



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

“P.G. CEVESE”

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E

MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

CICLO: XX

## **MECCANISMI ESTRINSECI ED INTRINSECI DEL PROCESSO APOPTOTICO NELL'EPATOCARCINOGENESI**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. PIER PAOLO PARNIGOTTO

**Supervisore :** Dott.ssa MARINA BORTOLAMI

**Dottoranda :** ANDROMACHI KOTSAFTI

31 gennaio 2008

## Indice.

Sommario.....	1
Summary.....	9
1. Introduzione.....	17
1.1 Apoptosi.....	17
1.2 Il sistema Fas/FasL.....	17
1.3 TNF- $\alpha$ .....	19
1.4 Famiglia delle proteine Bcl-2.....	21
1.5 Bax 1 inibitore.....	22
1.6 IL-1 $\beta$ .....	23
1.7 TGF- $\beta$ .....	26
1.8 NF-kB.....	27
2. Apoptosi e fegato.....	29
2.1 Epatopatie.....	29
2.2 Apoptosi epatocitaria.....	32
3. Scopi della tesi.....	35
4. Materiali e metodi.....	37
4.1 Casistica.....	37
4.2 Tessuti.....	37
4.3 Estrazione del RNA totale.....	38
4.4 RT-PCR .....	39
4.5 PCR.....	40
4.6 PCR primers.....	40
4.7 PCR Semiquantitativa.....	40
4.8 Preparazione curve standard per Real-Time PCR.....	40
4.9 Purificazione del DNA.....	41
4.10 Quantificazione spettrofotometrica del DNA purificato.....	42
4.11 Quantificazione fluorimetrica del DNA purificato .....	42
4.12 Elettroforesi su gel di poliacrilamide.....	43
4.13 Analisi Densitometrica.....	44
4.14 SYBR Green I Real Time PCR.....	44
4.15 Analisi dei dati di PCR.....	45
4.16 Analisi di proteine.....	45
4.17 Colture epatocitarie.....	47
4.17a Allestimento di colture cellulari.....	48
4.17b Stimolazione delle colture cellulari.....	48
5. Risultati.....	49

5.1 Cinetiche.....	49
5.2 Curve standard.....	49
5.3 Real Time PCR.....	49
5.4 Espressione di mRNA nei tessuti epatici.....	50
5.4a Espressione di mRNA di Fas.....	50
5.4b Espressione di mRNA di FasL .....	51
5.4c Espressione di mRNA di IL-1 $\beta$ .....	51
5.4d Espressione di mRNA di TNF- $\alpha$ .....	51
5.4e Espressione di mRNA di TGF $\beta$ -1.....	52
5.4f Espressione di mRNA di Bcl-2.....	52
5.4g Espressione di mRNA di Bax.....	52
5.4h Espressione di mRNA di Bad.....	53
5.4i Espressione di mRNA di BI-1.....	53
5.4j Espressione di mRNA di NF-kB.....	53
5.5 Espressione proteica di NF-kB.....	53
5.6 Risultati colture epatocitarie.....	54
5.6a Effetti delle condizioni di coltura sull'espressione dei trascritti Fas/FasL, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, Bcl-2. Bax, Bad, BI-1 ed NF-kB.....	54
5.6b Stimolazione con TNF- $\alpha$ .....	54
5.6c Stimolazione con Staurosporina (STS).....	55
5.6d Stimolazione con LY294002.....	56
5.6e Pretrattamento con STS e LY294002.....	56
5.7 Analisi statistica.....	56
6. Discussione.....	57
7. Bibliografia.....	65
8. Figure e tabelle.....	77

## **0. Sommario**

### **Introduzione**

I meccanismi alla base della stretta interrelazione tra infezioni virali, cirrosi e sviluppo di HCC sono stati intensivamente investigati ma nonostante ciò, diversi aspetti sono ancora sconosciuti o compresi solo in parte. I virus epatici sarebbero coinvolti nella trasformazione neoplastica sia attraverso meccanismi indiretti, dovuti all'infiammazione, sia a meccanismi diretti, dovuti alla capacità di alcune proteine virali di modulare la proliferazione e la morte delle cellule infettate. È stato inoltre ipotizzato che una disregolazione del processo apoptotico nelle cellule infettate possa determinare la cronicizzazione dell'infezione, la mancata risposta al trattamento con antivirali e la trasformazione neoplastica.

Sebbene l'apoptosi possa essere scatenata da diversi stimoli, il segnale apoptotico all'interno della cellula viene tradotto principalmente attraverso due distinte vie molecolari: la via estrinseca, in cui il legame ligando/recettore (Fas/FasL, TNF- $\alpha$ /TNFR1-R2) attiva i domini di morte; e la via intrinseca o mitocondriale (Bcl-2, Bax, Bad).

Accanto a questi mediatori sono stati studiati altri sistemi recettoriali che coinvolgono IL-1 $\beta$  e TGF $\beta$ -1 ma anche mediatori intrinseci come Bcl-2 ed NF- $\kappa$ B.

In questo studio è stata valutata l'espressione di mRNA dei mediatori estrinseci ed intrinseci del processo apoptotico sopra citati, in biopsie e tessuti chirurgici ottenuti da pazienti con diversi stadi di malattia epatica mediante tecniche di amplificazione genica.

Sulla base dei risultati ottenuti sono state allestite colture primarie di epatociti umani trattate con TNF- $\alpha$  ed inibitori delle protein chinasi, quali Staurosporina e LY294002 al fine di valutare l'attivazione e/o inibizione di tali mediatori nel processo apoptotico.

### **Scopi della tesi**

La prima fase dello studio prevedeva la:

- 1) quantificazione dell'espressione di RNA messaggeri di Fas /FasL, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-2 ed NF- $\kappa$ B in campioni di fegato ottenuti da pazienti con epatite cronica, cirrosi ed HCC

- 2) valutazione del ruolo svolto dal tipo d'infezione virale (HBV o HCV indotta) nella modulazione di fattori pro ed anti apoptotici.
- 3) determinazione dell'espressione proteica mediante tecnica di Western Blott in campioni di fegato di soggetti con HCC.

La seconda fase dello studio prevedeva:

- 4) allestimento di colture primarie di epatociti
- 5) valutazione delle diverse vie di attivazione dell'apoptosi nelle colture epatocitarie umane dopo stimolazione con:
  - a) TNF- $\alpha$ , principale citochina proinfiammatoria presente ad elevati livelli nei processi infiammatori, durante la malattia epatica;
  - b) Staurosporina (STS) potente inibitore delle proteine tiroxina/serina chinasi con attività antiproliferativa ed anti-apoptotica;
  - c) LY294002, inibitore sintetico delle PI3K (Fosfatidil inositol-3-chinasi)

## **Materiali e metodi**

Sono stati esaminati tessuti epatici ottenuti da: 39 pazienti con epatite cronica (EC), 7 con cirrosi (CIRR), 13 con carcinoma epatocellulare insorto su tessuto cirrotico (HCC) ed infine 3 soggetti di controllo.

Per lo studio "in vitro" sono state allestite colture primarie di epatociti umani ottenuti da fegati non idonei al trapianto .

L'espressione dell'mRNA di Fas/FasL, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  è stata valutata mediante PCR semiquantitativa mentre l'espressione dei trascritti per Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, NF-kB e TGF $\beta$ -1 è stata valutata mediante Real Time PCR quantitativa assoluta.

L'analisi proteica, nei campioni di fegato di soggetti con HCC, è stata valutata mediante tecnica di Western Blot.

