



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Biologia e Medicina della Rigenerazione

INDIRIZZO: Scienze Epatologiche e Gastroenterologiche

CICLO XXV

## **DANNO OSSIDATIVO NUCLEARE E MITOCONDRIALE E DISFUNZIONE TELOMERICA NEL PROCESSO DI CARCINOGENESI EPATICA**

**Direttore della Scuola:** Ch.ma Prof. ssa Maria Teresa Conconi

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

**Supervisor:** Ch.mo Prof. Fabio Farinati

Dott.ssa Romilda Cardin

**Dottoranda:** Marika Picocchi

<b><u>ABBREVIAZIONI</u></b>	<b><u>5</u></b>
-----------------------------	-----------------

<b><u>SOMMARIO</u></b>	<b><u>9</u></b>
------------------------	-----------------

<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b><u>11</u></b>
------------------------	------------------

<b><u>INTRODUZIONE</u></b>	<b><u>13</u></b>
----------------------------	------------------

**I RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO (ROS): DEFINIZIONE E PRODUZIONE**

13

**PROTEZIONE E RISPOSTA CELLULARE ALLO STRESS OSSIDATIVO**

15

**L'ADDOTTO AL DNA 8-IDROSSIDEOSSIGUANOSINA (8-OHDG)**

17

**METODI ANALITICI PER LA RILEVAZIONE DEGLI ADDOTTI AL DNA**

19

**GENE *OGG1***

21

**TELOMERI, TELOMERASI E POTENZIALE REPLICATIVO ILLIMITATO**

22

**METODI ANALITICI PER LA VALUTAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI**

**TELOMERI**

25

**METODI ANALITICI PER LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ**

**TELOMERASICA**

26

**REGOLAZIONE DI *TERT***

27

METILAZIONE DEL PROMOTORE DI *TERT*

27

METODI ANALITICI PER LO STUDIO DELLA METILAZIONE

30

LOCALIZZAZIONE CELLULARE DI *TERT*

31

**DANNO OSSIDATIVO E FEGATO**

33

**CARCINOGENESI EPATICA**

35

EPIDEMIOLOGIA

35

EZIOLOGIA

36

□ VIRUS DELL'EPATITE B	37
□ VIRUS DELL'EPATITE C	40
□ MECCANISMI MOLECOLARI DELL'HCC	44
<b><u>OBIETTIVO DELLO STUDIO</u></b>	<b>49</b>
<b><u>PAZIENTI E METODI</u></b>	<b>51</b>
<b>PAZIENTI</b>	<b>51</b>
VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEI TESSUTI EPATICI	53
<b>METODI</b>	<b>54</b>
ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA BIOPSIE EPATICHE E CAMPIONI CHIRURGICI	54
DETERMINAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DELLA CONCENTRAZIONE DEL DNA GENOMICO ESTRATTO	55
PCR E RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP): DETERMINAZIONE DEL POLIMORFISMO DEL GENE <i>OGG1</i>	56
DETERMINAZIONE DELL'ADDOTTO 8-OHDG	57
□ Idrolisi enzimatica del DNA	57
□ HPLC-EC	58
ANALISI DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI	59
DETERMINAZIONE DELLO STATO DI METILAZIONE DEL PROMOTORE DI <i>TERT</i>	61
□ Trattamento del DNA genomico con bisolfito di sodio	61
□ Determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA trattato con bisolfito di sodio	61
□ PCR	61
□ MSP quantitativa	62
ESTRAZIONE DI PROTEINE DA COLTURE DI CELLULE PLC/PRF/5	64
ESTRAZIONE DI PROTEINE DA TESSUTI EPATICI	64

DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA DEI LISATI CELLULARI E TISSUTALI	64
DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA MEDIANTE REAL TIME PCR –TRAP	65
ISOLAMENTO DI MITOCONDRI DA TESSUTI TUMORALI EPATICI	66
ESTRAZIONE E DOSAGGIO DELLE PROTEINE MITOCONDRIALI	67
WESTERN BLOTTING	67
ESTRAZIONE DEL MTDNA	68
ANALISI STATISTICA	68
<b><u>RISULTATI</u></b>	<b>71</b>
<b>DANNO GENOMICO OSSIDATIVO: DETERMINAZIONE DELL'8-OHdG</b>	<b>71</b>
<b>POLIMORFISMO DEL GENE <i>OGG1</i></b>	<b>74</b>
<b>LUNGHEZZA DEI TELOMERI</b>	<b>76</b>
<b>ATTIVITÀ TELOMERASICA</b>	<b>78</b>
<b>METILAZIONE DEL PROMOTORE DI <i>TERT</i></b>	<b>80</b>
<b>LOCALIZZAZIONE MITOCONDRIALE DI <i>TERT</i></b>	<b>82</b>
<b>ANALISI DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA A LIVELLO MITOCONDRIALE</b>	<b>84</b>
<b>DANNO OSSIDATIVO AL DNA MITOCONDRIALE</b>	<b>84</b>
<b>CORRELAZIONI</b>	<b>85</b>
<b><u>DISCUSSIONE</u></b>	<b>87</b>
<b>CONFRONTO TRA I MECCANISMI DI DANNO EPATICO DA HBV E HCV</b>	<b>97</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>103</b>



## **ABBREVIAZIONI**

8-OHdG 8-hydroxydeoxyguanosine (8-idrossideossiguanosina)

A adenine (adenina)

ALT.. alanine aminotransferase (alanina aminotransferasi)

AP site apurinic/aprimidinic site (sito apuinico/apirimidinico)

AP-PCR Arbitrary primers PCR (PCR con primers arbitrari)

ATP Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)

BER Base Excision Repair (riparazione per escissione di basi)

bp base pairs (paio di basi)

C cytosine (citosina)

CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilammonio]-propano sulfonato)

COBRA Combined Bisulfite Restriction Analysis (analisi di restrizione associata al bisolfito)

Ct cycle threshold (ciclo di threshold)

Cys cysteine (cisteina)

dATP Deoxyadenosine triphosphate (deossiadenosina trifosfato)

dCTP Deoxycytidine triphosphate (deossicitosina trifosfato)

dG Deoxyguanosine(deossiguanosina)

dGTP Deoxyguanosine triphosphate (deossiguanosina trifosfato)

DMH Differential Methylation Hybridization (ibridazione differenziale in base allo stato di metilazione)

DNA Deoxyribonucleic Acid (acido deossiribonucleico)

DNMT DNA methyltransferase (DNA metiltransferasi)

dNTP Deoxyribonucleotide triphosphate (deossiribonucleotide trifosfato)

dTTP Deoxythymidine triphosphate (deossitimina trifosfato)

dUTP Deoxyuridine triphosphate (deossiuridina trifosfato)

EDTA Ethylene diamine tetraacetic acid (acido etilendiaminotetracetico)

EGTA ethylene glycol tetraacetic acid (acido etilenglicotetracetico)

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay (Saggio immuno-enzimatico)

FPG FormamidopyrimidineDNA glycosylase (DNA glicosilasi formamido pirimidina)

G guanine (guanina)

GC-MS Gas chromatography–mass spectrometry (gas cromatografia associata a spettrometria di massa)

GSH Glutathione (glutazione)

GSSG Glutathione disulfide (glutazione disulfito)

HBcAg Hepatitis B core antigen (antigene core del virus dell'epatite B)

HBV hepatitis B virus (epatite da virus B)

HCC hepatocellular carcinoma (carcinoma epatocellulare)

HCV hepatitis C virus (epatite da virus C)

HPLC-EC High Pressure Liquid Chromatography- Electrochemical Detection (cromatografia liquida ad alta pressione con detector elettrochimico)

INF- $\alpha$  interferon- $\alpha$  (interferone- $\alpha$ )

MAPK1 Mitogen-activated protein kinase 1 (proteina chinasi 1 mitogeno attivata)

MCA Methylation CpG Amplification (amplificazione delle isole CpG metilate)

MeST Methylation Sequences Tags (Tag di sequenze di metilazione)

MnSOD Manganese Superoxide Dismutase (manganese superossido dismutasi)

MOPS 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (acido morfolinopropanosulfonico)

mRNA messenger RNA (RNA messaggero)

MSP Methylation Specific PCR (PCR metilazione specifica)

Ms-SnuPE Methylation sensitive Single nucleotide Primer Extension  
(Metilazione sensibile all'estensione di un primer con un singolo nucleotide)

mtDNA mitochondrial DNA (DNA mitocondriale)

NAFLD Non-alcoholic fatty liver disease (malattia epatica non alcolica)

NASH Non- alcoholic steato hepatitis (steato-epatite non alcolica)

NF-kB nuclear factor-kB (fattore nucleare-kB)

NOX2 NADPH oxidase (NADPH ossidasi )

NTU-HCC non-tumoral HCC (tessuto peritumorale dell'HCC)

PAS Periodic acid-Schiff

PBS Phosphate buffered saline (tampone fosfato salino)

PCR polymerase chain reaction (reazione a polimerizzazione a catena)

PDGFR $\beta$  Platelet-Derived Growth Factor Receptor- $\beta$  (recettore  $\beta$  per il fattore di crescita piastrinico)

PDGF $\beta$  Platelet-Derived Growth Factor - $\beta$  (fattore  $\beta$  di crescita piastrinico)

Pol polymerase (polimerasi)

PVDF Polyvinylidene fluoride (polivinilfluoride)

qFISH Quantitative Fluorescent in situ hybridization (ibridazione fluorescente quantitativa in situ)

RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism (analisi di restrizione della lunghezza dei frammenti)

RIA radioimmunoassay (test radio-immunologico)

RLGS Restriction Landmark Genome Scanning (scansione del genoma mediante punti di riferimento)

RNA Ribonucleic Acid (acido ribonucleico)

ROS reactive oxygen species (specie reattive dell'ossigeno)

rRNA ribosomal RNA (RNA ribosomiale)

RTQ-TRAP Real Time Quantitative Telomerase Repeat Protocol (Analisi quantitativa in tempo reale associata all'amplificazione delle sequenze telomeriche)

SCGE Single Cell Gel Electrophoresis (elettroforesi su gel a singola cella)

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (elettroforesi su gel di poliacrilammide sodiododecilsolfato)

SEM standard error of mean (errore standard medio)

Ser serine (serina)

STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3 (segnale di traduzione e attivatore trascrizionale 3)

T thymine (timina)

TBE Tris/Borate/EDTA (Tris/acido bórico/EDTA)

TBS Tris-buffered saline (buffer salino di Tris)

TERC telomerase RNA component (componente di RNA della telomerasi)

TERT telomerase reverse transcriptase (trascrittasi inversa della telomerasi)

TGF- $\beta$  transforming growth factor-  $\beta$  (fattore di crescita trasformante- $\beta$ )

TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor- $\alpha$  (fattore di necrosi tumorale- $\alpha$ )

TRAP Telomeric Repeat Amplification Protocol (Protocollo di amplificazione delle ripetizioni telomeriche)

TRF Terminal Restriction Fragment (analisi dei frammenti di restrizione terminale)

tRNA transfer RNA (RNA di trasporto)

TU-HCC tumoral HCC (tessuto tumorale dell'HCC)

## **SOMMARIO**

Lo stress ossidativo e le specie reattive dell'ossigeno (ROS), la cui sintesi è indotta dal danno epatico causato dai virus delle epatiti C (HCV) e B (HBV), sono in grado di scatenare la cascata di eventi molecolari che portano allo sviluppo del carcinoma epatocellulare (HCC). I telomeri sono siti elettivi di attacco da parte dei ROS, che inducono un loro progressivo accorciamento e una conseguente instabilità cromosomica. L'attività della telomerasi gioca un ruolo cruciale nel mantenimento dei telomeri e nell'immortalizzazione cellulare. TERT, il fattore limitante per la trascrizione della telomerasi, è regolato da meccanismi epigenetici e in condizioni di stress ossidativo può migrare ai mitocondri, dove sembra migliorare la stabilità della membrana ed esercitare una funzione anti-apoptotico. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare la complessa rete molecolare alla base della carcinogenesi epatica ad eziologia virale mediante la valutazione:

- della presenza dell'8-idrossideossiguanosina (8-OHdG), marker di danno ossidativo al DNA, mediante HPLC-EC, e del polimorfismo del gene di riparazione (*OGG1*);
- della lunghezza dei telomeri e dell'attività della telomerasi mediante Real-Time-PCR;
- dello stato di metilazione del promotore di *TERT* mediante PCR quantitativa specifica;
- dell'eventuale traslocazione mitocondriale di TERT mediante western blotting.

In questo studio sono stati esaminati 162 pazienti di cui 21 con HCC (di questi pazienti sono stati analizzati sia i campioni di tessuto tumorale che peritumorale),

71 con epatite cronica HCV-correlata, 35 con epatite cronica HBV-correlata e 15 controlli.

In generale, considerando i pazienti tutti insieme, i dati ottenuti hanno mostrato livelli di 8-OHdG significativamente più alti nei tessuti tumorali rispetto ai controlli ( $p=0.02$ ); i telomeri sono risultati significativamente più corti negli HCC rispetto agli altri gruppi con stadio di malattia meno avanzato ( $p=0.01$ ), mentre l'attività della telomerasi è risultata significativamente più elevata nei tessuti tumorali rispetto ai controlli ( $p=0.01$ ). Negli HCC i livelli di 8-OHdG sono risultati inversamente correlati con la lunghezza telomerica. Nelle nostre analisi il promotore di *TERT* è risultato essere ipermetilato nel carcinoma epatico e nei campioni di tessuto peritumorale ( $p=0.0001$ ). Inoltre, è interessante notare che, quando i pazienti sono stati suddivisi in base all'eziologia virale, è stato possibile verificare come la progressione del danno epatico correlato all'HBV sia caratterizzato da un accumulo di 8-OHdG più tardivo e che caratterizza le fasi più avanzate, rispetto a quello indotto da HCV e, successivamente, da una attivazione della telomerasi limitata, però, al solo tessuto tumorale. Infine la proteina *TERT* è stata localizzata nei mitocondri di tutti i campioni di HCC esaminati, dove è stato dimostrato non avere attività telomerasica, e, nel DNA mitocondriale (mtDNA), i livelli di 8-OHdG sono risultati significativamente più bassi rispetto a quelli valutati nel DNA genomico ( $p=0.0003$ ).

Questi dati descrivono una complessa rete di eventi nella carcinogenesi epatica HBV/HCV correlata in cui il danno ossidativo al DNA è legato a cambiamenti nella lunghezza dei telomeri, all'attivazione della telomerasi e ad un'aumentata metilazione del promotore di *TERT*. Infine, il ruolo di *TERT* a livello mitocondriale nell'HCC è ancora argomento di discussione, ma un'ipotesi interessante riguarda il suo potenziale coinvolgimento nella possibile regolazione dell'apoptosi.

## **ABSTRACT**

Induction of chronic oxidative stress by hepatitis C (HCV) and B (HBV) virus is one of the molecular events leading to hepatocellular carcinoma (HCC) development. Telomeres are prone to oxidative modifications, that induce a progressive telomere shortening and a consequent chromosomal instability. Telomerase activity plays a crucial role in telomeres maintenance and cell immortalization. TERT, the rate limiting factor for telomerase transcription, is regulated by epigenetic mechanism and under oxidative stress migrates to mitochondria, where it ameliorates the membrane stability and exerts an anti-apoptotic role. The aim of the study was to investigate the complex molecular network underlying virus-related liver carcinogenesis, evaluating: 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a marker of oxidative DNA damage, and *OGG1* gene, telomere length, telomerase activity, *TERT* promoter methylation and mitochondrial TERT translocation.

One hundred sixty-two patients were investigated: 21 with HCC (both tumor and peritumoral tissue samples), 71 with chronic hepatitis HCV-related and 35 with chronic hepatitis HBV-related and 15 controls. Eight-OHdG was quantified through HPLC-EC, telomerase activity and telomeres length by Real Time PCR, *TERT* promoter methylation status by Quantitative Methylation Specific PCR and mitochondrial TERT translocation by western blotting. Overall, 8-OHdG levels were significantly higher in tumor tissues than in controls ( $p=0.02$ ), telomeres were significantly shorter in HCC compared to the less advanced stages of disease ( $p=0.01$ ), whereas telomerase activity was significantly higher in tumor tissues than in controls ( $p=0.01$ ). Eight-OHdG levels inversely correlated with telomere length in HCC. Overall, *TERT* promoter was hypermethylated in HCC and peritumoral tissue samples ( $p=0.0001$ ). When the patients were subgrouped

on the basis of etiology, HBV-related liver damage progression was characterized by later *8-OHdG* accumulation and a pronounced telomerase activation limited to HCC tissue. TERT was localized in mitochondria in all the investigated HCC samples and, in mitochondria DNA, *8-OHdG* levels were significantly lower than in genomic DNA ( $p=0.0003$ ).

These data describe a complex network in which oxidative DNA damage is linked to changes in telomeres length, extent of telomerase activation and higher methylation of *TERT* promoter in HBV/HCV related carcinogenesis. The role of mitochondrial TERT in HCC is open to debate, but an intriguing work hypothesis is that it could down-regulate apoptosis.

## **INTRODUZIONE**

### **I RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO (ROS): DEFINIZIONE E PRODUZIONE**

Per radicale libero si intende ogni specie chimica, atomo o molecola, provvista di uno o più elettroni spaiati nell'orbitale periferico. Questa configurazione elettronica conferisce ai radicali liberi un'elevata reattività legata alla necessità di cedere o acquistare un elettrone per assumere uno stato energetico più stabile, interagendo con le macromolecole cellulari adiacenti (lipidi, proteine e acidi nucleici) [1]. La produzione intracellulare dei radicali liberi può essere sia endogena che esogena e può essere innescata in differenti modi.

Fonti endogene:

- fosforilazione ossidativa: in tutti gli organismi, durante il metabolismo aerobico cellulare la maggior parte dell' $O_2$  viene ridotta in  $H_2O$  grazie all'azione della citocromo ossidasi della catena respiratoria per produrre energia. Durante questa reazione alcuni elettroni possono sfuggire alla catena di trasporto mitocondriale degli elettroni, soprattutto dal complesso I e III, e reagire con una piccola parte dell'ossigeno molecolare (circa il 4-5%) per formare dei sottoprodotti della respirazione mitocondriale, i ROS, quali l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e il radicale idrossilico ( $OH\cdot$ ).

L'anione superossido ( $O_2^-$ ) viene convertito dalla manganese superossidodismutasi (MnSOD) in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), che in seguito viene detossificato e trasformato in  $H_2O$  dalla glutationeperossidasi mitocondriale. L'enzima richiede alti livelli di glutatione ridotto (GSH), quindi bassi livelli di GSH mitocondriali portano a disfunzioni mitocondriali e alla produzione di ROS da parte della catena respiratoria. Nonostante la maggior

parte dei ROS venga convertita in H<sub>2</sub>O, una piccola parte rimane all'interno delle cellule danneggiandole

- metabolismo del citocromo p450 coinvolto nella produzione di ROS in base all'isoforma;
- perossisomi che liberano H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in seguito all'assunzione di potenti induttori del p450A portando a uno sbilanciamento dello stato redox cellulare;
- attivazione dell'infiammazione cellulare attraverso macrofagi e monociti i quali, una volta attivati, producono alti livelli di ROS attraverso 4 diversi enzimi quali la superossidodismutasi, la NADPH ossidasi, le mieloperossidasi e l'ossido nitrico sintetasi. NADPH ossidasi produce O<sub>2</sub><sup>-</sup>, substrato per la superossidodismutasi, che lo converte in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la quale è relativamente stabile e capace di diffondere e penetrare le membrane cellulari permettendo ai neutrofili di agire a distanza. Tuttavia la maggior parte dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene utilizzata dalla mieloperossidasi che la converte in acido ipocloroso (HOCl). Inoltre i neutrofili producono ossido nitrico (NO·) mediante l'ossido nitrico sintetasi a partire dall'ossigeno. Tutti gli ossidanti prodotti dai neutrofili interagiscono tra loro e generano altri ossidanti tra cui il radicale idrossilico (OH·) che è il composto maggiormente reattivo con il DNA.

Fonti esogene:

- assorbimento di energia radiante come luce ultravioletta, raggi X e radiazioni ionizzanti;
- metabolismo di xenobiotici;
- ioni metallici come ferro e rame che permettono di convertire l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la reazione di Fenton:



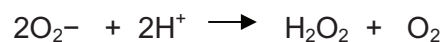
I ROS sono da molti anni argomento di particolare interesse in biologia a causa del ruolo fisiologico e fisiopatologico che svolgono nei diversi tessuti. Infatti a concentrazioni sub-letali svolgono un ruolo fisiologico importante come secondi messaggeri nella mediazione e nella promozione di diversi eventi cellulari in quanto stimolano la proliferazione cellulare e fungono da meccanismo di difesa nei fagociti. Tuttavia a causa della loro estrema reattività i ROS inducono danno tissutale e sono coinvolti in numerosi processi (infiammazione, apoptosi e senescenza) e in differenti tipi di patologie: malattie infiammatorie, artrite reumatoide, aterosclerosi e cancro [3, 4].

## **PROTEZIONE E RISPOSTA CELLULARE ALLO STRESS OSSIDATIVO**

Nella maggior parte dei casi i radicali liberi sono instabili e decadono spontaneamente prima di danneggiare le macromolecole cellulari, tuttavia, per minimizzare i loro effetti, le cellule hanno sviluppato dei meccanismi scavenger:

➤ enzimi ad azione antiossidante:

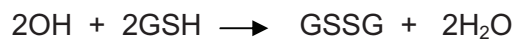
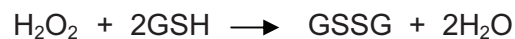
⇒ superossidodismutasi, presente nei mitocondri e nel citosol di diversi tipi di cellule, converte l'anione superossido a  $H_2O_2$ :



⇒ catalasi, presente nei perossisomi, converte  $H_2O_2$  in  $H_2O$ :



⇒ glutationeperossidasi, localizzata nel citosol delle cellule, catalizza la degradazione dei radicali liberi e permette di controllare lo stato ossidativo e la capacità cellulare di detossificare le specie reattive dell'ossigeno mediante il rapporto tra glutatione ossidato (GSSG) e GSH:



Il GSH è il maggiore tiolo cellulare ad azione antiossidante e coniugante che permette di neutralizzare i composti endogeni potenzialmente tossici attraverso reazioni di ossido-riduzione, da parte della glutatione perossidasi, e di detossificare composti endogeni ed esogeni mediante coniugazione con la GSH-transferasi;

- antiossidanti ad azione non enzimatica come vitamine A, C, E;
- enzimi di riparazione dei danni al DNA [2].

Tuttavia quando i sistemi di produzione dei ROS superano quelli cellulari di difesa e di detossificazione si crea una situazione di squilibrio e l'esposizione cronica ad un eccesso di ROS porta alla saturazione delle difese e allo stress ossidativo implicato nella patogenesi di molte malattie infiammatorie acute e croniche [5], ischemia, danno da radiazioni ionizzanti [6], tossici e virus [7] e nell'accumulo dei difetti genetici [8] che contribuiscono alla distruzione delle cellule e dei tessuti e all'iniziazione della carcinogenesi. I ROS possono danneggiare differenti biomolecole cellulari quali lipidi, proteine e DNA, ma il target iniziale dipende dal tipo, dalla localizzazione e dalla severità dello stress ossidativo.

Il DNA è un target importante per l'ossidazione e il danno genetico è mediato dalla formazione di radicali idrossilici che attaccano l'acido nucleico producendo legami covalenti stabili, e di conseguenza addotti, oppure portando ad un cambiamento dell'espressione genica. Il danno ossidativo al DNA gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della carcinogenesi attraverso differenti meccanismi:

1. modificazioni delle basi, siti apurinici e apirimidinici (AP), rotture del singolo filamento, frameshifts e riarrangiamenti cromosomici [9];

2. alterazioni genetiche indotte da agenti ossidanti, come mutazioni e riarrangiamenti cromosomici, possono giocare un ruolo nell'iniziazione della carcinogenesi. Molti danni ossidativi al DNA portano ad anomalie cromosomiche che causano il blocco dell'attività di replicazione e citotossicità. La potenziale iniziazione degli ossidanti potrebbe dipendere dalla loro capacità di indurre cambiamenti nelle basi del DNA in alcuni oncogeni e geni soppressori tumorali contribuendo alla carcinogenesi. L'aumento degli errori di replicazione può compromettere la fedeltà del DNA predisponendo le cellule iniziate ad un'ulteriore attivazione degli oncogeni ed inattivazione degli oncosoppressori. Inoltre la citotossicità indotta dagli agenti ossidanti può contribuire alla iniziazione della carcinogenesi tramite la deplezione della normale popolazione cellulare e la promozione dell'espansione clonale delle cellule iniziate con una elevata quantità di mutazioni;
3. modulazione dell'espressione genica può portare alla promozione dei segnali di crescita e proliferazione cellulare tramite attivazione di proto-oncogeni.

