffer 5X, 2 μ l di DTT 0.1 M, 1 μ l di RNase OUT e RT Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alla concentrazione di 200 U/ μ g. La soluzione è stata incubata a 42° C per 50 minuti e conservata a -80° C fino all'utilizzo.

3.5 Colture cellulari epatiche e condizioni di coltura

Le linee cellulari di epatocarcinoma utilizzate (HepG2 e Huh7) sono state coltivate in monostrato su fiasche sterili all'interno di incubatori a 37 °C, in atmosfera contenente 5% di CO₂ e 95% di umidità, utilizzando per HepG2 Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e per Huh7 Dulbecco's Modified Medium (DMEM Sigma-Aldrich) contenenti: 10% di Fetal Bovine Serum, 1% Non-Essential Amino Acid Solution, L-Glutamina 2mM, 1% di soluzione Penicillina-Streptomicina.

Sono stati anche impiegati epatociti umani primari crioconservati (Provitro, GmbH, Berlin, Germany) utilizzando il Medium di coltura standard raccomandato (Provitro GmbH, Germany) a 37 °C, 5% di CO₂ e 95% di umidità.

Negli esperimenti disegnati per valutare il ruolo dell'ipossia, le cellule sono state mantenute in condizioni normossiche per ottenere la desiderata confluenza (65-70%) e successivamente incubate in apposito incubatore in controllate condizioni di ipossia (3% O₂) fino a 96 ore. (Cannito *et al*, 2008)

3.6 Costruzione del vettore d'espressione SERPINB3

Differenti varianti del gene SERPINB3 (accession number NM_006919) sono state sintetizzate utilizzando i primer 1-4 (vedi tabella 1) partendo dall'RNA totale, mediante Nested PCR per ottenere il corrispondente cDNA. Quest'ultimo è stato direttamente clonato nel vettore d'espressione eucariotico direzionale pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen, Carlsbad). Il costrutto è stato inserito in cellule competenti di *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) mediante shock termico a 42°C per 30 sec e la linea trasformata è stata propagata in apposito terreno di crescita a 37°C. Successivamente la coltura è stata estratta e purificata mediante maxiprep utilizzando il kit di purificazione Genopure Plasmid Maxi kit (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Le sequenze sono state confermate mediante sequenziamento automatico (Apply Biosystem, Foster City, CA).

Come controllo negativo è stato utilizzato il plasmide pcDNA3.1 mancante dell'inserito SERPINB3. Mentre come controllo positivo per la successiva immunofluorescenza è stato utilizzato il vettore di espressione SERPINB3/GFP il quale possiede, associato a SERPINB3, il gene *green fluorescent protein* codificante per una proteina fluorescente che emette una radiazione di colore verde a 505 nm.

Il sito attivo di SERPINB3, denominato Reactive Site Loop (RSL) conferisce alla proteina l'attività antiproteasica. Per valutare il coinvolgimento del sito attivo nella modulazione della risposta sono stati prodotti diversi vettori d'espressione e differenti proteine ricombinanti ciascuna con una differente mutazione/delezione diversa a livello del sito attivo con conseguente alterata attività enzimatica proteasica. In questo studio sono stati utilizzati i seguenti vettori d'espressione :

- A. Delezione totale dell'intera regione RSL.
- B. Delezione della regione costante di RSL
- C. Mutazione puntiforme nel codone P14 dov'è stata sostituita un'alanina con un'arginina.
- D. Mutazione puntiforme nel codone P4: sostituzione di una glicina con un'alanina. (denominato anche SCCA-PD).

I mutanti A, e B comportano una totale abolizione dell'attività enzimatica proteasica, il mutante C una parziale riduzione (Harrison *et al*, 2003), mentre il mutante D possiede un'attività

enzimatica 6 volte maggiore nei confronti della forma wild type per quanto riguarda l'inibizione della proteasi papaina. (Turato *et al*, 2010 Exp Bio Med, *in press*)

3.7 Produzione delle proteine ricombinanti SerpinB3

Il cDNA della forma wild type di SerpinB3 e delle differenti varianti sopra descritte, sono stati clonati nel vettore di espressione pET101 (Invitrogen Carlsbad, CA). Il costrutto plasmidico pET101/SerpinB3 è stato usato per trasformare le cellule competenti BL21 Star(DE3) per l'espressione proteica.

Dopo opportuna incubazione a 37°C in incubatore overnight e induzione proteica mediante isopropil-β-galattosidasi (IPTG, Sigma-Aldrich), l'estratto proteico è stato purificato mediante colonna a scambio ionico e la frazione di SERPINB3 purificata è stata caratterizzata mediante SDS page.

Le proteine ricombinanti ottenute, conservate a -80°C sono state utilizzate per i successivi studi di stimolazione cellulare paracrina.

3.8 Trasfezione delle linee cellulari epatiche

Tutte e tre le linee cellulari a disposizione (HepG2, Huh7 ed epatociti primari umani) sono stati trasfettati transientemente con il vettore plasmidico contenente il gene d'interesse completo SERPINB3 oppure con una delle tre varianti contenenti differenti mutazione/delezione del sito attivo come precedentemente descritto. Come controllo negativo sono state trasfettate le stesse cellule solamente con il vettore vuoto (pcDNA3.1, Invitrogen).

Le cellule, che crescono in adesione sulla plastica, sono state seminate in piastre da 6 pozzetti con una densità di 5×10^6 cellule per pozzetto.

In ogni pozzetto è stato aggiunto 1μg di DNA (della preparazione plasmidica contenente il gene SERPINB3 precedentemente descritto) con l'aggiunta di Lipofectamin Reagent e plus Reagent (Invitrogen). Dopo 5 ore d'incubazione a 37 °C, 5% di CO₂ e 95% di umidità le cellule son state lavate per due volte con OptiMEM (Invitrogen) ed incubate con terreno di coltura fresco RPMI medium (Sigma-Aldrich) arricchito con 10% FBS per le seguenti 48 ore.

La produzione del clone stabile (HepG2/SerpinB3) è stata ottenuta dopo diluzioni seriali ed espansione di una singola colonia trasfettata mediante l'utilizzo dell'antibiotico G418 nel medium (0.3 mg/ml G418 Sigma).

3.9 Amplificazione genica mediante Real-Time Polymerase Chain Reaction

Per valutare quantitativamente l'espressione genica dell'mRNA è stata effettuata la reazione di amplificazione quantitativa (Real-time PCR) con lo strumento LightCycler® (Roche, Mannheim, GE) utilizzando il Sybr Green (Roche, Mannheim, GE) come indicatore di fluorescenza e verifica della specificità dei prodotti amplificati mediante curva di melting.

La Real-Time PCR è una tecnica che consente la simultanea amplificazione e quantificazione di acidi nucleici attraverso il monitoraggio in tempo reale dell'intensità di fluorescenza che si libera dal prodotto di amplificazione durante la reazione a catena della DNA polimerasi: questo risulta possibile mediante l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo, a livello del prodotto di reazione, segue la stessa cinetica della PCR. Il Sybr green emette una fluorescenza maggiore quando intercalato al DNA a doppia elica, quindi, con il procedere dei cicli di amplificazione, si assisterà ad un continuo aumento della fluorescenza (Morrison, 1998). Il ciclo raggiunto il quale la fluorescenza supera il valore base (*threshold*) viene indicato come Ct (*Cycle threshold*).

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta sui campioni conservati a - 80°C per i seguenti geni: GAPDH, SERPINB3, TGF-β1. Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse sono state individuate tramite consultazione del database Nucleotide disponibile online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e sono stati disegnati specifici primers avvalendosi del programma Primer3 (versione 0.4.0).

Nella tabella n.1 sono riportate le sequenze dei primers utilizzati: SERPINB3 For, SERPINB3 Rev, TGF-β1 For, TGF-β1 Rev. Come gene housekeeping si è considerato il gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e l'espressione di questo gene è stata sempre valutata in parallelo in ciascuna amplificazione per stimare l'integrità dell'RNA estratto.

La soluzione di reazione (20 µl) era così costituita: 4µl di FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I master Mix (Roche), 0.25 µl di ciascun primer 20 µM, 2 µl del cDNA retrotrascritto da 1µg di RNA dei campioni. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono state le seguenti:

- 1 ciclo di denaturazione iniziale a 95°C per 10 min;
40 cicli di
- denaturazione (94°C per 1 s),
- annealing (62°C per 10 s)
- estensione (72°C per 10s);

Oltre alla curva d'amplificazione è stata considerata per ogni ciclo anche la curva di Melting che permette di valutare la specificità d'amplificazione, inoltre l'amplificato è stato confermato con

corsa elettroforetica in gel d'agarosio dopo colorazione con l'intercalante Etidio Bromuro (Sigma-Aldrich).

I dati sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relativa dell'algoritmo della derivata seconda. Tale metodo consente di valutare le differenze nei livelli di espressione di un gene tra un campione ed il relativo controllo. Per ogni campione (analizzato in triplicato) è stato individuato il valore di Ct del gene di interesse (SERPINB3, TGF- β 1) e di quello housekeeping (Gapdh). È stata quindi calcolata la loro differenza che rappresenta il Δ Ct in modo tale che la quantità di ogni messaggero codificante il gene di interesse sia normalizzata rispetto al gene housekeeping. Per ogni gruppo di trattamento è stato calcolato il Δ Ct medio e la deviazione standard. La differenza tra il Δ Ct di un qualsiasi gruppo di trattamento ed il Δ Ct del gruppo controllo (campioni trasfettati con il plasmide vuoto) rappresenta il $\Delta\Delta$ Ct, derivandone che il $\Delta\Delta$ Ct del gruppo controllo è pari a zero. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta Ct}$, che per il gruppo dei campioni controllo sarà quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni non trattati). Con tale metodo per ogni campione la quantità del gene di interesse analizzato è quindi stata espressa come n-volte rispetto alla quantità presente nelle cellule di controllo. Tutti i dati sono stati espressi come media \pm errore standard.

3.10 Valutazione dell'espressione proteica

3.10.1 Immunofluorescenza

L'espressione proteica cellulare è stata valutata attraverso la tecnica dell'immunofluorescenza.

Le cellule sono state seminate e cresciute in adesione su vetrino in una quantità di circa 2×10^5 cellule/ vetrino e mantenute in incubatore a 37 °C secondo le condizioni richieste. Successivamente le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4%, quindi permeabilizzate con Triton allo 0.2% e bloccata l'aspecificità dei siti di legame con 5% di BSA in PBS. Ai vetrini è stato aggiunto l'anticorpo primario, quindi sono state incubate a overnight a 4°C.

Sono state poi lavate in Tween 20 allo 0.1% in PBS quindi incubate con l'anticorpo secondario propriamente coniugato (FITC-TRITC) diluito 1:50 (Dako, Copenhagen, Denmark) a temperatura ambiente per 2 ore. Per poter identificare i nuclei, le cellule son state trattate con 20ug/mL di Hoechts 33342 (Sigma-Aldrich) per 5 min. Successivamente i vetrini sono stati lavati in PBS, asciugati a temperatura ambiente e fissati con Glicerolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Per ogni vetrino è stato eseguito un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità). I vetrini così

ottenuti sono stati osservati al microscopio a fluorescenza (Axiovert 200M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Germany).

3.10.2 Saggio ELISA

La quantificazione di SERPINB3 libera è stata eseguita con metodo ELISA tipo sandwich, impiegando il Kit SCCA-LISA (Xeptagen, Marghera, VE, Italy) che prevede l'utilizzo di un anticorpo oligoclonale anti-SERPINB3 fissato sulla fase solida. La reazione è stata rivelata con l'aggiunta di un anticorpo anti-SERPINB3 biotinilato e sviluppata con TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) e streptavidina-HRP. Ogni campione è stato testato in doppio e la concentrazione di SERPINB3 è stata determinata inserendo, in ogni seduta, una curva di calibrazione a 6 punti ottenuta con diluizioni scalari di una preparazione standard di SERPINB3 ricombinante in un range compreso fra 16-0.5 ng/ml.

Per valutare la concentrazione proteica attiva del TGF- β presente nel surnatante è stato utilizzato il TGF- β 1 E_{max} Immuno Assay System (Promega) con caratteristiche analoghe a quelle appena descritte. La quantità di TGF- β 1 biologicamente attivo presente nel campione è stata calcolata in base alla densità ottica misurata e riportata alla curva standard di taratura standard del Kit con un range lineare tra 15.6 e 1000 pg/ml.

3.10.3 Western Blot

Una quantità di 5×10^6 cellule al termine dei diversi trattamenti in condizioni normossiche e ipossiche sono state lavate con PBS 1X, staccate mediante tripsinizzazione e centrifugate a 1200g per 5 minuti ottenendo un pellet cellulare che può essere conservato a -80°C.

L'estrazione della frazione proteica totale è stata effettuata risospendendo il pellet cellulare nel buffer di lisi (*triple lysis buffer*: 50mM Tris-HCl pH 8.8, 150mM NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1% NP40, 10mM PMSF, 10mM Na₃OV₄, 100mM aprotinina, 5 mM EDTA, 100mM antipaina, *Protease Inhibitor cocktail III* diluito 1:10). Il pellet così risospeso è stato mantenuto in ghiaccio per 30 minuti, agitandolo ogni 10 minuti. Alla fine dell'incubazione il lisato cellulare è stato centrifugato a 6000g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato recuperato ed è stata effettuata la determinazione proteica utilizzando il kit di estrazione BCA Protein Assay Reagent (PIERCE, Rockford, IL).

40 μ g di estratto proteico totale sono stati separati tramite SDS-PAGE con un gel al 10% di acrilammide; al termine della corsa elettroforetica il trasferimento delle proteine su membrana di

PVDF (Millipore) è stato effettuato per 18 ore a 4°C. La membrana è stata poi saturata con TBS-Tween20 0.1% (TBS-T) addizionato di 5% di latte in polvere (Sigma Aldrich) per 1 ora a temperatura ambiente. L'ibridazione con l'anticorpo primario è stata effettuata incubando la membrana in TBS-T al 5% di BSA per 18 ore a 4°C. Il giorno successivo sono stati eseguiti tre lavaggi di 10 min con TBS-T, al termine dei quali è stata effettuata l'ibridazione con l'anticorpo secondario (HRP-coniugato, anti-coniglio IgG, GE Healthcare-Amersham) per 1 ora a temperatura ambiente. Come controllo di trasferimento e come controllo interno, la membrana è stata re-incubata con anticorpo anti-actina (policlonale di coniglio, Sigma Aldrich) diluito in PBS-Tween20 0.05%. La membrana di PVDF è stata poi sviluppata utilizzando il kit ECL kit, (Amersham LifeScience).

3.11 Saggio di migrazione/invasione cellulare

Il test è stato effettuato mediante l'utilizzo di camere di Boyden, allo scopo di valutare l'eventuale effetto chemiotattico/proinvasivo di determinati stimoli nei confronti delle diverse linee cellulari utilizzate. A tal proposito, le cellule sono state seminate in piastre da 6 cm di diametro, dopo 24 ore sono state staccate dalla piastra mediante una soluzione di tripsina-EDTA e centrifugate a 1600 rpm per 5 minuti: le cellule del pellet sono state contate in una camera di Burker. Per allestire ogni camera di Boyden sono state utilizzate 25000 cellule ed il primo passo è stato quello di rivestire dei filtrini (porosità di 8 µm) con collagene (per i test di chemiotassi) o con Matrigel (per i test di invasività) diluiti in SFIF alla concentrazione finale di 50 µg/ml, per 30 minuti a 37°C. Nel frattempo la parte inferiore delle camere di Boyden è stata riempita con 210 µl di SFIF, con o senza l'aggiunta di sostanze chemiotattiche (SERPINB3 S-WT, S-PD, S-Del o raccolta dal terreno di coltura delle HepG2/SCCA a 96 ore). Sulla parte inferiore della camera di Boyden è stato adagiato il filtrino rivestito con collagene o con Matrigel, la cameretta è stata chiusa e, nella parte superiore di essa, sono state introdotte le cellule (220 µl). La camera di Boyden è stata quindi incubata per 6h (nei test di chemiotassi) o per 48h (nei test di invasività) a 37°C per valutare l'eventuale capacità migratoria/invasiva delle cellule. Al termine dell'incubazione, il filtro è stato rimosso, le cellule sono state fissate per 2 minuti in metanolo e poi colorate con cristal violetto per 5 minuti: la migrazione è stata valutata contando, con l'ausilio di un microscopio ottico, le cellule migrate attraverso il collagene o il Matrigel in almeno 10 differenti campi ottici (x40 Zeiss, Oberkochen, Germany). I conteggi sono stati espressi come $media \pm DS$.

3.12 Produzione intracellulare di ROS

Cellule HepG2 sono state seminate in piastre da 12 pozzetti (10^5 cellule/pozzetto) ed esposte a ipossia (3% O_2) per 15 minuti o come controllo positivo trattate con $50\mu M$ di H_2O_2 in condizioni di normossia.

La produzione intracellulare dei ROS è valutata con un metodo fluorimetrico basato sull'ossidazione del substrato non fluorescente 2',7'-dichloro fluorescein (DCFH) che si trasforma nel prodotto fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). La forma esterificata del DCFH, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), è capace di attraversare le membrane cellulari e, deacilata, è ossidata al prodotto fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). La fluorescenza è misurata mediante microscopia a fluorescenza (Zeiss).

3.13 Silenziamento genico di HIF-1 α e HIF-2 α mediante small RNA Interference

Gli esperimenti di silenziamento genico (siRNA) che conducono all'inibizione dell'espressione di singoli geni, sono stati effettuati mediante siRNA duplex (Qiagen Italia, Milano, Italy) utilizzando le seguenti sequenze target:

HIF-1 α : 5'-AGG AAG AAC TAT GAA CAT AAA-3'

HIF-2 α : 5'-CCC GGA TAG ACT TAT TGC CAA-3'

Il siRNA e il corrispondente controllo negativo non silenziato è stato trasfettato in cellule HepG2 mediante Lipofectamin (Invitrogen) fino a 72h. Successivamente le cellule trasfettate sono state trasferite in nuovo terreno di coltura ed esposte per ulteriori 48 ore alle condizioni sperimentali desiderate.