## **Risultati**

### TESSUTI:

#### Espressione di Fas/FasL:

I tessuti cirrotici senza tumore (CIRR) esprimevano i più alti livelli sia di Fas che di FasL rispetto all'HCC (p=0,026 e p=0,005 rispettivamente). I trascritti di FasL risultavano inoltre aumentati in maniera statisticamente

significativa nei tessuti CIRR, rispetto ai tessuti cirrotici peritumorali (PHCC) ( $p=0,018$ ).

#### Espressione di IL-1 $\beta$ :

I livelli di mRNA per IL-1 $\beta$  erano maggiori nei tessuti PHCC sia rispetto ai tessuti con epatite cronica (EC) ( $p<0,0001$ ) che rispetto ai tessuti CIRR ( $p=0,005$ ).

#### Espressione di TNF- $\alpha$ :

Nei tessuti PHCC e nei tessuti con HCC è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa di TNF- $\alpha$  rispetto ai tessuti cirrotici senza tumore ( $p=0,038$  e  $p=0,05$  rispettivamente).

#### Espressione di TGF $\beta$ -1:

Nei tessuti con EC sono stati osservati i più bassi livelli di mRNA per TGF $\beta$ -1, statisticamente significativi rispetto sia ai tessuti con HCC ( $p=0,014$ ) che a quelli PHCC ( $p=0,028$ ).

#### Espressione di Bcl-2:

I tessuti cirrotici peritumorali esprimevano maggiori livelli di mRNA per Bcl-2 con differenze statisticamente significative tra: PHCC vs Contr ( $p=0,026$ ), PHCC vs EC ( $p=0,0004$ ), PHCC vs CIRR ( $p=0,05$ ).

#### Espressione di BI-1:

E' stata osservata una progressiva diminuzione dei livelli di BI-1 in relazione alla gravità della malattia nelle EC vs CIRR ( $p=0,033$ ) e CIRR vs HCC ( $p=0,019$ ).

#### Espressione di Bad:

Nei tessuti di controllo sono stati osservati i più alti livelli di mRNA per Bad, statisticamente significativi rispetto a tutti gli altri tessuti (Contr vs EC  $p=0,006$ ; Contr vs PHCC  $p=0,0005$ , Contr vs HCC  $p=0,002$ ). Differenze statisticamente significative nell'espressione di Bad sono state inoltre osservate tra i tessuti con EC vs PHCC ( $p=0,00006$ ) e tra EC vs HCC ( $p=0,0007$ ).

#### Espressione di Bax:

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nell'espressione di Bax nei tessuti considerati.

#### Espressione di NF- $\kappa$ B:

I tessuti di controllo presentavano i più bassi livelli di trascritti per NF- $\kappa$ B statisticamente significativi rispetto ai tessuti con EC ( $p=0,05$ ) ed ai tessuti PHCC ( $p=0,05$ ).

#### Ruolo dei virus B e C nella malattia epatica:

Suddividendo i tessuti in base al tipo di infezione virale (HCV o HBV) solo nei tessuti ottenuti da pazienti con EC HCV-correlati è stata osservata una maggior espressione statisticamente significativa dei livelli di mRNA per IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  rispetto ai tessuti con EC HBV-correlati ( $p < 0,0025$ ,  $p < 0,001$  rispettivamente). Mentre i tessuti con EC HBV-correlati presentavano un aumento dei trascritti di Bad significativo, rispetto ai tessuti con EC HCV-correlati ( $p = 0,018$ ).

#### EPATOCITI:

##### Stimolazione con TNF- $\alpha$ :

Gli epatociti stimolati con TNF- $\alpha$  esprimevano aumentati livelli statisticamente significativi rispetto alle cellule con solo medium di FasL (solo a 12h), IL-1 $\beta$  (fino a 24h), TGF $\beta$ -1 (24 e 48h), Bcl-2 (4h, 24h), Bad (24 e 48h) ed NF-kB (8h).

Nessuna differenza è stata osservata nell'espressione di Fas, Bax, Bad (fino a 12h), NF-kB (fino a 4h) e TGF $\beta$ -1 (fino a 12h).

##### Stimolazione con Staurosporina (STS):

Epatociti stimolati con STS esprimevano bassi livelli statisticamente significativi rispetto agli epatociti in presenza di solo medium solo di Bcl-2 fino a 48h. Nessuna differenza per quanto riguarda l'espressione di TGF $\beta$ -1, Bax, ed NF-kB. Mentre si osservava un'aumentata espressione di Bad solo a 12h e di BI-1 a 8 e 24h.

##### Stimolazione con LY294002:

Dopo stimolazione degli epatociti con LY294002 si osservava un'inibizione di Bcl-2 fino a 24h, rispetto agli epatociti incubati con solo medium. Nessuna differenza è stata osservata nell'espressione di TGF $\beta$ -1, Bax, ed NF-kB mentre sono stati trovati aumentati livelli di Bad a 12, 24 e 48h e di BI-1 a partire da 8 fino a 48h d'incubazione.

##### Pretrattamento con STS e LY294002:

Il pretrattamento delle cellule con LY294002 un'ora prima della stimolazione con TNF- $\alpha$  inibiva in maniera statisticamente significativa l'espressione di Bcl-2 fino a 48h. Tale inibizione era completamente risolta dopo 48h di stimolazione.

Nelle cellule pretrattate con LY294002 rispetto alle cellule trattate con solo TNF- $\alpha$ , si osservavano livelli aumentati in maniera significativa di Bax dopo 4h, Bad dopo 24h e BI-1 dopo 24h d'incubazione.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nell'espressione di TGF $\beta$ -1 ed NF-kB.

Mentre nelle cellule pretrattate con STS soltanto i trascritti di BI-1 sono stati trovati aumentati fino a 24h.

## **Discussione**

### **TESSUTI:**

I tessuti con HCC presentavano una bassa espressione del sistema Fas/FasL. Si ipotizza che questa diminuzione dei trascritti possa essere dovuta a meccanismi di difesa, attuati dalle cellule dell'HCC nei confronti delle cellule della risposta immune.

L'aumentata espressione della citochina infiammatoria IL-1 $\beta$ , osservata nei tessuti cirrotici peritumorali, molto probabilmente è dovuta alla presenza dell'infiltrato infiammatorio e conseguentemente al reclutamento di nuove cellule infiammatorie.

Contrariamente la diminuita espressione di TNF- $\alpha$  osservata nei tessuti PHCC potrebbe essere spiegata dalla perdita della funzione delle cellule di Kupffer, principali cellule produttrici di TNF- $\alpha$ , soprattutto negli stadi avanzati della malattia.

I più alti livelli di trascritti per Bcl-2 osservati nei tessuti cirrotici peritumorali sembrano svolgere un ruolo importante nell'ostacolare il processo apoptotico delle cellule epatiche danneggiate, contribuendo alla persistenza dei virus C o B dell'epatite, alla proliferazione cellulare incontrollata e conseguentemente alla trasformazione neoplastica.

L'iperespressione di Bad osservata nelle epatiti croniche sembra essere rilevante nell'induzione dell'apoptosi soprattutto nei tessuti epatici con infezione da HBV, suggerendo un coinvolgimento delle proteine di HBV principalmente nelle fasi iniziali della malattia epatica.

Con la progressione del danno epatico si osservava una diminuzione dei livelli di BI-1, e questo suggerisce l'importanza di questo mediatore nella modulazione dell'apoptosi, tanto da considerarlo come un nuovo regolatore del processo apoptotico nelle malattie croniche epatiche. Nella nostra casistica i virus B e C dell'epatite non sembrano essere direttamente coinvolti nell'espressione dei trascritti per quanto riguarda BI-1.