L'OH· è il radicale libero che tra le diverse forme di ROS, a causa della sua limitata diffusione, crea maggiori danni al DNA perché interagisce direttamente con componenti cellulari [10].

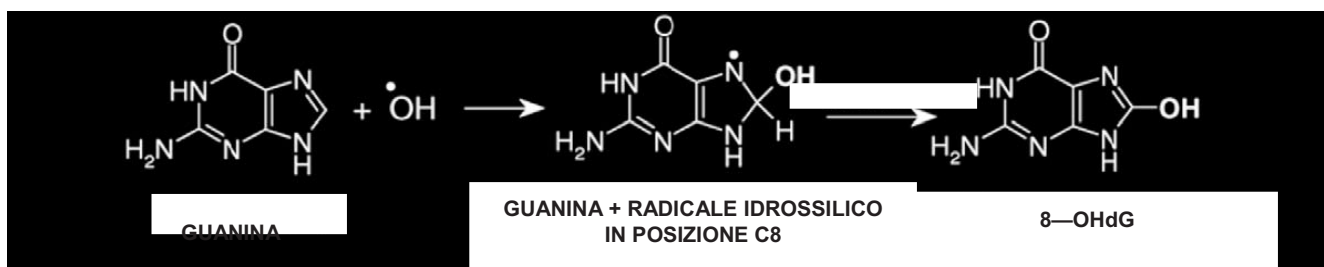
### **L'ADDOTTO AL DNA 8-IDROSSIDEOSSIGUANOSINA (8-OHDG)**

Il danno ossidativo rappresenta la principale minaccia per l'integrità del genoma nella maggior parte degli organismi viventi. La deossiguanosina (dG) è uno dei costituenti del DNA e quando viene ossidata si trasforma in 8-OHDG, uno dei più

abbondanti e rilevanti danni ossidativi alle basi del genoma, e per questo molto studiato [11-15].

L'addotto 8-OHdG può essere causato da due meccanismi possibili:

- interazione diretta dei radicali liberi dell'ossigeno (radicale idrossile) o dell'ossigeno singoletto con la guanina in posizione C8: idrossilazione della dG con formazione di un composto intermedio che, in seguito alla perdita di un atomo di idrogeno, porta alla formazione dell'addotto;
- ossidazione della guanina nel pool di nucleotidi durante le fasi di replicazione del DNA. *Fig.1.*



**Figura1:** Formazione dell'8-OHdG (modificata da [77]).

In condizioni fisiologiche si formano circa 200 residui/cellula/die dell'addotto 8-OHdG nel DNA cellulare come prodotto dei normali processi metabolici in qualunque distretto dell'organismo [2].

L'8-OHdG, analogamente a qualunque lesione del DNA, è coinvolto in diversi processi cellulari di difesa e di riparazione da parte dell'organismo:

- meccanismi di riparazione del DNA mediante eliminazione delle basi (BER) come la DNA glicosilasi /AP liasi codificata dal gene *OGG1*;
- meccanismi ad azione antiossidante;
- enzimi scavenger dei radicali liberi.

Quindi, una volta eliso, l'8-OHdG viene rilasciato in circolo ed eliminato con le urine. Nell'uomo, la molteplicità delle modificazioni ossidative e le loro conseguenze, soprattutto in termini di carcinogenesi, non sono state studiate in maniera esaustiva. Tuttavia, quando l'8-OHdG si accumula nel genoma cellulare determina una lesione persistente che porta a mutazioni puntiformi sito-specifiche come transversioni G-C:T-A durante la replicazione del DNA e a scorretti appaiamenti nei filamenti figli che non vengono riconosciuti dagli enzimi proofreading. Questa lesione, dalle elevate caratteristiche mutagene, può interessare sequenze genomiche rilevanti. E' stato visto, infatti, che questo tipo di mutazione è particolarmente frequente nei codoni 248-249 del gene soppressore *p53* dopo esposizione a ROS [16]. L'addotto, quindi, rimanendo stabile nell'organismo, è pre-mutageno e potenzialmente carcinogenetico.

L'8-OHdG è un ottimo marcatore biologico di stress ossidativo, poiché risponde sensibilmente al grado di stress ed è particolarmente utile nella valutazione delle condizioni predisponenti le malattie.

## **METODI ANALITICI PER LA RILEVAZIONE DEGLI ADDOTTI AL DNA**

L'importanza del danno ossidativo al DNA in molte condizioni patologiche, come sottolineato precedentemente, ha stimolato la ricerca di metodi che possedessero la capacità di misurare questo tipo di danno con alta sensibilità e specificità in campioni biologici differenti. Diversi sono gli approcci analitici utilizzati:

1. metodi enzimatici, il Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE), conosciuto anche come COMET assay, e la DNA N-glicosilasiformamido pirimidina (FPG), che permettono di valutare il danno genomico analizzando

la frammentazione del DNA associata al danno nucleare. I tessuti vengono lisati e trattati con alcali che rompono il DNA a livello dei siti labili a causa dell'esposizione a composti ossidanti. Questi metodi, sebbene non producano artefatti, non sono specifici per l'8-OHdG e possono tagliare il filamento di DNA in siti dove si trovano basi ossidate diverse dall'8-OHdG sovrastimando il danno [17];

2. metodi immunocitochimici, che usano anticorpi monoclonali per evitare cross-reattività, ma non sono abbastanza sensibili per determinare bassi livelli di danno genomico presente durante il normale metabolismo di produzione endogena di questi addotti;
3. metodi cromatografici:
  - gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS) con opportuni accorgimenti per evitare artefatti nella fase di preparazione del campione, quando il materiale biologico viene a contatto con l'ossigeno a temperatura ambiente;
  - cromatografia liquida con rilevazione elettrochimica (HPLC-EC) è in grado di dosare direttamente il danno ossidativo in modo altamente specifico e sensibile e permette di apprezzare anche basse quantità di addotto presente nel campione. Con questa tecnica, è possibile misurare i livelli endogeni di 8-OHdG non solo nelle urine, come misura indiretta dell'attività enzimatica deputata a correggere questo danno a livello di DNA, ma anche in DNA isolati da differenti materiali biologici. Il danno genomico misurato nelle urine non fornisce, infatti, informazioni sull'attuale quantità di danno al DNA nelle cellule, che dipende dalla quantità di addotti formati, per unità di tempo, e dalla capacità enzimatica cellulare di correggere gli addotti in tale periodo. Quindi misurando il livello di danno direttamente nel DNA cellulare si riesce a fornire una

specifica indicazione sul danno ossidativo presente. Tuttavia devono essere adottate alcune precauzioni, quali l'uso di antiossidanti e metalli chelanti, che permettono di limitare la formazione di falsi positivi durante la preparazione del materiale biologico per l'analisi. E' necessario, infatti, inibire un danno ossidativo al DNA durante la fase di omogenizzazione e lisi cellulare dei tessuti bloccando il ferro che potrebbe fungere da catalizzatore redox. Anche l'uso di reagenti non altamente purificati nella fase di estrazione del DNA, quali ad esempio il fenolo, potrebbero interferire con il dosaggio, inducendo una sovrastima del danno [18, 19].

## **GENE OGG1**

Il gene umano *OGG1* si trova sul cromosoma 3p26.2 e presenta due diverse isoforme:

- $\alpha$ -*OGG1* presente soprattutto nel nucleo;
- $\beta$ -*OGG1* presente solo a livello dei mitocondri.

Tale gene codifica per una DNA glicosilasi/AP liasi che appartiene al sistema BER. Questo enzima è una *DNA glicosilasi* bifunzionale che oltre a rimuovere la base colpita dal danno ha associato anche un'attività AP liasica [20].

La riparazione dell'8-OHdG avviene durante gli stadi pre-replicativi del ciclo cellulare e richiede cinque step:

1. rimozione della base danneggiata per opera della *DNA glicosilasi*: l'enzima rimuove direttamente l'addotto mediante  $\beta$ -eliminazione sul filamento stampo della base ossidata, incidendo in posizione 3' rispetto al sito AP prodotto dall'escissione della base;
2. incisione del sito abasico: il sito AP viene riconosciuto dall'AP endonucleasi che incide il corpo fosfodiesterico del DNA liberando un 3'-OH;

3. processamento dei terminali prodotti;
4. sintesi del nucleotide corretto mancante da parte della polimerasi che utilizza il 3<sup>l</sup>-OH liberato;
5. ripristino dell'integrità della catena fosfodiesterica del DNA da parte della DNA ligasi [21].

Il polimorfismo C:G in posizione 1245 dell'esone 7 del gene *OGG1* porta alla sintesi di una proteina mutata che presenta nel codone 326 la sostituzione della serina (*OGG1-Ser<sup>326</sup>*) con la cisteina (*OGG1-Cys<sup>326</sup>*). Dati in letteratura riportano una ridotta attività di riparazione del DNA da parte dell'enzima mutato rispetto a quello wild-type [22].

## **TELOMERI, TELOMERASI E POTENZIALE REPLICATIVO ILLIMITATO**

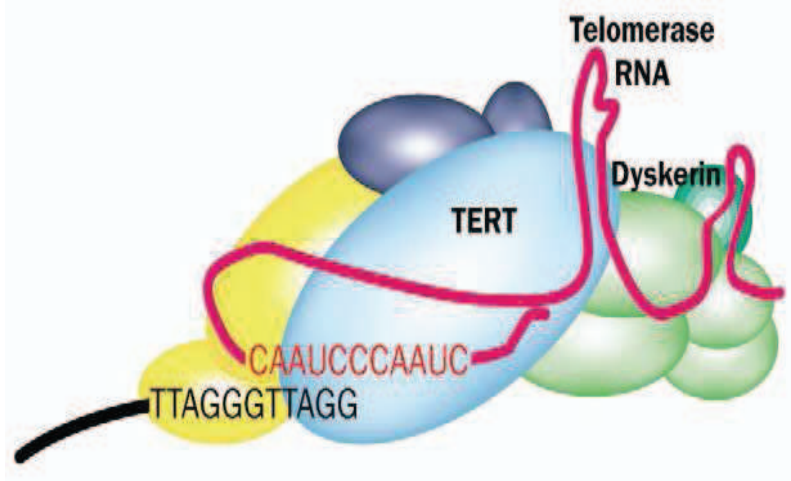
Dati recenti in letteratura riportano una stretta correlazione tra danno ossidativo non riparato (preferenzialmente 8-OHdG) a livello della guanina nel DNA telomerico, ricco di sequenze GGG altamente ripetute, ed espressione dell'attività telomerasica, la cui attivazione è coinvolta nell'immortalizzazione delle cellule [23-25].

Nel 2009 Elizabeth Blackburn, Jack Szostak e Carol Greider sono stati insigniti del Premio Nobel per la Medicina per i loro studi sulla struttura ed il mantenimento dei telomeri. I telomeri sono strutture specializzate costituite da DNA e proteine situate alle estremità dei cromosomi caratterizzati da 4-15 kbp di sequenze tandem ripetute e ben conservate ricche di TG su un filamento e di AC sul filamento complementare. Alla fine di ogni cromosoma il filamento telomerico di DNA ricco in G protrude in direzione 5' → 3' di circa 100-150 nucleotidi oltre il filamento complementare ricco in C intercalandosi nella doppia elica del DNA telomerico in modo tale da determinare la formazione di un loop. I telomeri sono

strutture essenziali per mantenere l'integrità strutturale, l'architettura tridimensionale e la stabilità del DNA, ma si riducono progressivamente didimensione (circa 20-200 bp) ad ogni ciclo replicativo [26]. È noto, infatti, che la lunghezza dei telomeri decresce con l'età. Tuttavia l'accorciamento dei telomeri è legato all'incapacità della DNA polimerasi di replicare completamente la parte terminale dei cromosomi dal momento che manca un primer di RNA su ogni filamento figlio di DNA. Gli ultimi primer sono rimossi dalla esonucleasi che agisce in direzione 5' → 3', ma la DNA polimerasi, data la mancanza di un 3'-OH, al quale poter aggiungere un nucleotide, non riesce a riempire il gap con la conseguente incompletezza di una piccola regione telomerica. Questo determina il progressivo accorciamento dei telomeri, la conseguente senescenza cellulare, con arresto del ciclo replicativo e, quindi, l'apoptosi.

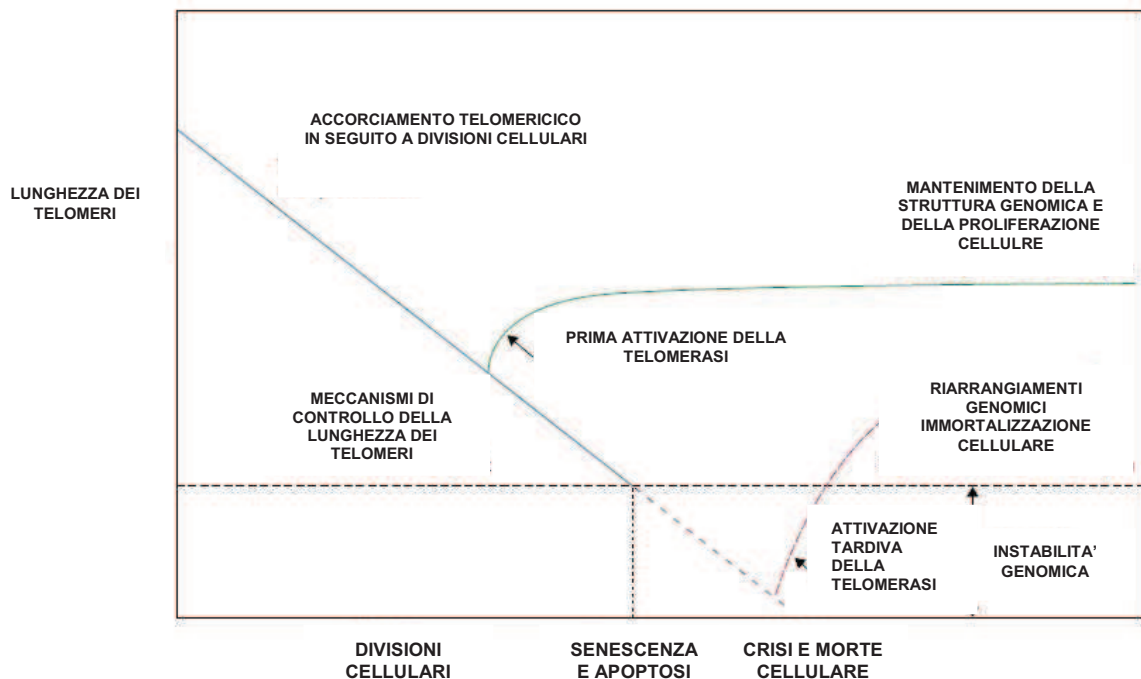
Il termine senescenza cellulare è stato inizialmente utilizzato da Hayflick L. [27] per definire le cellule che in coltura cessavano la loro capacità replicativa. Oggigiorno la senescenza cellulare è definita come la fine della proliferazione delle cellule somatiche in risposta allo stress e al danno da agenti esogeni ed endogeni. La senescenza cellulare è caratterizzata da arresto permanente del ciclo cellulare. Le cellule senescenti mostrano un'alterata morfologia e un alterato pattern di espressione genico [28, 29]. Questa risposta cellulare può avere effetti sull'organismo sia positivi (anti-cancerogeni) che negativi (invecchiamento tissutale) [30].

La telomerasi è una ribonucleoproteina responsabile principalmente del mantenimento del DNA telomerico. La telomerasi è un tipo specializzato di trascrittasi inversa, composto da due distinte subunità, una componente proteica che fornisce l'attività catalitica alla trascrittasi inversa (TERT) e un template di RNA non codificante (TERC) di 15–22 basi ricco in C usato per la sintesi di una sequenza complementare al DNA telomerico ricco in G. *Fig. 2.*



**Figura 2:** Struttura della telomerasi.

Ad ogni ciclo cellulare, questo enzima sintetizza le sequenze telomeriche di DNA alla fine della replicazione dei telomeri utilizzando solo dGTP e dTTP e il 3<sup>1</sup>-OH del filamento telomerico G+T come innesco per la sintesi di ripetizioni in tandem TTAGGG. Lo stampo di RNA si posiziona sull'innesco di DNA, i vari nucleotidi vengono aggiunti uno alla volta ai primer e infine l'enzima trasloca e comincia un altro ciclo. La telomerasi è espressa principalmente nelle cellule embrionali e germinali di maschi adulti, mentre nelle cellule somatiche normali, eccetto nelle cellule in proliferazione dei tessuti con alto potere rigenerante, l'attività dell'enzima è bassa e i telomeri si accorciano ad ogni divisione cellulare. Quindi una volta che i telomeri si sono accorciati oltre un certo limite, i meccanismi di controllo del DNA vengono attivati e portano le cellule alla senescenza, all'arresto proliferativo o alla morte mediante apoptosi. Quando la telomerasi viene espressa costitutivamente, come nelle cellule neoplastiche, si previene l'accorciamento dei telomeri, sfuggendo all'invecchiamento [31]. Questo meccanismo conferisce alle cellule un potenziale replicativo illimitato. *Fig.3.* Grazie alla sua funzione di trascrittasi inversa, la telomerasi gioca un ruolo chiave nella promozione della carcinogenesi [32-34].



*Figura 3: Risposta cellulare all'attività telomerasica.*

## METODI ANALITICI PER LA VALUTAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

La lunghezza dei telomeri può essere analizzata utilizzando diverse metodiche:

1. Analisi di Southern blotting dei frammenti di restrizione terminali dei cromosomi (TRF) che misura la lunghezza media e la distribuzione non solo delle lunghezze telomeriche canoniche (ripetizioni TTAGGG), ma anche delle regioni non canoniche, che si trovano più vicine al sito di restrizione riconosciuto dagli enzimi utilizzati, per frammentare il DNA prima dell'analisi in Southern blotting;
2. Ibridazione quantitativa in situ a fluorescenza (qFISH) o a flusso analizzano solo le componenti canoniche dei telomeri. Il metodo FISH quantifica il segnale di fluorescenza dei telomeri utilizzando come controllo cellule di nota

lunghezza telomerica e fornisce informazioni sulla distribuzione del contenuto del DNA telomerico nella popolazione cellulare considerata;

3. Real-Time PCR: è il metodo più economico e versatile. Analizza solo le componenti canoniche dei telomeri e normalizza la quantità di prodotto telomerico con una singola copia di un gene preso come riferimento [35].

## **METODI ANALITICI PER LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA**

Il metodo che normalmente viene utilizzato per determinare l'attività telomerica è il Telomeric Repeat Amplification Protocol assay (TRAP).

Il TRAP assay consiste nell'aggiungere ripetizioni TTAGGG da parte della telomerasi e nell'amplificazione mediante PCR dei prodotti di estensione. Questa metodica è caratterizzata da una bassa sensibilità ed essendo un'analisi qualitativa, come altri metodi di PCR end-point, non permette un'accurata misurazione dell'attività telomerica poiché i prodotti di amplificazione possono essere analizzati solo alla fine della reazione. L'uso del TRAP assay necessita di un'ulteriore analisi dei prodotti post-PCR mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide o Kit ELISA. Questo rende la metodica molto dispendiosa sia dal punto di vista economico che lavorativo e soggetta a contaminazioni che facilmente portano a sovrastimare l'attività enzimatica.

L'RTQ-TRAP assay (Real Time Quantitative Telomerase Repeat Protocol), combina una Real Time PCR con il metodo TRAP convenzionale e permette di misurare l'attività telomerica in modo rapido, preciso e riproducibile poiché la quantità dei frammenti di DNA a doppia elica, formati partendo da estratti proteici, è proporzionale all'attività telomerica presente nel campione iniziale.

Questametodica è stata messa a punto per migliorare e superare i limiti della PCR convenzionale. I coloranti usati hanno la capacità di legarsi agli ampliconi a doppio filamento e mediante l'emissione di un segnale fluorescente permettono di monitorare la PCR ad ogni ciclo e di analizzare i dati in tempo reale. L'analisi risulta più semplice, veloce ed efficiente in modo da poter testare molti campioni contemporaneamente [36].

## **REGOLAZIONE DI TERT**

L'attività della telomerasi è altamente regolata dall'espressione del gene che codifica per la subunità TERT. Nell'uomo TERT è espressa durante la fase di sviluppo, ma poi ad eccezione delle cellule progenitrici e dei tessuti che si rinnovano, è assente nelle cellule somatiche normali.

La telomerasi può essere regolata a diversi livelli, localizzazione sub-cellulare, modificazioni epigenetiche, attivazione o repressione trascrizionale da parte di diversi fattori di trascrizione, ormoni, splicing alternativo dell'mRNA o modificazioni post-trascrizionali. La regolazione di TERT sembra giocare un ruolo fondamentale nella capacità funzionale della proteina.

### ➤ **Metilazione del promotore di *TERT***

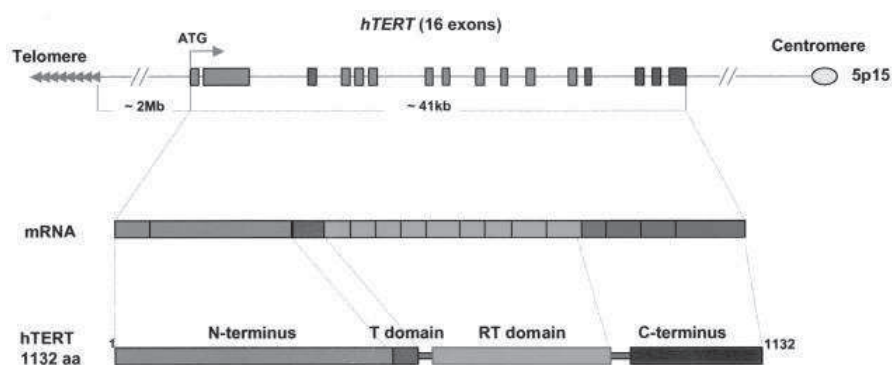
Il gene che codifica per TERT nell'uomo è localizzato sul cromosoma 5 (5p15.33), consiste di 16 esoni e di 15 introni, è lungo ~40 Kb e dista 2 Mb dalle sequenze telomeriche. *Fig.4*. Il gene è soggetto a diversi splicing alternativi in seguito alla trascrizione, ma l'attività della telomerasi è associata solo al trascritto relativo all'intera lunghezza del gene. La regolazione trascrizionale e post-trascrizionale di TERT sono tra i maggiori meccanismi di controllo dell'attività

della telomerasi. Nella regione 5' del gene *TERT* sono state identificate ~4 Kb contenenti isole CpG, da -1800 bp a +2200 dal sito di inizio della trascrizione (ATG), con più del 70% di basi GC [37].

La metilazione del DNA è un fenomeno epigenetico che modula l'espressione dei geni senza interferire con le sequenze nucleotidiche. Tale meccanismo consiste nella modificazione chimica dei residui delle citosine, mediante l'aggiunta di un gruppo metile, solo quando sono localizzati in 5' rispetto ad un residuo di guanina (siti CpG). Le isole CpG sono sequenze poco rappresentate nel genoma umano e possono essere raggruppate in clusters di circa 0.5-5 Kb dove la frequenza di nucleotidi CpG eguaglia o supera la distribuzione casuale matematicamente prevedibile. Le regioni CpG si trovano principalmente in prossimità del promotore di circa 40-50% dei geni umani, tra cui geni housekeeping e geni tessuto-specifici e si sono molto ben conservate durante l'evoluzione. La metilazione dei siti CpG nel genoma umano è effettuata da diverse DNA metiltransferasi (DNMT) che hanno un importante ruolo nel silenziamento di elementi trasponibili, nella difesa dall'integrazione virale e nella repressione trascrizionale di diversi geni. In gran parte dei geni dei tessuti normali la trascrizione non è regolata dalla metilazione dell'isola CpG localizzata nel promotore. In alcuni casi, tuttavia, le isole CpG sono metilate e associate ad una conformazione della cromatina altamente condensata contribuendo così all'inattivazione di geni e alla carcinogenesi. Infatti, le 5-metilcitosine sono altamente mutagene causando transizioni tra le basi del DNA da C:G ad T:A. E' noto infatti, che l'ipermetilazione delle isole CpG del promotore (nota anche come metilazione *ex novo*) agisce come meccanismo alternativo o complementare alla mutazione di un gene e porti a una mancata attività trascrizionale dovuta ad un'azione diretta dell'inattivazione del gene o indirettamente all'azione di fattori di trascrizione ed è per questo motivo un importante meccanismo coinvolto nel processo carcinogenetico. [38].