3.14 Analisi statistica

La significatività statistica è stata determinata utilizzando il test Unpaired t test, con correzione di Welch e Mann Whitney nel caso di test non parametrico. La normalità della distribuzione per le variabili quantitative è stata valutata mediante Kolmogorov e Smirnov test. Per valutare la correlazione lineare tra le variabili è stata utilizzata la correlazione di Spearman. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante GraphPad InStat Software (San Diego, CA).

Tabella 1. Lista dei Primer mRNA utilizzati (Invitrogen)

Primer	Sequenza 5'-3'
1 SERPINB3 out For	CACAGGAGTTCCAGATCACATCGAG
2 SERPINB3out Rev	CTGGAAGAAAAAGTACATTTATATGTGGGC
3 SERPINB3 in For	CACCATGAATTCCTCAGTGAAGCCA
4 SERPINB3 in Rev	ATTGCATCTACGGGGATGAG
SERPINB3 RT For	GCA AAT GCT CCA GAA GAA AG
SERPINB3 RT Rev	CGA GGC AAA ATG AAA AGA TG
TGF- β 1 RT For	AAGTGGACATCAACGGGTTC
TGF- β 1 RT Rev	GTCCTTGCGGAAGTCAATGT
Gapdh RT For	TGG TAT TCG GGA AGG ACT CAT GAC
Gapdh RT Rev	ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC

For= forward

Rev= reverse

Tabella 2 Lista degli anticorpi utilizzati.

ANTICORPO	SPECIFICITA'	AZIENDA PRODUTTRICE
SERPINB3	Rabbit polyclonal	Xeptagen Biotechnology, Italy
TGF- β	Mouse monoclonal	Genzyme Diagn,MA, USA
E-caderina	Mouse monoclonal	Santa Cruz, CA, USA
Fibronectina	Mouse monoclonal	Santa Cruz, CA, USA
GSK-3 β totale	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology
GSK-3 β fosforilato	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology
HIF-1 α	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology
HIF-2 α	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology
SNAIL	Rabbit polyclonal	AbCAM, Cambridge, UK
MMP-2/MMP-9	Rabbit polyclonal	AbCAM, Cambridge, UK
α -SMA	Mouse monoclonal	Sigma Aldrich, Italy
β actina	Mouse monoclonal	Sigma Aldrich, Italy
Cy2 Ab secondario	Goat anti-mouse IgG	Millipore, Italy
Cy3 Ab secondario	Goat anti Rabbit IgG	Millipore, Italy
Cy3 Ab secondario	Goat anti-mouse IgG	Millipore, Italy
HRP Ab secondario	Goat anti Mouse IgG-	Sigma Aldrich, Italy
HRP Ab secondario	Goat anti Rabbit IgG-	Sigma Aldrich, Italy

4. RISULTATI

4.1. Studio I

SERPINB3 modula l'espressione di TGF- β nella malattia epatica cronica

La prima parte della tesi è rivolta allo studio della correlazione tra SERPINB3 e TGF- β . Recenti studi infatti hanno dimostrato che in un'altra patologia fibrosante progressiva quale la fibrosi idiopatica polmonare è stata osservata una correlazione diretta tra la citochina TGF- β e la serpina SERPINB3 (Calabrese *et al*, 2008). Abbiamo voluto quindi verificare la correlazione tra queste due molecole anche in ambito epatico sia mediante studi *in vivo* che studi *in vitro*.

4.1.1 Correlazione in vivo tra SERPINB3 e TGF- β

Sono state analizzate mediante immunostochimica sezioni di fegato consecutive, al fine di valutare la presenza della serpina e di TGF- β e la loro localizzazione a livello cellulare. Nei pazienti con epatite cronica, TGF- β parenchimale è stato visualizzato nel citoplasma degli epatociti che si trovano all'interfaccia con lo spazio portale, mentre nei pazienti con cirrosi la reattività è stata osservata non solo negli epatociti di confine degli spazi portali, ma anche all'interno delle bande fibrose che circondano i pseudolobuli. SERPINB3 ha mostrato una reattività simile a quella di TGF- β e nelle sezioni epatiche consecutive si è rilevata inoltre una correlazione positiva non solo riguardo all'espressione delle due molecole ma anche della loro localizzazione. Nelle immagini sotto riportate (Fig.1) si osserva come il pattern d'espressione di TGF- β sia simile a quello di SERPINB3.

Per definire meglio la correlazione tra entità della fibrosi, SERPINB3 e TGF- β e parametri eziologici e virologici, l'immunoreattività è stata considerata nei seguenti gruppi:

- Le 3 principali cause eziologiche: HCV, HBV e Alcool
- I 3 principali genotipi di HCV: genotipo 1, 2, 3

I risultati hanno documentato come la correlazione tra SERPINB3 e TGF- β sia statisticamente positiva indipendentemente dall'eziologia ed anche dal genotipo di HCV. (Fig 2)

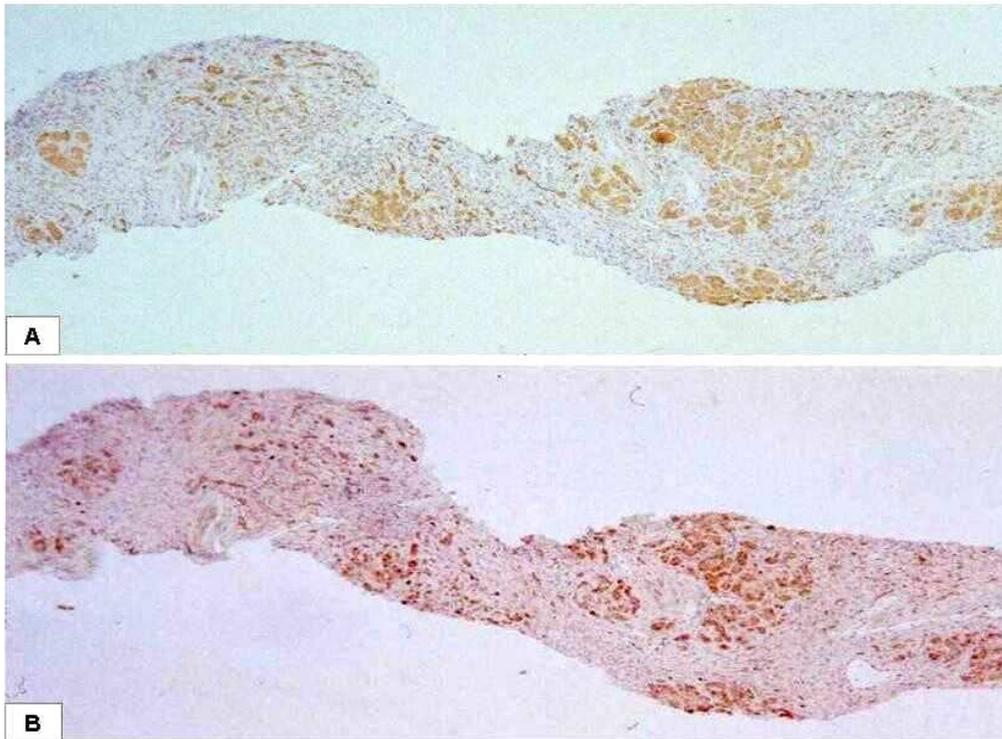


Figura 1 Colocalizzazione di SERPINB3 e TGF- β nel fegato.

Immunoistochimica per SERPINB3 (A) e TGF- β (B), le due sezioni epatiche sono tra loro sequenziali e derivano dalla biopsia epatica di un paziente cirrotico. L'immunoreattività mostra, in entrambe le colorazioni, una distribuzione simile caratterizzata da gruppi di cellule a positività prevalentemente citoplasmatica.

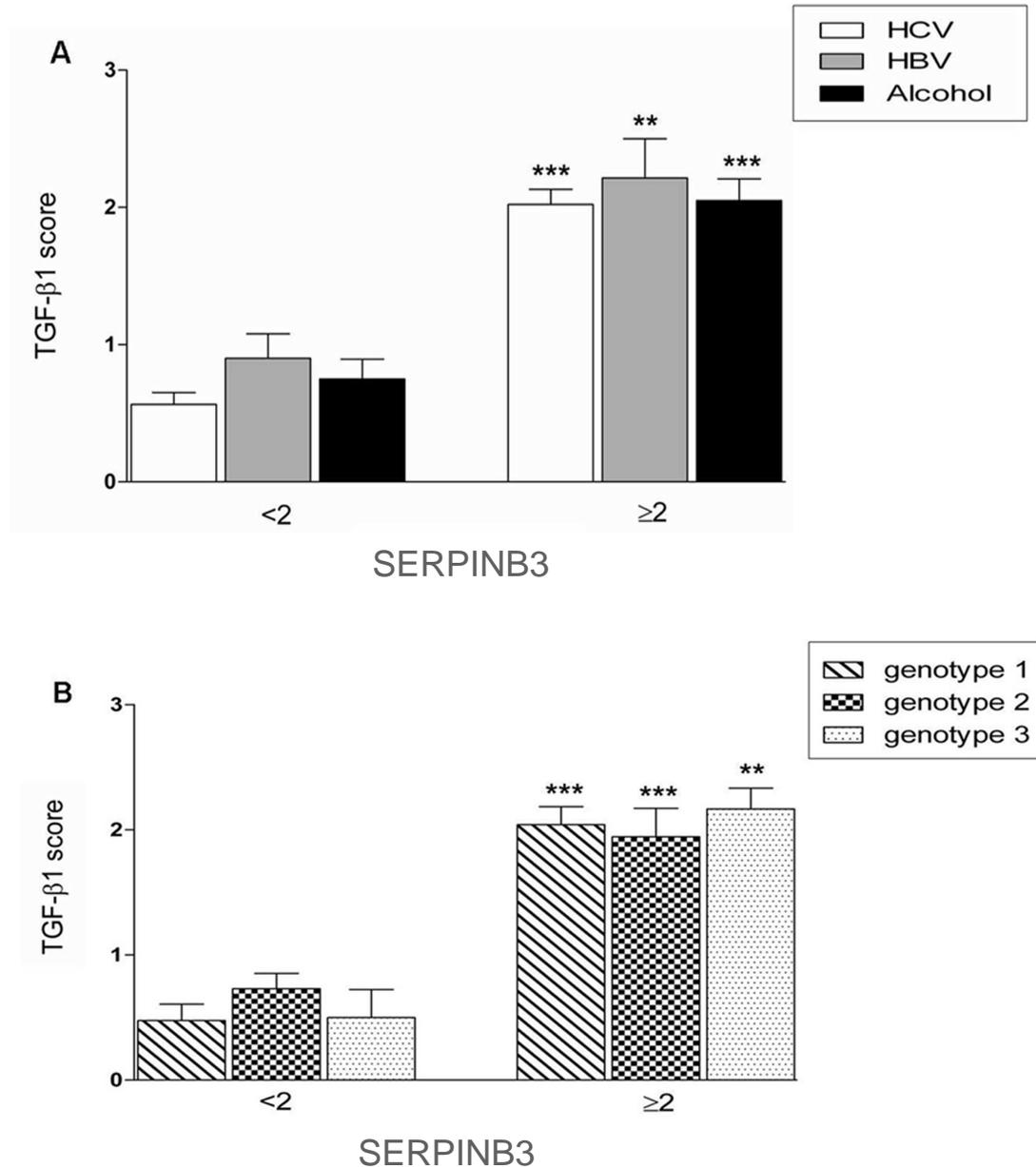


Figura 2. Rapporto tra l'espressione epatica di SERPINB3 e TGF-β.

(A) L'istogramma mostra l'immunoreattività valutata rispetto all'eziologia della patologia epatica. La distribuzione dei valori medi di TGF-β, determinati nelle biopsie epatiche dei soggetti in studio, sono stati raggruppati secondo l'eziologia e divisi per l'entità di espressione di SERPINB3 (score<2 vs ≥ 2) valutato nelle sezioni epatiche sequenziali ottenute dallo stesso campione.

(B) Immunoreattività rilevata in rapporto al genotipo di HCV. La distribuzione dei valori medi di TGF-β nelle biopsie epatiche dei soggetti affetti da HCV è stata analizzata nei pazienti con infezione HCV, raggruppati in base al genotipo e suddivisi in base alla differente espressione di SERPINB3. Le analisi statistiche sono state svolte utilizzando il test t di Student corretto con il test di Welch's. ** SerpinB3 < 2 vs > 2 = (P < 0.005); *** SERPINB3 < 2 vs > 2 = (P < 0.001).

4.1.2 Correlazione con la fibrosi epatica

Come descritto dalla letteratura, TGF- β è una delle citochine maggiormente coinvolte nel processo fibrogenetico epatico. Partendo da tale asserzione e considerando i risultati descritti nel capitolo precedente, dove si osservava una correlazione positiva tra le due molecole, è stata analizzata la possibile correlazione tra SERPINB3 e la fibrosi epatica.

Sono state quindi studiate separatamente SERPINB3 e TGF- β rispetto al corrispondente grado di fibrosi epatica secondo lo score di Ishak (Ishak *et al*, 1995). (Fig.3)

L'analisi statistica dei dati, utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman, ha dimostrato una correlazione positiva non solo tra TGF- β vs la fibrosi epatica, ma anche tra la fibrosi epatica e SERPINB3. I valori di correlazione di SERPINB3 e TGF- β con la fibrosi epatica sono stati rispettivamente: $r = 0.6485$, $P < 0.0001$; $r=0.7424$, $P < 0.0001$.

I parametri clinici e biochimici della popolazione in studio quali età, sesso e transaminasi non hanno mostrato alcuna relazione con il valore d'espressione di SERPINB3 e TGF β .

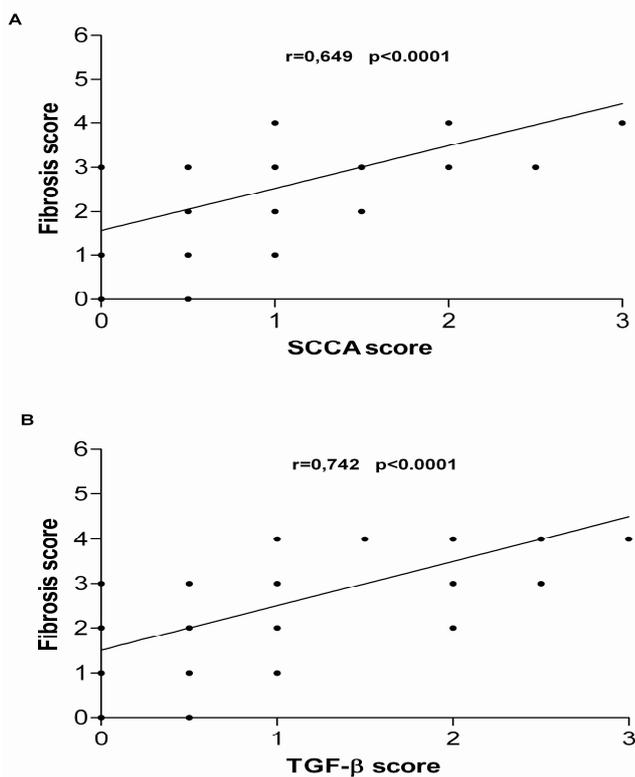


Figura 3. Correlazione tra il grado di fibrosi e SERPINB3 e TGF- β .

I parametri considerati sono stati valutati in un gruppo di pazienti con epatite cronica. Il grado di fibrosi è stato determinato nelle sezioni di biopsia epatica colorate con Ematossilina Eosina. Per l'analisi statistica dei valori si è utilizzato il coefficiente di correlazione di Spearman; ciò ha permesso di evidenziare una correlazione positiva tra il grado d'espressione di entrambe le molecole rispetto al grado di fibrosi epatica sia per SERPINB3 ($r = 0.6485$, 95% intervallo di confidenza:0.4716-0.7752, $P < 0.0001$) che per TGF- β ($r = 0.7424$, 95% intervallo di confidenza:0.6014–0.8386, $P < 0.0001$).

Studi *in vitro*

4.1.3 SERPINB3 induce l'espressione di TGF- β 1

Sono stati effettuati anche degli studi *in vitro* per poter dimostrare la presenza di un rapporto causale tra TGF- β e SERPINB3. Al fine di confermare l'induzione di TGF- β da parte di SERPINB3, sono state trasfettate 2 linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2 e Huh 7 ed epatociti umani primari con il plasmide contenente il gene SERPINB3. Come controllo negativo di tale esperimento sono state trasfettate le stesse linee cellulari con il plasmide vuoto, ossia privo del gene della serpina.

La variazione d'espressione di TGF- β 1 e SERPINB3 è stata analizzata sia dal punto di vista trascrizionale, valutando l'espressione di mRNA mediante real time-PCR, sia dal punto di vista proteico, mediante il saggio ELISA per l'analisi della proteina nel sovrinatante delle cellule trasfettate dopo 48h.