L'elevata espressione dei livelli di mRNA per NF- $\kappa$ B nei vari stadi della malattia epatica sembra essere dovuta ad uno stato di infiammazione cronica con conseguente rischio di fibrosi epatica e sviluppo di HCC. Pertanto bisogna tener conto che NF- $\kappa$ B, a seconda del tipo cellulare in cui è espresso, ma anche a seconda della fase della malattia, mostra effetti diversi. È stato visto che la sua attivazione negli epatociti è essenziale per la protezione dell'apoptosi indotta dal TNF- $\alpha$ , mentre l'attivazione di questo mediatore nelle cellule di Kupffer sembra essere essenziale per la stimolazione della proliferazione epatocitaria durante la rigenerazione epatica.

Infine, suddividendo i tessuti in base al tipo di infezione virale, HBV- ed HCV- correlata, solo nelle epatiti croniche è stata osservata una differenza statisticamente significativa nell'espressione delle citochine proinfiammatorie suggerendo un ruolo importante svolto dalle proteine virali nella modulazione della risposta immune da una parte ed ad una diversa attivazione e delle vie apoptotiche dall'altra.

### **EPATOCITI:**

IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sono citochine proinfiammatorie secrete sempre durante l'infiammazione. Gli alti livelli del IL-1 $\beta$  indotti dopo stimolazione con TNF- $\alpha$  in colture primarie di epatociti umani, suggeriscono che la presenza del TNF- $\alpha$  nel microambiente epatico contribuisca all'incremento di IL-1 $\beta$  e conseguentemente all'intensificazione dei processi infiammatori.

Nelle nostre condizioni sperimentali, il TNF- $\alpha$  sembra modulare l'espressione di FasL ma non di Fas. È ipotizzabile che nell'iperespressione di Fas/FasL riscontrata invece nei tessuti cirrotici siano coinvolti altri fattori, quali proteine virali, in grado di modulare tale espressione.

L'attivazione del Bcl-2 da parte del TNF- $\alpha$  potrebbe invece spiegare la resistenza all'apoptosi indotta dal TNF- $\alpha$  osservata in colture epatocitarie di topo e di ratto. Il pre-trattamento con STS e LY924002 ed il successivo trattamento con TNF- $\alpha$  riduce i livelli dei trascritti di Bcl-2, soprattutto dopo pretrattamento con LY924002, se confrontati con i livelli ottenuti dalle cellule trattate solo con TNF- $\alpha$ . Questo confermerebbe il coinvolgimento degli inibitori delle protein chinasi ed, in particolar modo, di LY924002 nell'inibizione di fattori anti-apoptotici a favore di quelli pro-apoptotici quali Bad e Bax soprattutto dopo 24h e 48h di coltura.

Dato interessante è la stimolazione dell'espressione di BI-1, fattore anti apoptotico, indotta dal pretrattamento e successiva costimolazione con TNF- $\alpha$ . È infatti interessante notare come in questo caso sembra esserci un' azione sinergica del TNF- $\alpha$  e STS nell'indurre l'espressione di trascritti per BI-1 in colture primarie di epatociti umani.



## **Summary**

### **Background**

The mechanisms underlying the strict correlation between viral infection, cirrhosis and HCC development have been investigated in deep, but, despite this several aspects are still largely unknown or understood only in part. Hepatitis B and C viruses seem to be involved in neoplastic transformation through both direct and indirect mechanisms, due to inflammation process and the capacity of viral proteins in modulating the proliferation and the death of infected hepatocytes. Moreover it has been hypothesized that dysregulation of apoptotic process in infected cells could be a crucial step for the cronicity of infection, in the failure to antiviral treatment and in the neoplastic transformation.

Although apoptosis can be triggered by several different stimuli, apoptotic signalling within the cell is transduced mainly via two defined molecular pathways: the death receptor pathways, also called extrinsic pathway (Fas/FasL, TNF- $\alpha$ /TNF-R1-R2) and the mitochondrial pathway also called the intrinsic pathway (Bcl-2, Bax, Bad). Other plasma membrane receptors such as IL-1b and TGF-b1 and intrinsic mediators as BI-1 and NF-kB are involved in the apoptotic pathways. In this study mRNA expression of mediators of the extrinsic and intrinsic apoptotic process was evaluated. The liver biopsies and the surgical hepatic tissues obtained from patients with different degree of liver disease were used. mRNA transcripts were detected by gene amplifications techniques. on the basis of our results human hepatocytes cultures were performed. Primary hepatocytes were treated with TNF-a, Staurosporine and LY294002, protein-kinase inhibitors, in order to evaluate the activation and/or the inhibition of these mediators in the apoptotic process.

### **Aims**

In the first part the study was performed in order to:

- 1) evaluate the mRNA expression of Fas/FasL, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bax, Bad, BI-1 and NF-kB in liver tissues from patients with different degrees of liver damage, from chronic hepatitis, to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.
- 2) determine whether HCV and HBV infection modulates their expression
- 3) analyze the protein expression of the mediators identified by Western Blot, in liver tissues from patients with HCC

the second part included an “in vitro” study in order to:

- 4) culture primary human hepatocytes
- 5) evaluate the different apoptotic pathways in human hepatocytes after stimulation with:
  - a) TNF- $\alpha$ , mainly proinflammatory cytokine found in abundance in the inflammatory process relating to liver injury
  - b) Staurosporine (STS), a potent protein tyrosine/serine kinase inhibitor with an antiproliferative and anti-apoptotic activity in many tumoral cells
  - c) LY294002 synthetic inhibitor of PI3K (phosphoinositide 3-kinase)

## **Material and methods**

We examined 62 patients: 39 with chronic hepatitis (CH), 7 with cirrhosis (CIRR), 13 with hepatocellular carcinoma HCC) and 3 controls (Contr). The Fas/FasL, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNAs were quantified by Semiquantitative RT-PCR, while the Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, NF-kB and TGF $\beta$ -1 mRNAs were quantified by quantitative Real Time PCR, using  $\beta$ -actin as the housekeeping gene. The protein expression of NF-kB in tissues with HCC was analyzed by Western Blot.

## **Results**

### Tissues:

### Fas/FasL mRNA expression:

Fas mRNA levels were significantly increased in CIRR when compared with HCC ( $p=0.026$ ) while FasL mRNAs showed a statistically significant

differences between CIRR and cirrhotic tissues surrounding tumours (PHCC) ( $p=0.018$ ) or HCC ( $p=0.005$ ).

IL-1 $\beta$  mRNA expression:

PHCC tissues had higher IL-1 $\beta$  levels than either CH tissues ( $p<0,0001$ ) or CIRR tissues ( $p=0,005$ ).

TNF- $\alpha$  mRNA expression:

TNF- $\alpha$  mRNAs were increased in CIRR tissues compared with PHCC ( $p=0,038$ ) and HCC tissues ( $p=0,05$ ).

TGF $\beta$ -1 mRNA expression:

In CH tissues, TGF $\beta$ -1 mRNA expression was significantly lower than in HCC ( $p=0,014$ ) or PHCC tissues ( $p=0,028$ ).

Bcl-2 mRNA expression:

Bcl-2 mRNA levels were statistically higher in PHCC when compared with normal liver tissues ( $p=0,026$ ), with CH ( $p=0,004$ ), and with CIRR ( $p=0,05$ ).

BI-1 mRNA expression:

CH tissues expressed the highest BI-1 mRNA amount that was significantly higher when compared to cirrhotic tissues ( $p=0,033$ ), cirrhotic tissues surrounding tumours ( $p<0,001$ ) and HCC ( $p<0,001$ ).