L'ipermetilazione di un'isola CpG è stabile e persiste nel tumore man mano che questo si sviluppa. Infatti i profili di metilazione sono considerati un utile indicatore dello stato trascrizionale dei geni in differenti tipi di tumore anche se l'esatto meccanismo dell'ipermetilazione aberrante non è ancora del tutto noto.

Studi effettuati sulla transfezione transiente di un reporter associato al promotore di *TERT* e alla luciferasi rivelano che il promotore è inattivo nelle cellule somatiche mentre è attivato nelle cellule neoplastiche, un pattern di espressione che rispecchia l'attività della telomerasi [39]. Queste osservazioni suggeriscono che il promotore di *TERT* è uno dei maggiori target per la regolazione dell'enzima [40]. Il promotore di *TERT* è stato largamente studiato e si estende 330 bp sopra il sito di inizio di trascrizione e 37 bp dopo il secondo esone [40]. L'analisi della sua sequenza ha mostrato che non contiene TATA o CAAT boxes, ma è ricco di isole CpG attorno all'ATG [41]. Inoltre il promotore di *TERT* contiene diversi siti di legame per fattori di trascrizione tra i quali vi sono c-Myc, la proteina E16 del papilloma virus e gli ormoni steroidei, suggerendo che l'espressione di TERT è soggetta a diversi livelli di controllo e può essere regolata da diversi fattori in differenti contesti cellulari [37].



**Figura 4:** Organizzazione del gene *TERT* [37].

### ➤ **Metodi analitici per lo studio della metilazione**

Le metodiche capaci di rivelare la metilazione sono estremamente sofisticate:

- enzimi di restrizione sensibili ad un particolare sito CpG metilato e valutazione dello stato di metilazione mediante Southern Blotting;
- enzimi di restrizione sensibili ad un particolare sito CpG metilato di DNA genomico derivante da campioni tumorali e normali seguito da procedure dirette a scoprire le regioni soggette a metilazione aberrante come PCR con primer arbitrari (AP-PCR), amplificazione delle isole CpG metilate (MCA), Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS) e la Differential Methylation Hybridization (DMH). Da ciascuna tecnica deriva un elenco di sequenze candidate dette Methylation Sequences Tags (MeST) che sono metilate diversamente nei due campioni di DNA esaminati;
- trattamento del DNA con bisolfito di sodio il quale converte le citosine non metilate in uracile, mentre quelle metilate rimangono intatte. Quindi la conversione crea una nuova sequenza. A questo punto si possono applicare diverse metodiche per ricercare le variazioni dovute alla metilazione: sequenziamento per determinare il pattern di metilazione, Methylation sensitive Single nucleotide Primer Extension (Ms-SnuPE) per l'analisi quantitativa, Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) che unisce l'uso di enzimi di restrizione e la metodica di PCR per amplificare i bersagli;
- microarray con array di oligonucleotidi sensibili alla metilazione che incrementano il numero di CpG che possono essere esaminate contemporaneamente;
- PCR metilazione specifica (MSP) dove l'amplificazione basata sulla PCR consente un'elevata sensibilità e la rivelazione in tempo reale mediante l'uso di sonde fluorescenti che rendono quantitativo il dosaggio [42].

### ➤ Localizzazione cellulare di TERT

Il ruolo della telomerasi nell'immortalizzazione cellulare e la sua attivazione in seguito ad accorciamento telomerico è ormai ben noto. Per molto tempo TERT è stata considerata una proteina nucleare, tuttavia studi recenti l'hanno localizzata non solo nel nucleo ma anche a livello mitocondriale dove sembra svolgere una potenziale funzione extratelomerica. In condizioni fisiologiche la telomerasi è presente principalmente nel nucleo, ma ~10-20% del contenuto cellulare di TERT è stato localizzato a livello dei mitocondri sia in cellule normali che tumorali. Tuttavia, in condizioni di forte stress ossidativo, TERT si accumula nei mitocondri fino a ~80% del contenuto totale della proteina. E' stato dimostrato che la subunità TERT della telomerasi presenta un target mitocondriale nella sua porzione N-terminale e viene importata a livello mitocondriale probabilmente dopo essersi legata a un complesso di traslocasi della membrana esterna ed interna dei mitocondri. Inoltre TERT sembra legare diverse regioni del mtDNA. I mitocondri sono organelli importanti per la respirazione cellulare, quindi i maggiori produttori endogeni di ROS nonché i principali target di danno indotto da stress ossidativo [43]. Quindi la disfunzione mitocondriale e lo stress ossidativo giocano un ruolo importante anche nella senescenza cellulare [44].

La disomogenea distribuzione intracellulare di proteine con diverse funzioni non è un fenomeno nuovo, ed è stato definito '*distribuzione eclissata*'. Tale distribuzione non uniforme può ostacolare il rilevamento della iso-forma meno abbondante poiché viene mascherata l'iso-proteina dominante nell'altro compartimento subcellulare. Questo fenomeno potrebbe spiegare perché la localizzazione mitocondriale di TERT non è stata descritta precedentemente [45]. Le ragioni dell'accumulo mitocondriale di TERT non sono ancora del tutto chiare. In condizioni di stress ossidativo non è ancora noto quale sia la funzione

biologica di TERT in questi organelli ossia se a livello mitocondriale rimane associata all'RNA nucleare o se in questa sede riveste un ruolo differente dall'attività di trascrittasi inversa e se è presente nei mitocondri a livelli fisiologici o se la sua differente distribuzione sub-cellulare viene conservata nelle diverse specie di mammiferi. La distribuzione intracellulare di TERT dipende da differenti stimoli in cui sono coinvolte diverse proteine nella migrazione tra nucleo e citoplasma. In condizioni di stress ossidativo la distribuzione di TERT è regolata da modificazioni post-trascrizionali. Infatti è stato dimostrato che la chinasi Src controlla l'uscita di TERT dal nucleo e che la defosforilazione di TERT da parte della fosfatasi Sph-2 è in grado di invertire questo processo. Recenti studi riportano che la migrazione di TERT dal nucleo al mitocondrio in seguito a stress ossidativo porti a un miglioramento della funzione mitocondriale quali la protezione del mtDNA, la riduzione del potenziale di membrana e a una riduzione dell'apoptosi [46]. Tuttavia, la dimostrazione che TERT sia in grado di avere una funzione nella replicazione del mtDNA o nella sua riparazione *in vivo* deve ancora essere fornita. Il mtDNA umano è una molecola circolare a doppio filamento con una sequenza di 16.569 bp che codifica per 2 rRNA, 22 tRNA e 13 poliproteine coinvolte nella catena di trasporto degli elettroni e nella produzione di ATP. Rispetto al DNA genomico, mtDNA non presenta istoni ed è estremamente sensibile ad errori durante la fase di replicazione a causa di inefficienti meccanismi di riparazione. Numerose patologie umane sono legate a disfunzioni mitocondriali a causa delle alterazioni della struttura o della funzione di questi organelli [47].

Il ruolo anti-apoptotico di TERT invece è indipendente dall'attività della telomerasi. L'aumento di ROS a livello intracellulare porta ad una acidificazione del citosol con conseguente attivazione della via mitocondriale di apoptosi mediata dalla via di segnale di Bax che scatena la cascata di eventi che porta

alla morte cellulare programmata. L'espressione di TERT a livello mitocondriale riduce i livelli di ROS proteggendo dall'apoptosi. Gli effetti protettivi derivano dall'interazione di TERT con il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TERT inoltre regola le difese antiossidanti interagendo con il fattore nucleare-kB (NF-kB) un fattore di trascrizione chiave che modula la risposta allo stato redox cellulare. TERT sembra aumentare l'espressione di NF-kB di circa 6 volte mediante l'interazione con il promotore del gene che codifica per NF-kB [46].

Il ruolo di TERT nella biologia mitocondriale e la sua iperespressione nella stragrande maggioranza dei tumori fanno ipotizzare una doppia funzione della telomerasi nell'invecchiamento cellulare e nella carcinogenesi infatti la sua localizzazione sub-cellulare è dipendente dal ciclo cellulare, dal danno genomico e dalla trasformazione cellulare. La localizzazione mitocondriale di TERT potrebbe compromettere la protezione telomerica. Tuttavia il significato biologico della localizzazione sub-cellulare di TERT e la sua funzione mitocondriale nel cancro non sono ancora chiari e sono campi ancora aperti alla ricerca. La localizzazione e la funzione mitocondriale di TERT porta complessità allo già complicato scenario cellulare [48, 49].

## **DANNO OSSIDATIVO E FEGATO**

I ROS sono importanti mediatori nella fisiologia e fisiopatologia degli epatociti. Quando l'equilibrio tra la produzione dei ROS e le difese antiossidanti viene alterato si arriva a una condizione di stress ossidativo, che, come già ricordato precedentemente, è uno dei maggiori eventi patogenetici presente in diverse patologie epatiche da quelle metaboliche ai disordini della proliferazione dove la maggior fonte di ROS è rappresentata dai mitocondri, dagli enzimi del citocromo P450 negli epatociti, dalle cellule di Kupffer e dai neutrofili. Nel fegato i ROS sono

prodotti principalmente da neutrofili, mitocondri, cellule di Kupffer e citocromo P450. I ROS nella cellula si comportano come secondi messaggeri di importanti vie di segnale quali citochine, ormoni, fattori di crescita e di altri mediatori solubili quali ad esempio l'ATP extracellulare. Attraverso l'attivazione di chinasi e fosfatasi, i ROS intracellulari possono controllare direttamente o indirettamente alcuni fattori di trascrizione come l'NF- $\kappa$ B portando a profondi cambiamenti nel profilo di espressione genica della cellula. Inoltre l'effetto dei ROS è potenziato dall'attivazione di citochine e fattori di crescita che a loro volta sono responsabili della produzione di ROS. A seconda della durata e dell'intensità dello stress ossidativo i ROS possono agire come molecole pro-apoptotiche o stimolare la proliferazione cellulare [41].

Le malattie epatiche si dividono in acute e croniche sulla base della persistenza del danno al fegato. Le malattie epatiche acute sono caratterizzate da una rapida risoluzione del danno e da una completa restituzione della normale architettura e funzione tissutale in seguito ad eliminazione del danno, mentre quelle croniche sono caratterizzate da un persistente danno con progressiva alterazione della funzione dell'organo causata da un aumentato danno cellulare. Le cause più comuni di danno del fegato alla base delle malattie epatiche croniche sono le infezioni virali, in particolari quelle da virus C e B, l'abuso di alcole le alterazioni del metabolismo lipidico e di carboidrati conosciute anche come malattie epatiche non alcoliche (NAFLD). Le patologie epatiche croniche comportano un maggior rischio di sviluppo dell'epatocarcinoma e nonostante le diverse eziologie e la differente storia naturale queste patologie sono accomunate da elevati livelli di ROS. Durante un danno epatico acuto o cronico, gli epatociti sono esposti ad elevati livelli di ossidanti, citochine e nonostante le fonti di antiossidanti, gli epatociti in seguito a danno da stress ossidativo vanno incontro alla morte

cellulare, tuttavia è ancora argomento di discussione quale sia il tipo di morte cellulare se per necrosi o apoptosi e quale sia la via di segnale coinvolta.

Nel fegato le cellule infiammatorie, i colangiociti e le cellule di Kupffer sono la maggior fonte di TNF- $\alpha$  e insieme ad altre citochine pro-infiammatorie contribuiscono alla disfunzione mitocondriale. I mitocondri giocano un ruolo cruciale nel controllo della morte cellulare in particolare negli epatociti. L'attivazione dei recettori di morte induce l'amplificazione delle vie di segnale apoptotiche includendo la caspasi 8 e le proteine di membrana mitocondriale che riduce il flusso di elettroni della catena di trasporto, aumentando la produzione di ROS e il danno diretto ai mitocondri tramite l'ossidazione di diverse biomolecole mitocondriali e l'aumento della perossidazione lipidica [50].

## **CARCINOGENESI EPATICA**

### **➤ Epidemiologia**

L'HCC è il più comune tipo di tumore epatico maligno primitivo (rappresenta circa l'85% dei cancri epatici) inoltre è il quinto tipo di cancro più frequente al mondo e la terza causa mondiale di morte [51, 52]. La prevalenza di HCC è più alta nei Paesi in via di sviluppo come Africa Sud sahariana, Cina, Taiwan, Corea e Vietnam, tuttavia nel mondo occidentale e nei Paesi del Mediterraneo, inclusa l'Italia, negli ultimi 20-30 anni l'incidenza e la mortalità stanno aumentando rapidamente [15, 53] e sono in linea con quella degli altri Paesi, rappresentando la settima causa di morte per cancro con circa 5000 morti/anno [54, 55]. I dati epidemiologici riportano una maggiore frequenza dell'HCC nella popolazione maschile rispetto a quella femminile con un rapporto 2-4: 1 [56]. La crescente incidenza di HCC nella popolazione mondiale, circa 600.000 deceduti/anno [57],

ha accresciuto l'interesse verso la ricerca dei complessi meccanismi fisiologici, cellulari e molecolari della malattia.

### ➤ **Eziologia**

L'HCC insorge in seguito a un graduale accumulo di cambiamenti genetici negli epatociti che portano alla trasformazione neoplastica delle cellule e allo sviluppo del tumore, caratterizzato da singole lesioni o più frequentemente da noduli multipli [56, 58]. Nel 70-90% dei casi l'HCC insorge in seguito a malattie infiammatorie croniche che determinano fibrosi o cirrosi, lo stadio più avanzato di fibrosi in cui si ha completa distruzione del parenchima epatico, formazione di noduli o setti con alterazione del normale flusso ematico e per questo uno dei più importanti fattori di rischio per lo sviluppo del tumore epatico[59, 60]. L'HCC è un tumore eterogeneo causato da diversi fattori di rischio [61]:

1. virus delle epatite B e C inducono HCC in modo indiretto, attraverso l'induzione dell'infiammazione cronica o in modo diretto, come nel caso dell'HBV, attraverso mutazioni a causa dell'integrazione del genoma virale in quello degli epatociti;
2. cloruro di vinile, tabacco;
3. dieta (contaminazioni da aflatoossina B<sub>1</sub> delle derrate alimentari, assunzione di alcol);
4. la NAFLD e la steatoepatite non alcolica (NASH) che causano fibrosi e cirrosi portando allo sviluppo dell'HCC [62, 63];
5. diabete caratterizzato da insulino-resistenza che, associata ad aumento degli acidi grassi liberi nel fegato e ad accumulo di trigliceridi, porta a danno del parenchima epatico, apoptosi degli epatociti, richiamo di citochine, perossidazione lipidica con produzione di radicali liberi dell'ossigeno e infine sviluppo di fibrosi [56, 63];

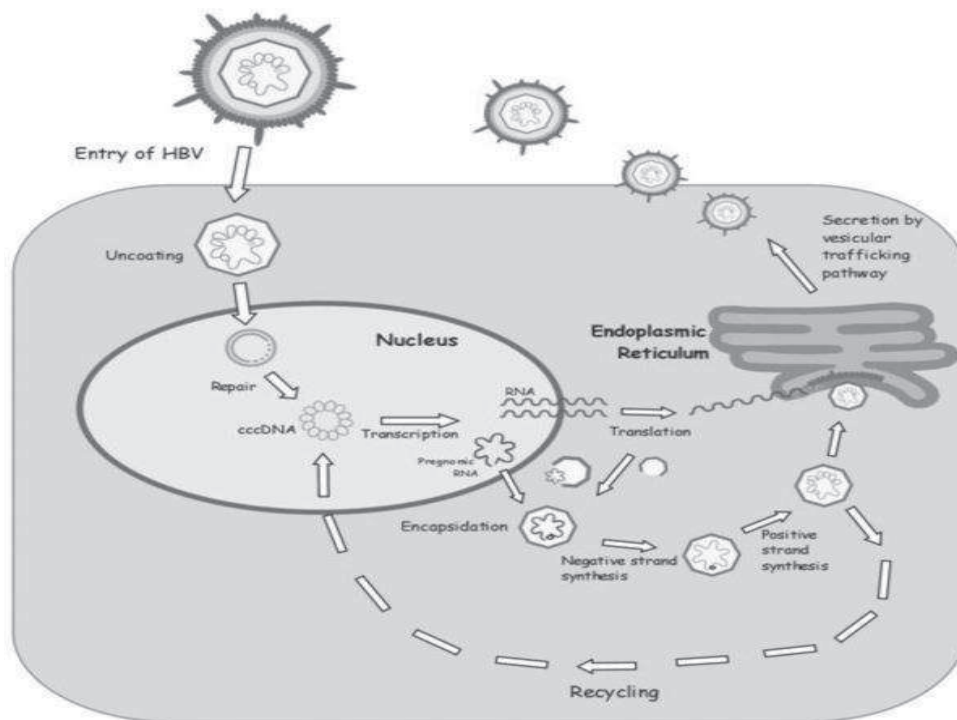
6. obesità;
7. uso per lunghi periodi di contraccettivi orali nelle donne [64];
8. disordini metabolici come l'emocromatosi ereditaria che è associata ad un aumentato assorbimento del ferro da parte degli epatociti e a danno del parenchima epatico [65, 66]; la porfiria cutanea tarda che è caratterizzata da un aumentato assorbimento di ferro nel fegato e in alcuni casi da un aumento dell'infiammazione, necrosi e fibrosi [67]; deficit da antitripsina  $\alpha_1$  che comporta un aumento dei livelli dei polimeri di antitripsina negli epatociti provocando la morte delle cellule epatiche e cirrosi [68]; tirosinemia ereditaria che comporta un difetto nel metabolismo della tirosina causando l'accumulo di metaboliti tossici nel fegato con potenziali proprietà mutagene [69];

Tuttavia nelle aree in cui vi è un'elevata incidenza di HCC, la maggior parte dei casi sono legati alle infezioni virali da HBV e HCV.

#### ➤ **Virus dell'epatite B**

Virus epatotropico a DNA appartenente alla famiglia degli *Hepadnaviridae*, il virus dell'epatite B è classificato come para-retrovirus in quanto la sua replicazione virale è legata alla retrotrascrizione dell'intero genoma a un intermedio di RNA. Diverse evidenze supportano il diretto coinvolgimento dell'HBV nel processo di trasformazione neoplastica che porta all'HCC, anche se i meccanismi molecolari rimangono ancora poco chiari. Il suo genoma codifica per diverse proteine virali essenziali per il suo ciclo vitale, includendo una *DNA* polimerasi trascrittasi inversa (pol), una proteina del capsido, nota come antigene core del virus B (HBcAg), e proteine dell'envelope L,M,S che sono associate alla membrana del reticolo endoplasmatico e fanno parte del sistema di replicazione virale. *Fig. 5.*

Inoltre l'HBV codifica per una serie di proteine la cui funzione non è ancora del tutto nota, come la proteina x (HBx) [70].



**Figura 5:** Ciclo di replicazione del virus dell'epatite B [72].

L'infezione con HBV causa HCC tramite meccanismi diretti ed indiretti.

HBV è capace di integrare il suo genoma in quello della cellula infettata conferendo un vantaggio selettivo alla crescita della cellula target e portando all'insorgenza del tumore. L'integrazione del genoma virale, infatti, avviene solitamente in prossimità di specifici geni del genoma dell'ospite coinvolti nel controllo della crescita e dei segnali cellulari come ad esempio TERT, PDGFR $\beta$  (recettore  $\beta$  per il fattore di crescita piastrinico), PDGF $\beta$  o MAPK1 (proteina chinasi 1 mitogeno attivata) inducendo instabilità cromosomica, riarrangiamenti o delezioni

Tuttavia sembra che la proteina HBx possa stimolare in modo diretto la cascata di chinasi intracellulare coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare e inibire il normale controllo della crescita degli epatociti infetti mediante l'attivazione di geni che promuovono la crescita. La proteina HBx mediante l'attivazione trascrizionale può alterare l'espressione di geni di controllo della crescita come tirosin-chinasi SRC, Ras, Raf, MAPK (ERK, JNK) e altri [71]. Inoltre HBx si lega a *p53*, interferendo probabilmente con la sua attività di inibizione della crescita, favorendo la proliferazione e la sopravvivenza cellulare e compromettendo i normali controlli del ciclo cellulare.

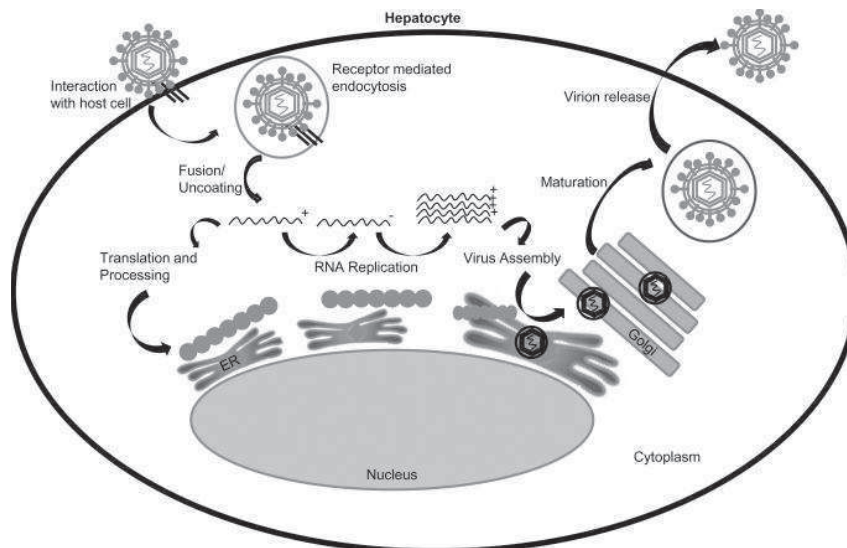
Inoltre HBV interagendo con il reticolo endoplasmatico degli epatociti causa stress ossidativo che induce vie di segnali di crescita e sopravvivenza portando alla carcinogenesi. HBx lega anche ad un canale anionico voltaggio dipendente alterando il potenziale della membrana mitocondriale e portando all'aumento della produzione di ROS. L'associazione di HBx con i mitocondri induce l'attivazione dei fattori trascrizionali STAT3 e NF- $\kappa$ B ostacolata da antiossidanti o dalla sovraespressione di MnSOD. Questi meccanismi permettono di ipotizzare che la proteina HBx partecipi allo sviluppo del carcinoma epatocellulare tramite l'induzione di stress ossidativo.

Infine anche l'interazione virus-ospite contribuisce alla carcinogenesi in diversi modi. Innanzitutto la risposta mediata dalle cellule T del sistema immunitario cerca di combattere l'infezione virale contribuendo allo stesso tempo a necrosi, infiammazione e rigenerazione degli epatociti. Tuttavia la continua replicazione degli epatociti determina instabilità genomica portando alla carcinogenesi. Dall'altra parte sembra che l'HBV possa indurre *HCC* mediante mutazioni che gli permettono di sfuggire alla risposta immunitaria dell'ospite permanendo nelle cellule epatiche che continuano ad essere danneggiate dalla presenza del virus e portano alla progressione del danno epatico. Quindi il danno continuo agli

epatociti e la rigenerazione del fegato portano cirrosi, aumento del turnover degli epatociti e mutazioni nel genoma dell'ospite. Questi meccanismi possono indurre alterazioni genetiche come riarrangiamenti cromosomici, attivazione di oncogeni e inattivazione di oncosoppressori [72].