Sia il valore d'espressione di mRNA del TGF- β 1 che il dosaggio proteico di TGF- β 1 hanno mostrato un considerevole aumento in seguito all'induzione di SERPINB3, effetto non verificatosi nei controlli. Questo esperimento ha quindi permesso di dimostrare come differenti tipi cellulari trasfettati transientemente con SERPINB3 siano capace d'indurre l'aumento di trascrizionale e un aumento della secrezione della forma biologicamente attiva della citochina TGF- β 1, suggerendo un possibile rapporto di causalità tra le due molecole. (Fig.4)

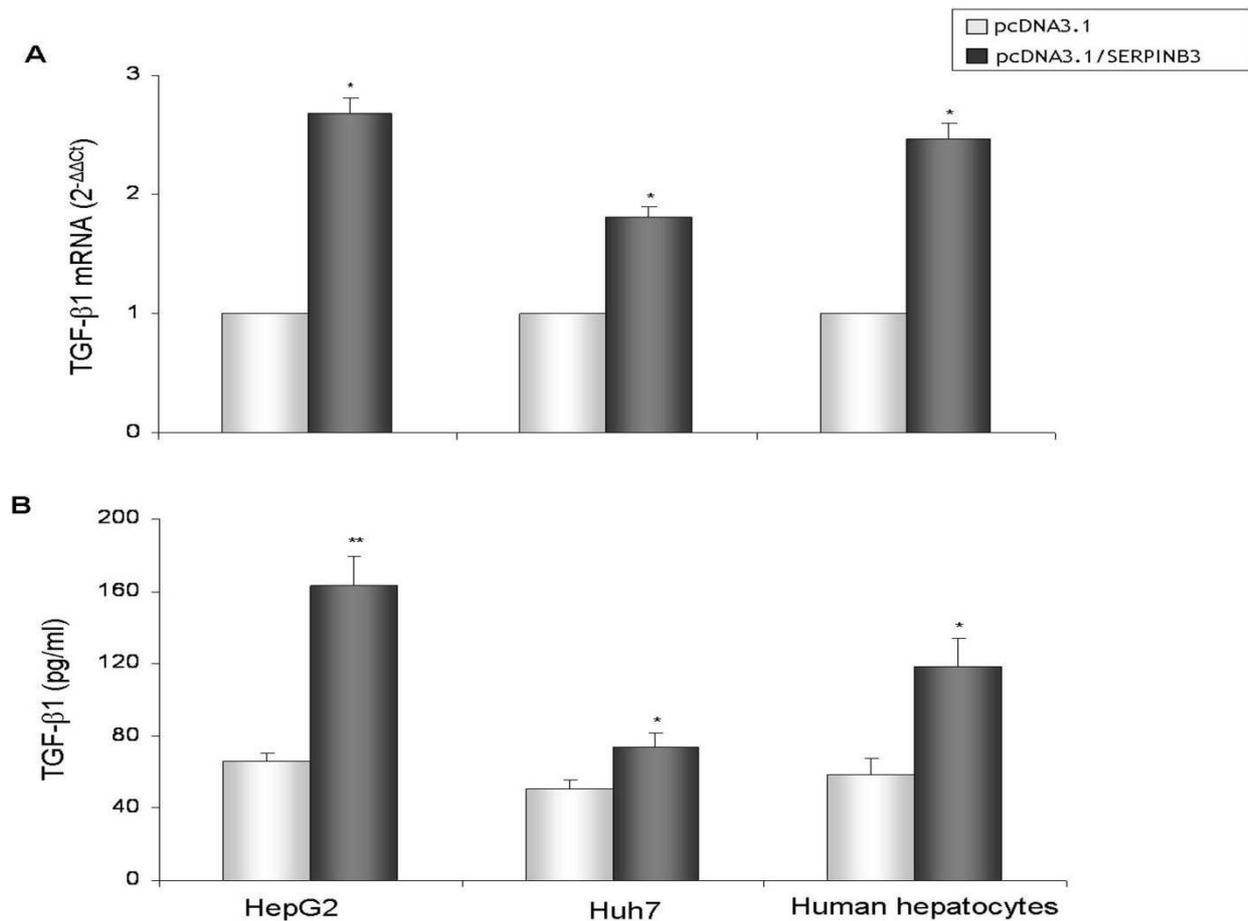


Figura 4. Induzione di TGF- β nelle cellule trasfettate transientemente con SERPINB3.

(A) Induzione di TGF- β nelle 3 linee cellulari epatiche usate: HepG2, Huh7 ed epatociti primari umani. I trascritti TGF- β sono stati valutati per ciascuna campione cellulare dopo 48h dalla trasfezione con SERPINB3 (bande grige) o con vettore vuoto (bande bianche) mediante Real-Time PCR grazie all'utilizzo di primers specifici per il gene umano TGF- β . Le variazioni d'espressione dell'mRNA TGF- β sono state valutate come l'incremento rispetto ai controlli utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$. Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati rapportandoli al gene housekeeping GAPDH. I risultati son stati espressi come la media \pm s.e.m. di tre esperimenti. La significatività statistica è stata calcolata utilizzando il test t di Student corretto con il test di Welch. *P < 0.05.

(B) Concentrazione proteica di TGF- β calcolata nel sovranatante delle cellule trasfettate. La distribuzione delle concentrazioni proteiche di TGF- β biologicamente attivo presente nel sovrinatante delle linee cellulari corrispondenti e negli epatociti primari umani. I risultati sono stati considerati separatamente nei 3 esperimenti ed espressi come media \pm s.e.m. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il t test corretto con Welch test

P < 0.005; *P < 0.001.

4.1.4 Modulazione del TGF- β mediante SERPINB3 ricombinante

Per valutare l'effetto paracrino di SERPINB3 nelle cellule in studio, le cellule HepG2 sono state trattate con dosi crescenti di proteina SERPINB3 ricombinante. Anche in questo caso si è documentato un aumento d'espressione di TGF- β dose-dipendente, che raggiungeva il plateau dopo 48 ore (Fig.5) suggerendone un effetto paracrino indotto dalla serpina.

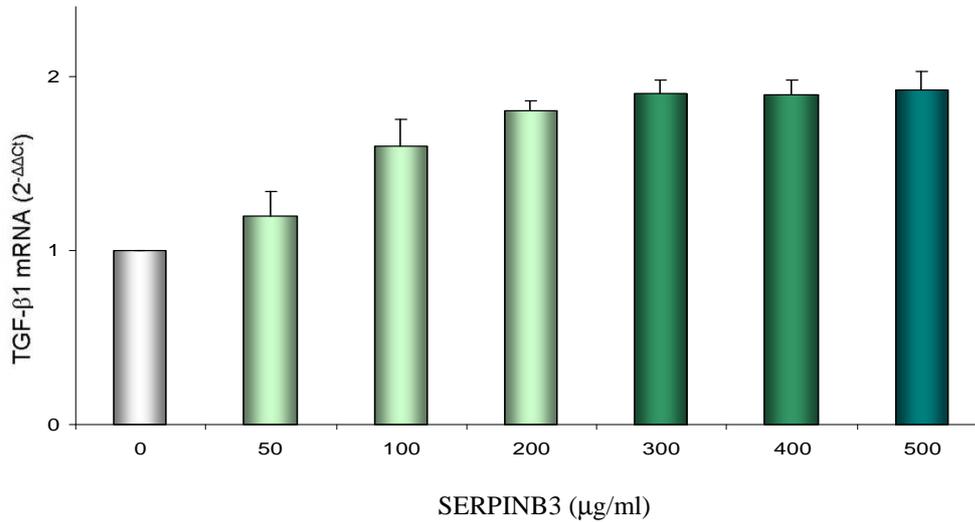


Fig. 5 Induzione di TGF- β nelle cellule HepG2 trattate con la proteina SerpinB3.

Induzione di TGF- β nella linea cellulari epatica HepG2 mediante l'aggiunta di quantità crescenti di proteina ricombinante SERPINB3 ($\mu\text{g/ml}$).

I trascritti TGF- β sono stati valutati per ciascun campione cellulare dopo 48h dalla trasfezione con SERPINB3 rispetto alle cellule trattate con PBS1x di controllo mediante Real-Time PCR. Le variazioni d'espressione dell'mRNA TGF- β 1 sono stati valutate come l'incremento rispetto ai controlli utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$. Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati rapportandoli al gene housekeeping GAPDH. I risultati son stati espressi come media \pm s.e.m. di tre esperimenti.

4.1.5 Localizzazione di SERPINB3 e TGF- β mediante immunofluorescenza.

La localizzazione cellulare di TGF- β e SERPINBB3 nelle linee cellulari studiate, HepG2 ed epatociti primari umani transfettati con il plasmide contenente SERPINB3-GFP è stata valutata anche mediante immunofluorescenza. Entrambe le linee cellulari trasfettate hanno mostrato un'intensa fluorescenza per TGF- β che si è rivelata co-localizzata con SERPINB3, mentre il segnale fluorescente è risultato trascurabile nei controlli. (Fig.6)

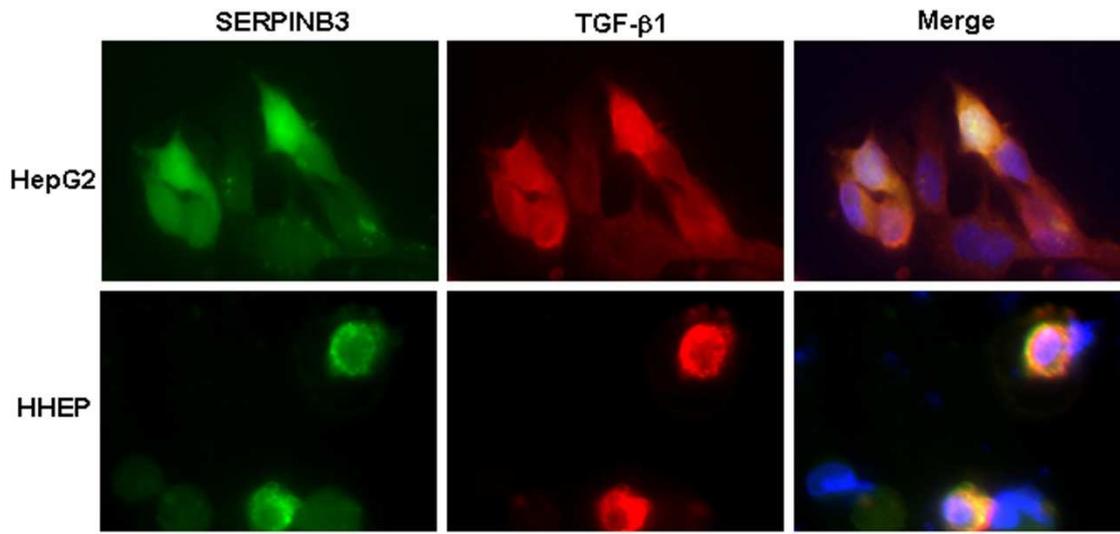


Figura n 6. Immunofluorescenza in cellule transfettate con SERPINB3-GFP.

Immunofluorescenza per la visualizzazione di SERPINB3 (verde) e TGF- β (rosso). I nuclei son stati colorati con colorante Hoechst 33342 (blu) e nell'immagine sovrapposta si apprezza la co-localizzazione della fluorescenza per SERPINB3 e TGF- β . Ingrandimento originale, 40X.

4.1.6 Influenza del sito attivo di SerpinB3 nella modulazione del TGF- β

Al fine di valutare se il sito attivo, responsabile dell'attività antiproteasica di SERPINB3 fosse coinvolto nell'induzione di TGF- β , sono stati utilizzati tre diversi vettori d'espressione, ciascuno con una delezione d'estensione diversa a livello del sito attivo della serpina (RSL). Ciascuna delle variazioni di RSL utilizzate comportano un'alterazione della sequenza catalitica che conducono ad una quasi completa abolizione dell'attività antiproteasica.

Colture cellulari trasfettate con tali vettori d'espressione sono state analizzate dopo 48 ore ed è stato quantificato il trascritto di TGF- β mediante Real Time PCR.

La presenza del sito attivo mutato nelle cellule trasfettate transientemente ha provocato una diminuzione dell'incremento dell'mRNA TGF- β e l'effetto massimo si osservato in relazione alle delezioni di lunghezza maggiore (mutante A: delezione dell'intero RSL, mutante B: delezione della regione costante di RSL) mentre una debole induzione della citochina è stata ancora documentata con il mutante C che contiene solo una mutazione puntiforme in RSL che determina una sostituzione aminoacidica.

Questi risultati sottolineano quindi l'importanza cruciale dell'attività antiproteasica della serpina per l'induzione di TGF- β . (Fig.7)

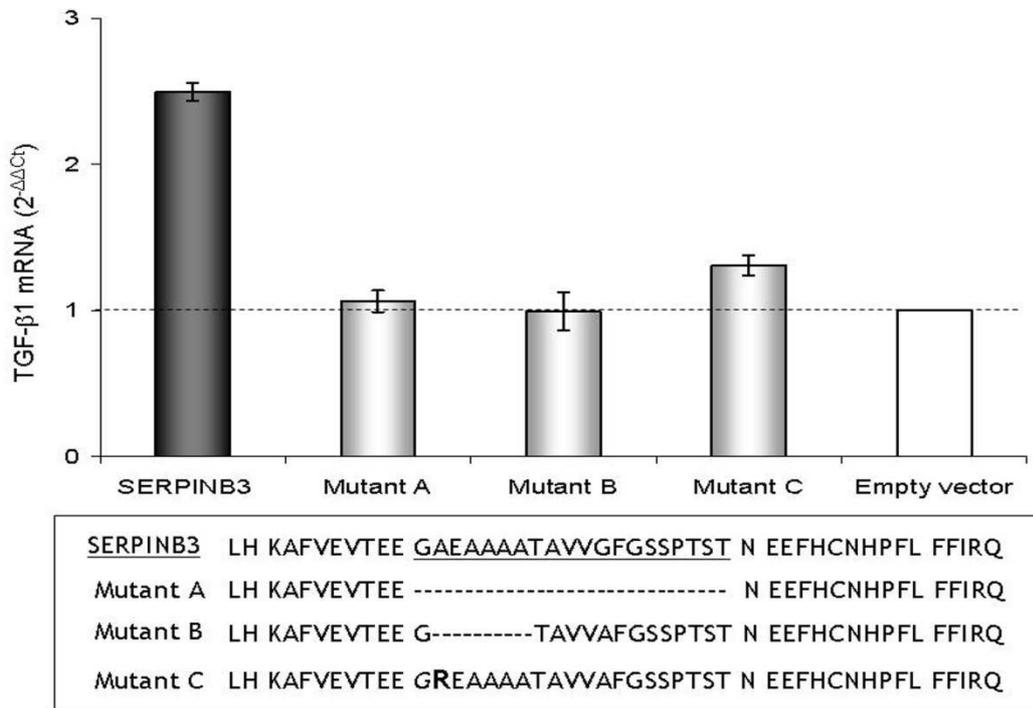


Figura 7. mRNA TGF-β nelle cellule HepG2 trasfettate con SERPINB3 mutata nel sito attivo.

Nel riquadro superiore le colonne rappresentano i livelli di mRNA TGF-β determinati dopo 48 ore dalla trasfezione con il vettore plasmidico contenente l'intera sequenza del gene SERPINB3 o una delezione nella regione del sito attivo (RSL).

Nel riquadro inferiore sono indicate le sequenze delete di SERPINB3. La sequenza RSL da P15 a P5 (Schechter e Berger Numbering) è sottolineata. Mutante A: delezione totale della regione costante di RSL; mutante B: delezione totale RSL; mutante C: sostituzione Ala P14 Arg.

4.2 STUDIO II

Modulazione di SERPINB3 indotta da ipossia

La seconda parte della tesi è rivolta allo studio della correlazione tra SERPINB3, transizione epitelio mesenchimale (EMT) e ipossia. Recenti risultati condotti nel nostro laboratorio (Quarta *et al*, 2010) hanno infatti dimostrato che linee cellulari epatiche trasfettate stabilmente con il gene SERPINB3 possiedono una maggiore capacità invasiva e possono indurre EMT documentato mediante aumento dell'espressione di vimentina se confrontate con le stesse cellule non esprimenti SERPINB3. In questo tesi, l'analisi è stata estesa allo studio degli stimoli regolatori e ai meccanismi di induzione della transizione epitelio mesenchimale determinata da SERPINB3. Inoltre, dato che sia l'ipossia che la serpina possono indurre EMT è stato studiata la potenziale correlazione e i meccanismi regolatori *in vitro* e *in vivo* tra l'ipossia e SERPINB3.

4.2.1 SERPINB3 induce EMT e invasività indipendentemente dalla sua attività antiproteasica

Abbiamo voluto verificare se oltre a stimoli autocrini (cellule trasfettate con SERPINB3), anche stimoli paracrini (cellule trattate con la proteina ricombinante SERPINB3) possano modulare l'EMT indotto da SERPINB3. Inoltre abbiamo indagato se il sito attivo di SERPINB3, responsabile della sua attività antiproteasica, fosse necessario per l'induzione di EMT.

Sono stati effettuati esperimenti di induzione utilizzando differenti proteine ricombinanti SERPINB3 caratterizzate da mutazioni/delezioni del sito attivo: proteina wild type, proteina PD (mutazione puntiforme della porzione variabile del sito attivo, proteina Del (delezione di tutta la porzione costante del sito attivo) e con il medium ottenuto dalla coltura di cellule HepG2 stabilmente trasfettate con SERPINB3 (cellule iperesprimenti SERPINB3).