Bad mRNA expression:

Contr tissues showed the highest Bad transcript levels, which were statistically higher than in CH ( $p=0,006$ ), PHCC ( $p=0,005$ ), or HCC ( $p=0,002$ ). CH coincided with higher Bad levels than in PHCC or HCC tissues ( $p=0,00006$  and  $p=0,0007$ , respectively)

Bax mRNA expression:

No differences in Bax expression were observed.

NF-kB mRNA expression:

CONTR expressed the lowest NF-kB mRNA amount, significantly lower when compared with CH ( $p=0.05$ ) and PHCC ( $p=0.05$ ).

HBV HCV infection:

In CH, only TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Bad mRNA expression were significantly different in HBV-related infection versus HCV-related infection.

Human hepatocytes:

TNF- $\alpha$  treatment:

Human hepatocytes incubated with TNF- $\alpha$  showed the highest levels of FasL (solo a 12h), IL-1 $\beta$  (until 24h), TGF $\beta$ -1 (24 e 48h), Bcl-2 (4h, 24h), Bad (24 and 48h) and NF-kB (8h) respect to unstimulated cells.

No differences in Fas, Bax, Bad (until 12h) , NF-kB (until 4h) e TGF $\beta$ -1 (until 12h) mRNA levels were observed.

Staurosporine (STS) treatment:

In cells treated with STS, Bcl-2 mRNA expression until 48h of culture, was significantly lower than in unstimulated cells. No difference in TGF $\beta$ -1, Bax, and NF-kB mRNAs levels were observed at the different time of incubation. While an increase in Bad mRNA at 12h and in BI-1 mRNA at 8 and 24h were observed.

LY294002 treatment:

LY294002 induce a strong inhibition of Bcl-2 mRNA (until 24h) in hepatocyte culture when compared with hepatocyte culture with medium alone. No difference in TGF $\beta$ -1, Bax, and NF-kB mRNAs levels were observed while high levels of Bad mRNA at 12, 24 and 48h and of BI-1 from 8 to 24h of incubation were observed.

Pre-treatment with STS and LY294002 :

The pre-treatment of human hepatocytes for 1h with LY294002 and the following treatment with TNF- $\alpha$  inhibits the Bcl-2 mRNA expression until 48h when compared with cell treated with TNF- $\alpha$  without the pre-treatment. This inhibition was completely resolved after 48h of incubation.

In cells pretreated with LY294002 respect to the cells treated with TNF- $\alpha$  alone, were observed the highest levels of Bax after 4h, Bad after 24h e BI-1 after 24h of incubation.

No difference in TGF $\beta$ -1 and NF-kB mRNAs expression were observed

In the cells pre-treated with STS only the BI-1 transcript levels were increased until 24h.

## DISCUSSION

### TISSUES

Fas/FasL system expression is upregulated in chronically-damaged livers while the onset of cancer is associated with a shut-down of this system in HCC, as a defense mechanisms adopted by HCC against the immune system.

High levels of IL-1 $\beta$  mRNA transcripts observed in cirrhotic tissues surrounding tumours, may be the result of an increased activation of lymphocytes or monocytes in the liver.

Contrary, the low expression of TNF- $\alpha$  mRNA transcripts in cirrhotic tissues surrounding tumours and HCC may be the result of loss function of Kupffer cells, one of the main sources of production of TNF- $\alpha$  in the liver.

The Bcl-2 hyperexpression observed in cirrhotic peritumoral tissues seems to play an important part in regulating cell survival in damaged liver cells, which may contribute to the persistence of HBV or HCV and thus activate cell proliferation and cell transformation.

The upregulation of the Bad-induced pro-apoptotic pathway in CH seems to be more relevant in controlling apoptosis in liver tissues with HBV infection suggesting an important role of the proteins of HBV particularly in early liver diseases.

Moreover the BI-1 expression decrease correlates closely with the progression of liver damage from CH to cirrhosis and HCC and indicate a role of BI-1 as regulator of apoptosis in early diseases. The high BI-1 mRNA levels observed in CH may provide protection against apoptosis of liver cells virus infected, on the other hand the down regulation of BI-1 observed in HCC tissues seems to favour the hepatocellular carcinogenesis.

The persistently elevated levels of NF- $\kappa$ B in all stage of liver diseases, seems to depends on a chronic inflammatory with an consequently increased risk of hepatic fibrosis and of an HCC milieu.



The different pattern of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and Bad expression in HCV- and HBV-related liver disease points to a different modulation of the immune response on the one hand, and to a different apoptotic activation pathways on the other.

### **HUMAN HEPATOCYTES**

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are proinflammatory cytokines always secreted during inflammation.

The high IL-1 $\beta$  mRNA transcripts induced by TNF- $\alpha$  stimulation in primary human hepatocytes suggest that the presence of TNF- $\alpha$  in the hepatic microenvironment contributes to the increase in IL-1 $\beta$  with a consequent intensification of inflammatory, proliferative and regenerative processes.

No difference in Fas/FasL mRNAs expression was observed after TNF- $\alpha$  treatment, suggesting that the expression of these mediators was not modulated by the extracellular TNF- $\alpha$  factor in our experimental conditions.

Bcl-2 is an antiapoptotic member of the intrinsic Bcl-2 family and its activation by TNF- $\alpha$  might explain the resistance to apoptotic process induced by TNF- $\alpha$  also observed in mouse and rat hepatocyte cultures.

Pre-treatment and treatment with STS, LY924002 and TNF- $\alpha$  reduce the Bcl-2 transcript levels by comparison with the levels obtained from cells treated with TNF- $\alpha$  alone. These effects were particularly evident using LY924002. STS is considered a scarcely-selective kinase inhibitor known for its toxicity, while LY924002 represents a highly specific PI3K inhibitor.

Bax and Bad are pro-apoptotic members of the Bcl-2 family.

TNF- $\alpha$ , STS and LY294002 had no effect on Bax expression in human hepatocytes compared with hepatocytes incubated with medium alone, whereas Bad mRNA levels increased after stimulation with TNF- $\alpha$ , STS and LY294002, particularly after 12 to 48 hours of incubation.

Costimulation with LY294002 and TNF- $\alpha$  increases the Bad mRNAs after 24h and 48h of incubation. So, when the antiapoptotic pathway (Bcl-2)

was inhibited in primary human hepatocytes, members of the apoptotic pathway (Bad and Bax) were activated.



# 1. Introduzione

## 1.1 Apoptosi

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, svolge un ruolo importante nella fisiologia dell'omeostasi cellulare, nella fisiopatologia dell'embriogenesi, e nel mantenimento della tolleranza immunologica. Questo processo è inoltre particolarmente rilevante nell'eliminazione di cellule prodotte in numero eccessivo, sfuggite ai meccanismi di controllo della crescita cellulare e di cellule potenzialmente pericolose quali cellule infettate da virus, cellule tumorali, etc.<sup>1</sup> Alterazioni dei meccanismi di regolazione del processo apoptotico possono essere pertanto implicati nella patogenesi di malattie autoimmuni, tumori, infezioni virali e sindromi da immunodeficienza.<sup>2,3</sup>

Sebbene l'apoptosi possa essere scatenata da diversi stimoli il segnale apoptotico all'interno della cellula vienetradotto principalmente attraverso due distinte vie molecolari: la via estrinseca, attivata dai recettori di morte; e la via intrinseca o via mitocondriale. Entrambe le vie portano all'attivazione di varie proteasi intracellulari, in particolare delle caspasi (cystein aspartame proteolytic enzymes) e di endonucleasi che determinano la degradazione dei costituenti cellulari.