### ➤ Virus dell'epatite C

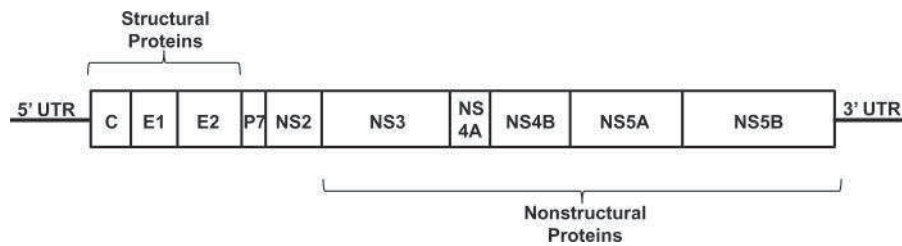
Il virus dell'epatite, un membro della famiglia dei *Flaviviridae*, è un virus a RNA positivo il cui genoma è di circa 9.6 Kb. Il genoma di HCV non è in grado di integrarsi con quello della cellula ospite, ma utilizza il reticolo endoplasmatico di quest'ultima come primo sito per la replicazione genomica e l'assemblaggio del virione. *Fig. 6.*



**Figura 6:** Ciclo di replicazione del virus dell'epatite C [72].

Una volta entrato nel reticolo endoplasmatico dell'epatocita, il genoma virale viene tradotto in una poliproteina e, dopo essere stato tagliato da proteasi virali e cellulari, genera 10 proteine virali mature che includono la proteina Core che

forma il capsid e ha capacità regolatrice sulla trascrizione che sulla crescita cellulare, le proteine non strutturali (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), la polimerasi virale e le proteine E1 e E2 dell'envelope. *Fig. 7.*



**Figura 7:** Organizzazione del genoma del virus dell'epatite C [72].

L'infezione da HCV è la più importante causa di epatite cronica che porta ad una progressiva fibrosi, cirrosi e allo sviluppo dell'HCC nel mondo occidentale. Circa 350 milioni di persone nel mondo presentano un'infezione cronica da virus C di cui l'80% sviluppa patologie epatiche croniche: 10-20% presenta cirrosi e di questi l'1-5% sviluppa carcinoma epatocellulare [73].

L'infezione da HCV differisce da quella da HBV per 3 importanti fattori clinico-biologici:

1. non si integra nel genoma dell'ospite in quanto è un virus a RNA ;
2. si presenta più frequentemente come epatite cronica (60-80% dei casi vs 10% di quelli con HBV) a causa probabilmente della capacità del virus di generare delle quasi-specie in seguito a errori durante la replicazione virale che gli permettono di sfuggire in modo più efficace alla risposta immunitaria dell'ospite;
3. dopo 10 anni dall'infezione il 5-10% dei pazienti affetti da HCV sviluppa cirrosi con una frequenza di 10-20 volte più alta rispetto a quella da virus B.

HCV causa HCC tramite meccanismi indiretti attraverso l'infiammazione cronica, la morte cellulare, accompagnata da proliferazione, e cirrosi.

La proteina Core lega gli oncosoppressori *p53*, *p73* e *pRb*, modulando i segnali che controllano il ciclo cellulare, la sopravvivenza, la risposta genotossica e ipossica allo stress, tuttavia le conseguenze di queste interazioni devono ancora essere delucidate. Recentemente è stato dimostrato che la proteina Core interagisce direttamente con vie di segnale appartenenti alla famiglia delle MAPK (ERK, MEK e Raf) modulando la proliferazione cellulare e contribuendo alla trasformazione neoplastica delle cellule infette [72].

Infine, analogamente a quello che succede in seguito ad infezione da HBV, i meccanismi di interazione patogenetica del virus C con la risposta immunitaria dell'ospite, che portano allo sviluppo dell'HCC, sono numerosi, estremamente complessi e non ancora del tutto noti, tuttavia sembra che:

1. continui cicli di morte degli epatociti infettati, in seguito all'azione delle cellule della risposta immunitaria, e di conseguente rigenerazione portano ad accumulo delle mutazioni;
2. l'RNA e la proteina Core di HCV inibiscono le funzioni delle cellule dendritiche che sono importanti attivatori delle cellule T della risposta immunitaria indebolendo la risposta immunologica dell'ospite;
3. la proteina Core e la proteina non strutturale NS5A riescono ad evadere la risposta dell'ospite uccidendo le cellule del sistema immunitario dell'ospite mediante l'interazione con TNF- $\alpha$  o il recettore per l'interferone-  $\alpha$  (INF- $\alpha$ );
4. le proteine virali NS3 e NS4A, funzionando da proteasi, attivano componenti che trasmettono segnali per la risposta immunitaria.

I meccanismi molecolari della patogenesi causata da HCV non sono ancora del tutto noti, tuttavia lo stress ossidativo, attraverso la sovrapproduzione di ROS, sembra rappresentare una caratteristica peculiare del danno epatico in seguito ad infezione da epatite C ed avere un ruolo chiave nell'iniziazione e nella progressione degli eventi di carcinogenesi [74]. Esiste una stretta correlazione tra

infezione da HCV e stress ossidativo. L'aumentato stress ossidativo nell'epatite C può essere spiegato dall'infiammazione cronica e dalla persistente produzione di ROS. Infatti dati in letteratura dimostrano che i pazienti con epatite cronica da HCV sono caratterizzati da aumentati markers di stress ossidativo sia a livello epatico che ematico (8-OHdG) [12]. Il danno epatico indotto da stress ossidativo include diversi meccanismi. Innanzitutto, come descritto in precedenza, l'HCV si lega alla membrana del reticolo endoplasmatico durante le fasi di replicazione virale e durante questo processo causa stress del reticolo, disregolazione dell'omeostasi del calcio e produzione di ROS da parte dei mitocondri portando all'induzione dell'apoptosi. Le proteine strutturali e non strutturali di HCV, come Core e NS3, giocano un ruolo importante nella trasformazione cellulare [15]. L'espressione della proteina Core di HCV nelle linee cellulari di epatoma induce la produzione di ROS e la riduzione del contenuto intracellulare e mitocondriale di GSH. Il GSH è un importante antiossidante e riducente endogeno e il fegato ne è il principale trasportatore che rifornisce tutti gli altri tessuti. L'HCV, danneggiando il fegato, potrebbe promuovere lo stress ossidativo sistemico bloccando l'esportazione di GSH. Inoltre la proteina Core sembra aumentare l'ingresso del calcio mitocondriale, portando all'accumulo dello ione e alla disfunzione mitocondriale. Lo stress ossidativo potrebbe essere spiegato anche dall'infiammazione cronica: la continua produzione di ROS potrebbe essere dovuta ad una aumentata attività della NAD(P)H ossidasi (Nox2) da parte delle cellule di Kupffer e dei polimorfonucleati nel fegato. La proteina NS3 del virus sembra attivare Nox2, una proteina localizzata sulle membrane plasmatiche e del fagolisosoma, portando all'aumento dei ROS e allo stress ossidativo delle cellule vicine. Questo meccanismo scatena l'apoptosi e induce la disfunzione delle cellule della risposta immunitaria [75].

Non è chiaro se lo stress ossidativo sia la causa o la conseguenza del danno epatico, ma è stato dimostrato che lo stress ossidativo può attivare direttamente le cellule di Kupffer rilasciando citochine proinfiammatorie e profibrogeniche [15]. Altro fattore patogenetico nell'epatite cronica da HCV è l'associazione tra danno al DNA degli epatociti e accumulo di ferro. Alti livelli di ferro epatico libero promuovono la produzione di ROS tramite la reazione di Fenton dove reagiscono con il perossido di idrogeno per generare il radicale idrossile il quale porta al danno genomico e alla formazione dell'addotto 8-OHdG. Ne segue una progressiva infiammazione, la perossidazione lipidica e il danno delle membrane con peggioramento del danno epatico e insorgenza del cancro [76].

#### ➤ **Meccanismi molecolari dell'HCC**

I meccanismi attraverso i quali i virus delle epatiti danneggiano le cellule epatiche non sono ancora chiari e numerosi sono gli studi in questa direzione. Tuttavia come argomentato in precedenza, lo stress ossidativo sembra essere uno dei più importanti fattori implicati nella patogenesi [77].

La correlazione tra danno ossidativo al DNA degli epatociti e infiammazione epatica, potrebbe evidenziare il coinvolgimento diretto dello stress ossidativo epatico nella patogenesi e nella progressione del danno epatico in seguito ad infezioni da epatiti virali croniche. Tuttavia resta ancora da chiarire se lo stress ossidativo e la produzione di ROS siano la causa o la conseguenza del danno epatico ossia se dipendono dalla risposta infiammatoria scatenata dalla presenza del virus o se è il virus stesso un potenziale induttore di stress ossidativo e di ROS. È stata dimostrata la presenza di stress ossidativo in assenza di infiammazione in un modello di topo con epatocarcinogenesi associata ad

infezione da HCV mostrando il virus di per se è in grado di indurre stress ossidativo [78].

L'epatocarcinogenesi è un processo multistep che coinvolge mutazioni di geni che controllano la proliferazione e l'apoptosi degli epatociti soggetti a stimoli continui di infiammazione e rigenerazione che portano alla progressione del danno dall'epatite cronica alla cirrosi. I meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo dell'HCC sono davvero complessi e rimangono da chiarire. Nell'epatocarcinogenesi sono coinvolte diverse vie di regolazione della proliferazione e della morte cellulare [61].

In particolare lo stress ossidativo sembra giocare un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione dell'HCC. Come abbiamo già discusso precedentemente, bassi livelli di ROS sono indispensabili nei processi cellulari fisiologici quali ad esempio la proliferazione, l'apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare e la senescenza, ma aumentati livelli di radicali liberi possono causare stress ossidativo e danno tossico alle cellule che in condizioni fisiologiche normali riescono a bilanciare tra la sovra-produzione di ROS grazie all'azione di enzimi con meccanismi di difesa antiossidante. Quando la produzione dei radicali liberi sovrasta i meccanismi di difesa cellulare si crea una situazione di squilibrio che amplifica la produzione di ROS in risposta al danno cellulare. Questa situazione di stress è nota giocare un ruolo chiave nello sviluppo del cancro, in primo luogo danneggiando il DNA genomico cellulare e poi modificando alcuni processi cellulari quali l'apoptosi e la proliferazione cellulare. Elevati livelli di ROS sono associati ad un aumento di espressione dell'MnSOD mitocondriale. Alti livelli sierici di MnSOD sono stati ritrovati in pazienti con HCC e con epatite cronica o cirrosi a conferma del ruolo dello stress ossidativo già nelle fasi precancerose della malattia come ad esempio le epatiti HBV o HCV correlate.

Lo stress del reticolo endoplasmatico è un meccanismo di omeostasi che regola il metabolismo cellulare e la sintesi delle proteine in risposta a un insulto. Moderati livelli di stress modulano la sintesi delle proteine e causano una riduzione della crescita cellulare, mentre condizioni di stress più prolungate portano all'apoptosi mediata dall'attivazione delle caspasi associate al reticolo endoplasmatico. Questi cambiamenti del metabolismo cellulare causano l'attivazione della cascata delle MAPK che compromette la regolazione della crescita cellulare e i processi di trasformazione.

Lo stress ossidativo può anche attivare le cellule stellate che, in risposta a varie citochine, chemochine e fattori di crescita, sono coinvolte nella produzione di matrice extracellulare e sono necessarie per una normale crescita e differenziazione delle cellule in seguito a un danno epatico [79].

L'attivazione cronica delle cellule stellate in seguito a stress ossidativo indotto dalla replicazione virale, può contribuire alla fibrogenesi e all'aumentata proliferazione degli epatociti infetti da HBV o HCV e attivando le MAPK indurre HCC.

L'HCC è associato a diverse lesioni morfologiche. L'ultimo stadio è descritto come lesione preneoplastica (mono o multi acinari), dove i noduli, a loro volta suddivisi in noduli displastici di basso e alto grado, e il grado di differenziamento (HCC bene, moderatamente e poco differenziato), secondo un ordine crescente dal punto di vista istologico, rappresentano i vari step dell'epatocarcinogenesi. L'accumulo di alterazione genetiche nelle lesioni preneoplastiche porta allo sviluppo dell'HCC. Queste alterazioni genomiche avvengono in modo casuale e possono essere indipendenti o specifiche dell'eziologia [51]. Tra i cambiamenti a livello genetico che avvengono durante lo sviluppo dell'HCC vi è la regolazione del pattern di metilazione di diversi geni. Uno squilibrio dello stato di metilazione del DNA è stato osservato frequentemente sia nei primi stadi della carcinogenesi

sia durante la fase di progressione del tumore. In particolare è stata individuata una locale ipermetilazione di alcuni geni normalmente ipometilati associata a un'augmentata espressione della DNMT. Specifici eventi di ipermetilazione, silenziando l'espressione di geni target, sembrano avere un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione della carcinogenesi [80].

Oltre a ciò, la riattivazione della telomerasi è stato suggerito come meccanismo per promuovere la progressione dell'epatocarcinogenesi. Infatti vi è una robusta attivazione dell'enzima in circa il 90% degli HCC correlata ad un aumento dei livelli dell'mRNA di TERT. Inoltre è stato dimostrato che il genoma virale dell'HBV si può integrare vicino al locus genico che codifica per TERT e che in molti HCC vi è una perdita allelica del braccio corto del cromosoma 10, in una regione che codifica per un repressore della telomerasi. L'accorciamento telomerico determina instabilità genomica che porta allo sviluppo dell'HCC. Per di più negli HCC sono stati trovati telomeri significativamente più corti rispetto a quelli riscontrati in fegati sani. L'accorciamento telomerico porta ad instabilità genomica e a promozione delle lesioni tumorali, mentre la riattivazione della telomerasi sembra essere un evento necessario per la progressione del tumore e per ripristinare la stabilità cromosomica necessaria alle cellule tumorali. Quindi l'HCC risulta da drammatici cambiamenti a livello dell'espressione di geni e di proteine appartenenti a un network che controlla importanti eventi cellulari. Il danno epatico cronico, che sta alla base, progredisce da epatite cronica a cirrosi e a cancro, ed è sostenuto da meccanismi infiammatori, dallo stress ossidativo, associato ad alterazioni genetiche di geni coinvolti in meccanismi di riparazione e regolazione, e ad alterazioni dell'attività della telomerasi [81].



## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

L'HCC è un tumore ad elevata incidenza e mortalità che insorge generalmente come complicanza della cirrosi epatica, conseguente ad epatopatia cronica nella maggior parte dei casi ad eziologia virale. I virus delle epatiti B e C sono tra i principali fattori eziologici nella carcinogenesi epatica, ma i meccanismi attraverso i quali i virus danneggiano le cellule epatiche non sono ancora chiari e numerosi sono gli studi in questa direzione. Lo stress ossidativo sembra essere uno dei più importanti fattori implicati nella patogenesi, infatti esiste uno sbilanciamento tra danno ossidativo e difese antiossidanti dell'ospite sia a livello plasmatico che del tessuto epatico.

L'HCC risulta infatti da un processo multifasico, multifattoriale e multigenico, caratterizzato da drammatici cambiamenti nel pattern di espressione di geni e proteine facenti parte di un network che controlla eventi cellulari critici, alla base dei quali stanno il danno epatico cronico virus-correlato che progredisce da epatite cronica a cirrosi e a cancro, sostenuto da meccanismi della flogosi e dal danno ossidativo conseguente. La rapida progressione del tumore rende indispensabile la diagnosi precoce basata su sensibili e specifici markers molecolari non ancora utilizzati nella pratica clinica di routine.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare in tessuti epatici di pazienti con HCC e con epatite cronica virale, HCV e HBV correlata, i seguenti parametri:

- danno genomico ossidativo con quantificazione dell'addotto 8-OHdG, principale alterazione del DNA indotta dai radicali ossigeno, mediante analisi in HPLC-EC;
- polimorfismo del gene *OGG1* che codifica per una DNA-glicosilasi in grado di rimuovere specificamente l'8-OHdG, mediante analisi di PCR e RFLP;

- quantificazione della lunghezza dei telomeri, come indice di stabilità genomica, mediante Real Time PCR quantitativa assoluta;
- espressione dell'attività telomerasica, coinvolta nell'immortalizzazione cellulare, primo passo della carcinogenesi epatica, mediante Real Time PCR quantitativa assoluta;
- quantificazione dello stato di metilazione del promotore del gene che codifica per TERT, la subunità catalitica della telomerasi, come meccanismo di regolazione dell'attività telomerasica mediante MSP;
- localizzazione mitocondriale di TERT mediante western blotting;
- valutazione dell'attività telomerasica a livello mitocondriale, per verificare una possibile funzione di TERT a livello dei mitocondri, mediante Real Time PCR quantitativa assoluta.
- quantificazione del danno ossidativo mitocondriale con determinazione dell'addotto 8-OHdG mediante HPLC-EC;

## **PAZIENTI E METODI**

### **PAZIENTI**

I tessuti epatici tumorali (TU-HCC) e non tumorali (NTU-HCC) sono stati prelevati, in seguito a resezione chirurgica, da 21 pazienti a cui era stato diagnosticato un HCC confermato dall'esame istologico. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico senza precedenti trattamenti chemioterapici.

I tessuti tumorali e quelli non tumorali corrispondenti sono stati sezionati dopo la rimozione chirurgica (da un peso minimo di 20 mg ad un massimo di 50 mg), quindi congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso. I tessuti epatici peritumorali sono stati prelevati ad almeno 1 cm di distanza dal margine del tessuto tumorale.

Dei 21 pazienti con HCC, 16 erano positivi per gli anticorpi anti-HCV, mentre 5 mostravano positività ai markers per l'infezione da virus dell'epatite B. Nella tabella seguente sono riportati il sesso e l'età dei pazienti considerati.

<b>EZIOLOGIA VIRALE</b>	<b>SESSO</b>		<b>ETA' (MEDIA <math>\pm</math> SEM)</b>
16 HCV	10M (63%)	6F (37%)	65 $\pm$ 2.4 (range 47-78)
5 HBV	4M (80%)	1F (20%)	57 $\pm$ 8.7 (range 27-78)

**Tabella 1:** Caratteristiche dei 21 pazienti con HCC studiati.

Inoltre sono stati reclutati 80 pazienti con HCV e 41 pazienti con HBV con differente grado di malattia, ricoverati nel reparto di Gastroenterologia per essere sottoposti a una biopsia epatica. Prima della biopsia ogni paziente è stato

sottoposto al dosaggio degli anticorpi per HCV e HBV. Dalla ricerca sono stati esclusi i soggetti che assumevano alcolici, farmaci e/o vitamine che potessero interferire con l'equilibrio ossidativo.

EZIOLOGIA VIRALE	STADIO FIBROSI	N°(%)	SESSO		ETA' (MEDIA ± SEM)
80 HCV	0	9 (11%)	5M(56%)	4F(44%)	45±3.5 (range 30-63)
	1	7(9%)	2M(29%)	5F (71%)	48 ±2.8 (range 37-57)
	2	17(21%)	12M (71%)	5F (29%)	51±1.8(range 33-66)
	3	27 (34%)	16M (59%)	11F (41%)	51±2.4(range 35-65)
	4	20 (25%)	12M (60%)	8F (40%)	55±2.4(range 36-80)
41 HBV	0	6 (15%)	4M (67%)	2F (33%)	40 ±1.9 (range 34-43)
	1	7 (17%)	4M (57%)	3F (43%)	49±4(range 33-61)
	2	23 (56%)	18M (78%)	5F(22%)	47±2.5(range 31-68)
	3	4(10%)	3M(75%)	1F(25%)	47±2.9 (range 40-54)
	4	1(2%)	1M (100%)		47

**Tabella 2:**Caratteristiche dei pazienti con epatiti croniche HCV e HBV correlate.

I 15 pazienti con stadio 0 di fibrosi (9 con HCV e 6 con HBV) sono stati considerati come gruppo di controllo, in quanto portatori sani della malattia. Questi pazienti eranopositivi ai markers per l'infezione da HCV o HBV, ma

presentavano alterazioni istologiche minime, lieve infiltrato infiammatorio negli spazi portali e transaminasi nella norma.

La diagnosi di epatite virale HCV correlata è stata effettuata sulla base di un pannello di marcatori per HCV testato usando un kit ELISA di seconda generazione e tutti i sieri risultati positivi sono stati confermati con il RIBA II assay. La sieropositività agli anticorpi anti-HCV è stata confermata da livelli positivi di RNA di HCV usando il test Amplicor HCV (Amplicor PCR Diagnostic, Hoffman-La Roche, Basel Switzerland). Inoltre è stato utilizzato un test per la standardizzazione della genotipizzazione (Inno-Lipa HCV III, Innogenetics, Gent, Belgium). I genotipi di HCV sono stati classificati come genotipo 1, sottotipi 1a e 1b, genotipi 2, 3, 4 e i loro sottotipi. Tutti i seguenti studi sono stati effettuati prima di ogni trattamento.

I marcatori sierici per la ricerca dell'HBV sono stati dosati mediante radioimmunoassay (RIA) (Abbott, Chicago, IL, USA), mentre l'HBV-DNA è stato testato mediante l'utilizzo di un test di ibridazione a fase fluida disponibile commercialmente (Abbott, Chicago, IL, USA).

Tutti i pazienti arruolati erano afferenti al Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche (DiSCOG) dell'Università di Padova e, prima di entrare nello studio, hanno firmato il consenso informato. Lo studio è stato svolto seguendo le linee guida del Comitato Etico dell'Università di Padova.

### **Valutazione istologica dei tessuti epatici**

Le biopsie (una per ciascun paziente) sono state effettuate usando un ago Menghini modificato di calibro 16-17 gauge sotto guida ecografica ed anestesia locale con lidocaina. Sono stati ammessi allo studio solo i pazienti le cui biopsie erano adeguate (circa 1-2 cm di lunghezza con un peso di circa 10 mg) per

evitare di effettuare un'ulteriore biopsia. Un piccolo frammento di questa biopsia (~3-4 mg) è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'uso, mentre il tessuto rimanente è stato fissato in formaldeide al 10% e consegnato ai patologi per la valutazione istologica. Quindi il tessuto è stato immerso in paraffina, tagliato e colorato con ematossilina-eosina e Periodic acid-Schiff (PAS) per la valutazione istologica di routine. Il grado di attività delle epatiti croniche è stato valutato in cieco dal patologo che attribuisce un punteggio semi-quantitativo (0-3) per la presenza e l'estensione della steatosi e l'indice di Knodell, come modificato da Ishak e colleghi [82, 83], includendo sia il grading che lo staging.