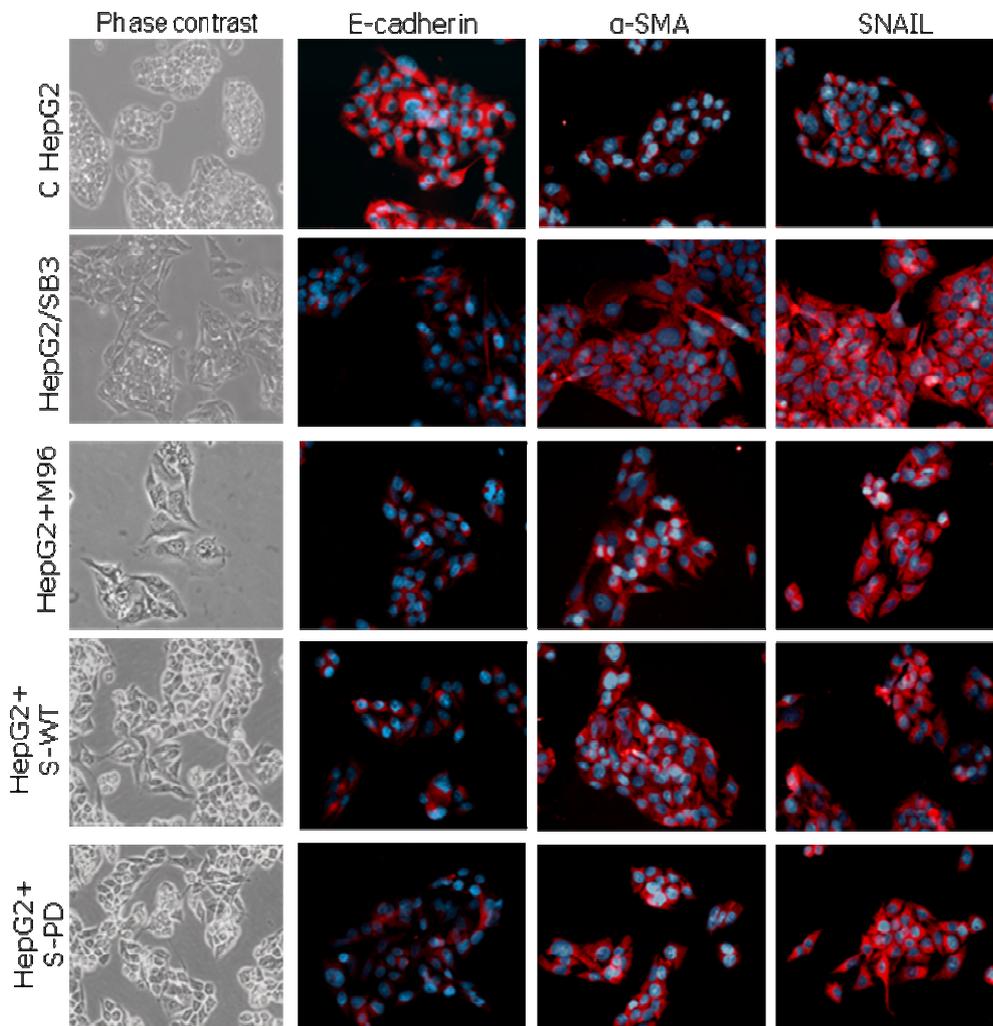
Utilizzando tecniche di immunofluorescenza, abbiamo potuto mettere in evidenza come il trattamento delle cellule HepG2 con le proteine ricombinanti determini entro 48h chiari segnali di induzione di EMT, quali scattering, acquisizione di fenotipo fibroblastoide, diminuzione di E-caderina rintracciabile a livello della membrana plasmatica, aumento di α -SMA (quest'ultima una proteina citoscheletrica espressa tipicamente da cellule con aspetto miofibroblastico), aumento dell'espressione di SNAIL1 e sua traslocazione nucleare (SNAIL1 agisce negativamente a livello del promotore del gene della E-caderina), oltre che un significativo incremento dell'attività delle metalloproteasi 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9). (Fig.8A,B,C)

Allo scopo di verificare l'esistenza di una effettiva correlazione tra le principali modificazioni cellulari indotte dalle nostre condizioni sperimentali e la conversione epitelio-mesenchimale,

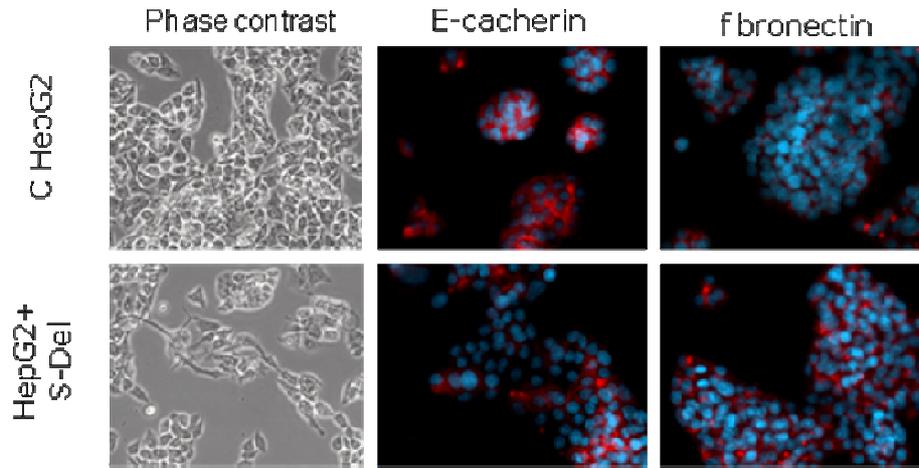
evento cruciale per l'acquisizione di una capacità migratoria e invasiva delle cellule tumorali, sono stati condotti esperimenti di invasività, e quello che si osserva è che, il trattamento delle HepG2 è di per sé in grado di determinare un significativo aumento della capacità invasiva di tali cellule (Fig.8D).

Questi chiari fenomeni di induzione di EMT risultano confermati anche utilizzando isoforme di SERPINB3 prive del dominio responsabile dell'attività antiproteasica indicando che SERPINB3 può indurre EMT e invasività cellulare indipendentemente dall'integrità del sito attivo e quindi indipendentemente dall'intrinseca attività antiproteasica della serpina (Fig8 B,E)

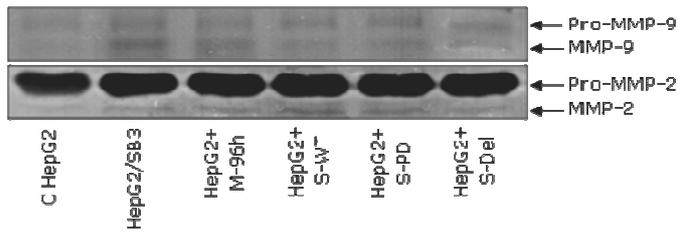
A



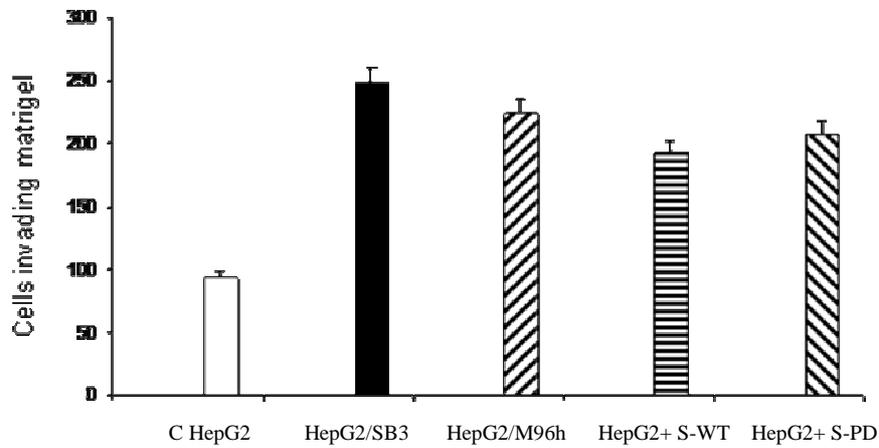
B



C



D



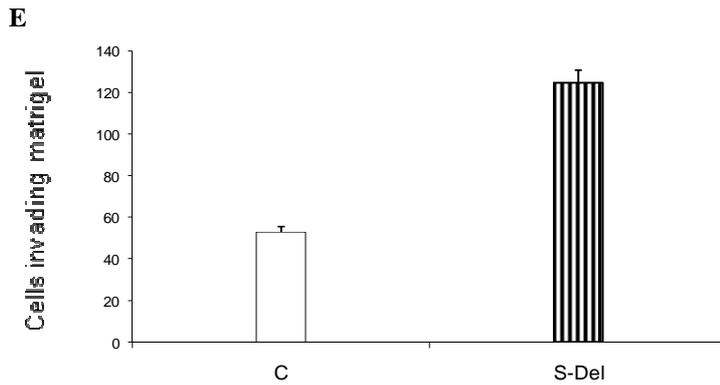


Figura 8. SERPINB3 induce EMT e aumenta l'invasività cellulare.

Le immagini riportate nel pannello sono relative a esperimenti eseguiti in cellule HepG2 di controllo (C HepG2), cellule transgeniche iperesprimenti SerpinB3 (HepG2/SB3), HepG2 trattate con le isoforme proteiche ricombinanti di SERPINB3 wild type (S-WT), mutata Pd (S-PD), o deleta del sito attivo (S-Del), oppure trattate con il medium ottenuto dalla coltura di cellule transgeniche HepG2/SB3 (HepG2+M96h).

A,B Analisi morfologica (x100) per le condizioni sperimentali indicate: a) Analisi di microscopia a contrasto di fase (figure a sinistra); b) analisi di immunofluorescenza (IF) per espressione di E-caderina, α -SMA e SNAI1, per E-Cadherin e fibronectina (Pannello B); queste immagini derivano da sovrapposizione di immagini per i corrispondenti antigeni e la corrispondente immagine della fluorescenza nucleare (blu DAPI).

C. Espressione proteica delle metalloproteinasi (MMP) 2 e 9 nel medium extracellulare nelle condizioni indicate.

D,E. Test di invasione cellulare mediante Matrigel in camera di Boyden. I risultati sono espressi come media \pm errore standard delle cellule HepG2 che invadono la matrice di matrigel in tre distinti esperimenti (* P < 0,01 vs controllo)

4.2.2 SERPINB3 attiva vie di segnale intracellulari attraverso una via redox dipendente.

Poiché il trattamento delle cellule HepG2 con le isoforme di SERPINB3 ricombinante è in grado di determinare tipici fenomeni EMT abbiamo rivolto la nostra attenzione all'individuazione dei possibili meccanismi molecolari coinvolti.

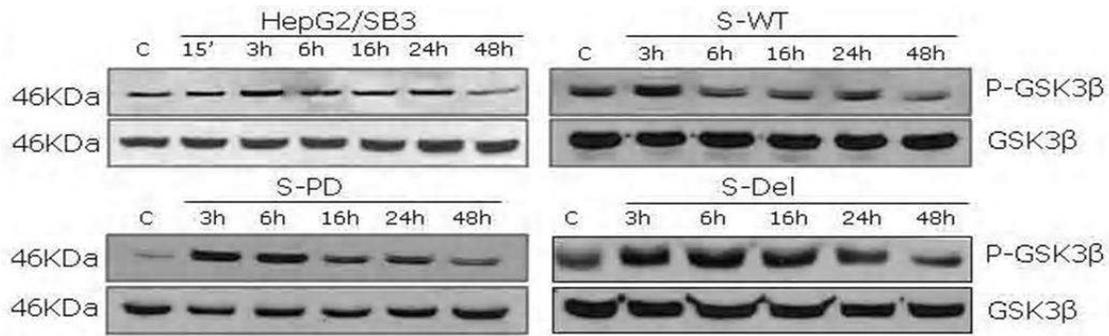
Dal momento che, come precedentemente riportato, il fattore trascrizionale SNAI1, agisce negativamente a livello del promotore del gene della E-caderina, è regolato dallo stato di fosforilazione e concomitante inibizione dell'enzima chiave glicogeno-sintasi chinasi (GSK-3 β), siamo andati a verificare, tramite analisi di western blotting e l'utilizzo di anticorpi specifici contro la forma fosforilata della proteina, se mediante le differenti isoforme proteiche ricombinanti SERPINB3 si osservasse un aumento dello stato di fosforilazione di GSK-3 β .

Le cellule HepG2 e Huh7 che sono state esposte alle diverse isoforme proteiche mostrano un rapido(3h) e persistente incremento della fosforilazione di GSK-3 β (e quindi l'inattivazione di GSK-3 β), un risultato riscontrato anche nel clone HepG2/SERPINB3 che esprime stabilmente la proteina SERPINB3 e nel clone mancante del sito attivo confermando la non necessarietà del sito attivo per l'EMT. (Fig9A).

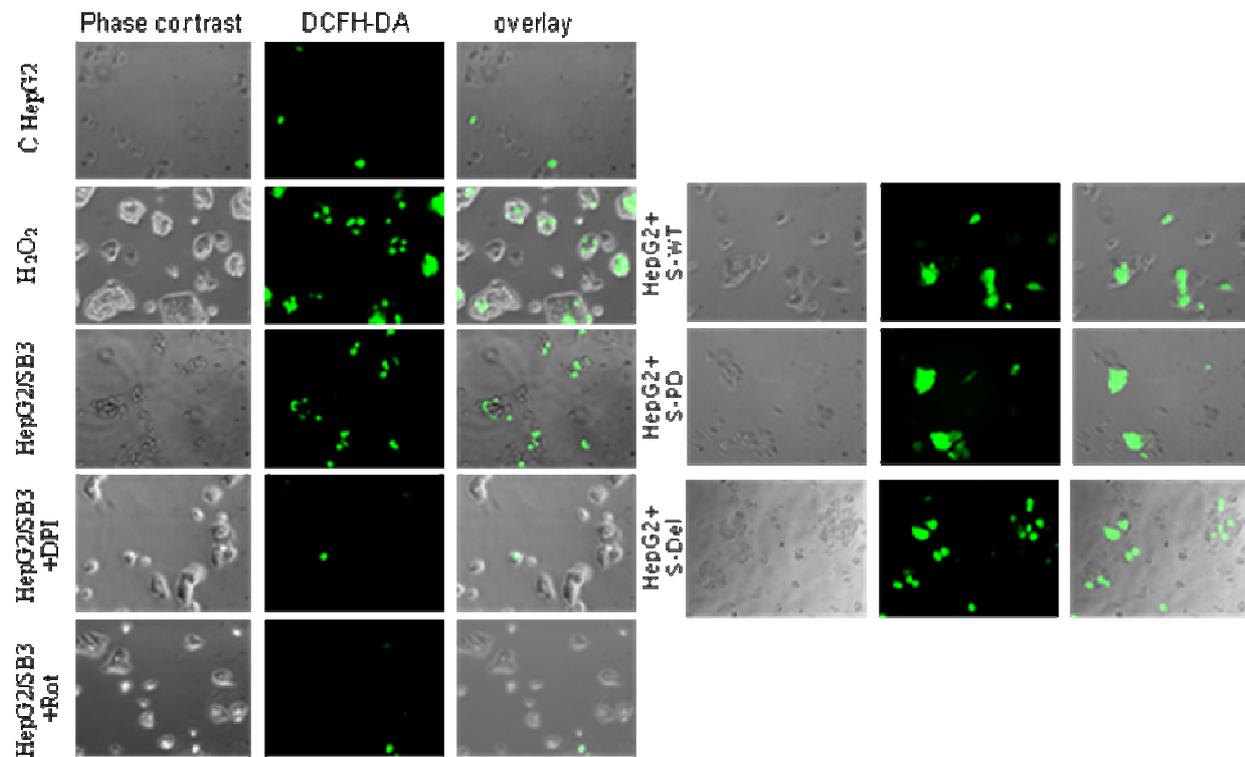
Dato che lo stesso fenomeno di induzione dell'EMT è stato recentemente osservato in cellule esposte a condizioni di ipossia, in cui la fosforilazione di GSK-3 β è correlata all'attivazione del segnale di Ras/ERK e PI3K mediata attraverso la generazione di ROS intracellulari (Cannito *et al*, 2008), abbiamo verificato la produzione di ROS in cellule esposte alle proteine ricombinanti SERPINB3. Quello che si osserva è che mediante una tecnica morfologica e semiquantitativa (DCFH-DA) dopo un tempo molto breve (15 minuti) c'è un aumento intracellulare di ROS che è però quasi completamente abolito preincubando le cellule con rotenone e DPI (due inibitori del trasporto elettronico mitocondriale) suggerendo quindi un'origine prevalentemente mitocondriale dei ROS. (Fig 9B,C)

Questi dati sono stati inoltre confermati dal fatto che PD-98095 (inibitore della risposta Ras/ERK), LY-294002 (inibitore di PI3K) oltre che rotenone e DPI possono significativamente inibire anche l'aumento dell'invasività cellulare mediata da SERPINB3 indicando quindi il coinvolgimento della serpina nell'induzione di EMT mediata attraverso l'attività intracellulare redox dipendente. (Fig9 D)

A



B



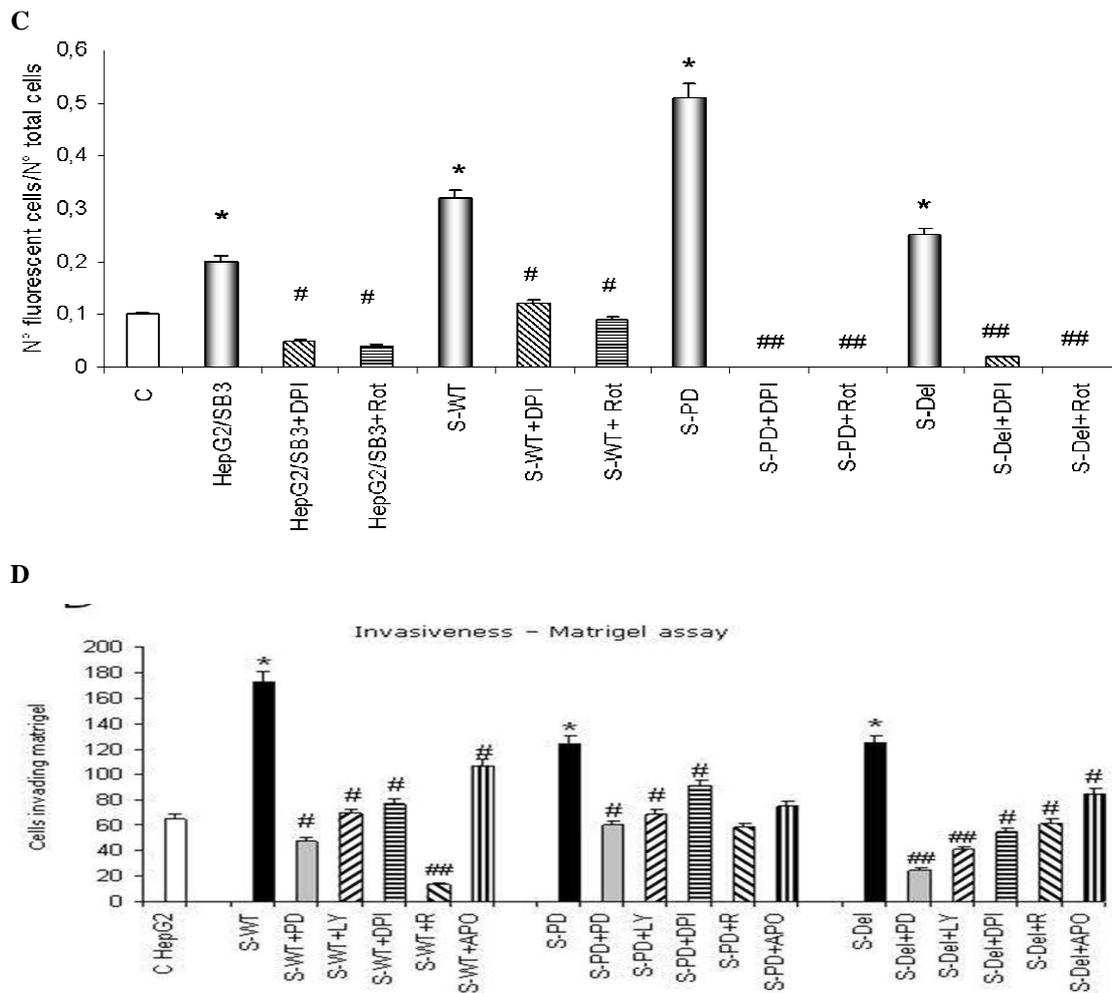


Figura 9. SERPINB3 attiva vie di segnale intracellulari attraverso una via redox dipendente.