L'attivazione della via estrinseca origina dal legame tra i recettori di membrana, appartenenti a famiglie di citochine, detti anche recettori di morte, ed i loro rispettivi ligandi. Il legame ligando /recettore porta al reclutamento di diverse molecole adattatrici intracellulari e proenzimi (pro-caspasi 8 e pro-caspasi 10) che formano il complesso riportato come DISC (death inducing signalling complex). Il segnale generato dal DISC induce l'attivazione di caspasi con conseguente morte della cellula. A seconda del tipo cellulare implicato, la morte cellulare può coinvolgere o meno l'attivazione mitocondriale.

I principali recettori di morte cellulari sono rappresentati da: Fas, TNF-R1, TNF-R2. (Fig.1)

## 1.2 Il sistema Fas/FasL

Il **recettore Fas**, identificato nel 1989 come recettore della membrana plasmatica, è composto da 325 aminoacidi con una sequenza segnale

NH<sub>2</sub>-terminale e una regione transmembrana nella zona centrale (proteina di membrana di tipo I). Nella regione intracellulare del Fas è stato individuato il cosiddetto dominio della morte (death domain, DD), comune a tutti i recettori della famiglia.<sup>4</sup> Il gene codificante per il Fas nell'uomo si trova sul braccio lungo del cromosoma 10,<sup>5</sup> è lungo dodici chilobasi e contiene nove esoni.<sup>6</sup> Il recettore viene denominato anche come APO-1, TNFRSF6 o CD95. Anticorpi specifici anti-Fas sono in grado di indurre apoptosi nelle cellule che esprimono Fas sulla loro membrana cellulare.<sup>7,8</sup> **Fas ligand (FasL)**, è una proteina di circa 40 kDa, con un dominio transmembrana idrofobico, ma senza sequenza segnale NH<sub>2</sub>-terminale e con la regione COOH-terminale extracellulare (proteina di membrana di tipo II).<sup>9</sup> Il gene per il Fas ligand si trova sul cromosoma 1 e contiene cinque esoni. L'organizzazione e la sequenza mostrano analogie con altri membri della famiglia dei TNF. Nell'uomo il Fas ligand viene espresso nei linfociti T attivati.<sup>10</sup> I linfociti T citotossici esprimono sulla loro membrana cellulare una proteina specifica in grado di legare Fas, scatenando la morte cellulare.<sup>11,12</sup>

**Il legame FasL/Fas** porta alla trimerizzazione del Fas sulla cellula bersaglio. L'associazione dei tre death domains, all'interno della membrana plasmatica, è necessaria per una traduzione efficace del segnale ed è il primo passo verso l'assemblaggio di un complesso funzionale. Le proteine di membrana e citoplasmatiche associate nel DISC sono diverse, a seconda del recettore che porta il death domain. L'attivazione del DISC attiva a sua volta fattori citoplasmatici, che amplificano lo stimolo.<sup>13</sup> Il segnale mediato dal Fas, all'interno della cellula viene modulato e amplificato, e porta in seguito a tutte le tipiche trasformazioni dell'apoptosi, come riduzione del volume cellulare, condensazione della cromatina e infine formazione di corpi apoptotici.<sup>14</sup>

Le caspasi appartengono ad una famiglia di proteasi con specificità di taglio per la sequenza cisteina aspartato (proteasi aspartato specifiche) e sono le regolatrici centrali del processo apoptotico. Le caspasi 8, 9, 10 e 11 sono strettamente legate a segnali proapoptotici. Una volta attivate, queste scindono ed attivano, più a valle, le caspasi effettrici 3, 6 e 7, che svolgono la loro azione proteolitica sulle proteine strutturali.

### 1.3 TNF- $\alpha$

Il **TNF- $\alpha$**  (Tumor necrosis Factor- $\alpha$ ) è una proteina di 17 kDa, composta da 157 amminoacidi che in soluzione esiste come omotrimerico. Il gene umano del TNF fu clonato nel 1985<sup>15</sup> ed è posizionato nel locus 6p21.3.<sup>16,17</sup> L'attività di questa citochina è regolata principalmente dal suo legame ai recettori.

Il TNF- $\alpha$  è una citochina pleiotropica multifunzionale, coinvolta nell'apoptosi, nell'infiammazione, nella regolazione delle cellule del sistema immunitario, nella replicazione virale ma anche in numerose patologie umane.<sup>18-20</sup> TNF- $\alpha$  è prodotto principalmente da monocyti/macrofagi attivati ma anche da linfociti T attivati, cellule natural killer (NK), neutrofili e mastociti. TNF- $\alpha$  condivide molte proprietà dell'IL-1 dalla qual differisce per legarsi a recettori diversi e per non avere un effetto diretto sull'attivazione dei linfociti. TNF- $\alpha$  e IL-1 agiscono sinergisticamente in diverse risposte biologiche quali la necrosi tumorale e le reazioni infiammatorie. Unitamente a IL-1 e prostaglandine, in particolare PGE2 è considerato un mediatore dell'infiammazione, coinvolto nella degradazione della matrice cartilaginea. Stimola la sintesi di collagene e di prostaglandine da parte di fibroblasti e cellule sinoviali. Favorisce l'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali modulando l'espressione dei recettori di superficie ICAM-1 (Inter-cellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell Adhesion Molecule-1), ELAM-1 (Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule-1) promuovendo la formazione di coaguli ematici e di trombi. Il TNF- $\alpha$  ha inoltre attività pirogenica, stimola l'angiogenesi, è mitogeneico per i fibroblasti ed agisce sinergisticamente con l'insulina ed EGF. Sebbene il TNF- $\alpha$  possa svolgere un'azione tumorigenica e possa favorire l'insorgenza di metastasi, è in grado di esercitare un ruolo inibitorio sulla proliferazione delle cellule tumorali. Svolge infine un ruolo determinante nei processi che portano alla morte cellulare per necrosi ed apoptosi.

Nelle cellule, il TNF- $\alpha$  è sintetizzato come pro-TNF (26 kDa), legato alla membrana cellulare e viene rilasciato grazie al taglio proteolitico del predomino da TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) un membro della famiglia delle metalloproteinasi-disintegrine.<sup>21</sup>

**TNFR1 e TNFR2** sono i due recettori di membrana specializzati per il legame con il TNF. Sebbene il TNFR-2 presenti un'affinità per il TNF- $\alpha$

cinque volte maggiore rispetto a quella per TNFR-1,<sup>22</sup> è quest'ultimo ad iniziare la maggior parte delle attività biologiche del TNF- $\alpha$ . Infatti TNFR-1 (p60) è espresso in tutti i tipi cellulari, mentre l'espressione del TNFR-2 è relegata principalmente alle cellule immunitarie.<sup>23</sup> A differenza del TNFR-1, il TNFR-2 non possiede il dominio di morte (DD), per questo motivo, il TNFR-1 rappresenta il più importante membro della famiglia dei recettori in grado di indurre apoptosi.<sup>24</sup> TNFR-1 è inoltre un recettore con un duplice ruolo: oltre che ad indurre apoptosi, è in grado di trasdurre segnali di sopravvivenza cellulare. Sebbene le vie di trasduzione del segnale siano a tuttoggi ben definite, la regolazione dei segnali di vita o di morte è ancora poco conosciuta.<sup>25,26</sup>

**Il legame TNF/ TNFR-1** porta alla trimerizzazione del TNFR-1 ed al rilascio della proteina silenziatrice (silencer) (SODD).<sup>27</sup> TRADD (TNFR-associated death domain) si lega al dominio di morte del TNFR-1 e recluta le proteine adattatrici RIP (receptor interacting protein), TRAF-2 (TNFR-associated factor 2) e FADD (Fas-associated death domain).<sup>28</sup> In seguito queste proteine adattatrici reclutano delle molecole chiave che sono responsabili per ulteriori segnali intracellulari. Quando TNFR-1 induce apoptosi, FADD si lega alla procaspasi 8, la quale di conseguenza viene attivata. Questo determina l'attivazione delle caspasi che porta all'apoptosi coinvolgendo anche i mitocondri.<sup>29</sup> Inoltre TNF- $\alpha$  attiva fortemente NF- $\kappa$ B attraverso TNFR-2 e RIP associati e questo fattore trascrizionale regola l'espressione di prodotti di geni trascrizionali.<sup>30</sup>