## **METODI**

### **Estrazione di DNA genomico da biopsie epatiche e campioni chirurgici**

L'estrazione di DNA genomico dalle biopsie epatiche e dai campioni chirurgici è stata effettuata sulle porzioni di tessuto conservate a -80°C. Per l'estrazione del DNA è stato usato un kit commerciale (Promega, Milano, Italia) secondo il protocollo fornito (Animal tissue: mouse tail). Brevemente i tessuti epatici (circa 10 mg) sono stati sminuzzati ed omogenati con pestello in 600 µl di una soluzione contenente 120 µl 0.5 M EDTA pH 8, 500 µl di Nuclei Lysis Solution e 17.5 µl di Proteinasi K (20 mg/ml). Dopo un' incubazione overnight a 55°C, è stata eseguita una digestione con 3 µl di Rnase a 37°C per 30 minuti. Al termine, ai campioni, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 200 µl di Protein Precipitation Solution. Quindi i campioni sono stati agitati per 20 secondi e incubati in ghiaccio per 5 minuti. Dopo centrifugazione a 14.000 g per 4 minuti, è stato recuperato il surnatante contenente il DNA. Quindi sono stati

aggiunti 600 µl di isopropanolo agitando gentilmente fino alla comparsa del flocculo. I campioni sono stati centrifugati a 14.000 g per 1 minuto ed il pellet, contenente il DNA è stato lavato con etanolo al 70% conservato a temperatura ambiente. Quindi i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 14.000 g per 1 minuto, in modo da eliminare l'etanolo usato per il lavaggio, e si sono lasciati asciugare i pellet per 10-15 minuti. Infine il DNA estratto è stato risospeso in 210 µl di DNA Rehydration Solution ed è stato lasciato in incubazione overnight a 4°C. Quindi il giorno seguente, dopo determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA estratto, i campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

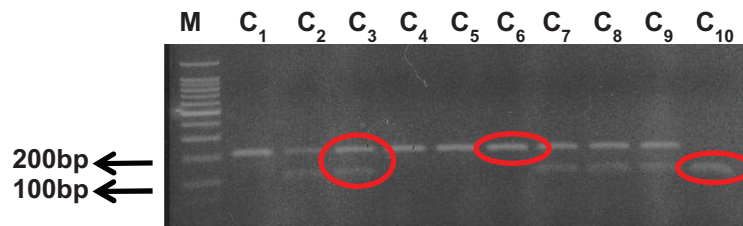
### **Determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA genomico estratto**

La concentrazione del DNA genomico estratto da ogni campione è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica. Per ogni campione sono state effettuate letture spettrofotometriche degli assorbimenti a 320, 280 e 260 nm. La contaminazione da parte delle proteine è stata valutata considerando il rapporto  $OD_{260}/OD_{280}$  ed i campioni con un rapporto inferiore a 1.7 sono stati riestratti. La concentrazione di DNA è stata calcolata utilizzando il valore di assorbanza a 260 nm e tenendo conto del fattore di diluizione mediante la seguente proporzione:

$$1 : 50 \mu\text{g/ml} = A \text{ campione } (\lambda 260) : x$$

## **PCR e Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): determinazione del polimorfismo del gene *OGG1***

La reazione di amplificazione è stata effettuata sui campioni di DNA genomico estratto dai tessuti epatici per individuare la transizione C:G in posizione 1245 del gene *OGG1*. La reazione di *PCR* è stata condotta in un volume finale di 25 µl contenente 100 ng DNA e la *PCR* Master Mix (Promega, Milano, Italia), composta da 50 unità/ml di Taq DNA polimerasi in tampone con pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM di MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl 1 µM primer senso e 2.5 µl 1 µM primer antisenso. I primers utilizzati sono stati : 5'-AGGGGAAGGTGCTTGGGGAA-3' per il primer senso e 5'-ACTGTCACTAGTCTCACCAG-3' per il primer antisenso ed amplificano un frammento di 200 paia di basi (pb). La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore Gene Amp PCR System 2400 Parkin Eluar a 94°C per 2 minuti, per 30 cicli a 94°C per 15 secondi, 58°C per 15 secondi, 72°C per 40 secondi ed infine a 72°C per 5 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad analisi RFLP mediante digestione per 3 ore a 37°C con 2.5 U dell'enzima Fnu4HI (BioLabs Ipswich, MA), che riconosce la transizione C:G e taglia i prodotti di *PCR* (200bp) in due frammenti di 100 bp ciascuno. *Fig. 8*. Quindi i prodotti di digestione sono stati caricati in un gel di agarosio al 3% contenente bromuro d'etidio 0.1%. Insieme agli ampliconi digeriti è stato caricato anche il marker 100 bp DNA Ladder (Promega, Milano, Italia). Ai campioni e al marker, prima del caricamento, è stato aggiunto il colorante Blue/Orange Loading Dye (Promega, Milano, Italia) 6X. La corsa elettroforetica è stata condotta a 55 V per 1.5 ora in tampone Tris/acido borico/EDTA 1X (TBE). Al termine della corsa elettroforetica i gel sono stati osservati al transilluminatore per visualizzare le bande ottenute.



**Figura 8:** Gel di agarosio per la presenza del polimorfismo del gene OGG1 in seguito ad amplificazione e digestione con l'enzima Fnu4HI. In figura è possibile valutare alcuni campioni wild-type (1 sola banda a 200 bp), eterozigoti (2 bande, di cui 1 a 200 e l'altra a 100 bp) e omozigoti per la mutazione (1 sola banda a 100 bp). In ogni gel insieme agli ampliconi digeriti è stato caricato un marker (M).

### Determinazione dell'addotto 8-OHdG

La determinazione dell'addotto 8-OHdG nei tessuti epatici è stata composta in due fasi:

1. idrolisi enzimatica del DNA;
2. analisi mediante HPLC-EC.

- **Idrolisi enzimatica del DNA**

A 100  $\mu$ l di DNA genomico, sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di Sodio Acetato 100 mM pH 4 e 20  $\mu$ l di Nucleasi P1 (Boehringer Mannheim, Monza), al fine di digerire il DNA a nucleotidi. Quindi la miscela è stata centrifugata per 1 minuti a 3000 g, risospesa e quindi incubata a 37°C per 45 minuti.

In seguito, sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di Tris/HCl 1 M pH 8 e 10  $\mu$ l di Fosfatasi alcalina 7500 U (Boehringer Mannheim, Monza) per idrolizzare i nucleotidi a nucleosidi. Quindi i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 3000 g per 1 minuto, risospesi e incubati a 37°C per 45 minuti [84].

- **HPLC-EC**

Dopo idrolisi, i campioni sono stati filtrati mediante filtri 0.2  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{l}$  di DNA sono stati iniettati nel sistema HPLC (Alliance Waters 2695). L'analisi è stata compiuta con una colonna LC-18-DB (Supelco, 75 x 4.6 mm) provvista di una pre-colonna (Supelguard LC-18-DB, 2cm, Supelco, Bellefonte, PA). L'analisi è stata effettuata in condizioni isocratiche ad un flusso di 1 ml/minuto, utilizzando una fase mobile composta per il 90% di 50 mM tampone  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 5.5 e per il 10% di metanolo.

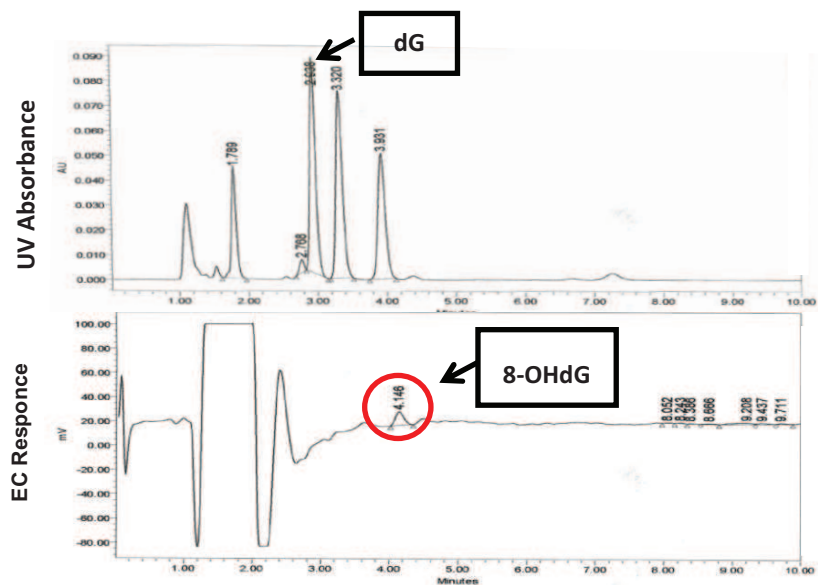
Un sistema di rivelazione a due canali è stato utilizzato per rilevare e quantificare gli analiti presenti:

- un canale per il rivelatore spettrofotometrico impostato alla lunghezza d'onda di 254 nm, una banda dello spettro UV molto intensa in grado perciò di rilevare piccolissime quantità di sostanza. Tramite questo rivelatore è stato possibile visualizzare la separazione dei deossinucleosidi (deossicitosina, 5-metildeossicitosina, deossiguanosina, deossitimina e deossiadenina);
- un canale per il rivelatore elettrochimico (Coulochem II, ESA, Chelmsford, MA) provvisto di una cella elettrochimica (ESA, modello 5011) con due elettrodi ai quali si applicano due diversi potenziali (150 mV e 350 mV), costanti durante tutta l'analisi, in modo da creare un potenziale sufficientemente elevato per far avvenire la reazione di ossido-riduzione e rilevare la presenza dell'addotto in seguito a variazioni della corrente nel tempo.

Concentrazioni note dello standard di 8-OHdG (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), con un range da 1 ng/ $\mu\text{l}$  a 0.03 ng/ $\mu\text{l}$ , sono state analizzate in triplicato al potenziale di lavoro di 350 mV con una sensibilità di 10 nA. I risultati dimostrano che la curva è lineare con questo range di concentrazioni con un coefficiente di

correlazione ( $R^2$ ) di 0.999. Il coefficiente di variazione (CV) inter-assay è risultato inferiore del 10%.

Le quantità di addotto rilevate sono state calcolate in base ai livelli di *dG* presenti ( $n^{\circ}$ addotti/ $10^5$ *dG*) in ciascun campione di DNA . *Fig. 9*.



*Figura 9:* Cromatogramma rappresentativo ottenuto in seguito all'analisi dell'8-OHdG mediante HPLC-EC.

### Analisi della lunghezza dei telomeri

Il DNA genomico estratto è stato utilizzato anche per la determinazione della lunghezza dei telomeri, secondo il metodo proposto da Cawthon R.M. [85].

Sono state preparate 2 piastre da 96 pozzetti per ogni esperimento contenenti: la prima i primers per amplificare le sequenze telomeriche: (*Tel-1*: 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3' e *Tel-2*: 5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3') e la seconda quelli relativi ad una singola copia del gene *36B4*, codificante per la proteina ribosomiale P0, utilizzato come riferimento (*36B4u*: 5'-

CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3' e 36B4d: 5'-  
CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3').

Ogni miscela di reazione è stata composta da 40 ng di DNA, SYBR Green Master Mix ed i primers *Tel-1* e *Tel-2* ad una concentrazione finale di 270 nM e 900 nM rispettivamente o i primers *36B4u* e *36B4d* ad una concentrazione finale di 300 nM e 500 nM rispettivamente. La reazione di Real-Time PCR è stata eseguita mediante strumentazione ABI PRISM 7900. In ogni piastra è stata allestita una curva standard utilizzando Human Genomic DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con un range da 4 a 80 ng. La Taq polimerasi è stata attivata a 95°C per 10 minuti, poi sono seguiti 30 cicli a 95°C per 5 secondi, 56°C per 10 secondi e 72°C per 60 secondi per la reazione telomerica mentre 30 cicli a 95°C per 5 secondi, 58°C per 10 secondi e 72°C per 40 secondi per il gene *36B4*.

Alla fine della reazione di amplificazione la temperatura è stata aumentata da 60°C a 95°C alla velocità di 2°C/minuti e la fluorescenza è stata misurata ogni 15 secondi al fine di permettere la costruzione della curva di melting. In ogni seduta di amplificazione è stato inserito un controllo negativo in cui l'aliquota di DNA è stata sostituita con H<sub>2</sub>O milliQ.

Infine i prodotti di amplificazione sono stati salvati ed elaborati mediante il software ABI 7900 SDS 2.3. Il software ha determinato il numero di cicli in cui la reazione raggiunge la Threshold. Questo valore, indicato come ciclo soglia (Ct), compare sempre durante la fase esponenziale della reazione ed è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione. Il software costruisce le curve standard fornendo tutti i parametri che permettono il calcolo dell'efficienza della reazione di amplificazione. Quindi il rapporto Telomeri/Singola copia genica (T/S) per ogni campione analizzato è stato

ottenuto dividendo la quantità media dei telomeri per la quantità media del gene 36B4 ottenuta dalla elaborazione dei dati.

### **Determinazione dello stato di metilazione del promotore di *TERT***

- **Trattamento del DNA genomico con bisolfito di sodio**

Il DNA genomico estratto è stato utilizzato anche per la quantificazione dello stato di metilazione del promotore di *TERT* dopo modificazione con bisolfito di sodio usando l'EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA). Il bisolfito di sodio induce una conversione chimica delle citosine non metilate in uracile, lasciando invariate le citosine metilate che quindi risultano protette, come precedentemente descritto da Herman J.G. e colleghi [86].

- **Determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA trattato con bisolfito di sodio**

La concentrazione di DNA genomico trattato è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica come già precedentemente descritto.

- **PCR**

Per verificare l'efficienza della conversione del DNA, è stata allestita una PCR usando Universal Methylated Human DNA Standard (Zymo Research, Orange, CA), metilato enzimaticamente, come controllo positivo e primers disegnati per amplificare un frammento del gene *MLH1*.

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 20 µl utilizzando 40 ng di DNA e 18 µl di mix di amplificazione composta da Zymo Taq PreMix (ZymoResearch,, Orange, CA), contenente 0.08 unità/µl, 0.5 µM primer senso e 0.5 µM primer antisenso. I primers utilizzati sono stati: 5'-GGAGTGAAGGAGGTTACGGGTAAGT-3' per il primer senso e 5'-AAAACGATAAAACCCTATACCTAATCTATC-3' per il primer antisenso e hanno amplificato un frammento di 182 bp. La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore Gene AmpPCR System 2400 Parkin Eluar a 95°C per 10 minuti, per 40 cicli a 95°C per 30 secondi, 59°C per 40 secondi, 72°C per 1 minuti ed infine a 72°C per 7 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati caricati in un gel di agarosio al 2% insieme al marker Sharp MASS100 PLUS (EuroClone, Milano, Italia). Ai campioni, prima del caricamento, è stato aggiunto il colorante Euro Safe Nucleic Acid Stain (EuroClone, Milano, Italia). La corsa elettroforetica è stata condotta a 55 V per 1.5 ore in TBE 1X. Al termine della corsa elettroforetica i gel sono stati osservati al transilluminatore per visualizzare le bande ottenute.

- **MSP quantitativa**

Lo stato di metilazione del DNA trattato con bisolfito è stato valutato utilizzando un ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 25 µl in presenza di 8µl di DNA trattato, 12 µl di SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) contenente DNA polimerasi AmpliTaq Gold, dNTPs e dUTP, SYBR Green in 1X buffer, primers specifici per il promotore di *TERT* (*TERTF*: 5'-TAGATTTTCGGGTTTCGTTTCG-3', *TERTR*: 5'-TCTATACCCGCGAATCCACT-3') alle concentrazioni di 0.3 µM e per il gene  $\beta$

*actina*, usato come housekeeping ( $\beta$ -*actina*F: 5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3,  $\beta$ -*actina*R:5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3') alle concentrazioni di 0.3  $\mu$ M. I primers sono stati precedentemente descritti da Guilleret I. e colleghi [87] e scelti in modo da amplificare la regione del promotore di *TERT* localizzata tra la posizione -317 e la -262 relativamente al codone ATG e una regione del gene della  $\beta$ -*actina* non contenente isole CpG e per questo motivo non soggetta a regolazione epigenetica. La reazione di amplificazione è stata eseguita in una piastra con 96 pozzetti separati. La PCR è stata condotta a 95°C per 15 minuti, seguita da 50 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. In ogni seduta di amplificazione sono stati inseriti un controllo negativo, in cui l'aliquota di DNA trattato con bisolfito è stata sostituita con H<sub>2</sub>O milliQ, e un controllo positivo di Universal Methylated Human DNA Standard trattato con bisolfito e metilato al 100% (Zymo Research, Orange, CA). Tutte le determinazioni sono state eseguite in triplicato per valutare la riproducibilità dei dati ottenuti. Alla fine della PCR la temperatura è stata aumentata da 60°C a 95°C alla velocità di 2°C/minuti e la fluorescenza è stata misurata ogni 15 secondi al fine di permettere la costruzione della curva di *melting*. Al termine dell'amplificazione i prodotti di *PCR* sono stati salvati ed elaborati mediante il software ABI 7900 SDS 2.3. Il software determina il numero di cicli in cui la reazione raggiunge la Threshold. Questo valore, indicato come Ct, compare sempre durante la fase esponenziale della reazione ed è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione. I livelli relativi di metilazione del promotore di *TERT* di ciascun campione di DNA sono stati determinati come  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e poi moltiplicati per 100 in modo da semplificare la tabulazione dei dati.

### **Estrazione di proteine da colture di cellule PLC/PRF/5**

L'estrazione delle proteine da colture di cellule PLC/PRF/5, una linea cellulare di epatoma, è stata effettuata utilizzando  $1 \times 10^6$  cellule sospese in 500  $\mu$ l di terreno completo. Le cellule dopo centrifugazione a 3.000 g per 10 minuti sono state private del terreno di coltura e al pellet sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di tampone di lisi (0.5% CHAPS, 10% glicerolo, 0.1 mM fenilmetilsolfonilfluoruro, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1mM  $MgCl_2$ , 1mM EGTA, 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol) e Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Quindi le cellule sono state omogenate mediante pestello, lasciate incubare in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate a 14.000 g a 4°C per 45 minuti. Infine, dopo centrifugazione, è stato recuperato il surnatante e conservato a -80°C fino al momento dell'uso.

### **Estrazione di proteine da tessuti epatici**

Per l'estrazione delle proteine dai tessuti epatici è stata usata la stessa procedura utilizzata per l'estrazione delle proteine dalle colture cellulari. In seguito i campioni, dopo determinazione della concentrazione proteica, sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

### **Determinazione della concentrazione proteica dei lisati cellulari e tissutali**

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato seguendo il protocollo fornito dal kit RCCD Protein Assay (Bio-Rad, Milano, Italia). L'assorbanza dei campioni è stata letta spettrofotometricamente a 750 nm.

## Determinazione dell'attività telomerasica mediante Real Time PCR –TRAP

L'attività telomerasica è stata testata partendo da proteine estratte da colture cellulari e tessuti epatici, conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizzando un ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'amplificazione è stata effettuata in un volume finale di 25  $\mu\text{l}$  in presenza di SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) contenente DNA polimerasi AmpliTaq Gold, dNTPs e dUTP, SYBR Green in 1X buffer, 0.2  $\mu\text{g}$  di  $T_4$  Gene 32 Protein, primers specifici 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  di omogenato proteico. I primers che sono stati utilizzati sono i seguenti: *TS* ( $5'$ -AATCCGTCGAGCAGAGTT- $3'$ ) alla concentrazione di 0.6  $\mu\text{M}$  e *ACX* [ $5'$ -GCGCGG(CTTACC) $_3$ CTAACC- $3'$ ] alla concentrazione di 0.4  $\mu\text{M}$ . La reazione di amplificazione è stata eseguita in una piastra con 96 pozzetti separati previa incubazione a  $25^{\circ}\text{C}$  per 20 minuti in modo da permettere l'attacco del primer *TS* alla telomerasi, presente nei campioni, con conseguente aggiunta delle sequenze ripetute TTAGGG. La PCR è stata condotta a  $95^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti, seguita da 40 cicli a  $95^{\circ}\text{C}$  per 20 secondi e a  $60^{\circ}\text{C}$  per 30 secondi. In ogni seduta di amplificazione è stato inserito un controllo negativo, in cui l'aliquota di omogenato proteico è stata sostituita con  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ, un campione di estratto proteico di cellule PLC/PRF/5, usato come controllo positivo (100% di attività), e una curva standard che è stata costruita con diluizioni seriali di oligo costituiti da ripetizioni telomeriche (TTAGGG) con un range da  $10^{-4}$  a 1 amol/ $\mu\text{l}$ .

Tutte le determinazioni sono state eseguite in triplicato per valutare la riproducibilità dei dati ottenuti. Alla fine della PCR la temperatura è stata aumentata da  $60^{\circ}\text{C}$  a  $95^{\circ}\text{C}$  alla velocità di  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e la fluorescenza è stata misurata ogni 15 secondi al fine di permettere la costruzione della curva di melting.

Al termine dell'amplificazione, i prodotti di PCR sono stati salvati ed i risultati elaborati mediante il software ABI 7900 SDS 2.3. Il software determina il numero di cicli in cui la reazione raggiunge la Threshold. Questo valore, Ct, compare sempre durante la fase esponenziale della reazione ed è inversamente proporzionale al numero iniziale di molecole stampo presenti nel campione. Il software costruisce le curve standard fornendo tutti i parametri che permettono il calcolo dell'efficienza della reazione di amplificazione. Le concentrazioni dei campioni sono state estrapolate dalla curva standard. I risultati sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo positivo (campione di estratto proteico di cellule PLC/PRF/5).

### **Isolamento di mitocondri da tessuti tumorali epatici**

L'isolamento dei mitocondri dai tessuti epatici è stata effettuato seguendo il protocollo proposto da Frezza C. e colleghi [88].

Brevemente, i tessuti epatici sono stati pesati (circa 200 mg) e lavati 3-4 volte con buffer di estrazione (0.1 M Tris-MOPS, 0.1 M EGTA/Tris e 1 M sucrosio). Quindi i tessuti sono stati omogenati per 3-4 volte nel buffer di estrazione (1:5-1:10 p/v) utilizzando un polytron e facendo attenzione a lavorare in ghiaccio in modo da minimizzare l'attivazione delle fosfatasi e delle proteasi. Quindi l'omogenato è stato centrifugato a 600 g per 10 minuti a 4°C, il surnatante è stato recuperato e centrifugato nuovamente a 7.000 g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante contenente il citosol è stato recuperato e stoccato a -80°C, mentre il pellet, in cui sono presenti i mitocondri, è stato lavato con il buffer di estrazione e centrifugato a 7.000 g per 10 minuti a 4°C. Infine il surnatante è stato eliminato, mentre il pellet, contenete i mitocondri, è stato risospeso nel minor volume possibile di buffer di estrazione e conservato a -80°C fino al momento del l'uso.

## **Estrazione e dosaggio delle proteine mitocondriali**

I mitocondri isolati sono stati lisati con 2% CHAPS in TBS e centrifugati per 2 minuti a 14.000 g . Quindi è stato recuperato il surnatante contenente le proteine mitocondriali e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. La concentrazione proteica è stata quantificata mediante BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA). L'assorbanza dei campioni è stata letta spettrofotometricamente a 540 nm.

## **Western Blotting**

I lisati proteici totali e mitocondriali sono stati caricati su gel SDS-PAGE Ready Gel Precast 4-15% (Bio-Rad, Milano, Italia) e trasferiti su membrana di PVDF (Bio-Rad, Milano, Italia). La membrana è stata saturata con PBS-Tween20 al 0.01% e BSA al 5% per 1 ora a temperatura ambiente quindi successivamente incubata a 4°C overnight con l'anticorpo primario. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: anti-TERT (127 kDa) 1:1000 (Abcam, Cambridge UK), anti-Vinculina 1:5000 (Sigma-Aldrich Milano, Italia) e anti-Tom-40 (40KDa) 1:200 (Santa Cruz, Biotechnology, CA, U.S.A), diluiti in PBS-Tween20 al 0.01% e BSA al 3%. Il giorno seguente la membrana è stata incubata 1ora a temperatura ambiente con gli anticorpi specifici secondari e l'immunoreattività delle proteine è stata visualizzata utilizzando il sistema Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA).

## **Estrazione del mtDNA**

L'estrazione del mtDNA dai mitocondri isolati è stata effettuata usando un kit commerciale (Promega, Milano, Italia) secondo il protocollo fornito (Tissue Culture Cells). Brevemente i mitocondri sono stati omogenati usando una siringa da insulina in 600  $\mu$ l di Nuclei Lysis Solution e 3  $\mu$ l di Rnase Solution. Quindi i campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti. Terminata l'incubazione ai campioni, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di Protein Precipitation Solution. I campioni successivamente sono stati agitati per 20 secondi e lasciati in ghiaccio per 5 minuti. Dopo centrifugazione a 14.000 g per 4 minuti, è stato recuperato il surnatante contenente il DNA. Quindi al surnatante sono stati aggiunti 600  $\mu$ l di isopropanolo agitando gentilmente fino alla comparsa del flocculo. I campioni sono stati centrifugati a 14.000 g per 1 minuto ed il pellet, contenente il DNA è stato lavato con etanolo al 70%. Quindi i campioni sono stati nuovamente centrifugati a 14.000 g per 1 minuto, per eliminare l'etanolo usato per il lavaggio e i pellet sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente per 10-15 minuti. Infine il DNA estratto è stato risospeso in 100  $\mu$ l di DNA Rehydration Solution e lasciato in incubazione overnight a 4°C. Quindi i DNA mitocondriali sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

## **Analisi statistica**

I risultati ottenuti sono stati espressi come media  $\pm$  SEM o mediana. I dati sono stati analizzati usando i test per dati non appaiati: unpaired t test e Anova one way. Per le correlazioni sono stati usati l'analisi della regressione lineare e il test di correlazione per Ranghi di Spearman (previo controllo con Kolmogorov-

Smirnov della distribuzione) con una significatività statistica di  $p=0.05$  (2-tailed).