A Analisi proteica mediante Western Blot dello stato di fosforilazione di GSK-3 β in HepG2/SB3 (o in cellule HepG2 di controllo) trattate con differenti isoforme proteiche SERPINB3 ricombinanti (S-WT, S-PD, S-Del) per il tempo indicato.

B. Produzione intracellulare rapida (15 minuti) di ROS utilizzando la tecnica DCFH-DA in cellule HepG2 di controllo (C HepG2), HepG2 trattate con 50 μ M H₂O₂ (H₂O₂, controllo positivo), HepG2/SB3 o HepG2 trattate con differenti isoforme proteiche di SERPINB3 (S-WT, S-PD, S-Del).

In alcuni casi HepG2/SB3 vengono precedentemente trattate per 15 minuti con Rotenone (HepG2/SB3 + Rot 15') o con DPI (HepG2/SB3 + DPI 15').

C. Il grafico rappresenta le medie \pm errore standard del numero di cellule HepG2 o HepG2/SB3 fluorescenti dei trattamenti del pannello B.

D. Test di invasione cellulare mediante Matrigel in camera di Boyden.

Cellule HepG2 trattate con differenti isoforme proteiche di SERPINB3 con i seguenti inibitori: Rotenone, DPI, apocianina (APO). In alcuni casi le cellule sono state trattate inoltre con gli inibitori farmacologici PD-98095 (PD) o LY-294002 (LY).

I risultati sono espressi come media \pm errore standard delle cellule HepG2 che invadono la matrice di matrigel in tre esperimenti indipendenti (*P<0,01; #P<0.05; ## P<0.001 vs controllo).

4.2.3 L'espressione di SERPINB3 è un evento dipendente dall'ipossia

Basandoci sui risultati descritti in letteratura nei quali si osserva come l'ipossia, una delle condizioni più comuni che si instaurano nel microambiente tumorale sia da considerarsi una condizione in grado di indurre in modo indipendente una tipica transizione epitelio-mesenchimale in cellule tumorali umane di origine epiteliale (Cannito *et al*, 2008), e lo stesso fenomeno di transizione si osserva mediato da SERPINB3 come dimostrato in questa tesi e da un recente lavoro condotto nel nostro laboratorio (Quarta *et al*, 2010), abbiamo voluto verificare se esiste un rapporto causale tra ipossia e SERPINB3.

Sono stati illustrati molteplici meccanismi che si innescano a livello cellulare come risposta ad una condizione di ipossia, tra questi l'attivazione delle proteina HIF-1 α e HIF-2 α e la conseguente espressione dei suoi bersagli genici riveste sicuramente un ruolo centrale (Sharp and Bernardin, 2004).

Le cellule HepG2 mantenute in condizioni di ipossia controllata (3% di ossigeno) mostrano una rapida (6h) e prolungata (24h) iper-regolazione della trascrizione dell'mRNA di SERPINB3. (Fig10A). Questo risultato è stato confermato anche dal punto di vista proteico, come si osserva nell'estratto proteico cellulare già dopo 16 ore di incubazione e aumentato fino a 72 ore di ipossia. I livelli proteici extracellulari (rilasciati nel medium) sono invece inalterati fino a 72 ore di trattamento ma notevolmente aumentati a 96 ore suggerendo quindi che l'ipossia può contribuire ad un rilascio tardivo di SERPINB3 in queste cellule. (Fig 10B).

In questo studio abbiamo constatato inoltre che l'espressione in condizioni ipossiche di SERPINB3 sembrerebbe dipendere dalle vie di segnale Ras/ERK e PI-3K, in quanto il pre-trattamento delle cellule HepG2 con i due classici inibitori farmacologici di tali vie di segnale (PD98095 e LY294002, rispettivamente) è in grado di ridurre significativamente l'incremento di mRNA per SERPINB3 registrato in condizioni di ipossia. Tale riduzione si osserva anche pre-trattando le cellule HepG2, mantenute successivamente in ipossia per 6h, con due classici inibitori del trasporto elettronico mitocondriale quali rotenone e DPI (Fig.10C), rafforzando l'ipotesi del coinvolgimento di meccanismi redox e di ROS di provenienza mitocondriale nella transizione epitelio-mesenchima indotta da SERPINB3.

Inoltre la rapida trascrizione di SERPINB3 mRNA è stata riprodotta in condizioni di normossia mediante trattamento con perossido di idrogeno, in grado anch'esso di indurre ROS.

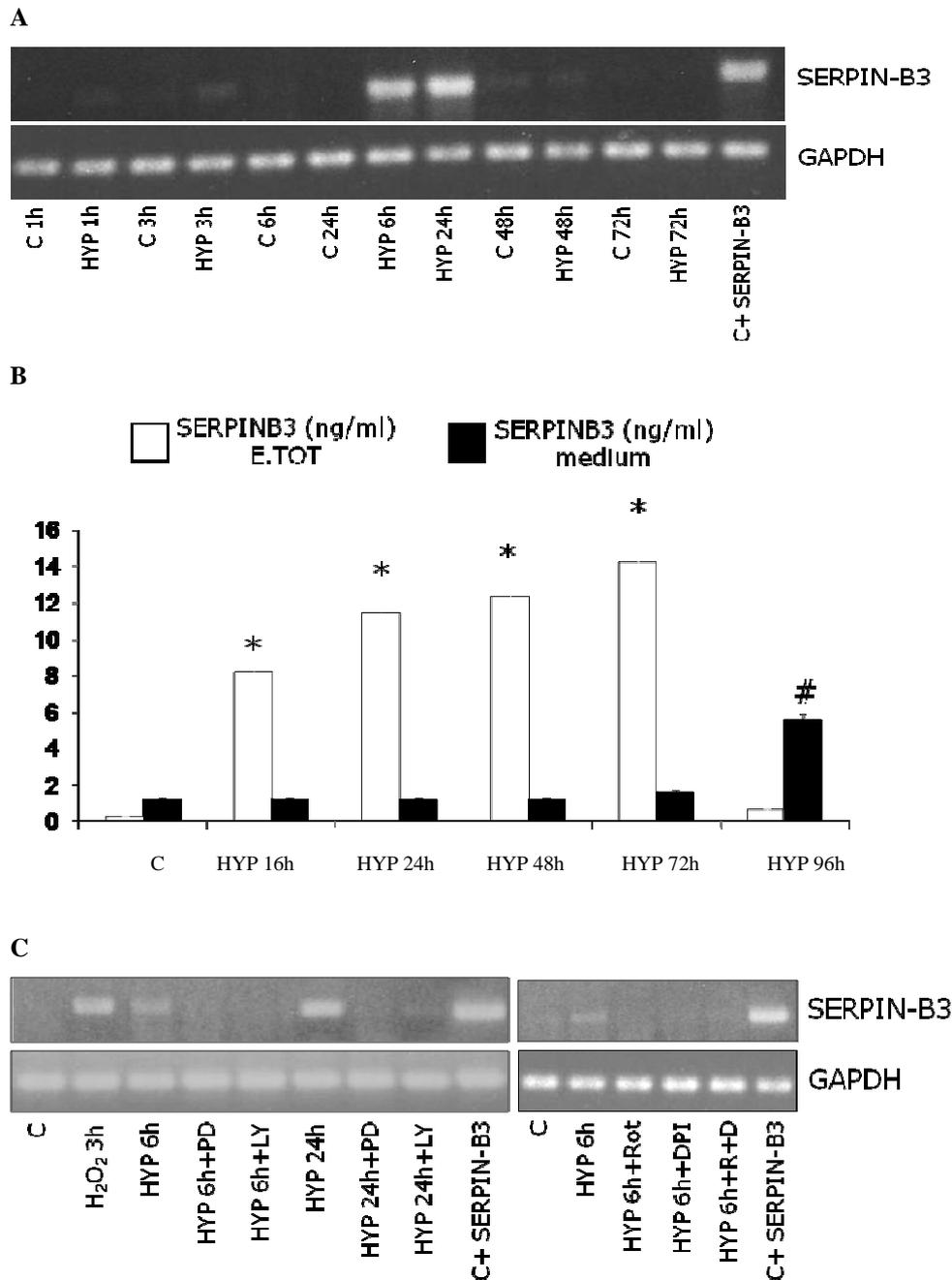


Figura 10. Condizioni di ipossia aumentano l'espressione di SERPINB3.

A. Espressione genica mediante RT-PCR di cellule HepG2 in normossia (C) o in condizioni di ipossia (HYP) mantenute per 72 ore. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. **B.** Espressione proteica mediante test ELISA rilevata in estratto proteico intracellulare (E.TOT ng/ml) e nel medium proteico extracellulare.

C: Espressione genica mediante RT-PCR di cellule HepG2 in normossia (C) o in condizioni di ipossia (HYP) mantenute fino a 96h.

In alcuni casi le cellule sono state trattate con gli inibitori farmacologici PD-98095 (PD) o LY-294002 (LY), o con Rotenone (Rot), o DPI. I risultati sono espressi come media \pm errore standard in tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,01$, # $P < 0,05$ vs controllo).

4.2.4 L'espressione di SERPINB3 in ipossia è mediata dal gene HIF-2 α

In base ai risultati appena descritti, per valutare il meccanismo con il quale l'ipossia può incrementare l'espressione di SERPINB3, è stato effettuato un siRNA in grado di silenziare efficacemente l'espressione dei geni HIF nelle cellule HepG2.

Sebbene nel promotore di SERPINB3 (Hamada *et al*, 2001) siano presenti 5 sequenze CGTG (Fig11C), conosciute come HRE (Hypoxia responding elements), il siRNA per HIF-1 α non ha portato ad alcuna riduzione del trascritto di SERPINB3 rispetto ai livelli di mRNA indotti dall'ipossia a 24h in cellule HepG2 non trasfettate o trasfettate con un vettore di controllo non silenziante. (Fig11 A-B).

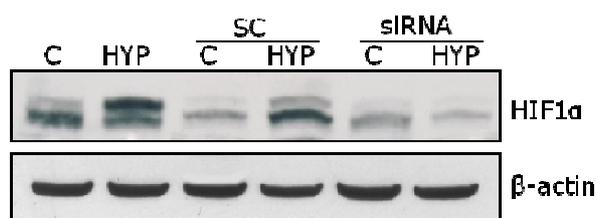
Inoltre, poiché l'analisi del promotore di SERPINB3 indica la presenza di ulteriori quattro sequenze GGCA (Fig 11C.), che sono state proposte come siti ETS in grado di aumentare l'affinità di legame per HIF-2 α (Aprelikova *et al*, 2006; Elvert *et al*, 2006), abbiamo analizzato il coinvolgimento di quest'ultimo gene in condizioni di ipossia.

L'analisi mediante western blotting, dei livelli proteici di HIF-2 α in cellule HepG2 mantenute in condizioni di ipossia ci ha confermato un precoce coinvolgimento (30 min-1 ora) di tale fattore trascrizionale.

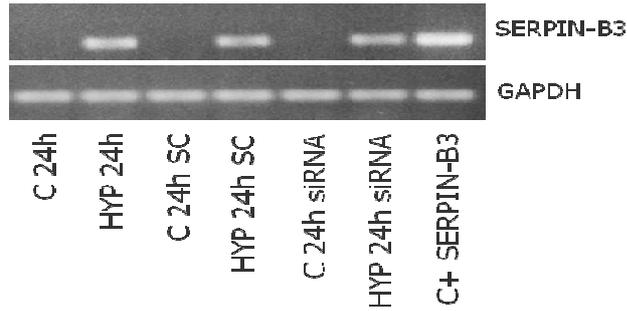
In base a questi presupposti, in modalità analoghe per HIF-1 α è stato effettuato il silenziamento genico anche per HIF-2 α in grado di silenziare per almeno il 70-75% l'espressione proteica di quest'ultima (Fig12A-C) e quello che si osserva è una significativa riduzione del trascritto dell'mRNA di SERPINB3 in condizioni ipossiche in cellule silenziate per HIF-2 α rispetto alle cellule non silenziate che invece iperesprimono la serpina.

La mancata induzione dell'mRNA è stata confermata anche a livello proteico, nel quale i livelli di espressione in ipossia di SERPINB3 in cellule non esprimenti HIF-2 α sono simili a quelli osservati in condizione di normossia (Fig.12D).

A



B



C

```

2581 aatattatttc gaccacaaaa aggaatgatg tactgatcca tgcaatgacg tgggacaaacc
2641 ttgaagataa tactagatga aagaagccag tcacaaaagg acttactgta tgattcgatt
2701 tacgtgaaat gtttagaata ggcaaatcca tagaaacagg aggtagatta ctggtttcca
2761 ggggtctcgag taaggggaaga acgagataca agttttcttt tggaggtagt gaaattgttg
2821 tggaacgaga tcatgatggt gatagcacia ctttgtgaat ataataaaat cattgaattg
2881 tacagttgaa tttgtggcat ataaattata tgttaaaaaa ggggggtccac aaaacaaaca
2941 gccccccact ctggttgtca gggagatatt ggattaaatg gccttggaca acaaccctct
3001 ccctggccac agacattctt cagattacaa gatattccag aggaaacact ggaatgagtc
3061 tgaagccagg tgctaaatgg aaggacacc aagaaacggt gtgatcctga caggtcaagc
3121 aacttctttt tctgcttaat ttttaaataga aaaattagaa agctgacatt caaaatggcc
3181 cgtctgtttc aattgctctt ctcaagtgtca gcctgttaac tcaatgtgtt agtctgtttt
3241 catgctgctg ataaagacat acctgagatt aggaagtaaa agaggtttaa ttggacttag
3301 agttccacgt gattggggag gcctcagaat cacggtagga ggcaaaaagt attcttacat
3361 ggtggctgca agagaaaaatg aggaagaagc aaaagaagaa acccctaata aaccattggt
3421 atctcctgag acttattaac tatcatgaga atagcacaag aaagaccggc ccccatgatt
3481 caattacctc tacctgggtc cctccaacaa catgtggaaa ttctggtaga tacaattcaa
3541 gttgagatth ggggtgggaac acagccaaac catatcactc agcaaggcag ataactttct
3601 cactgagcct atgcaacaga aaaccatctg ggatggttgt aaggggcaca ggaagtgact
3661 ggtaggatca ctgccaaagc tgagcattca ggagaaggca atagaatcct attctccata
3721 gtatgctata agatactgaa gtacacttct tcaactatctc ttggactta gaattagcac
3781 tatattcctt gttatacaga aaaattacta aggaaattca taggatgaca aaaactttca
3841 gaactgaaaa acaggaaatg taagcttttt agttctttgg tattcgaagt atgcctaaaa
3901 gacaatgcaa aatccaagaa aagaatggtg gggtttttgt ttgtttgttt ttgtttttgt
3961 tttacagctg gagtagaata caaagggatg gagttgaaac aaatgagagg aaattggaat
4021 tctaaactta ttctcattgg cattagaaag gcacctacat gtatttcaca tgagccgggtg
4081 actgctgact tgcattotta ttttttccct atagattaaa aaggaggtag aatggtagaa
4141 ctgtaatcct gtcctttgtc ataaatcttc gtattcataa aggtgagtgtag tagcccgtt
4201 gtgaaatctg aagttgagta acttcaaata ctaaccacag agggagagggc agcaagagga
    
```

Figura 11. Il silenziamento del gene HIF-1 α non influenza l'espressione di SERPINB3 in condizioni di ipossia.