**La via intrinseca** è scatenata da diversi segnali sia extra che intracellulari quali radiazioni  $\gamma$ , stress ossidativo, tossine, farmaci chemioterapici, fattori di crescita e citochine in grado di attivare la via intrinseca responsabile della disfunzione mitocondriale. Come risultato finale si osserva un'alterazione dell'architettura degli organelli intracellulari ed il rilascio di proteine mitocondriali nel citoplasma inclusi fattori proapoptotici quali il citocromo c, e SMAC/DIABLO (Second Mitochondria Derived Activator of Caspases / Direct IAP Binding protein with Low pI), endonucleasi G che contribuiscono all'attivazione delle proteasi ed alla degradazione della cromatina.

Diverse proteine intracellulari sono coinvolte nell'attivazione e regolazione della via intrinseca dell'apoptosi. In particolare la famiglia di proteine Bcl-2, che contiene sia membri ad attività antiapoptotica (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Al,

Bcl-W) che proapoptotica (Bax, Bad, Bak, Bcl-X<sub>s</sub>), rappresenta la principale classe dei regolatori intracellulari.

## 1.4 Famiglia delle proteine Bcl-2

**Bcl-2**, il capostipite della famiglia delle proteine Bcl-2 è in grado d'impedire o ritardare l'apoptosi indotta da una grande varietà di stimoli in diversi tipi di cellule, ma il meccanismo della sua azione protettiva è ancora sconosciuto. Bcl-2 è una proteina di 26 kDa, composta da 239 amminoacidi nella quale sono stati identificati quattro domini di omologia (BH), denominati BH1, BH2, BH3 e BH4 corrispondenti a segmenti  $\alpha$  elica.<sup>31,32</sup>

Tutti i membri della famiglia Bcl-2, indipendentemente dal loro ruolo nell'apoptosi, sono caratterizzati dalla presenza di almeno una delle quattro sequenze omologhe conservate: domini BH. In generale i membri anti-apoptotici mostrano sequenze conservate in tutti e quattro i domini, mentre i membri proapoptotici sono caratterizzati dalla perdita della sequenza del primo segmento  $\alpha$ -elica (BH4).<sup>33</sup> Le proteine della famiglia Bcl-2 sono localizzate sulla membrana esterna dei mitocondri, su quella del reticolo endoplasmatico e sulla membrana nucleare. Come altri membri di questa famiglia, Bcl-2 ha un dominio idrofobico (TM domain) all'estremità C-terminale che permette l'inserzione della proteina nella faccia citoplasmatica della membrana intracellulare: questa localizzazione risulta essere importante per la sua attività.<sup>34</sup> L'associazione del Bcl-2 con Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor) sembra impedire il rilascio del citocromo c e di conseguenza l'attivazione delle caspasi effettrici: caspasi 9 e caspasi 3. Bcl-2 potrebbe infine agire modulando il "ripiegamento" della membrana mitocondriale, cambiamento che si osserva durante il processo apoptotico.

**Bax** è una proteina con funzione proapoptotica. Come tutti gli altri membri proapoptotici della famiglia Bcl-2, è caratterizzato dalla perdita della sequenza del primo segmento  $\alpha$ -elica, BH4. Il dominio BH3 è ritenuto essere il dominio critico per l'induzione dell'apoptosi in tutti i membri proapoptotici. Questo concetto è supportato dal fatto che tutti i membri proapoptotici della famiglia Bcl-2 mostrano omologia solo per la sequenza del dominio BH3.<sup>35</sup>

In condizioni normali Bax è presente in forma monomerica nel citosol. Segnali apoptotici inducono l'accumulo di omodimeri Bax-Bax e la loro



traslocazione dal citosol alla membrana mitocondriale.<sup>36-38</sup> Tuttavia, non è ancora noto se la dimerizzazione del Bax avvenga nel citosol o nella membrana dei mitocondri.

Quando la proteina Bax è situata nella membrana interna mitocondriale, favorisce il rilascio del citocromo c, che legandosi ad Apaf-1, attiva le caspasi, principali esecutori del programma apoptotico.<sup>39</sup> Le caratteristiche delle caspasi sono quelle di possedere un residuo di cisteina nel loro sito catalitico e di tagliare le proteine bersaglio immediatamente a valle di un residuo di acido aspartico.

I membri della famiglia Bcl-2 possono formare tra loro omo- o eterodimeri. La formazione di tali complessi con attività pro o antiapoptotica risulta particolarmente importante nella regolazione e/o modulazione del processo apoptotico.

**Bad** (Bcl Antagonist of cell Death)<sup>40</sup> è un membro pro-apoptotico "BH3-only" della famiglia delle proteine Bcl-2. Le proteine "BH-3 only" contengono soltanto il dominio BH-3 come suggerisce il loro nome.

Bad è una proteina di 22 kDa, composta da 204 aa<sup>40</sup> ed è regolata negativamente dalla fosforilazione di più residui serina in risposta ai segnali indotti dai fattori di crescita.<sup>41</sup> In condizioni normali, in presenza dei fattori di crescita, Bad è mantenuto fosforilato da varie protein chinasi, come la chinasi S6 ribosomiale di 90 kDa (RSK),<sup>40,42</sup> l'Akt,<sup>43,44</sup> la protein chinasi A,<sup>45</sup> la Raf-1<sup>46</sup> e la chinasi p70S6.<sup>47</sup> In forma fosforilata Bad è sequestrato nel citoplasma dalle proteine 14-3-3.<sup>48</sup> In assenza dei fattori di crescita, Bad si defosforila e si trasferisce al mitocondrio dove interagisce con i membri anti-apoptotici Bcl-2 e Bcl-xL, bloccando la loro funzione e promuovendo la morte cellulare.<sup>49</sup>

## 1.5 Bax 1 inibitore

**Bax 1 inibitore** (BI-1) è una proteina di membrana considerata un inibitore della morte cellulare indotta da Bax. L'espressione ectopica di Bax nei lieviti, condotta con tecniche di ingegneria genetica, conferiva loro un fenotipo letale.<sup>50</sup> Dallo studio di questo fenotipo è stato identificato BI-1 quale nuovo inibitore umano di Bax. Sono stati successivamente identificati diversi omologhi di BI-1 negli eucarioti ed anche questi, una volta espressi nei lieviti, hanno bloccato il processo apoptotico Bax indotto.<sup>51</sup> BI-1 è una proteina prevalentemente localizzata nelle membrane

intracellulari, molto simile alle proteine della famiglia Bcl-2. La delezione del dominio C-terminale degli omologhi di BI-1 elimina la loro funzione citoprotettiva indicando così una relazione tra struttura e funzione di questa regione. Studi di cross-linking e coimmunoprecipitazione hanno dimostrato che BI-1 può interagire con Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> ma non con Bax o Bak. Nelle cellule di mammifero l'iperespressione di BI-1 è in grado di sopprimere l'apoptosi indotta da Bax, da stauroporina e da deprivazione di fattori di crescita ma non l'apoptosi Fas-mediata. BI-1 rappresenta pertanto un nuovo regolatore dei meccanismi di morte cellulare controllati da Bcl-2 e Bax.<sup>52</sup> (Fig. 1).