L'analisi statistica è stata effettuata usando STATSDIRECT software



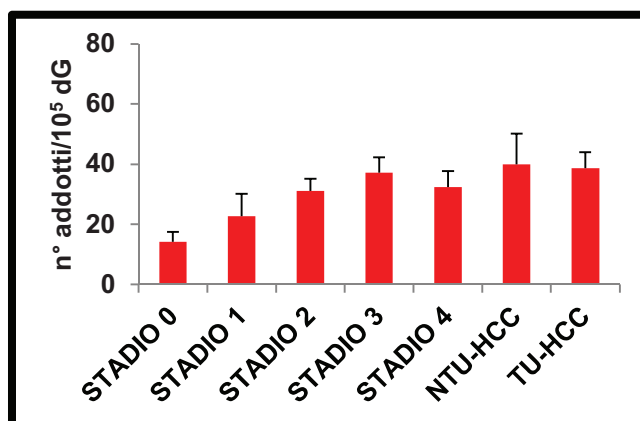
## **RISULTATI**

L'ampia casistica che è stata presa in considerazione in questo studio (162 pazienti), ha permesso di suddividere i pazienti in base all'eziologia virale HCV e HBV correlata e di valutare la progressione del danno epatico cronico in base allo stadio di fibrosi fino allo sviluppo dello cirrosi e dell'HCC. In particolare sono stati analizzati un gruppo di pazienti con stadio 0 di fibrosi che è stato valutato come gruppo di controllo. Questi pazienti HCV/HBV positivi, sono stati considerati come portatori sani della malattia, poiché presentavano alterazioni istologiche minime, lieve infiltrato infiammatorio negli spazi portali e transaminasi nella norma.

### **DANNO GENOMICO OSSIDATIVO: DETERMINAZIONE DELL'8-OHdG**

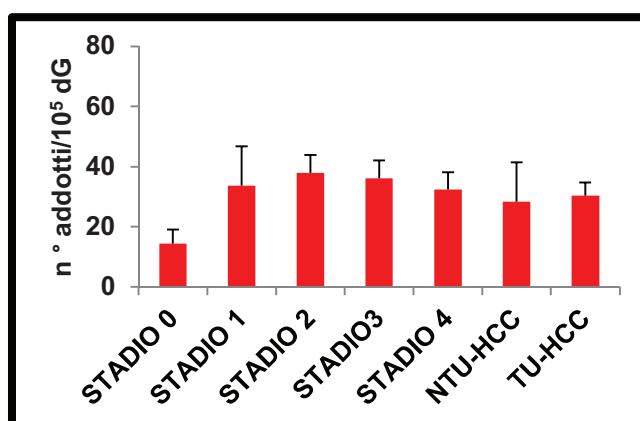
Il metodo utilizzato in questo studio per la valutazione della presenza dell'8-OHdG, indice di danno ossidativo diretto al DNA mediato dai ROS, ha permesso di identificare facilmente l'addotto in tutti i tessuti analizzati. Se si prendono in considerazione tutti i pazienti insieme, indipendentemente dall'eziologia virale e si dividono solo in base allo stadio di malattia, i livelli medi di 8-OHdG aumentano significativamente con l'avanzare del danno epatico ( $p=0.02$  Anova one way).

*Fig. 10.*



**Figura 10** : Livelli medi di 8-OHdG espressi come n°addotti/10<sup>5</sup> dG nei 162 pazienti studiati considerati tutti insieme indipendentemente dall'eziologia virale e divisi in base allo stadio di malattia.

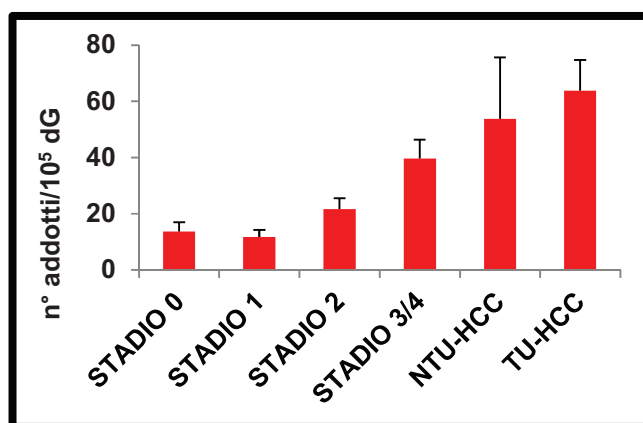
Quando sono stati analizzati i dati scorporando i pazienti in base all'eziologia virale, nel gruppo con epatite cronica HCV-correlata, i livelli di addotto 8-OHdG sono risultati significativamente più elevati già nei primi stadi di malattia (fibrosi allo stadio 1 e 2) e nei TU-HCC rispetto al gruppo di controllo ( $p=0.005$ ,  $p=0.01$  e  $p=0.03$  unpaired t test, rispettivamente). Fig. 11.



**Figura 11**: Livelli medi di 8-OHdG espressi come n°addotti/10<sup>5</sup> dG in 80 pazienti con epatite cronica HCV-correlata suddivisi in base ai diversi stadi di fibrosi (0-4) e in 16 pazienti con HCC da virus C considerando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che i corrispettivi tessuti peritumorali (NTU-HCC)

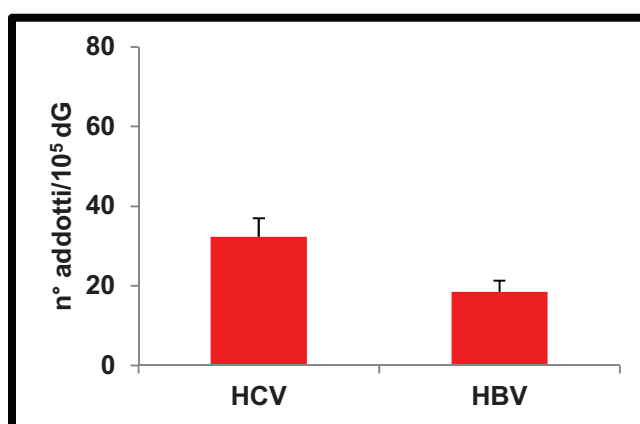
Inoltre sempre in questo gruppo di pazienti i livelli di addotto sono risultati significativamente più elevati nei pazienti con genotipo 1 rispetto a quelli con altri genotipi ( $31.9 \pm 5.2$  vs  $18.2 \pm 4.4$  n°addotti/ $10^5$ dG,  $p=0.05$  unpaired t test) e nel gruppo di pazienti che presentava steatosi ( $33.1 \pm 4.3$  vs  $22.6 \pm 4.1$  n°addotti/ $10^5$ dG,  $p=0.05$  unpaired t test) rispetto a quello che non la presentavano.

Per quanto riguarda invece il gruppo di pazienti con epatite HBV-correlata, i livelli di 8-OHdG sono risultati più elevati negli stadi più avanzati di malattia mostrando livelli significativamente più alti rispetto al gruppo di controllo e agli stadi iniziali di fibrosi ( $p=0.004$  Anova one way). Fig. 12.



**Figura 12:** Livelli medi di 8-OHdG espressi come n°addotti/ $10^5$  dG in 41 pazienti con epatite cronica HbV-correlata suddivisi in base ai diversi stadi di fibrosi (0-4) e in 5 pazienti con HCC da virus B considerando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che i corrispettivi tessuti peritumorali (NTU-HCC)

Quindi quando sono stati considerati insieme solo gli stadi iniziali di malattia (fibrosi stadio 0-2), i livelli medi di addotto 8-OHdG nel gruppo delle epatiti HCV-correlate sono risultati essere significativamente più elevati rispetto a quelli riscontrati nelle epatiti HBV-correlate ( $p=0.01$  unpaired t test). Fig. 13.



**Figura 13:** Livelli medi di 8-OHdG espressi come n° addotti/10<sup>5</sup> dG nei primi stadi di malattia, fibrosi allo stadio 0-1-2, di pazienti con epatite cronica HCV e HBV correlata.

## **POLIMORFISMO DEL GENE OGG1**

Nel gruppo di pazienti con epatite cronica HCV-correlata, il polimorfismo del gene *OGG1* (eterozigosi ed omozigosi per la mutazione) è stato riscontrato nel 50-56% dei pazienti con HCC sia nei TU-HCC che in NTU-HCC, mentre era presente nel 42% dei pazienti con stadio 4 di fibrosi e nel 34.5% (valore % medio) dei pazienti con stadio di malattia meno avanzato (fibrosi stadio 0-1-2-3). Tuttavia, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i vari gruppi e, inoltre, sia nei pazienti con HCC che in quelli con stadio di malattia meno avanzato non sono state trovate differenze significative tra i livelli di 8-OHdG valutati nei pazienti wild-type rispetto a quelli eterozigoti o omozigoti per la mutazione del gene *OGG1*.

OGG1	STADIO 0 (n=9)	STADIO 1 (n=7)	STADIO 2 (n=27)	STADIO 3 (n=17)	STADIO 4 (n=20)	NTU- HCC (n=16)	TU- HCC (n=16)
WILD-TYPE	50%	71%	59%	82%	58%	44%	50%
ETEROZIGOSI	38%	29%	37%	18%	37%	56%	50%
OMOZIGOSI	12%	0%	4%	0%	5%	0%	0%

**Tabella 3:** Percentuali di frequenza di OGG1 wild-type e eterozigote o omozigote per la mutazione negli 80 pazienti con epatite cronica HCV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi e nei 16 pazienti con HCC da virus, considerando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispondente tessuto peritumorale (NTU-HCC).

Considerando il gruppo di pazienti con epatite HBV-correlata, il polimorfismo del gene OGG1 (eterozigosi ed omozigosi per la mutazione), dall'analisi effettuata, è risultato presente nel 20% dei NTU-HCC, nel 50% dei pazienti con stadio 1/2 e 3/4 di fibrosi, mentre non è stato riscontrato in alcuno dei tessuti dei pazienti con TU-HCC e con stadio 0 di fibrosi.

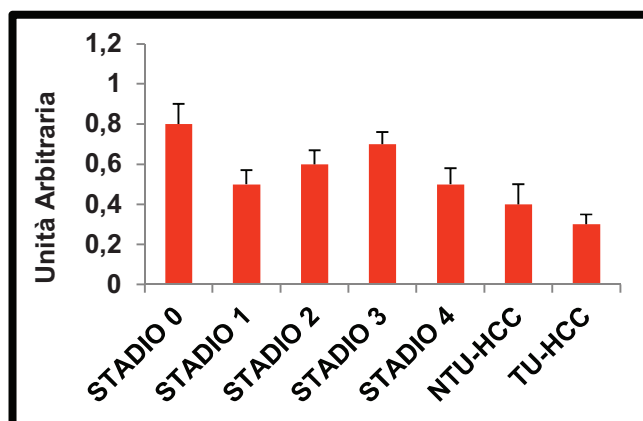
Anche in questo caso, come nel gruppo di pazienti con epatite HCV-correlata, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra i livelli di 8-OHdG valutati nei pazienti wild-type per il gene OGG1 rispetto a quelli in eterozigosi.

OGG1	STADIO 0 (n=6)	STADIO 1/2 (n=30)	STADIO 3/4 (n=5)	NTU- HCC (n=5)	TU- HCC (n=5)
WILD-TYPE	100%	50%	50%	80%	100%
ETEROZIGOSI	0%	39%	50%	20%	0%
OMOZIGOSI	0%	11%	0%	0%	0%

**Tabella 4:** Percentuali di frequenza di OGG1 wild-type e eterozigote o omozigote per la mutazione nei 41 pazienti con epatite cronica HBV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi e nei 5 pazienti con HCC da virus B, considerando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispondente tessuto peritumorale (NTU-HCC).

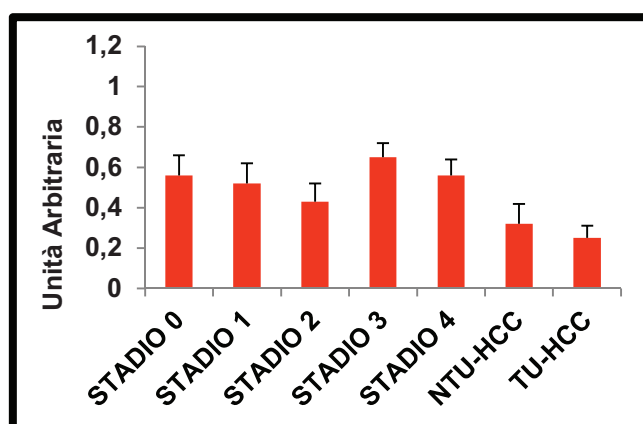
## LUNGHEZZA DEI TELOMERI

Considerando i pazienti tutti insieme, indipendentemente dall'etiologia virale, e dividendoli solo in base allo stadio di fibrosi, i telomeri sono risultati significativamente più corti nei TU-HCC rispetto agli altri gruppi con stadio di malattia meno avanzato. In particolare, la lunghezza telomerica ha mostrato un primo accorciamento nello stadio 1 di fibrosi per allungarsi nello stadio 3 e poi riaccorciarsi nelle fasi finali della malattia (p=0.01 Anova one way). Fig. 14.



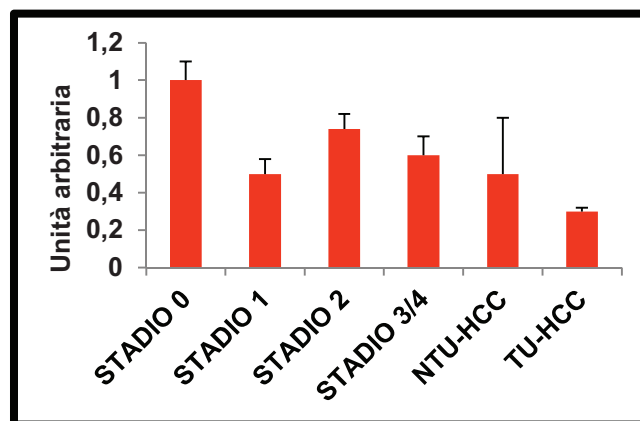
**Figura 14:** Livelli medi della lunghezza dei telomeri nei 162 pazienti studiati considerando sia i pazienti con epatite cronica che con HCC analizzandoli tutti insieme indipendentemente dall'eziologia virale e suddividendoli solo in base allo stadio di malattia.

Lo stesso andamento è stato rispecchiato anche quando è stato considerato solo il gruppo delle epatiti HCV correlate, dove i telomeri sono risultati significativamente più corti nei TU-HCC rispetto al gruppo di controllo ( $p=0.05$  unpaired t test). Fig. 15.



**Figura 15:** Livelli medi della lunghezza dei telomeri negli 80 pazienti con epatite cronica HCV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi (0-4) e nei 16 pazienti con HCC da virus C, analizzando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispettivo tessuto peritumorale (NTU-HCC)

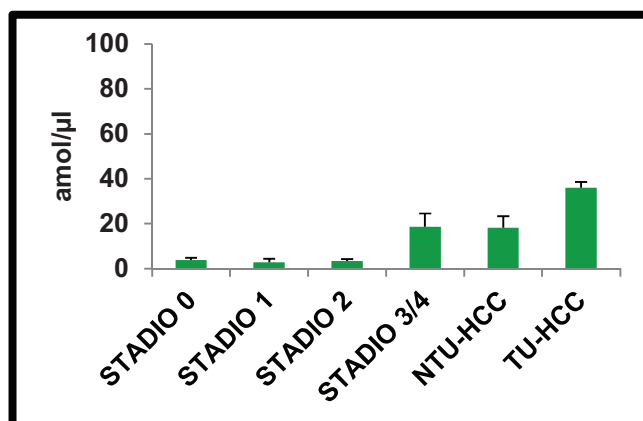
Anche nel gruppo dei pazienti con epatite HBV correlata, la lunghezza telomerica è risulta significativamente più corta nei TU-HCC sia rispetto al gruppo di controllo che a quello con stadio 2 di fibrosi. Infatti nello stadio di fibrosi 2 i telomeri mostrano un lieve allungamento rispetto allo stadio 1 ( $p=0.01$  e  $p=0.0001$  unpaired t test rispettivamente). *Fig. 16.*



**Figura 16:** Livelli medi della lunghezza dei telomeri nei 41 pazienti con epatite cronica HBV-correlata, suddivisi in base allo stadio di fibrosi (0-4), e nei 5 pazienti con HCC da virus B, analizzando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispettivo tessuto peritumorale (NTU-HCC).

## ATTIVITÀ TELOMERASICA

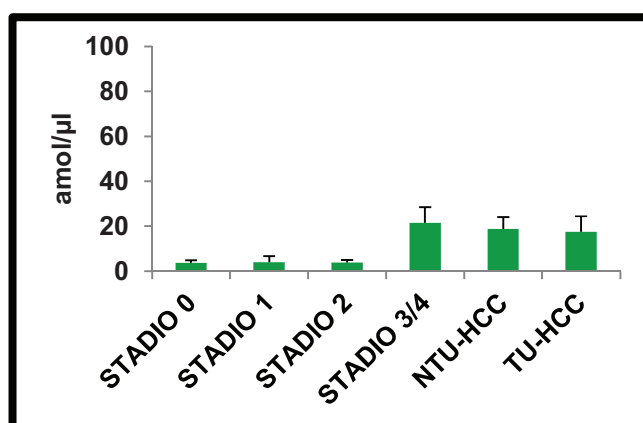
Inizialmente, l'attività della telomerasi è stata analizzata nel complesso, considerando tutti i pazienti insieme senza dividerli in base all'eziologia virale, ed è risultata significativamente più alta nei tessuti con grado maggiore di malattia rispetto a quella riscontrata nei tessuti con stadio di fibrosi meno avanzato. ( $p=0.01$  Anova one way). *Fig. 17.*



**Figura 17:** Livelli medi dell'attività della telomerasi nei 162 pazienti studiati sia con epatite cronica che con HCC considerati tutti insieme indipendentemente dall'eziologia virale e suddivisi solo in base allo stadio di malattia.

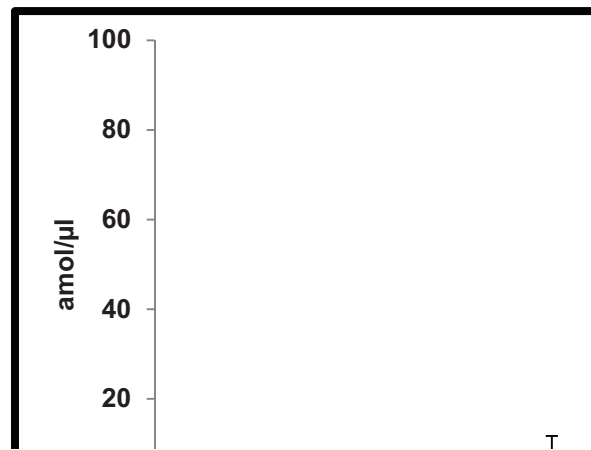
Considerando poi l'eziologia virale della malattia, l'attività telomerasica, anche nel gruppo con epatite HCV-correlata, è risultata significativamente aumentata negli stadi terminali della malattia rispetto agli stadi iniziali ( $p=0.04$  Anova one way).

*Fig. 18.*



**Figura 18 :** Livelli medi dell'attività telomerasica negli 80 pazienti con epatite cronica HCV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi (0-4) e nei 16 pazienti con HCC da virus B, analizzando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispettivo tessuto peritumorale (NTU-HCC).

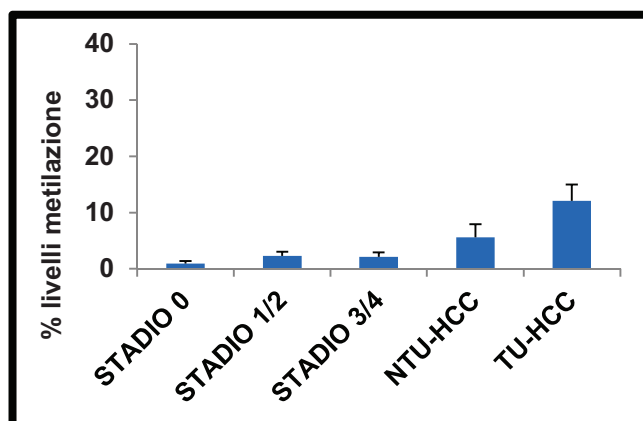
Quando invece sono stati presi in considerazione i pazienti con epatite HBV-correlata l'attività dell'enzima è risultata significativamente aumentata solo nei TU-HCC rispetto a quella che è stata riscontrata nei tessuti con stadio di fibrosi meno avanzato ( $p=0.03$  Anova one way). *Fig. 19.*



**Figura 19:** Livelli medi dell'attività telomerasica nei 41 pazienti con epatite cronica HBV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi (0-4) e nei 5 pazienti con HCC da virus B, analizzando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispettivo tessuto peritumorale (NTU-HCC)

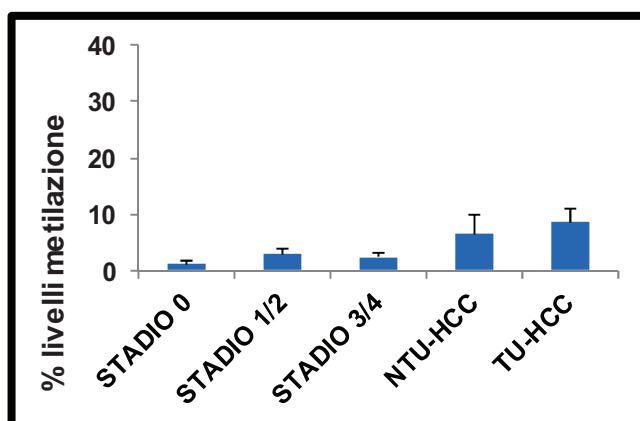
## **METILAZIONE DEL PROMOTORE DI *TERT***

Quando sono stati considerati tutti i pazienti insieme, divisi solo sulla base dei differenti stadi di malattia, l'analisi dello stato di metilazione del promotore di *TERT* ha mostrato che i livelli medi sono significativamente più elevati negli stadi più avanzati rispetto a quelli che sono stati valutati nei tessuti con minor grado di malattia ( $p=0.0001$  Anova one way). *Fig. 20.*



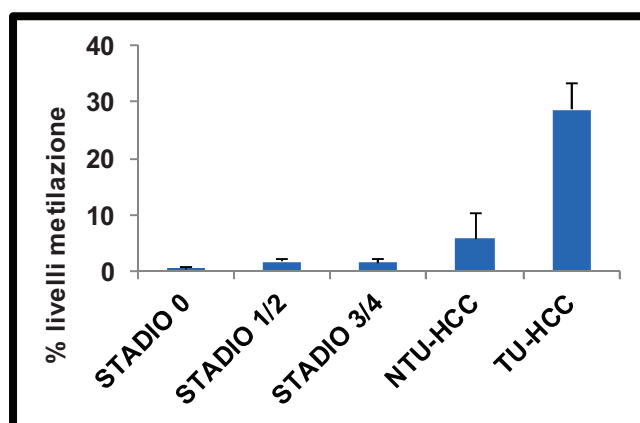
**Figura 20:** Percentuali dei livelli dello stato di metilazione del promotore del gene che codifica per TERT nei 162 pazienti studiati sia con epatite cronica che con HCC considerati tutti insieme indipendentemente dall'eziologia virale e suddivisi solo in base allo stadio di malattia.

I pazienti con epatite cronica HCV-correlata, quando sono stati scorporati dai pazienti totali, hanno mostrato una metilazione del promotore di TERT significativamente più elevata nei TU-HCC e NTU-HCC rispetto agli stadi meno avanzati di fibrosi ( $p=0.04$  Anova one way). Fig. 21.



**Figura 21:** Percentuali dei livelli dello stato di metilazione del promotore del gene che codifica per TERT negli 80 pazienti con epatite cronica HCV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi (0-4) e nei 16 pazienti con HCC da virus C, analizzando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispettivo tessuto peritumorale (NTU-HCC).

Infine nel gruppo di pazienti con epatite cronica HBV- correlata, il promotore di *TERT* è risultato significativamente più metilato nei TU-HCC e NTU-HCC rispetto agli altri stadi malattia considerati ( $p=0.0001$  Anova one way). Fig. 22.



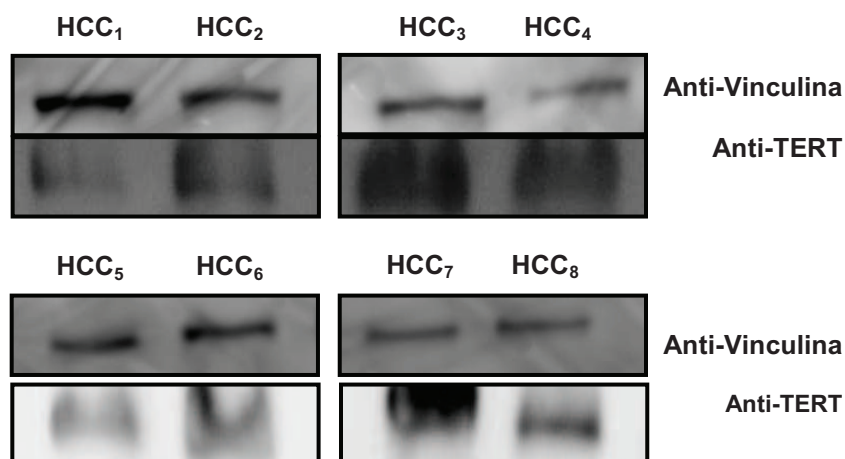
**Figura 22:** Percentuali dei livelli dello stato di metilazione del promotore del gene che codifica per *TERT* nei 41 pazienti con epatite cronica HBV-correlata suddivisi in base allo stadio di fibrosi (0-4) e nei 5 pazienti con HCC da virus B, analizzando sia il tessuto tumorale (TU-HCC) che il corrispettivo tessuto peritumorale (NTU-HCC).