A. Analisi mediante Western blot dei livelli proteici di HIF-1 α dall'estratto proteico totale di cellule HepG2 ottenuto nelle seguenti condizioni: 1) cellule mantenute in condizioni di normossia per 72 ore (C), esposte a condizioni di ipossia fino a 24 ore (HYP); 2) cellule trasfettate con siRNA di controllo e mantenute in normossia per 24 ore (C - SC) o in condizioni di ipossia (HYP - SC); 3) cellule trasfettate con siRNA per HIF-1 α e mantenute in condizioni di normossia per 72 ore (C - siRNA) o in condizioni di ipossia (HYP-siRNA). **B.** Espressione genica di SERPINB3 mediante RT-PCR di cellule HepG2 nelle stesse condizioni sperimentali del pannello A. **C.** L'analisi di sequenza del promotore di SERPINB3 indica la presenza di cinque sequenze CGTG (sequenze HRE) e quattro sequenze GGAC che sono state precedentemente proposte come siti ETS in grado di aumentare l'affinità di legame per HIF-2 α . (Aprelikova *et al*, 2006)

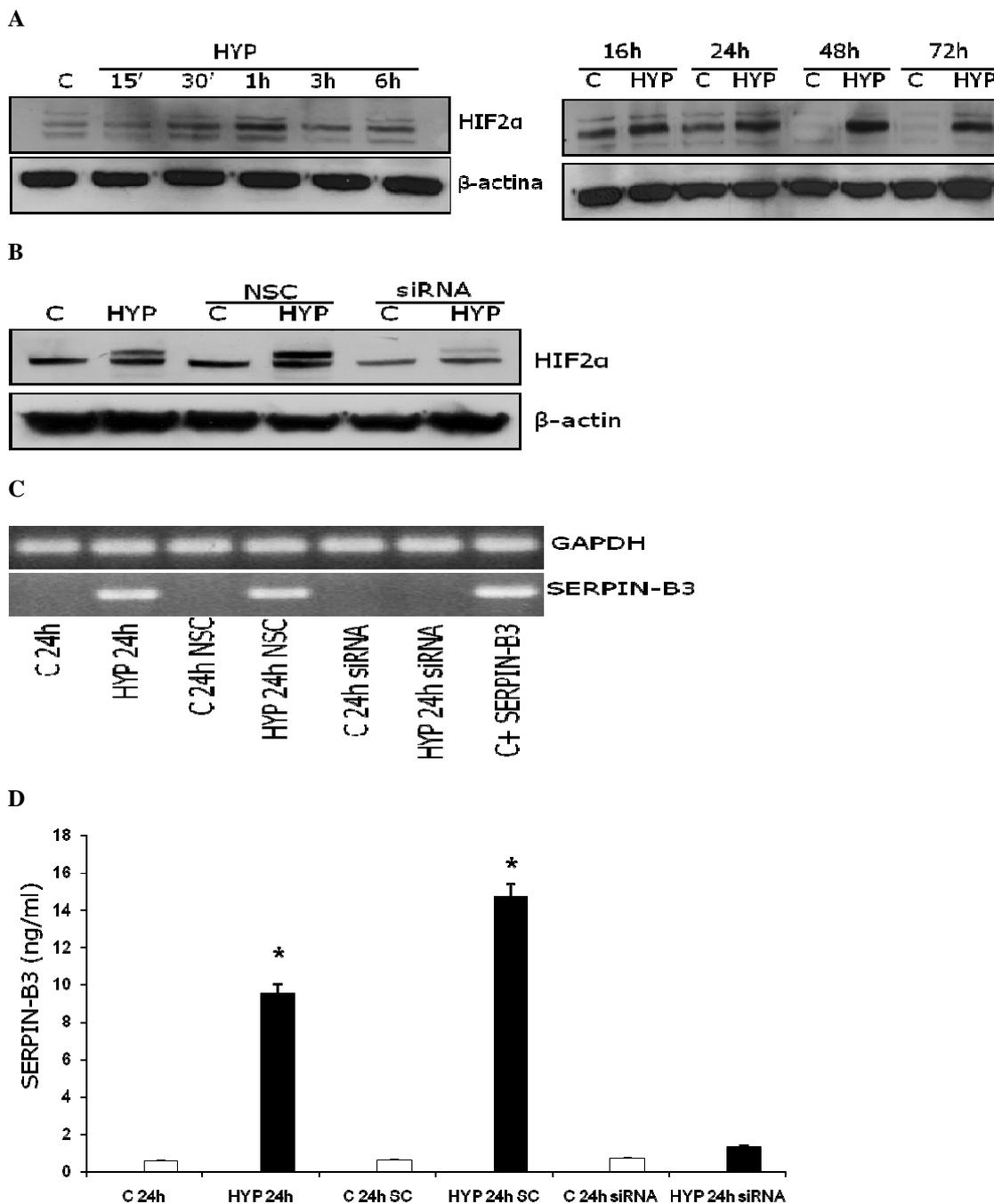


Figura 12. L'espressione di SERPINB3 in ipossia è mediata dal gene HIF-2 α

A: Analisi mediante Western blot dei livelli proteici di HIF-2 α in cellule HepG2 in condizioni di normossia (C) e ipossia (HYP) per il tempo indicato.

B: Analisi mediante Western blot dei livelli proteici di HIF-2 α dall'estratto proteico totale di cellule HepG2, HepG2 trasfettate con siRNA di controllo (NSC) o con siRNA per HIF-2 α (siRNA) che sono state mantenute in condizioni di normossia (C) o di ipossia (HYP)

C: Espressione genica di SERPINB3 mediante RT-PCR di cellule HepG2 mantenute nelle stesse condizioni del pannello B

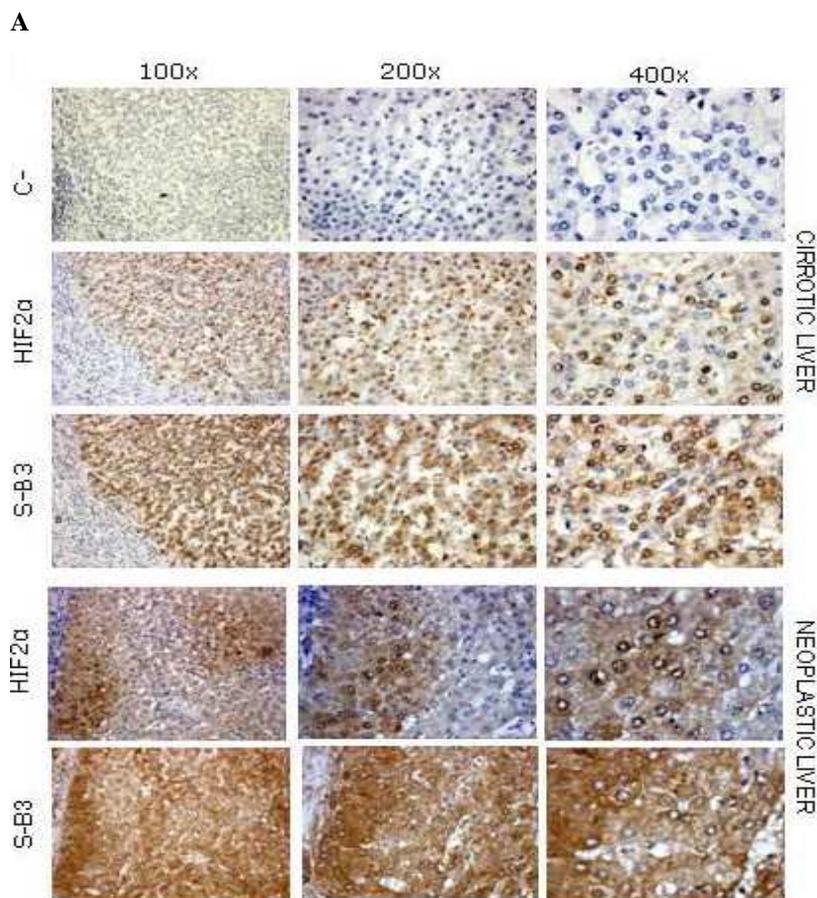
D: Analisi mediante test ELISA dei livelli proteici di SERPINB3 (ng/ml) nell'estratto totale intracellulare di cellule HepG2 mantenute nelle stesse condizioni del pannello B e C.

I risultati sono espressi come media \pm errore standard di tre esperimenti indipendenti (* P < 0,01 vs controllo)

4.2.5 Analisi *in vivo*

Sono state analizzate mediante immunohistochimica sezioni di fegato seriali ottenute da resezioni chirurgiche di fegati di pazienti cirrotici (con eziologia da infezione cronica da HCV) portatori di epatocarcinoma.

Si osserva una reattività per HIF-2 α e SERPINB3 nelle stesse cellule neoplastiche in aree tumorali così come nei pseudolobuli degli epatociti del tessuto cirrotico circostante, suggerendo quindi una stretta correlazione tra l'espressione di HIF-2 α e SERPINB3 anche *in vivo*. (Fig.13A). Questo dato è stato confermato anche nell'animale da esperimento, infatti in sezioni sequenziali di fegato di topi sani wild type (non esprimenti SERPINB3) o transgenici per SERPINB3 (iperesprimenti SERPINB3), l'analisi immunohistochimica evidenzia l'espressione della serpina solamente nelle aree degli epatociti circostanti le vene centrolobulari, che sono comunemente caratterizzate da parziale ipossia. (Fig.13B)



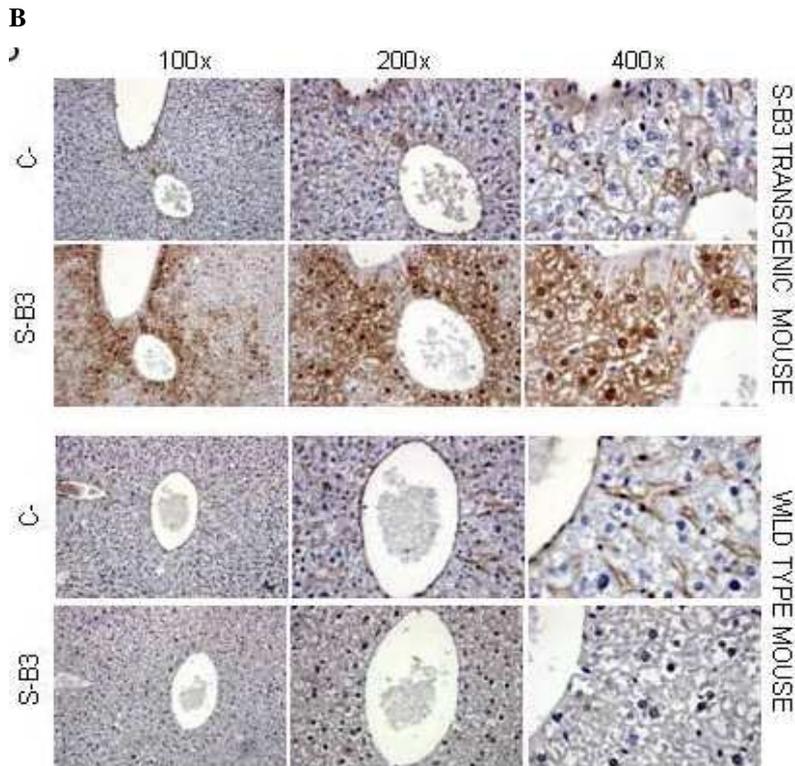


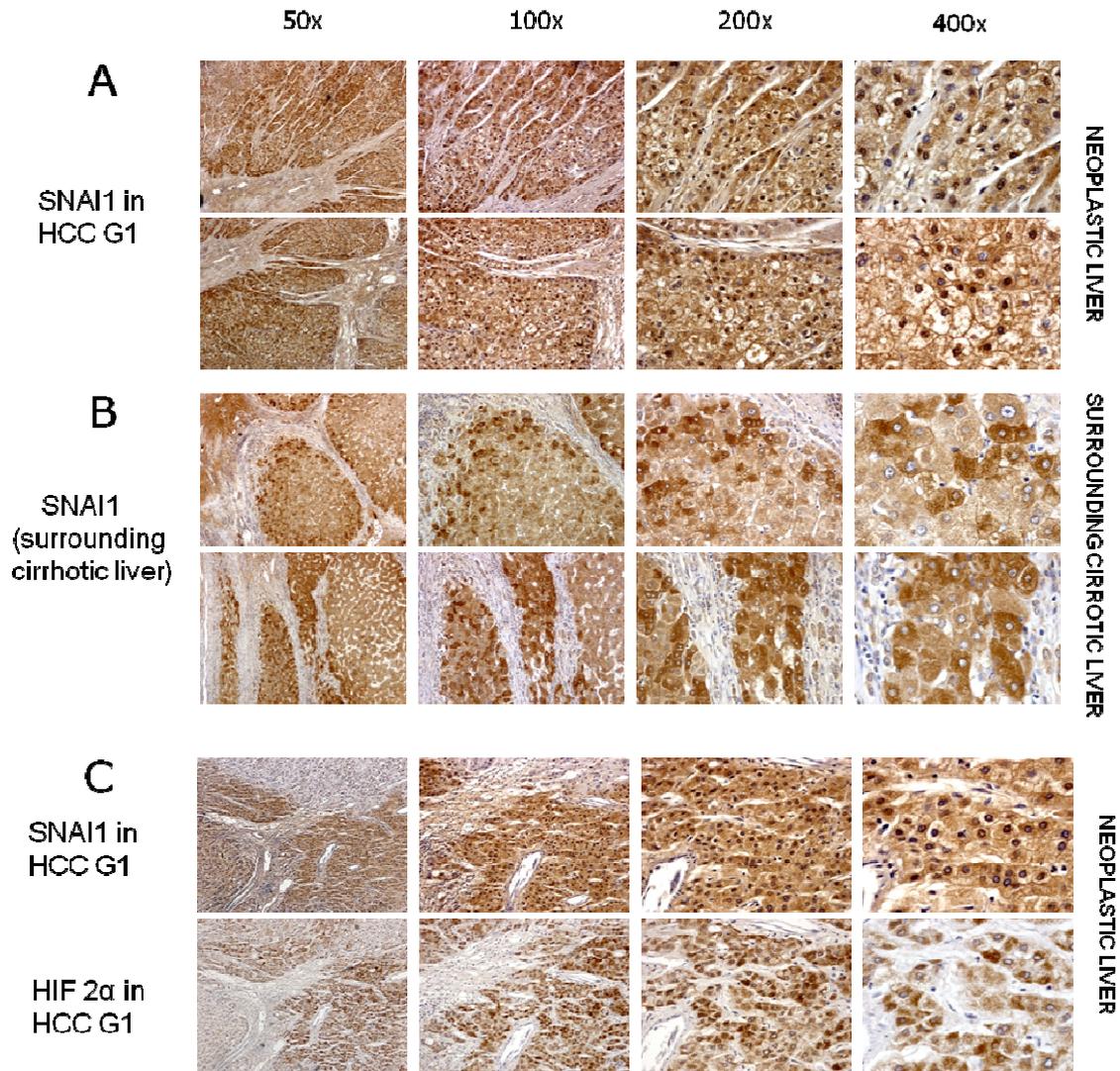
Figura 13. Espressione di SERPINB3 e HIF2 α *in vivo*.

A. Immunoistochimica di SERPINB3 (SB3) e HIF2 α di sezioni epatiche seriali ottenute da pazienti con epatocarcinoma (G1) in tessuto neoplastico o tessuto cirrotico circostante.

B. Immunoistochimica di sezioni seriali ottenute da biopsia epatica di topo C57B16 transgenico per SERPINB3 e topo non transgenico (wild type).

(c- immunoistochimica nella quale è stato omesso il corrispondente anticorpo primario).

Analizzando le stesse biopsie epatiche anche per le molecole coinvolte nella transizione epitelio-mesenchimale, si osserva che le stesse cellule positive per SERPINB3 e il fattore ipossico HIF-2 α , lo sono anche per il fattore di trascrizione SNAI1 con prevalenza nucleare in cellule neoplastiche, mentre nel tessuto cirrotico è presente soprattutto a livello citoplasmatico. (Fig.14) Questi dati confermano quindi SERPINB3 come una molecola chiave nel regolare la risposta dell'ipossia e nel modulare la transizione epitelio mesenchimale anche *in vivo*.