Come precedentemente detto molti sono gli stimoli sia extracellulari che intracellulari in grado di attivare e/o inibire il processo apoptotico. Pertanto anche diversi recettori per citochine e fattori di crescita, generalmente coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare sono attualmente orientati allo studio per valutare il loro ruolo nel determinare i processi apoptotici.

## 1.6 IL-1 $\beta$

L'IL-1 è una citochina pleiotropica con effetti sul sistema immune ed emopoietico ed azioni di controllo dell'infiammazione. La famiglia dell'IL-1 è costituita da due agonisti funzionalmente simili tra loro IL-1 $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  codificati da geni separati e con solo il 26% di omologia;<sup>53</sup> da IL-1Ra proteina biologicamente inattiva ma che compete per il legame con i recettori dell'IL-1 $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ , da due recettori: il recettore di tipo I (IL-1RI) e di recettore di tipo II (IL-1RII) ed infine da una proteina accessoria IL-1RI (IL-1RAcP).<sup>53,54</sup> IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nella loro forma secreta hanno un peso molecolare di 17 kDa ma punto isoelettrico diverso (pH 5.2 per IL-1 $\alpha$  e pH 7 per IL-1 $\beta$ ). Benché la forma matura extracellulare di IL-1 sia di 17 kDa, IL-1 è prodotta come un precursore di 31 kDa nel citoplasma. Il precursore di IL-1 $\alpha$  ProIL-1 $\alpha$  è un precursore altamente attivo ma rimane per lo più all'interno della cellula in associazione con strutture del citoscheletro (microtubuli). Con la morte della cellula, proIL-1 $\alpha$  viene rilasciato e per azione di taglio delle proteasi extracellulari si ha la formazione della forma matura di IL-1 $\alpha$ . Anche l'attivazione di cistein-proteasi della membrana plasmatica calcio dipendenti dette calpaine, in grado di tagliare proIL-1 $\alpha$ ,

porta alla produzione della forma attiva di IL-1 $\alpha$ . La formazione della forma matura di IL-1 $\beta$  avviene invece per azione dell'enzima specifico ICE (enzima convertitore dell' IL-1 $\beta$  o caspasi 1). IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mancano di una sequenza segnale e benché la sequenza contenga potenziali siti di glicosilazione, queste proteine non sono glicosilate. IL-1Ra, proteina di circa 20-25 kDa di peso molecolare, presenta un'omologia significativa con IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A differenza di IL-1, IL-1Ra presenta una sequenza segnale, che ne giustifica la produzione come mediatore solubile, rapidamente trasportato e secreto fuori dalla cellula sIL-1Ra. IL-1RI e IL-1RII sono due strutture recettoriali distinte entrambe capaci di legare IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sono distribuiti in modo differente in tipi cellulari diversi. IL-1RI è una glicoproteina di 80kDa presente prevalentemente sulle cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, cellule epiteliali, epatociti, fibroblasti, cheratinociti, cellule dendritiche dell'epidermide e linfociti T e trasduce tutti gli effetti della IL-1 mentre IL-1RII è principalmente espresso sui linfociti B. IL-1RII lega IL-1 ma non traduce il segnale, agisce come un'esca per IL-1 $\beta$ . IL-1 originariamente è stata descritta come monochina, vale a dire un prodotto delle cellule appartenenti allo stipite differenziativo monocito-macrofagico. Studi successivi hanno dimostrato che pressoché ogni tipo cellulare è in grado di produrre IL-1 quando appropriatamente stimolato, benché i monociti-macrofagi rimangano la sorgente quantitativamente più importante di questa citochina. Le cellule capaci di produrre IL-1 comprendono, fra le altre, linfociti T e B, cellule NK, fibroblasti, astrociti, cellule della sinovia e del mesangio, cheratinociti, cellule muscolari lisce e cellule endoteliali.<sup>55,56</sup> Batteri e prodotti batterici, ed in particolare l'endotossina, sono potenti induttori di IL-1, che costituisce uno dei mediatori essenziali della risposta dell'organismo a questi microrganismi. Altri induttori rilevanti nella fisiopatologia sono prodotti dalla cascata del complemento, da complessi antigene-anticorpo e citochine quali il TNF- $\alpha$  ed IL-1 stessa. I livelli di espressione della proteina possono variare enormemente a seconda del tipo cellulare: i monociti producono prevalentemente IL-1 $\beta$ , mentre i cheratinociti sintetizzano soprattutto IL-1 $\alpha$ . Tra gli effetti biologici, IL-1 agisce come un adiuvante endogeno, inducendo la sintesi di altre linfocine, promuovendo l'attivazione dei linfociti T helper da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). Determina inoltre una serie di effetti sistemici associati alla fase acuta della risposta infiammatoria (febbre, sintesi di proteine di fase acuta, rilascio di cortisolo, insulina e ormone adrenocorticotropo). Induce la

proliferazione dei timociti in presenza di mitogeni (PHA, ConA), e la proliferazione dei fibroblasti. In sinergia con altre interleuchine induce la proliferazione di B linfociti. Facilita l'aderenza dei leucociti alle cellule endoteliali stimolando la secrezione di prostaglandine causando ipotensione. È presente nel liquido infiammatorio delle articolazioni e giuoca un ruolo importante nella patogenesi dell'artrite reumatoide inducendo la produzione di collagenasi, favorendo il riassorbimento dell'osso e diminuendo la produzione del collagene I;<sup>57</sup> modula inoltre la proliferazione e la funzione delle cellule epiteliali stimolando la sintesi del collagene di tipo IV, tipico delle membrane basali. IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  si legano quasi con la stessa affinità ( $K_d = 10^{-10}$  M) ai recettori IL-1RI e IL-1RII.<sup>58</sup> Questi recettori presentano una struttura tridimensionale che include tre domini extracellulari ed una glicoproteina transmembrana che lega sia IL-1 $\alpha$  che IL-1 $\beta$ . IL-1RI ha una coda citoplasmatica di 217 aminoacidi mentre IL-1RII ha una coda citoplasmatica di soli 29 aminoacidi ed al contrario di IL-1RI non traduce alcun segnale. Il dominio extracellulare di IL-1RII è rilasciato in forma solubile durante i processi infiammatori. Presenta una maggiore affinità di legame con IL-1 $\beta$  rispetto all'IL-1 $\alpha$  o IL-1Ra, agendo così come inibitore endogeno dell'IL-1 $\beta$ .

Il dominio citoplasmatico di IL-1RI non presenta una apparente attività tirosin chinasi ma la fosforilazione della tirosina della chinasi MAP (Mitogen Activated Protein Kinases) p38 rappresenta una tappa della via di traduzione del segnale dell'IL-1 in alcuni tipi cellulari. Particolarmente interessante è l'omologia aminoacidica pari al 45% osservata tra il dominio citoplasmatico di IL-1RI ed il dominio citoplasmatico della proteina Toll sintetizzata dal gene Toll di Drosophila. Toll è una proteina transmembrana con azione simil-recettoriale Toll-like receptors (TLRs). Meccanismi di traduzione del segnale postrecettoriale possono essere cellula specifici. In cellule mesenchimali ad esempio IL-1 agisce come un fattore di crescita ed il segnale è associato alla fosforilazione serina/treonina di p42/44 di MAPK. Fosforilazione di altri membri appartenenti alla famiglia delle MAP chinasi sono invece fosforillati in altri tipi cellulari: p38 nei fibroblasti e p54 $\alpha$  negli epatociti. IL-1 induce diversi fattori di trascrizione. Molti dei effetti biologici dell'IL-1 sono dovuti alla traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B a AP-1 che inducono la sintesi di numerose molecole coinvolte nel processo flogistico.