## LOCALIZZAZIONE MITOCONDRIALE DI TERT

Nei campioni tissutali di HCC è stata valutata la localizzazione di *TERT* sia a livello del lisato proteico totale che mitocondriale mediante analisi di western blotting.

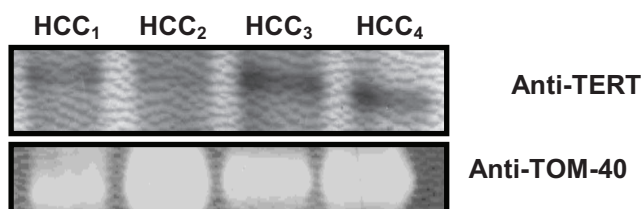
Come atteso, la presenza di *TERT* è stata visualizzata in tutti i lisati totali analizzati, a conferma dell'attività telomerasica riscontrata negli stessi campioni.

In Fig. 23 sono state riportate le bande corrispondenti all'espressione di *TERT* nel lisato totale di alcuni campioni ottenuti da pazienti affetti da HCC. Come proteina housekeeping è stata utilizzata la Vinculina, una proteina deputata all'ancoraggio dei filamenti di actina del citoscheletro alla membrana cellulare.



**Figura 23:** Analisi di western blotting per la valutazione della presenza di TERT (127 kDa) nei lisati totali di pazienti affetti da HCC. TERT è stata normalizzata sulla presenza della Vinculina (130 kDa).

Inoltre sono stati analizzati 15 campioni tissutali di HCC da cui sono stati isolati i mitocondri ed estratte le proteine mitocondriali. Su questi campioni è stata valutata, mediante analisi di western blotting, la presenza di TERT. I dati ottenuti hanno dimostrato, in tutti i campioni analizzati, la presenza mitocondriale di TERT in quanto co-localizzata con TOM-40, una proteina della membrana esterna dei mitocondri. In Fig. 24 è stato riportato un blot esemplificativo in cui è possibile notare la presenza di TERT e di TOM-40 nello stesso campione di lisato proteico mitocondriale.



**Figura 24:** Analisi di western blotting per la valutazione della presenza di TERT (127 kDa) nei lisati mitocondriali di pazienti affetti da HCC. TERT è stata co-localizzata con TOM-4 (40kDa), proteina della membrana esterna mitocondriale.

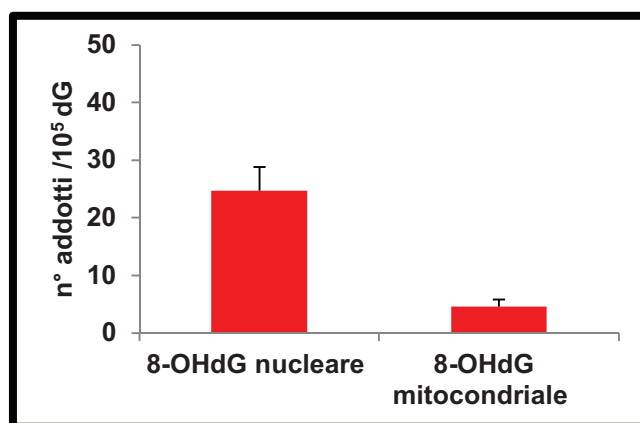
## ANALISI DELL'ATTIVITÀ TELOMERASICA A LIVELLO MITOCONDRIALE

Quindi i lisati proteici mitocondriali sono stati utilizzati per l'analisi dell'attività telomerasica mediante Real-Time PCR. I dati ottenuti dimostrano l'assenza di attività in tutti i campioni analizzati, suggerendo una possibile funzione extra-nucleare "non canonica" della proteina.

## DANNO OSSIDATIVO AL DNA MITOCONDRIALE

Infine, è stato isolato e analizzato il DNA mitocondriale per valutare i livelli di danno ossidativo mediante quantificazione dell'addotto 8-OHdG nel gruppo di campioni nel quale è stata riscontrata la presenza mitocondriale di TERT. I dati ottenuti hanno mostrato livelli medi di addotto significativamente più elevati a livello nucleare rispetto a quello riscontrato nel mtDNA ( $p=0.0003$  unpaired t test).

Fig. 25.



**Figura 25:** Livelli medi di 8-OHdG, espressi come n°addotti/10<sup>5</sup> dG, a livello del DNA nucleare e mitocondriale nei tessuti tumorali di 15 pazienti con HCC ad eziologia HCV e HBV-correlata in cui è stata riscontrata la presenza mitocondriale di TERT.

## CORRELAZIONI

Considerando i pazienti tutti insieme, la lunghezza telomerica correla negativamente con il grado di attività della malattia ( $Rho=-0.34$ ,  $p=0.01$  Spearman's rank correlation) e con i livelli di 8-OHdG nei tessuti tumorali e peritumorali ( $Rho=-0.5$ ,  $p=0.04$  Spearman's rank correlation).

Inoltre nei pazienti con HCC è stata individuata una correlazione statisticamente significativa tra il danno ossidativo a livello nucleare e quello mitocondriale ( $r=0.58$ ,  $p=0.02$  Simple Linear Regression).

Considerando i pazienti con HCV, l'attività telomerasica è risultata correlare negativamente con i livelli di danno ossidativo nei primi stadi di malattia ( $r=-0.4$ ,  $p=0.04$  Simple Linear Regression) e i livelli di 8-OHdG sono risultati positivamente correlati con i valori di ALT ( $r=0.39$ ,  $p=0.04$  Simple Linear Regression).

Infine nei pazienti con epatite cronica HBV-correlata, l'attività telomerasica è correlata positivamente con lo stato di metilazione del promotore nei TU-HCC e NTU-HCC ( $Rho=0.9$ ,  $p=0.02$  Spearman's rank correlation).

Infine i dati che sono stati analizzati finora risultano forse maggiormente interpretabili se, utilizzando un modello di progressione temporale della malattia epatica, tutti i parametri analizzati (danno ossidativo, lunghezza dei telomeri, attività telomerasica, metilazione del promotore e localizzazione mitocondriale di TERT) vengono valutati insieme indipendentemente dall'eziologia virale. In *Fig. 26* si possono individuare 3 ipotetiche fasi nel processo carcinogenetico:

1. **Precoce**: che caratterizza i primi stadi di malattia (stadio 0-2 di fibrosi) in cui si ha un aumento del danno genomico ossidativo con progressivo

accorciamento della lunghezza dei telomeri, in assenza di attività telomerasica e di metilazione del promotore di *TERT*;

2. **Intermedia:** che va dallo stadio di fibrosi 2 allo stadio 4 di cirrosi conclamata caratterizzata da elevato e costante danno ossidativo, associato ad attivazione della telomerasi e ad una maggiore metilazione del promotore di *TERT* che portano ad allungamento dei telomeri;
3. **Tardiva:** che comprende le fasi terminali di malattia (tessuto tumorale e peritumorale) in cui si ha un danno genomico ossidativo cronico accompagnato dall'accorciamento dei telomeri, probabilmente dovuto alla forte instabilità genomica, nonostante vi sia un'attività telomerasica elevata e un'ipermetilazione del promotore di *TERT*. Inoltre in questo scenario va ricordata la migrazione di TERT a livello mitocondriale che potrebbe modulare l'apoptosi favorendo la proliferazione cellulare.

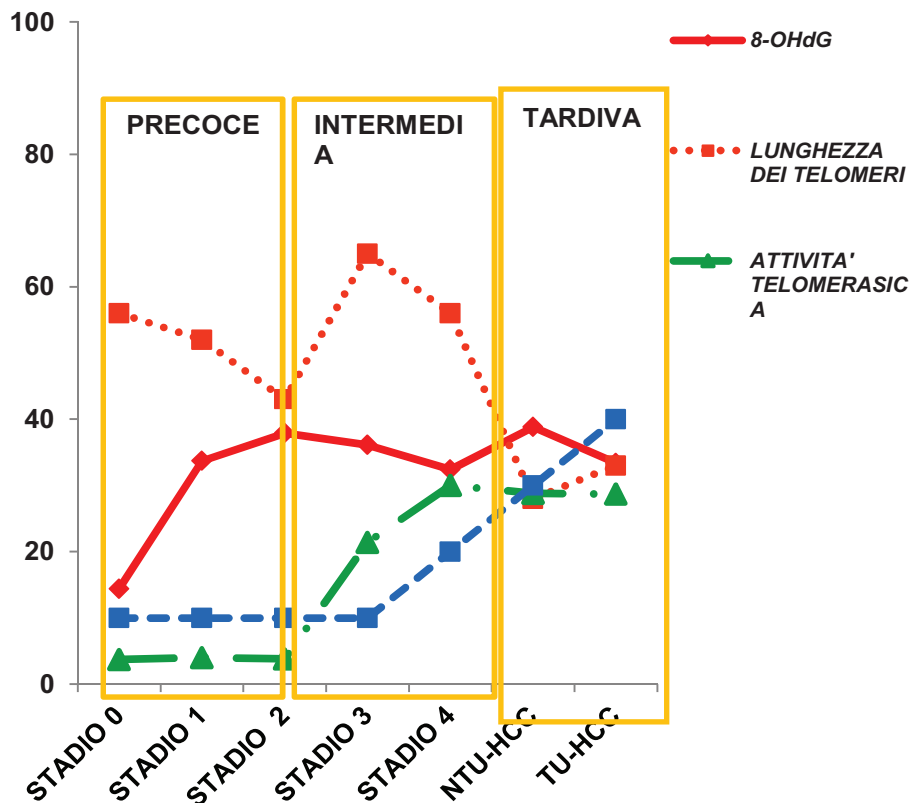


Figura 26: Andamento dei parametri analizzati nella progressione della malattia epatica virus-correlata.

## **DISCUSSIONE**

Molti dati indicano che i ROS possono giocare un ruolo importante nelle epatopatie croniche e nella patogenesi dell'HCC, ad esempio attraverso l'induzione di specifiche mutazioni al DNA cellulare, la cui persistenza ed entità è modulata da differenti fattori dell'ospite. Il danno genomico ossidativo è particolarmente rilevante in situazioni di aumentata proliferazione e/o di diminuita morte cellulare. Esiste, infatti, uno sbilanciamento, in corso di epatopatia cronica virus-correlata e di carcinogenesi, tra danno ossidativo e meccanismi antiossidanti di difesa dell'ospite, documentata sia a livello plasmatico che tissutale epatico [89]. Cellule che non sono in grado di iniziare il processo di apoptosi, in risposta al danno al DNA, possono essere infatti più suscettibili ad alterazioni genetiche persistenti e ad acquisire immortalità attraverso la modulazione dell'attività telomerasica [90].

Questo studio si è posto l'obiettivo di definire con maggior chiarezza la relazione tra danno ossidativo e disfunzione telomerica, intesa come accorciamento telomerico, attività della telomerasi e i suoi meccanismi di regolazione nella progressione del danno epatico cronico e nello sviluppo dell'HCC.

Da molti anni questo gruppo di ricerca si occupa dello studio del danno ossidativo in questo particolare ambito e numerosi lavori sono stati pubblicati in riviste internazionali [91-94].

In questa nostra esperienza, con l'utilizzo di un metodo altamente sensibile e specifico, l'analisi in HPLC mediante rilevazione elettrochimica, è stato possibile individuare la presenza di un addotto al DNA, l'8-OHdG, la cui produzione è mediata esclusivamente dall'interazione tra i ROS e il genoma cellulare. E' stato possibile quindi valutare i livelli di 8-OHdG sia nei campioni tissutali di un gruppo di pazienti con HCC, sottoposti ad intervento chirurgico, sia in un gruppo di

pazienti con epatite cronica, HCV e HBV correlata, sottoposti a biopsia epatica. I dati ottenuti dimostrano il progressivo accumulo del danno genomico ossidativo e l'importante ruolo che svolge, come già dimostrato in precedenza e pubblicato da noi e da altri Autori, nella progressione della patologia epatica virus correlata fino all'HCC [93-95]. L'accumulo di danno ossidativo al DNA raggiunge i livelli più elevati nei TU-HCC e nei NTU-HCC, infatti i dati ottenuti hanno dimostrato che l'8-OHdG, nel caso in cui vengano considerati tutti i pazienti indipendentemente dall'eziologia, è significativamente più alto negli stadi più avanzati di malattia rispetto al gruppo delle epatiti. Questo andamento è più marcato se l'8-OHdG è analizzato nei pazienti in base all'eziologia virale: più la patologia si aggrava più esso è presente. Inoltre i pazienti con infezione da HCV mostrano già nelle fasi precoci della malattia epatica un più elevato danno ossidativo rispetto al gruppo dei pazienti con epatite cronica HBV-correlata, come confermato dalla differenza statisticamente significativa riscontrata tra i livelli di 8-OHdG nelle prime fasi di malattia (fibrosi stadio 0-2) nei due gruppi considerati. Inoltre nell'ambito delle epatiti HCV-correlate, un altro risultato ottenuto riguarda il più alto livello di 8-OHdG riscontrato nei pazienti infettati con il genotipo 1. Se la presenza o meno del genotipo 1 sia di per se stesso un marker della capacità del virus di indurre un danno epatico più severo ed un più alto rischio di evoluzione neoplastica è ancora da chiarire. Tuttavia, i nostri risultati supportano la conclusione che il genotipo 1 può essere considerato come un fattore di rischio da un punto di vista biologico, dal momento che la presenza del genotipo 1 è associato ad un più alto danno ossidativo al DNA, quando confrontato con gli altri genotipi. Ed ancora, sempre in questo gruppo di pazienti, i più alti livelli di 8-OHdG sono stati riscontrati in associazione alla presenza di steatosi ed a più alti livelli di transaminasi, confermando ancora una volta la relazione tra danno ossidativo al DNA e danno epatico più severo. L'8-OHdG, come già ricordato, è il prodotto di

un danno ossidativo al DNA la cui persistenza all'interno del genoma può indurre mutazioni in geni specifici coinvolti nel processo carcinogenetico epatico. Quindi elevati livelli di 8-OHdG possono essere un fattore di rischio importante per l'HCC e potrebbero essere usati come fattore prognostico, come già fatto in alcuni studi in letteratura. Tuttavia non è ancora chiaro se lo stress ossidativo sia la causa o la conseguenza del danno epatico cronico, anche se recentemente è stato dimostrato che esso è in grado di attivare le cellule di Kupffer, le quali a loro volta rilasciano citochine pro-infiammatorie e pro-fibrogeniche tra cui TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  [95].

Il danno ossidativo al DNA può essere corretto da specifici processi di riparazione, quali il sistema BER, del quale fa parte una specifica *DNA glicosidasi*, codificata dal gene *OGG1*, che rimuove direttamente l'8-OHdG dal DNA, riducendo quindi il rischio di accumulo di possibili mutazioni al genoma. In questo studio, nei DNA estratti dagli stessi campioni tissutali, è stato valutato anche il polimorfismo del gene *OGG1*, dal momento che dati in letteratura hanno riportato che la presenza di questo polimorfismo può ridurre la capacità riparatrice dell'enzima, anche se i risultati a questo proposito non sono sempre del tutto concordi. Per quanto riguarda il polimorfismo del gene *OGG1*, sia nei pazienti con HCC che in quelli con stadio di malattia meno avanzato (epatiti croniche e cirrosi), non vi è nessuna differenza significativa tra i livelli di 8-OHdG valutati nei pazienti wild-type rispetto a quelli in eterozigosi per il gene *OGG1*. Inoltre, nella nostra esperienza, il polimorfismo del gene non correla significativamente con i livelli di 8-OHdG. Tuttavia, in alcuni studi è stata documentata una correlazione significativa tra polimorfismo dell'*OGG1* e livelli di 8-OHdG confermando che, quando il polimorfismo è presente, è associato a una bassa capacità di riparazione dell'enzima e i livelli di danno ossidativo al DNA aumentano significativamente, indipendentemente dalla fase di malattia e

dall'attività di altri sistemi di riparazione [96-98]. Ciò nonostante, se la presenza del polimorfismo possa correlarsi o meno con una più alta tendenza all'evoluzione a cirrosi o ad HCC rimane sicuramente da verificare, poiché altri lavori suggeriscono che il gene *OGG1*, nonostante svolga un ruolo importante, non sia l'unico meccanismo di riparazione coinvolto che possa modulare il processo di danno epatico. Esistono infatti diversi enzimi coinvolti nella riparazione del DNA in seguito a stress ossidativo e la mancanza di correlazione tra danno ossidativo e polimorfismo dell'*OGG1* suggerisce che probabilmente nel fegato esistano altri meccanismi di riparazione più importanti rispetto all'*OGG1*.

In questo studio, però, si è voluta rivolgere particolare attenzione alla relazione tra danno ossidativo e disfunzione telomerica, meccanismo coinvolto nel processo carcinogenetico epatico. Recenti dati di letteratura riportano una stretta correlazione tra i livelli di 8-OHdG e la lunghezza dei telomeri. Infatti, l'alto contenuto di sequenze GGG altamente ripetute rende i telomeri un facile bersaglio per il danno da stress ossidativo [23]. I ROS creano siti di rottura sul DNA mediante l'interazione diretta o errati meccanismi di riparazione delle basi ossidate. A causa della ridotta capacità di riparazione del DNA telomerico, a differenza di quello genomico, i telomeri accumulano facilmente basi non riparate (preferenzialmente 8-OHdG) [99]. Alcuni Autori hanno dimostrato che l'accorciamento dei telomeri potrebbe essere accelerato o diminuito da modificazioni nello stato dello stress ossidativo, ma non è del tutto noto il suo ruolo nell'influenzare l'attività telomerasica nei tessuti umani [24]. E' ormai ben chiaro che i telomeri svolgono un ruolo fondamentale nel processo di senescenza, infatti si accorciano con il progredire dell'età. Tuttavia l'infiammazione e lo stress ossidativo possono portare ad un accelerato accorciamento telomerico. Numerosi dati di letteratura riportano che la lunghezza dei telomeri possa essere potenzialmente utilizzata come indicatore prognostico

nei tumori solidi [100-102]. L'accorciamento della lunghezza dei telomeri avverrebbe nelle prime fasi del processo carcinogenetico, quindi nella fase di iniziazione del cancro, aumentando pertanto il rischio di rotture cromosomiche ed aneuploidia [24]. È tuttavia noto che non tutte le lesioni pre-neoplastiche siano in grado di progredire a cancro. Solo quelle cellule che trovano una via per mantenere i loro telomeri, permettendo così di effettuare illimitate divisioni cellulari e di conseguenza di mantenere un certo grado di instabilità cromosomica, saranno in grado di progredire a neoplasia maligna avanzata. Il DNA telomerico è dinamico e la lunghezza dei telomeri è il risultato di un continuo bilanciamento tra telomeri corti e meccanismi di allungamento dei telomeri che coinvolgono la telomerasi.

Sono stati proposti due principali meccanismi che legano la disfunzione telomerica al cancro:

1. **Telomeri corti**: associati alla senescenza cellulare e ad una ridotta capacità di rigenerazione tissutale. Infatti, quando i telomeri raggiungono una lunghezza critica, le cellule vanno incontro a senescenza replicativa o apoptosi. Tuttavia se i meccanismi di controllo vengono bypassati, le cellule continuano a proliferare grazie all'attivazione della telomerasi, promuovendo l'instabilità cromosomica. L'accumulo di mutazioni, di lesioni genetiche e l'inattivazione di geni coinvolti nei meccanismi di controllo, promuove la trasformazione neoplastica e il cancro. Una review di Calado RT e colleghi [103] sottolinea che il rischio di progressione a cancro è legato all'accorciamento dei telomeri e il dato può essere considerato un indicatore precoce di rischio neoplastico, tanto da ritenere utile la prevenzione dell'accelerato accorciamento dei telomeri nella cirrosi e nello sviluppo dell'epatocarcinoma. Infatti è noto che i telomeri mostrano un modesto accorciamento nelle cellule epatiche normali durante l'invecchiamento, mentre

l'accorciamento è accelerato nei pazienti con patologie epatiche croniche [100];

2. **Telomeri lunghi**: è necessario, d'altra parte, considerare anche la relazione tra lunghezza dei telomeri e instabilità genomica. Non è irragionevole pensare che l'allungamento dei telomeri rifletta una stabilizzazione telomerica che potrebbe avvantaggiare la progressione tumorale [104]. I telomeri lunghi infatti portano ad un rallentamento della senescenza cellulare, con maggiore possibilità per le cellule di acquisire instabilità cromosomica e anomalie genetiche, tutti fattori che aumentano il rischio di trasformazione neoplastica. Infatti si potrebbe ipotizzare che l'attività telomerasica sia maggiormente espressa negli stadi avanzati come avviene nell'HCC [100].

Rispetto ad altri modelli animali e tissutali, il ruolo della senescenza nelle cellule epatiche e nella carcinogenesi cellulare è stato ancora poco investigato.

Per quanto riguarda la nostra esperienza, la lunghezza dei telomeri è significativamente più corta nei tessuti tumorali rispetto agli altri gruppi analizzati, sia quando abbiamo considerato i pazienti tutti insieme, sia quando li abbiamo scorporati in base all'eziologia virale, probabilmente a causa di un progressivo accumulo di alterazioni genetiche con l'aggravarsi della malattia, legato anche all'aumento di danno ossidativo riscontrato. L'accorciamento dei telomeri quindi potrebbe essere o accelerato o diminuito da modificazioni nello stato dello stress ossidativo, ma non è del tutto noto il ruolo dello stesso nell'influenzare l'attività telomerasica nei tessuti umani. Una possibile spiegazione per questa osservazione è che l'accorciamento telomerico indotto dallo stress ossidativo raggiunga una lunghezza critica che causa la trascrizione genica di *TERT* e l'attivazione della telomerasi [101].

La telomerasi è una trascrittasi inversa che ha come funzione principale quella di mantenere la lunghezza dei telomeri. Recentemente è stato dimostrato che l'attività telomerasica può essere modificata dallo stress ossidativo e contribuire all'accorciamento telomerico [81]. Di conseguenza lo stress ossidativo può portare ad un accorciamento telomerico danneggiando il DNA dei telomeri e alterando i livelli di telomerasi. Come premessa all'analisi dei nostri risultati, va sottolineata l'importanza di aver standardizzato, in questo studio, le condizioni più idonee per l'analisi quantitativa in Real Time PCR di questa attività, al fine di utilizzare questo metodo in modo routinario anche eventualmente in altri distretti dell'organismo. Normalmente l'attività della telomerasi nella maggior parte degli studi viene analizzata negli estratti proteici cellulari utilizzando il TRAP che, come già descritto, permette solamente una valutazione qualitativa (presenza/assenza) a differenza della metodica in Real Time PCR-TRAP che consente una misurazione accurata e riproducibile. Questa metodica consente di misurare l'attività telomerasica tissutale grazie alla capacità intrinseca di questo enzima di sintetizzare DNA *de novo in vitro* partendo da estratti proteici cellulari. La precisione, l'accuratezza e la sensibilità di questa procedura consentono di evitare di sottoporre gli amplificati ad ulteriori, complesse e lunghe analisi post-PCR. I nostri risultati hanno dimostrato che, nel complesso, l'attività telomerasica è significativamente più alta nei TU-HCC rispetto a quella riscontrata nei tessuti con stadio di malattia meno avanzato, dove l'attività dell'enzima è pressoché nulla, in particolare nei tessuti di controllo.