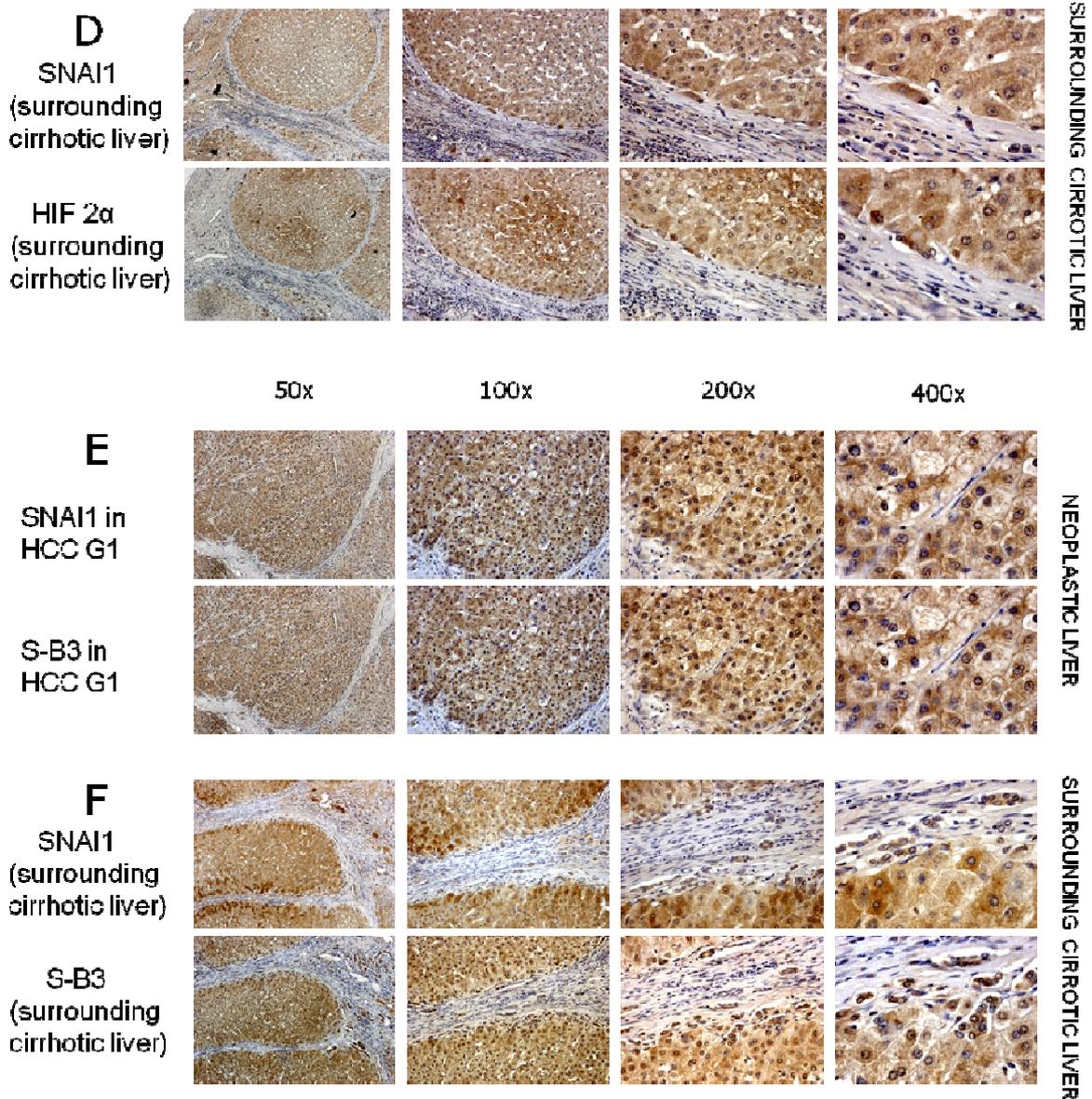


Figura 14. Correlazione dell'espressione di SERPINB3, HIF2α e SNAI1 "in vivo". Immunoistochimica di sezioni epatiche seriali ottenute da pazienti cirrotici con epatocarcinoma (G1).

L'analisi è stata eseguita per SNAI1 (A,B), SNAI e HIF2α (C,D), SNAI e SERPINB3 (E,F) in tessuto neoplastico e nel tessuto cirrotico circostante.

5. DISCUSSIONE

Per quanto concerne lo studio I, la fibrosi epatica è una comune risposta al danno epatico cronico o alla necrosi epatocellulare che può essere provocata da un'ampia varietà di fattori, incluso qualunque processo che disturbi l'omeostasi epatica, quali processi infiammatori, infezioni da virus epatitici, alterazioni della vascolarizzazione epatica o patologie di accumulo. Inoltre anche numerose sostanze tossiche come l'alcol e numerosi farmaci possono provocare fibrosi (Bataller *et al*, 2005).

Questi agenti provocano da un lato un danno a carico della cellula epatica fino a determinarne la morte, dall'altro inducono l'attivazione di un processo di tipo riparativo cicatriziale che porta all'accumulo progressivo di collagene. In generale questo fenomeno può essere considerato come una risposta difensiva di tipo riparativo. Anche nel fegato questo processo porta inizialmente al completo ripristino della normale architettura e funzione epatica, ma quando la causa primaria del danno persiste, lo stimolo alla produzione di collagene si perpetua cronicamente e la matrice extracellulare si accumula portando progressivamente al sovvertimento dell'architettura del fegato, tipico della cirrosi. (Pinzani *et al*, 2001) .

Svariati sono i meccanismi coinvolti in questo processo patologico e durante la fibrogenesi si verifica un disequilibrio tra le citochine pro-fibrogeniche e quelle anti-fibrogeniche sbilanciandosi notevolmente a favore delle prime. Inoltre, le metalloproteasi, che nei normali processi riparativi degradano la matrice extracellulare depositata, vengono inibite favorendo la così progressione del processo patologico (Arthur *et al*, 2000).

La comprensione sempre più approfondita dei meccanismi molecolari che portano alla fibrosi epatica riveste perciò un ruolo di notevole importanza poiché i componenti responsabili di questo processo potrebbero rappresentare dei possibili bersagli farmacologici.

Le cellule principalmente coinvolte nella fibrosi epatica sono le cellule stellate epatiche le quali in seguito ad un insulto cronico vengono "attivate" e passano da un fenotipo quiescente non proliferante, ad un fenotipo simil-fibroblasto altamente proliferante con abbondante sintesi delle proteine della matrice (Friedman 2003) .

Una delle citochine che riveste un ruolo chiave in questo processo fibrotico è il TGF- β , noto come uno dei principali agenti pro-fibrogenici iper-espressi durante la risposta al danno epatico (Gressner *et al*, 2007) .

Il TGF- β svolge diverse funzioni nella fibrosi epatica come l'induzione dell'apoptosi, la trasformazione delle cellule stellate in miofibroblasti, i quali aumentano la produzione di matrice extracellulare ed inibisce l'attività delle proteasi normalmente coinvolte nella degradazione della matrice.

In questi studi è stato confermato che TGF- β è espresso nel fegato cronicamente danneggiato, sia documentando un aumento della sua attività sia trascrizionale che a livello proteico.

La serpina SERPINB3 è espressa normalmente negli epitelii squamosi, mentre si trova iper-espressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale (Takeshima *et al*, 1992, Cataltelpe *et al*, 2000) e nel tumore primitivo del fegato (Pontisso *et al*, 2004, Giannelli *et al*, 2005, Guido *et al*, 2005), ma non nel fegato normale. Livelli più bassi di espressione sono stati riscontrati anche nella cirrosi epatica e nell'epatite cronica, in relazione all'attività infiammatoria (Beneduce *et al*, 2005).

Ulteriori studi hanno dimostrato che SERPINB3 regola la crescita tumorale non solo proteggendo le cellule dall'apoptosi, attraverso la riduzione del processo di attivazione della caspasi-3 (Suminami *et al*, 2000), ma anche inibendo l'infiltrazione intratumorale delle cellule NK (Suminami *et al*, 2001). Nella regolazione dei processi proteolitici l'equilibrio che si instaura tra le proteasi ed i loro inibitori si dimostra infatti fondamentale nell'influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione e la morte cellulare stessa (Hamada *et al*, 2001).

Inoltre, recenti dati sperimentali condotti nel nostro laboratorio suggeriscono il coinvolgimento di SERPINB3 nell'indurre transizione epitelio-mesenchimale (Quarta *et al*, 2010), caratteristica già precedentemente descritta e conosciuta per quanto riguarda il TGF- β (Song *et al*, 2007).

Uno studio recente ha dimostrato che in un'altra patologia fibrosante progressiva, quale la fibrosi idiopatica polmonare, c'è una correlazione diretta tra entità di espressione di TGF- β e della serpina SERPINB3, con co-localizzazione delle due molecole a livello cellulare. Gli stessi autori documentano anche che l'espressione della serpina risulta correlata positivamente all'andamento clinico-patologico della malattia. (Calabrese *et al*, 2008)

La fibrosi polmonare idiopatica è una patologia progressiva dall'infausta prognosi e fase cruciale del processo di sviluppo e progressione della malattia è l'instabilità epiteliale portando nei casi più gravi alla trasformazione neoplastica. Molte delle caratteristiche della fibrosi idiopatica polmonare rendono tale patologia paragonabile alla fibrosi epatica.

Dati questi presupposti abbiamo voluto approfondire il ruolo che può assumere SERPINB3 nella fibrogenesi epatica studiando il suo comportamento sia in vivo su biopsie epatiche che *in vitro* utilizzando differenti linee cellulari di derivazione epatica in relazione al TGF- β .

Gli studi condotti su 94 soggetti affetti da epatopatia cronica hanno evidenziato mediante l'analisi immunohistochimica la presenza di SERPINB3 e TGF- β nel fegato con danno cronico. Abbiamo in questa tesi dimostrato per la prima volta che in corso di epatite cronica TGF- β e SERPINB3 sono espresse dalle stesse cellule tissutali. Si è osservato infatti non solo un'iper-espressione delle due molecole ma anche una loro co-localizzazione tissutale, particolarmente evidente all'interno delle bande fibrotiche che circondano i pseudolobuli. Inoltre l'iper-espressione di SERPINB3 e TGF- β e la loro correlazione è indipendente dalla causa eziologica di malattia epatica (infezione da HCV, HBV, alcool) e, nel caso di infezione virale HCV, non è correlata dal genotipo infettante.

Come precedentemente descritto, TGF- β riveste un ruolo chiave nel processo fibrogenico, la sua centralità durante le tappe che comportano la trasformazione del tessuto epatico lo rendono una citochina di grande interesse clinico. Nello studio da noi condotto non solo abbiamo confermato la presenza di una relazione positiva tra la fibrosi e TGF- β , ma abbiamo anche evidenziato una correlazione positiva tra SERPINB3 ed il grado di fibrosi epatica. Questo dato, considerato alla luce dei dati precedentemente ottenuti, mostra una relazione sinergica tra le due molecole e come le stesse siano coinvolte probabilmente in un comune meccanismo molecolare attivato nel processo fibrotico.

Per verificare se ci fosse un rapporto causale tra TGF- β e SERPINB3 sono stati condotti anche degli studi *in vitro*, utilizzando modelli cellulari trasfettati con il gene SERPINB3 umano. I risultati d'espressione di TGF- β e SERPINB3 osservate sia dal punto di vista trascrizionale che proteico, hanno dimostrato come SERPINB3 sia in grado di indurre un aumento di TGF- β , confermando un rapporto di causalità tra le due molecole in differenti linee cellulari epatiche. Si è inoltre osservata un incremento dell'espressione anche mediante immunofluorescenza della citochina TGF- β proprio nelle cellule trasfettate con il plasmide contenente SERPINB3.

Inoltre, sono stati condotti studi finalizzati a valutare non solo l'effetto autocrino di SERPINB3 caratterizzato dalle cellule transientemente trasfettate, ma anche quello paracrino della serpina, attraverso l'utilizzo di proteine ricombinanti SERPINB3 in cellule HepG2. L'incremento di TGF- β rilevato anche con questo trattamento ha permesso di concludere che questa serpina induce TGF- β anche con meccanismo paracrino, oltre che autocrino.

Nello studio è stata evidenziata anche l'importanza dell'integrità del sito attivo di SERPINB3 nell'induzione di TGF- β utilizzando costrutti di SERPINB3 caratterizzati da diverse mutazioni/delezioni nella regione del sito attivo, determinanti l'abolizione dell'attività antiproteasica della serpina. I risultati dimostrano come sia cruciale l'integrità del sito attivo per

l'induzione del TGF- β , infatti l'alterazione della porzione catalitica ha completamente alterato la citochina, impedendone l'incremento trascrizionale.

In conclusione gli studi effettuati nella malattia epatica cronica, analogamente ai risultati recentemente descritti nella fibrosi idiopatica polmonare (Calabrese *et al*, 2008), evidenziano come SERPINB3, sebbene in modalità ancora non conosciute, possa essere ritenuto un modulatore positivo di TGF- β e che questo effetto dipenda dall'attività antiproteasica di questa serpina. Questi risultati suggeriscono un comune meccanismo fibrogenico nel quale SERPINB3 agisce come proteina modulatrice del processo a monte di TGF- β . Pertanto, SERPINB3 nel danno epatico cronico può regolare diversi aspetti della malattia inducendo la produzione di TGF- β , legato all'attivazione delle cellule stellate, all'aumento della sintesi di collagene e aumentando la capacità di sopravvivenza degli epatociti danneggiati aumentandone la suscettibilità ad acquisire caratteristiche tipiche di cellule neoplastiche.

Per quanto concerne lo studio II, recenti studi sperimentali condotti nel nostro laboratorio suggeriscono il coinvolgimento di SERPINB3 nella riduzione di espressione della E-caderina, nell'aumento di espressione della vimentina e nell'aumento della capacità invasiva in diverse linee cellulari (Quarta *et al*, 2010).

Il presente studio conferma e ampiamente estende questi risultati preliminari in quanto:

- a) dimostra in modo inequivocabile come SERPINB3, agendo come fattore solubile e non solo in maniera autocrina come dimostrato nel recente studio (Quarta *et al*, 2010), sia in grado di indurre una tipica EMT e di aumentare la capacità invasiva di cellule HepG2;
- b) indica, per la prima volta, che la SERPINB3, agendo indipendentemente dalla sua attività anti-proteasica, induce una via di segnalazione intracellulare redox-sensibile attraverso l'attivazione delle vie Ras/Erk e PI-3K;
- c) identifica l'ipossia come il primo stimolo di rilevanza fisiopatologica per la prima volta descritto in letteratura capace di modulare la trascrizione e l'espressione di SERPINB3 attraverso un meccanismo redox-sensibile e dipendente dal gene HIF-2 α , che coinvolge nuovamente l'attivazione delle vie Ras/Erk e PI-3K. Abbiamo infatti dimostrato che l'aumento trascrizionale della serpina in ipossia viene quasi completamente abolito dal trattamento con inibitori della catena mitocondriale (rotenone e DPI) e inibitori di Ras/ERK e PI3K (PD-98095 e LY-294002);
- d) indica, in resezioni chirurgiche di fegati di pazienti cirrotici con epatocarcinoma, un riscontro in vivo della effettiva correlazione tra ipossia, SERPINB3 e EMT.

Gli esperimenti effettuati dimostrano che nelle cellule HepG2 trattate con le diverse isoforme proteiche di SERPINB3 (wild type e mutate) o con il terreno di cellule stabilmente esprimenti la

serpina, quest'ultima possa agire in veste di mediatore solubile capace di indurre una tipica EMT e di esplicare la sua attività biologica su cellule limitrofe in modo autocrino-paracrino, come inequivocabilmente dimostrato non solo dalla microscopia a contrasto di fase, ma anche da alcune modificazioni caratteristiche dell'EMT quali riduzione dell'espressione di E-caderina e modificazione della sua distribuzione intracellulare, traslocazione nucleare di SNAIL, aumento dell'espressione di α -SMA, attivazione delle metallo-proteasi 2 e 9, nonché rimodellamento del citoscheletro, assunzione di fenotipo fibroblastoide ed aumentata capacità invasiva. Inoltre è evidente come tutte le condizioni sperimentali utilizzate mostrino un meccanismo di segnale intracellulare comune che richiede la produzione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno, l'attivazione delle vie di segnale Ras/Erk e PI-3K e la fosforilazione della GSK-3 β . La fosforilazione e conseguente inattivazione della GSK-3 β è un punto cruciale per il controllo della EMT in quanto i più noti tra gli stimoli capaci di indurre la EMT agiscono inducendo vie di segnale intracellulare che convergono proprio sull'inattivazione della GSK-3 β (Thiery, 2003; Larue e Bellacosa, 2005; Lee *et al*, 2006; Acloque *et al*, 2009; Kalluri e Weinberg, 2009; Zeisberg e Neilson, 2009).

I risultati ottenuti indicano inoltre come la generazione delle specie reattive dell'ossigeno e la conseguente attivazione delle vie di segnale intracellulare Ras/Erk e PI-3K siano inibite da agenti che bloccano il rilascio dei ROS a livello mitocondriale.

Come già precedentemente discusso, tra gli stimoli potenzialmente capaci di indurre EMT bisogna includere i ligandi dei recettori tirosinochinasici (HGF, FGFs, PDGF), la proteina Wnt ed i segnali indotti dalle componenti della matrice extracellulare.

SERPINB3 potrebbe quindi aggiungersi alla lista di stimoli extracellulari in grado di indurre il programma EMT, probabilmente attraverso interazioni, ancora non conosciute, con proteine della plasmamembrana.

In aggiunta, come dimostrato in questa tesi, il fatto che i cambiamenti EMT siano indotti indifferentemente da tutte le isoforme SERPINB3, inclusa quella mancante del sito proteico catalitico, ci permette di escludere ogni coinvolgimento dell'attività antiproteasica di SERPINB3 nell'induzione del programma di EMT.

Nonostante il ruolo della serpina nel mediare la via di segnale ROS/Erk/PI-3K non completamente chiaro, il punto chiave rimane sempre l'inattivazione della GSK-3 β mediata da SERPINB3 e la conseguente traslocazione di SNAIL e β -catenina nel nucleo, dove tali fattori possono verosimilmente esercitare la loro azione trascrizionale pro-EMT (Thiery, 2003; Zeisberg e Neilson, 2009).

Inoltre nel complesso possiamo osservare come il meccanismo che porta alla transizione epitelio-mesenchimale da parte di SERPINB3 sia sovrapponibile a quello precedentemente descritto per alcune linee cellulari tumorali (incluse HepG2) esposte a moderate condizioni di ipossia (Cannito *et al*, 2008).

I risultati ottenuti in questa tesi relativamente all'ipossia, mediante silenziamento dell'espressione dei geni HIF, indicano che l'esposizione delle cellule a basse concentrazioni di ossigeno è correlata ad un significativo aumento della trascrizione e dell'espressione di SERPINB3 che è redox-sensibile ma assolutamente HIF-2 α dipendente.

Inoltre, in tali condizioni sperimentali si osserva un progressivo accumulo intracellulare della proteina in modo tempo-dipendente fino alle 72h di ipossia per poi ridursi drasticamente a 96h, tempo in cui apparentemente inizia il rilascio della proteina nel terreno di coltura. Sulla base dei risultati ottenuti utilizzando le diverse isoforme ricombinanti di SERPINB3, possiamo ipotizzare che la proteina rilasciata nell'ambiente extracellulare è potenzialmente capace di indurre e sostenere la EMT delle cellule limitrofe.