Come ricordato nell'introduzione, lo stress ossidativo è uno dei meccanismi coinvolti nel processo carcinogenetico alterando il DNA anche attraverso meccanismi epigenetici. Inoltre, la telomerasi, che gioca un ruolo importante nell'immortalizzazione cellulare, è fortemente attivata nei tessuti tumorali e la sua espressione è strettamente regolata da diversi fattori, tra cui modificazioni nello

stato di metilazione del promotore che codifica per la sua subunità catalitica. I nostri risultati mostrano un'ipermetilazione del promotore del gene che codifica per *TERT* nei TU-HCC rispetto agli stadi iniziali di malattia sia nel gruppo dei pazienti con HCV che in quelli con HBV. Tuttavia non vi è alcuna correlazione con l'attività della telomerasi che comunque risulta fortemente aumentata in questi tessuti. Questo risultato è in contrasto con il modello generale di regolazione della metilazione del DNA, in cui la presenza di citosine metilate nel promotore non consente la trascrizione del gene. La distribuzione della metilazione del DNA è significativamente differente tra *TERT* ed altri geni regolati da meccanismi epigenetici. Infatti in questi geni tutti i siti CpG presenti nel promotore e nel primo esone sono completamente metilati mentre per *TERT* queste regioni sono completamente metilate nel promotore, ma solo parzialmente nel primo esone. La parziale demetilazione di questa regione sembrerebbe svolgere un importante ruolo nella regolazione del promotore di *TERT* [87]. Numerosi studi, infatti, hanno mostrato che lo stato di metilazione del promotore non correla con i livelli di espressione della proteina in vari tipi di cancro, suggerendo che altri meccanismi, come la modificazione degli istoni, potrebbero essere coinvolti nella regolazione di *TERT*. Tuttavia, questo dato potrebbe essere spiegato anche dal fatto che la regione core del promotore di *TERT*, che è stata presa in considerazione in questo studio, è nota contenere numerose sequenze consenso come E-boxes, GC-boxes, siti consenso Ets, E2F e noti fattori di trascrizione che sono coinvolti nella sua regolazione come Sp1, ER, Ets, AP1, E2Fs, NF- $\kappa$ B e c-Myc. L'espressione di *TERT* nelle cellule somatiche normali è attivata dalla sovraespressione del protooncogene c-Myc il quale agisce come importante regolatore trascrizionale di *TERT* dal momento che si lega alle sequenze di DNA contenenti un sito CpG [105]. E' noto infatti che c-Myc è un fattore trascrizionale sensibile allo stato di metilazione del DNA:

quando il DNA è ipermetilato, c-Myc legato all'E-box di *TERT* ne attiva l'espressione, mentre quando il promotore di *TERT* non è metilato, c-Myc inattiva l'espressione di *TERT*. Differenti combinazioni di fattori di trascrizione e di meccanismi epigenetici possono regolare l'espressione di *TERT*, suggerendo che la regolazione post-trascrizionale di *TERT* è specifica del tipo di cancro [106]. Nel processo di senescenza replicativa lo stress ossidativo coinvolge anche la disfunzione mitocondriale. I mitocondri giocano un importante ruolo nel metabolismo energetico delle cellule sintetizzando ATP, tuttavia durante questo processo producono ROS che possono danneggiare il mtDNA [107]. L'aumentata produzione di ROS e il danno al mtDNA soggetto a meccanismi di riparazione poco efficienti rispetto a quelli del DNA genomico, portano ad un aumento della permeabilità di membrana e alla fuoriuscita di fattori pro-apoptotici. Inoltre recenti dati in letteratura riportano che lo stress ossidativo possa indurre una migrazione di *TERT* al citosol, in seguito alla fosforilazione della tirosina 707 da parte della chinasi Src, modificando l'attività nucleare della telomerasi [46, 108]. Mediante western blotting è stato possibile determinare nei nostri campioni tissutali di HCC, che, come abbiamo discusso precedentemente, sono caratterizzati da un elevato danno genomico ossidativo, la localizzazione di *TERT* e la sua traslocazione dal nucleo ai mitocondri. I nostri dati dimostrano la presenza mitocondriale della subunità catalitica della telomerasi in quanto co-localizzata con TOM-40, una proteina della membrana esterna dei mitocondri. Quindi, una volta verificata la presenza mitocondriale di *TERT*, siamo andati a valutare una possibile funzione extra-nucleare della proteina. Innanzitutto abbiamo verificato se *TERT* a livello mitocondriale potesse avere attività telomerasica mediante l'analisi in Real-Time PCR-TRAP. I dati ottenuti hanno dimostrato l'assenza dell'attività canonica della proteina, e quindi sostengono che la subunità di RNA della telomerasi non sia presente nei mitocondri o comunque non sia richiesta per la funzione di *TERT* in

questi organelli. Questo dato non ci sorprende dal momento che il mtDNA è una molecola circolare, quindi priva delle sequenze telomeriche, rendendo di fatto improbabile che la funzione mitocondriale di TERT sia la stessa di quella nucleare. Infine abbiamo analizzato anche il danno ossidativo a livello del mtDNA valutando i livelli dell'addotto 8-OHdG nel gruppo di campioni dove è stata riscontrata la presenza mitocondriale di TERT. I dati ottenuti hanno mostrato livelli significativamente più elevati di danno ossidativo a livello nucleare rispetto a quello mitocondriale ed evidenziato una correlazione tra il danno ossidativo nucleare e quello mitocondriale nei pazienti con HCC. Tuttavia, i dati relativi alla funzione mitocondriale di TERT sono ancora contrastanti: alcuni studi riportano un ruolo negativo della telomerasi mitocondriale che sembrerebbe avere un ruolo pro-apoptotico, aumentando il danno mitocondriale e lo stress ossidativo [109]. Altri Autori, invece, dimostrano un effetto positivo di TERT che sembrerebbe coinvolta nella protezione dei mitocondri riducendo lo stress ossidativo [46]. Quindi quale sia la funzione di TERT a livello mitocondriale è ancora oggetto di discussione, ma una delle ipotesi più accreditate è che possa giocare un ruolo nella modulazione dell'apoptosi. Infatti secondo Haendeler J. e colleghi [110], TERT interagisce con il mtDNA migliorando l'attività della catena di trasporto degli elettroni e proteggendo la cellula dal danno ossidativo ROS-indotto. In particolare è stato dimostrato che TERT interagisce con 2 regioni contenenti le sequenze codificanti per la NADH: ubichinone ossido riduttasi (ND1 e ND2). In questo modo, TERT mitocondriale riuscirebbe a contrastare la produzione di ROS da parte del complesso I della catena respiratoria, riducendo il danno ossidativo. Questo meccanismo ridurrebbe la permeabilità della membrana mitocondriale ed eviterebbe la fuoriuscita di fattori pro-apoptotici. La riduzione dei segnali apoptotici in un contesto di stress ossidativo cronico, di instabilità

genomica e di aumentata proliferazione cellulare favorirebbe la trasformazione in senso neoplastico.

## **CONFRONTO TRA I MECCANISMI DI DANNO EPATICO DA HBV E HCV**

In questo lavoro abbiamo tentato di definire i meccanismi molecolari che sono alla base della carcinogenesi epatica associata ad HBV o HCV. Infatti, come ricordato nell'introduzione, le infezioni virali croniche HCV e HBV correlate sono importanti fattori di rischio associati allo sviluppo dell'HCC. Dalla scoperta dell'HCV e dell'HBV, sono stati fatti notevoli passi avanti verso la comprensione della biologia molecolare di questi virus nonché degli eventi molecolari, cellulari e delle vie di trasduzione del segnale che vengono alterate in seguito ad epatiti croniche HBV e HCV correlate.

In particolare sia l'HBV che l'HCV portano alla trasformazione maligna degli epatociti mediante infiammazione cronica e la produzione e la persistenza dello stress ossidativo. Tuttavia i meccanismi mediante i quali si crea uno sbilanciamento nell'equilibrio ossidativo delle cellule epatiche in seguito alla replicazione virale sono differenti in base al tipo di virus considerato. Infatti, l'infezione HBV correlata causa stress ossidativo principalmente in seguito a meccanismi indiretti legati alla risposta immunitaria dell'ospite, mentre l'HCV causa danno ossidativo sia mediante la risposta immunologica sia mediante l'interazione diretta di proteine virali (proteina Core). Questi differenti meccanismi di induzione di stress ossidativo spiegherebbero il differente andamento di accumulo di 8-OHdG nella progressione della malattia epatica virus-correlata, da noi riscontrato. Infatti i pazienti con epatite cronica HBV-correlata mostrano un più tardivo e progressivo accumulo di danno ossidativo che aumenta significativamente solo nelle ultime fasi di malattia. I pazienti con infezione da

HCV, invece, mostrano già nelle fasi precoci della malattia epatica un più elevato danno ossidativo rispetto al gruppo dei pazienti con epatite cronica HBV-correlata, come confermato dalla differenza statisticamente significativa riscontrata tra i livelli di 8-OHdG nelle prime fasi di malattia (fibrosi stadio 0-2) nei due gruppi considerati. Questi dati sono la conferma del fatto che il virus C induce stress ossidativo persistente già nelle prime fasi di infezione. Tuttavia, nonostante queste differenze nei livelli di 8-OHdG, nella progressione della malattia virale, il DNA telomeric, indice di stabilità genomica, sia nel gruppo delle epatiti HBV che HCV correlate, mostra un andamento simile nelle differenti fasi di malattia con un accorciamento significativo nei TU-HCC. In questo contesto, di alterato equilibrio ossidativo, è noto che le infezioni croniche da HBV e HCV inducono un danno cronico al fegato creando un microambiente caratterizzato da infiammazione e continua rigenerazione degli epatociti portando allo sviluppo dell'HCC. Tuttavia, mentre si sa molto riguardo l'impatto dello stress ossidativo sugli epatociti, ancora molto rimane da chiarire riguardo al ruolo della disfunzione telomerica. Di particolare importanza infatti è lo studio sull'attività della telomerasi. Dallo studio della progressione della malattia epatica legata alle due differenti infezioni virali, la telomerasi ha mostrato un significativo aumento nelle ultime fasi di malattia (fibrosi stadio 3, 4, NTU-HCC e TU-HCC) a conferma dell'importanza dell'enzima nella continua proliferazione e immortalizzazione cellulare. Tuttavia l'attivazione della telomerasi avviene in momenti diversi nella progressione della malattia epatica virus-correlata verso l'HCC. Infatti, nel gruppo delle epatiti croniche HCV-correlata la telomerasi presenta un'attività significativamente più alta già nelle fasi pre-cancerose (fibrosi stadio 3, 4 e NTU-HCC) rispetto al gruppo con epatite cronica HBV correlata dove l'attività dell'enzima è praticamente nulla e aumenta solo nei TU-HCC. Questa differente attivazione della telomerasi rispecchia l'andamento dell'accumulo di danno

genomico ossidativo. Infatti nelle epatiti HCV correlate, dove i livelli di 8-OHdG sono alti già nelle prime fasi di malattia, si ha un'attivazione precoce della telomerasi, che invece nelle epatiti HBV-correlate si attiva solo nelle fasi terminali di malattia, quando ormai il danno genomico ossidativo è elevato.

Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere i meccanismi riguardo le modificazioni genetiche ed epigenetiche che le infezioni da HBV e HCV inducono negli epatociti. In questo lavoro è stato valutato il ruolo dell'epigenetica nella malattia epatica HBV e HCV-correlata studiando lo stato di metilazione del promotore di TERT che ha mostrato una ipermetilazione nelle fasi terminali della malattia sia nel gruppo delle epatiti HBV che HCV correlate.

In conclusione, quindi, anche se l'HBV e l'HCV presentano caratteristiche patogenetiche e cliniche differenti, possono alterare la fisiologia degli epatociti e utilizzare meccanismi simili per la progressione della malattia epatica verso l'HCC.



## **CONCLUSIONI**

Riassumendo questo lavoro ha dimostrato:

- un aumento significativo del danno genomico ossidativo che si accumula progressivamente dall'epatite cronica all'HCC, ma non correla con il polimorfismo del gene *OGG1*;
- una particolare cinetica della lunghezza dei telomeri durante la progressione del danno epatico, con un iniziale accorciamento nelle fasi precoci di malattia e un secondo nell'HCC;
- un aumento dell'attività della telomerasi nei pazienti con stadio di malattia più avanzato ed in particolare nei tessuti tumorali;
- un maggior grado di metilazione del promotore del gene che codifica per *TERT* negli HCC;
- la localizzazione di TERT a livello mitocondriale nei tessuti tumorali.

Infine alcune considerazioni vanno fatte relativamente ai pazienti con epatite cronica HBV-correlata dove il danno genomico ossidativo è un evento più tardivo e l'accumulo avviene in modo più marcato solo nelle fasi finali della malattia epatica. Inoltre anche la telomerasi e la sua regolazione mediante metilazione del promotore di *TERT* sono significativamente aumentate solo nei tessuti tumorali del gruppo degli HCC.

In conclusione, questi dati descrivono un complesso network di eventi dove il danno ossidativo è legato a cambiamenti a livello della lunghezza telomerica, all'attivazione della telomerasi e alla metilazione del promotore di *TERT*. Questi meccanismi seguono un andamento differente nella storia naturale della patologia epatica HCV e HBV correlata. Infine il ruolo mitocondriale di TERT è

ancora un argomento di discussione, sebbene l'ipotesi più accreditata riguarda il suo ruolo nella modulazione dell'apoptosi.

Lo studio, quindi, potrà dare oltre ad un importante contributo alla conoscenza dei meccanismi molecolari alla base del processo di progressione del danno e di carcinogenesi epatica virus-correlata, anche alla valutazione di nuovi potenziali fattori prognostici utili nell'epatopatia cronica virus-correlata e nell'HCC per definire strategie in grado di rallentare la progressione del danno epatico.

Tuttavia rimane di fondamentale interesse investigare l'effettivo peso dei vari parametri sino ad oggi studiati e di altri possibili futuri meccanismi per compensare la forbice tra ipotesi e conoscenza oggettiva della patogenesi.

## **BIBLIOGRAFIA**

[1] Basaga H S. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68:989-998.

[2] Sasaki Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma?. *J Gastroenterol* 2006; 41:1135-1148.

[3] Demopoulos H B, Pietronigro DD, Flamm ES, Seligman ML. The possible role of free radical reactions in carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 3:273-303.

[4] Kryston T B, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011; 711:193-201.

[5] Fantone J C, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982; 107:395-418.

[6] Lieber C S. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med* 1988; 319:1639-1650.

[7] Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:449-456.

[8] Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011; 711:167-173.

[9] Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett* 1995; 93:113-120.

- [10] Cerda S, Weitzman SA. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat Res* 1997; 386:141-152.
- [11] Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391:499-510.
- [12] Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y et al. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:353-362.
- [13] Fujita N, Sugimoto R, Ma N, Tanaka H, Iwasa M, Kobayashi Y et al. Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis B and C. *J Viral Hepat* 2008; 15:498-507.
- [14] Ock C Y, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2012; 18:302-308.
- [15] Tanaka H, Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, Horiike S, Kobayashi Y et al. Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Br J Cancer* 2008; 98:580-586.
- [16] Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med* 2012; 52:7-18.
- [17] Rodriguez H, Jurado J, Laval J, Dizdaroglu M. Comparison of the levels of 8-hydroxyguanine in DNA as measured by gas chromatography mass spectrometry

following hydrolysis of DNA by Escherichia coli Fpg protein or formic acid. Nucleic Acids Res 2000; 28:E75.

[18] European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. Free Radic Biol Med 2003; 34:1089-1099.

[19] ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. Carcinogenesis 2002; 23:2129-2133.

[20] Park J, Chen L, Tockman MS, Elahi A, Lazarus P. The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk. Pharmacogenetics 2004; 14:103-109.

[21] Tarng D C, Tsai TJ, Chen WT, Liu TY, Wei YH. Effect of human OGG1 1245C-->G gene polymorphism on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels of leukocyte DNA among patients undergoing chronic hemodialysis. J Am Soc Nephrol 2001; 12:2338-2347.

[22] Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. Oncogene 1998; 16:3219-3225.

[23] Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. FEBS Lett 1999; 453:365-368.

- [24] Houben J M, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress?. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:235-246.
- [25] Saliques S, Teyssier JR, Vergely C, Lorgis L, Lorin J, Farnier M et al. Circulating leukocyte telomere length and oxidative stress: a new target for statin therapy. *Atherosclerosis* 2011; 219:753-760.
- [26] Monaghan P. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1206:130-142.
- [27] HAYFLICK L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614-636.
- [28] Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:729-740.
- [29] Shay J W, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* 2011; 21:349-353.
- [30] Campisi J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21:107-112.
- [31] Stern J L, Bryan TM. Telomerase recruitment to telomeres. *Cytogenet Genome Res* 2008; 122:243-254.
- [32] Belgiovine C, Chiodi I, Mondello C. Telomerase: cellular immortalization and neoplastic transformation. Multiple functions of a multifaceted complex. *Cytogenet Genome Res* 2008; 122:255-262.

- [33] Masutomi K, Hahn WC. Telomerase and tumorigenesis. *Cancer Lett* 2003; 194:163-172.
- [34] Podlevsky J D, Chen JJ. It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat Res* 2012; 730:3-11.
- [35] Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:e134.
- [36] Hou M, Xu D, Bjorkholm M, Gruber A. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem* 2001; 47:519-524.
- [37] Cong Y S, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66:407-25.
- [38] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28:1057-1068.
- [39] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59:551-557.
- [40] Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2012; 498:135-146.
- [41] Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res* 2012; 42:741-749.

- [42] Cottrell S E. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem* 2004; 37:595-604.
- [43] Chiodi I, Mondello C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol* 2012; 2:133.
- [44] Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol* 2009; 44:485-492.
- [45] Sharma N K, Reyes A, Green P, Caron MJ, Bonini MG, Gordon DM et al. Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2012; 40:712-725.
- [46] Indran I R, Hande MP, Pervaiz S. hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71:266-276.
- [47] Sawyer D E, Van Houten B. Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res* 1999; 434:161-176.
- [48] Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci* 2008; 121:1046-1053.
- [49] Gordon D M, Santos JH. The emerging role of telomerase reverse transcriptase in mitochondrial DNA metabolism. *J Nucleic Acids* 2010; 2010:10.4061/2010/390791.
- [50] Tell G, Vascotto C, Tiribelli C. Alterations in the redox state and liver damage: Hints from the EASL Basic School of Hepatology. *J Hepatol* 2012.

- [51] Marra M, Sordelli IM, Lombardi A, Lamberti M, Tarantino L, Giudice A et al. Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J Transl Med* 2011; 9:171-5876-9-171.
- [52] Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42 Suppl 3:S206-14.
- [53] Bosch F X, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127:S5-S16.
- [54] La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C. The rise and fall in primary liver cancer mortality in Italy. *Dig Liver Dis* 2002; 34:169-171.
- [55] Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Continuing declines in cancer mortality in the European Union. *Ann Oncol* 2007; 18:593-595.
- [56] El-Serag H B, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132:2557-2576.
- [57] Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009; 27:80-92.
- [58] Farazi P A, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:674-687.
- [59] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134:1655-1669.

- [60] Severi T, van Malenstein H, Verslype C, van Pelt JF. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31:1409-1420.
- [61] Aravalli R N, Cressman EN, Steer CJ. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol* 2012.
- [62] Adams L A, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22:1129-1133.
- [63] Farrell G C, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:S99-S112.
- [64] Thorgeirsson S S, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31:339-346.
- [65] Limdi J K, Crampton JR. Hereditary haemochromatosis. *QJM* 2004; 97:315-324.
- [66] Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* 2000; 76:4-11.
- [67] Sarkany R P. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26:225-232.
- [68] Parfrey H, Mahadeva R, Lomas DA. Alpha(1)-antitrypsin deficiency, liver disease and emphysema. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:1009-1014.
- [69] Tanguay R M, Jorquera R, Poudrier J, St-Louis M. Tyrosine and its catabolites: from disease to cancer. *Acta Biochim Pol* 1996; 43:209-216.

- [70] Block T M, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22:5093-5107.
- [71] Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001; 276:34671-34680.
- [72] Bouchard M J, Navas-Martin S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. *Cancer Lett* 2011; 305:123-143.
- [73] Giannini C, Brechot C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ* 2003; 10 Suppl 1:S27-38.
- [74] Jahan S, Ashfaq UA, Qasim M, Khaliq S, Saleem MJ, Afzal N. Hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2012; 7:2-9378-7-2.
- [75] Choi J, Ou JH. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G847-51.
- [76] Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol* 2011; 8:258-269.
- [77] Klaunig J E, Kamendulis LM, Hoocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010; 38:96-109.
- [78] Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H et al. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61:4365-4370.

[79] Jain S, Singhal S, Lee P, Xu R. Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am J Transl Res* 2010; 2:105-118.

[80] Ierardi E, Rosania R, Zotti M, Giorgio F, Prencipe S, Valle ND et al. From chronic liver disorders to hepatocellular carcinoma: Molecular and genetic pathways. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2:259-264.

[81] Ozturk M, Arslan-Ergul A, Bagislar S, Senturk S, Yuzugullu H. Senescence and immortality in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2009; 286:103-113.

[82] Knodell R G, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-435.

[83] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696-699.

[84] Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res* 1996; 316:277-285.

[85] Cawthon R M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e47.

[86] Herman J G, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:9821-9826.

[87] Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:1037-1043.

[88] Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2007; 2:287-295.

[89] Tsai W L, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010; 29:2309-2324.

[90] Stewart S A, Bertuch AA. The role of telomeres and telomerase in cancer research. *Cancer Res* 2010; 70:7365-7371.

[91] Bortolami M, Kotsafti A, Cardin R, Farinati F. Fas / FasL system, IL-1beta expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease. *J Viral Hepat* 2008; 15:515-522.

[92] Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Guido M, Rugge M. Oxidative damage, pro-inflammatory cytokines, TGF-alpha and c-myc in chronic HCV-related hepatitis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2065-2069.

[93] Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Burra P, Russo FP, Rugge M et al. Hepatitis C virus: from oxygen free radicals to hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2007; 14:821-829.

[94] Farinati F, Picciocchi M, Lavezzo E, Bortolami M, Cardin R. Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase induction in carcinogenesis. *Dig Dis* 2010; 28:579-584.

[95] Li S, Wang X, Wu Y, Zhang H, Zhang L, Wang C et al. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine expression predicts hepatocellular carcinoma outcome. *Oncol Lett* 2012; 3:338-342.

[96] Jung S W, Park NH, Shin JW, Park BR, Kim CJ, Lee JE et al. Polymorphisms of DNA repair genes in Korean hepatocellular carcinoma patients with chronic hepatitis B: possible implications on survival. *J Hepatol* 2012; 57:621-627.

[97] Romilda C, Marika P, Alessandro S, Enrico L, Marina B, Andromachi K et al. Oxidative DNA damage correlates with cell immortalization and mir-92 expression in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12:177-2407-12-177.

[98] Gwak G Y, Lee DH, Moon TG, Choi MS, Lee JH, Koh KC et al. The correlation of hepatitis B virus pre-S mutation with cellular oxidative DNA damage in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2008; 55:2028-2032.

[99] Brown K E, Meleah Mathahs M, Broadhurst KA, Coleman MC, Ridnour LA, Schmidt WN et al. Increased hepatic telomerase activity in a rat model of iron overload: a role for altered thiol redox state?. *Free Radic Biol Med* 2007; 42:228-235.

[100] Hou L, Zhang X, Gawron AJ, Liu J. Surrogate tissue telomere length and cancer risk: shorter or longer?. *Cancer Lett* 2012; 319:130-135.

[101] Prescott J, Wentzensen IM, Savage SA, De Vivo I. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res* 2012; 730:75-84.

[102] von Figura G, Hartmann D, Song Z, Rudolph KL. Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87:1165-1171.

[103] Calado R T, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med* 2009; 361:2353-2365.

[104] Svenson U, Roos G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792:317-323.

[105] Zhu J, Zhao Y, Wang S. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein Cell* 2010; 1:22-32.

[106] Iliopoulos D, Satra M, Drakaki A, Poultsides GA, Tsezou A. Epigenetic regulation of hTERT promoter in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2009; 34:391-399.

[107] Yen H H, Shih KL, Lin TT, Su WW, Soon MS, Liu CS. Decreased mitochondrial deoxyribonucleic acid and increased oxidative damage in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2012; 18:5084-5089.

[108] Chen Y, Kong Q. Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase: a critical process in chemical induced hepatocellular carcinogenesis. *Neoplasma* 2010; 57:222-227.

[109] Santos J H, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet* 2006; 15:1757-1768.

[110] Haendeler J, Droese S, Buchner N, Jakob S, Altschmied J, Goy C et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects

mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*  
2009; 29:929-935.