Sebbene i geni HIF abbiano un elevato livello di omologia di sequenza, ci sono alcune importanti differenze nell'attivazione genica.

HIF-1 α è espresso ubiquitariamente, mentre HIF-2 α è presente nelle cellule vascolari endoteliali, nelle cellule derivate dalla cresta neuronale, pneumociti di tipo II, epatociti, cardiomiociti e cellule renali interstiziali. HIF-2 α (ma non HIF-1 α) iperegola i geni TGF e ciclina D1 e la sua iperespressione è stata recentemente correlata ad una più rapida crescita di cellule neoplastiche tumorali. (Wiesener *et al*, 2003; Gordan *et al*, 2007; Qing *et al*, 2009).

Inoltre l'aumentata espressione dei livelli di mRNA e di proteina HIF-2 α è stata osservata in più di venti tipi differenti di tumori e, per quanto concerne il carcinoma epatocellulare è stato proposto come la espressione di entrambi i fattori inducibili da ipossia sia correlata ad una peggiore prognosi.

Questo potrebbe essere spiegato in quanto si ipotizza che HIF-2 α sia in grado di aumentare l'espressione/attività di prodotti genici (Octamer-4, c-Myc, Sox2) con un ruolo predominante nella promozione del fenotipo staminale (Qing *et al*, 2009).

Questi ultimi risultati costituiscono la prima caratterizzazione nota in letteratura dei meccanismi mediante i quali uno stimolo come l'ipossia, sia capace di determinare un incremento di trascrizione e sintesi della SERPINB3 e questa molecola si aggiunge alla lista di geni che risultano preferenzialmente controllati, in condizioni di ipossia, da HIF-2 α e non da HIF-1 α .

Questa correlazione tra SERPINB3, l'ipossia e la transizione epitelio mesenchimale risulta di potenziale importanza per dare una possibile interpretazione ai dati dal nostro gruppo precedentemente descritti in letteratura che indicano che SERPINB3 non è espressa nel fegato normale ma la sua espressione compare precocemente in corso di cancerogenesi. Inoltre, è stato proposto che l'espressione di tale proteina possa rivestire valore prognostico e di marker dell'aggressività del tumore (Guido *et al*, 2008).

In questa tesi infatti, i dati di immunohistochimica ottenuti nell'epatocarcinoma confermano una reattività per SERPINB3 e HIF-2 α sia nelle aree neoplastiche che nel tessuto cirrotico circostante (caratterizzato da ipossia), suggerendo un potenziale ruolo della serpina nella progressione dell'epatocarcinoma.

Questi risultati ci consentono di ipotizzare che l'ipossia può indurre EMT e un aumento di invasività e tumore sostanzialmente attraverso due meccanismi:

- uno relativamente precoce rappresentato dall'aumento dei livelli intracellulari di ROS, dall'inattivazione di GSK-3 β e traslocazione nucleare di SNAI1, mediata da HIF-1 α ;
- uno leggermente più tardivo caratterizzato dal rilascio extracellulare di SERPINB3, mediato da HIF-2 α , in grado di indurre direttamente l'EMT e facilitando l'invasività anche nelle cellule vicine mediante un meccanismo paracrino.

CONCLUSIONI

Nel complesso, gli studi condotti in questa tesi hanno permesso di caratterizzare meglio una nuova proteina potenzialmente coinvolta nella fibrogenesi epatica, SERPINB3, che è in grado di indurre la principale citochina profibrogenica TGF- β e potrebbe contribuire alla comprensione dei complessi e molteplici meccanismi che determinano lo sviluppo della fibrosi epatica.

In aggiunta, il comportamento di SERPINB3 in condizioni di ipossia potrebbe favorire la trasformazione neoplastica e condizionare l'aggressività dell'epatocarcinoma.

BIBLIOGRAFIA

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1438-1449 (2009).
- Adachi, T. *et al.* NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* **41**, 1272-1281 (2005).
- Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell. Sci.* **116**, 217-224 (2003).
- Aprelikova, O., Wood, M., Tackett, S., Chandramouli, G. V. & Barrett, J. C. Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res.* **66**, 5641-5647 (2006).
- Arthur, M. J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G245-9 (2000).
- Bachelder, R. E., Yoon, S. O., Franci, C., de Herreros, A. G. & Mercurio, A. M. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **168**, 29-33 (2005).
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* **275**, 36803-36810 (2000).
- Barbera, M. J. *et al.* Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* **23**, 7345-7354 (2004).
- Bataller, R. & Brenner, D. A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **115**, 209-218 (2005).
- Battle, E. *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84-89 (2000).
- Beck, S. *et al.* Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* **4**, 981-985 (2002).

Bedossa, P. & Paradis, V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* **200**, 504-515 (2003).

Benarafa, C. & Remold-O'Donnell, E. The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11367-11372 (2005).

Beneduce, L. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* **103**, 2558-2565 (2005).

Benyon, R. C. & Arthur, M. J. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* **21**, 373-384 (2001).

Benyon, R. C., Iredale, J. P., Goddard, S., Winwood, P. J. & Arthur, M. J. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* **110**, 821-831 (1996).

Berra, E. *et al.* HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J.* **22**, 4082-4090 (2003).

Biasiolo, A. *et al.* Monitoring SCCA-IgM complexes in serum predicts liver disease progression in patients with chronic hepatitis. *J. Viral Hepat.* **15**, 246-249 (2008).

Birchmeier, C., Birchmeier, W. & Brand-Saberi, B. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat. (Basel)* **156**, 217-226 (1996).

Bissell, D. M., Roulot, D. & George, J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* **34**, 859-867 (2001).

Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R. & Roll, F. J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* **96**, 447-455 (1995).

Bosch, F. X., Ribes, J., Diaz, M. & Cleries, R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* **127**, S5-S16 (2004).

Boyer, B., Roche, S., Denoyelle, M. & Thiery, J. P. Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *EMBO J.* **16**, 5904-5913 (1997).

Calabrese, F. *et al.* Overexpression of squamous cell carcinoma antigen in idiopathic pulmonary fibrosis: clinicopathological correlations. *Thorax* **63**, 795-802 (2008).

Cannito, S. *et al.* Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* **29**, 2267-2278 (2008).

Cano, A. *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76-83 (2000).

Casini, A. *et al.* Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* **25**, 361-367 (1997).

Cataltepe, S. *et al.* Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 113-122 (2000).

Conacci-Sorrell, M. *et al.* Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* **163**, 847-857 (2003).

Corpechot, C. *et al.* Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* **35**, 1010-1021 (2002).

Ding, Q. *et al.* Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol. Cell* **19**, 159-170 (2005).

Edme, N., Downward, J., Thiery, J. P. & Boyer, B. Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways. *J. Cell. Sci.* **115**, 2591-2601 (2002).

Elvert, G. *et al.* Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J. Biol. Chem.* **278**, 7520-7530 (2003).

Erdemir, F. *et al.* The relationship between the expression of E-cadherin and tumor recurrence and progression in high-grade stage T1 bladder urothelial carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* **39**, 1031-1037 (2007).

Fidler, I. J. & Poste, G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol.* **9**, 808 (2008).

Forino, M. *et al.* TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture. *Int. J. Exp. Pathol.* **87**, 197-208 (2006).

Frame, S. & Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1-16 (2001).

Franco, D. L. *et al.* Snail1 suppresses TGF-beta-induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J. Cell. Sci.* **123**, 3467-3477 (2010).

Friedman, S. L. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J. Hepatol.* **38 Suppl 1**, S38-53 (2003).

Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* **275**, 2247-2250 (2000).

Geerts, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* **21**, 311-335 (2001).

Gettins, P. G. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* **102**, 4751-4804 (2002).

Giannelli, G. *et al.* Clinical role of tissue and serum levels of SCCA antigen in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **116**, 579-583 (2005).

Giehl, K. & Menke, A. Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions. *Front. Biosci.* **13**, 3975-3985 (2008).

Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J., Diehl, J. A. & Simon, M. C. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer. Cell.* **11**, 335-347 (2007).

Gordan, J. D. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 71-77 (2007).

Gort, E. H., Groot, A. J., van der Wall, E., van Diest, P. J. & Vooijs, M. A. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Curr. Mol. Med.* **8**, 60-67 (2008).

Gressner, A. M. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int. Suppl.* **54**, S39-45 (1996).

Gressner, A. M., Polzar, B., Lahme, B. & Mannherz, H. G. Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. *Hepatology* **23**, 571-581 (1996).

Gressner, O. A., Weiskirchen, R. & Gressner, A. M. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp. Hepatol.* **6**, 7 (2007).

- Guido, M. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* **61**, 445-447 (2008).
- Hamada, K. *et al.* Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**, 124-131 (2001).
- Hanafusa, H. *et al.* Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 27161-27167 (1999).
- Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 38-47 (2002).
- Harrison, L. & Blackwell, K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist* **9 Suppl 5**, 31-40 (2004).
- Hashimoto, K., Kiyoshima, T., Matsuo, K., Ozeki, S. & Sakai, H. Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF-alpha-induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Tumour Biol.* **26**, 165-172 (2005).
- Hegyí, K., Fulop, K., Kovacs, K., Toth, S. & Falus, A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol. Int.* **28**, 159-169 (2004).
- Higgins, D. F., Kimura, K., Iwano, M. & Haase, V. H. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell. Cycle* **7**, 1128-1132 (2008).
- Hill, R. P., Marie-Egyptienne, D. T. & Hedley, D. W. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin. Radiat. Oncol.* **19**, 106-111 (2009).
- Hoshida, Y. *et al.* Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin. Liver Dis.* **30**, 35-51 (2010).
- Hynes, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219 (2009).
- Inagaki, Y. & Okazaki, I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* **56**, 284-292 (2007).
- Ishak, K. *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J. Hepatol.* **22**, 696-699 (1995).
- Izuhara, K., Ohta, S., Kanaji, S., Shiraiishi, H. & Arima, K. Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 2541-2553 (2008).

Kalluri, R. & Neilson, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1776-1784 (2003).

Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420-1428 (2009).

Katagiri, C., Nakanishi, J., Kadoya, K. & Hibino, T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase. *J. Cell Biol.* **172**, 983-990 (2006).

Kato, H. & Torigoe, T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* **40**, 1621-1628 (1977).

Keely, P. J. Rho GTPases as early markers for tumour progression. *Lancet* **358**, 1744-1745 (2001).

Klimova, T. & Chandel, N. S. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* **15**, 660-666 (2008).

Koli, K., Saharinen, J., Hyytiainen, M., Penttinen, C. & Keski-Oja, J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 354-362 (2001).

Kordes, C. *et al.* CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 410-417 (2007).

Kountouras, J., Zavos, C. & Chatzopoulos, D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* **50**, 242-249 (2003).

Kuorilehto, T., Nissinen, M., Koivunen, J., Benson, M. D. & Peltonen, J. NF1 tumor suppressor protein and mRNA in skeletal tissues of developing and adult normal mouse and NF1-deficient embryos. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 983-989 (2004).

Kuwano, A., Kondo, I., Kishi, F., Suminami, Y. & Kato, H. Assignment of the squamous cell carcinoma antigen locus (SCC) to 18q21 by in situ hybridization. *Genomics* **30**, 626 (1995).

Lang, T. *et al.* Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1091-1095 (2004).

Larue, L. & Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**, 7443-7454 (2005).

- Laurent-Puig, P. & Zucman-Rossi, J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* **25**, 3778-3786 (2006).
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R. & Thompson, E. W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* **172**, 973-981 (2006).
- Lee, J. S., Semela, D., Iredale, J. & Shah, V. H. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* **45**, 817-825 (2007).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
- Luke, C. *et al.* Simple modifications of the serpin reactive site loop convert SCCA2 into a cysteine proteinase inhibitor: a critical role for the P3' proline in facilitating RSL cleavage. *Biochemistry* **39**, 7081-7091 (2000).
- Malumbres, M. & Pellicer, A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front. Biosci.* **3**, d887-912 (1998).
- Marra, F. *et al.* Characterization and regulation of the latent transforming growth factor-beta complex secreted by vascular pericytes. *J. Cell. Physiol.* **166**, 537-546 (1996).
- Masumoto, K., Sakata, Y., Arima, K., Nakao, I. & Izuhara, K. Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1. *J. Biol. Chem.* **278**, 45296-45304 (2003).
- Montalto, G. *et al.* Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **963**, 13-20 (2002).
- Montesano, R., Soriano, J. V., Hosseini, G., Pepper, M. S. & Schramek, H. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **10**, 317-332 (1999).
- Mori, K., Shibamura, M. & Nose, K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **64**, 7464-7472 (2004).
- Moustakas, A. & Heldin, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009).
- Moustakas, A. & Heldin, C. H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer. Sci.* **98**, 1512-1520 (2007).

Murakami, A. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br. J. Cancer* **84**, 851-858 (2001).

Nelson, W. J. & Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-1487 (2004).

Ng, Y. Y. *et al.* Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 2860-2872 (1999).

Nieto, N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology* **44**, 1487-1501 (2006).

Novo, E. *et al.* Proangiogenic cytokines as hypoxia-dependent factors stimulating migration of human hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* **170**, 1942-1953 (2007).

Novo, E. & Parola, M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**, 5 (2008).

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer. J. Clin.* **55**, 74-108 (2005).

Passino, M. A., Adams, R. A., Sikorski, S. L. & Akassoglou, K. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science* **315**, 1853-1856 (2007).

Pinzani, M. & Marra, F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* **21**, 397-416 (2001).

Pinzani, M. & Rombouts, K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig. Liver Dis.* **36**, 231-242 (2004).

Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 265-273 (2009).

Pontisso, P. *et al.* Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **90**, 833-837 (2004).

Povero, D. *et al.* Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol. Histopathol.* **25**, 1075-1091 (2010).

- Przybylo, J. A. & Radisky, D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition: tumor progression at Snail's pace. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1082-1088 (2007).
- Qing, G. & Simon, M. C. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 60-66 (2009).
- Quarta S, *et al.* SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* **221**: 343-356 (2010)
- Rachfal, A. W. & Brigstock, D. R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol. Res.* **26**, 1-9 (2003).
- Radisky, D. C. *et al.* Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436**, 123-127 (2005).
- Remold-O'Donnell, E. The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett.* **315**, 105-108 (1993).
- Saharinen, J., Taipale, J. & Keski-Oja, J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* **15**, 245-253 (1996).
- Sakata, Y. *et al.* The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1. *J. Biol. Chem.* **279**, 5081-5087 (2004).
- Saxena, N. K., Ikeda, K., Rockey, D. C., Friedman, S. L. & Anania, F. A. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* **35**, 762-771 (2002).
- Saxena, N. K. *et al.* Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J.* **18**, 1612-1614 (2004).
- Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162 (1967).
- Schick, C. *et al.* Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J. Biol. Chem.* **272**, 1849-1855 (1997).
- Schick, C. *et al.* Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* **37**, 5258-5266 (1998).

Schmierer, B. & Hill, C. S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 970-982 (2007).

Schneider, S. S. *et al.* A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3147-3151 (1995).

Schreck, R., Rieber, P. & Baeuerle, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258 (1991).

Sharp, F. R. & Bernaudin, M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 437-448 (2004).

Silverman, G. A. *et al.* SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumour Biol.* **19**, 480-487 (1998).

Silverman, G. A. *et al.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* **276**, 33293-33296 (2001).

Silverman, G. A. *et al.* Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 301-325 (2004).

Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 285-296 (2008).

Song, J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell Res.* **17**, 289-290 (2007).

Strutz, F. *et al.* Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* **61**, 1714-1728 (2002).

Suminami, Y., Kishi, F., Sekiguchi, K. & Kato, H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 51-58 (1991).

Suminami, Y. *et al.* Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res.* **61**, 1776-1780 (2001).

- Suminami, Y. *et al.* Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br. J. Cancer* **82**, 981-989 (2000).
- Sun, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* **75**, 1278-1287 (2009).
- Svegliati Baroni, G. *et al.* Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **27**, 720-726 (1998).
- Svegliati-Baroni, G. *et al.* Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* **33**, 1130-1140 (2001).
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208 (2001).
- Takeda, A., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Takahashi, T. & Hibino, T. Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. *FEBS Lett.* **359**, 78-80 (1995).
- Takeshima, N. *et al.* Expression of mRNA of SCC antigen in squamous cells. *Tumour Biol.* **13**, 338-342 (1992).
- Temkin, V. & Karin, M. From death receptor to reactive oxygen species and c-Jun N-terminal protein kinase: the receptor-interacting protein 1 odyssey. *Immunol. Rev.* **220**, 8-21 (2007).
- ten Dijke, P. & Arthur, H. M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 857-869 (2007).
- Teoh, N. C. Proliferative drive and liver carcinogenesis: too much of a good thing? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 1817-1825 (2009).
- Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 740-746 (2003).
- Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 442-454 (2002).
- Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131-142 (2006).

Vaupel, P. & Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 225-239 (2007).

Vinas, O. *et al.* Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* **38**, 919-929 (2003).

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510-5514 (1995).

Wiesener, M. S. *et al.* Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* **17**, 271-273 (2003).

Williams, E. J., Gaca, M. D., Brigstock, D. R., Arthur, M. J. & Benyon, R. C. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* **32**, 754-761 (2000).

Winau, F. *et al.* Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* **26**, 117-129 (2007).

Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156-172 (2009).

Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell.* **14**, 818-829 (2008).

Zeisberg, M. & Kalluri, R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J. Mol. Med.* **82**, 175-181 (2004).

Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**, 1429-1437 (2009).

Zhan, S. S. *et al.* Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* **43**, 435-443 (2006).

Zhang, A., Jia, Z., Guo, X. & Yang, T. Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **293**, F723-31 (2007).

Zhou, B. P. *et al.* Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* **6**, 931-940 (2004).