## 1.7 TGF- $\beta$

Il fattore di crescita trasformante **TGF- $\beta$**  è un regolatore essenziale di processi cellulari e fisiologici inclusi proliferazione, differenziazione, migrazione, sopravvivenza cellulare, angiogenesi ed immunosorveglianza.<sup>59-63</sup> Nei mammiferi esistono tre isoforme di TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3) ognuna delle quali viene codificata da un gene distinto e le quali funzionano attraverso lo stesso sistema di segnale recettoriale.<sup>64,65</sup> TGF- $\beta$ 1 è l'isoforma più abbondante, espressa universalmente.

TGF- $\beta$  viene sintetizzato come parte di un grande precursore che contiene una regione propeptidica chiamata LAP (Latency-Associated Protein) oltre al TGF- $\beta$  vero e proprio.<sup>66</sup> TGF- $\beta$  viene scisso dal propeptide prima che il precursore venga secreto dalla cellula ma rimane attaccato al propeptide da legami non covalenti. Una volta secreto, la maggior parte del TGF- $\beta$  viene immagazzinato nella matrice extracellulare come un complesso latente costituito da: TGF- $\beta$ , propeptide (LAP) e di una proteina chiamata LTPB (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein). L'unione del TGF- $\beta$  al LTPB mediante legami disolfuro previene la formazione di legami con i suoi recettori.<sup>67,68</sup> Di conseguenza, fino a che il complesso latente non venga disgregato, svolge poca o zero attività biologica. Il meccanismo esatto coinvolto nell'attivazione di questo complesso latente non è completamente compreso ma sembra coinvolgere enzimi specifici.

TGF- $\beta$  regola i processi cellulari legandosi a tre recettori (Rc di tipo I, II e III) ad alta affinità della superficie cellulare. Il Rc di tipo III è quello più abbondante ed agisce legando il TGF- $\beta$  e trasferendolo ai recettori di segnale di tipo I e II.<sup>69</sup> I recettori di tipo I e II contengono nel loro dominio intracellulare proteine serin-treonin chinasi<sup>70-72</sup> che danno inizio al segnale intracellulare fosforilando diversi fattori di trascrizione noti come Smads. Le proteine Smad derivano dagli omologhi dei geni Sma (Small body size) e MAD (Mothers against Dpp) di *C.Elegans* e *Drosophila* rispettivamente.

TGF- $\beta$  si lega sia al Rc di tipo III che poi presenta TGF- $\beta$  al Rc di tipo II o direttamente al Rc di tipo II. Una volta attivato dal TGF- $\beta$ , il Rc di tipo II recluta, lega e fosforila il Rc di tipo I, stimolando la sua attività protein chinasi.<sup>73</sup> Il Rc di tipo I in forma attiva, fosforila Smad2 o Smad3,<sup>73-75</sup> i quali in seguito si legano al Smad4. Il complesso risultante del Smad si

trasloca all'interno del nucleo dove interagisce in una maniera cellula specifica con vari fattori di trascrizione per regolare la trascrizione di vari geni. Il TGF- $\beta$  è sintetizzato principalmente dalle piastrine ove si localizza negli  $\alpha$ -granuli ma pressoché tutti gli organi esprimono una o più forme della citochina: tessuti mesenchimali, epiteli, macrofagi, linfociti T attivati. Uno dei principali effetti biologici del TGF- $\beta$  è la regolazione della proliferazione cellulare e della sintesi di matrice extracellulare. In vitro stimola od inibisce la crescita cellulare a seconda del tipo cellulare coinvolto e delle condizioni di coltura. Inibisce la crescita di cheratinociti, epatociti, fibroblasti embrionali, linfociti T e B. per quanto riguarda il suo ruolo sulle molecole connettivali stimola la sintesi di glicosaminoglicani, collagene di tipo I, II, V, VI, VII, fibronectina, elastina e ne diminuisce la loro degradazione inibendo la sintesi di svariate proteasi ed aumentando la sintesi di inibitori di proteasi. Svolge un'azione di forte induttore del metabolismo connettivale in alcuni processi patologici fibrotici quali la fibrosi polmonare, la glomerulonefrite e durante le fasi di riparazione cicatriziale sia in condizioni fisiologiche che patologiche. È chemiotattico per fibroblasti, neutrofili e monociti. E anche un potente immunosoppressivo agendo sui linfociti a minime concentrazioni, riduce l'espressione di molecole di classe II dell'MHC e di recettori per IL-1, inibisce l'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali.

## 1.8 NF- $\kappa$ B

Un altro meccanismo intracellulare è rappresentato dall'attivazione del Fattore Nucleare kappa-B (NF- $\kappa$ B) da parte di numerosi stimoli patologici. Per questo motivo NF- $\kappa$ B è considerato un importante regolatore delle risposte cellulari verso patogeni e stimoli stressanti.

L'attività di NF- $\kappa$ B dipende in parte dalla sua localizzazione subcellulare. In condizioni basali (di non induzione) NF- $\kappa$ B è sequestrato nel citoplasma mediante l'interazione con una proteina inibitrice nota come I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B). Numerosi stimoli extracellulari possono attivare NF- $\kappa$ B mediante vie di trasduzione del segnale che attivano un complesso IKK (I $\kappa$ B kinase) che fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  in serina 32 e 36.<sup>76</sup> La fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  porta alla sua onnipresenza ed infine degradazione mediante proteasomi, in seguito NF- $\kappa$ B trasloca nel nucleo dove attiva l'espressione di geni. L'attivazione di NF- $\kappa$ B B/Rel famiglia di fattori di trascrizione che regolano l'espressione

di geni che partecipano nelle vie che coinvolgono l'infiammazione, la proliferazione cellulare, l'apoptosi che includono: mediatori infiammatori quali l'ossido nitrico sintetasi e la cicloossigenasi-2. Nf-kB svolge infatti un ruolo importante in diversi processi patologici, inclusi proliferazione cellulare, morte cellulare, sviluppo cellulare e risposta immunitaria.<sup>77,78</sup> Un'abnorme stimolazione costitutiva di NF-kB è associata a malattie infiammatorie croniche e cancro.

Recentemente, è stato dimostrato che forme oncogeniche di ras e l'oncoproteina Bcr-Abl attivano entrambe NF-kB mediante l'attivazione delle subunità trascrizionali di RelA/p65. D'altra parte non solo l'attività di NF-kB è richiesta per Ras per iniziare la trasformazione cellulare ma è anche richiesta per l'iniziazione da parte di Bcr-Abl nel processo di tumorigenesi e di trasformazione. Attivazione di NF-kB è stata osservata nei tumori primitivi della mammella e si è visto essere richiesta per la proliferazione e la sopravvivenza di cellule tumorali nella malattia di Hodgkin's. In termini di proliferazione cellulare, cancro della mammella ed altri di cancri spesso esibiscono alti livelli di ciclina D1 ed è stato osservato che NF-kB attiva i livelli trascrizionali del gene D1 della ciclina. Il reclutamento di NF-kB nel processo oncogenetico, sembra essere basato sulla sua capacità di sopprimere la trasformazione associata all'apoptosi.

## 2. Apoptosi e fegato

Da quanto riportato si evince come sia determinante l'equilibrio tra fattori proapoptotici ed antiapoptotici nel mantenere l'omeostasi cellulare. Una disregolazione del processo apoptotico sarebbe pertanto importante nella patogenesi di diverse malattie. Un eccessivo aumento dell'apoptosi si osserva infatti nelle patologie infiammatorie ed immunomediate, mentre una forte diminuzione di fenomeni apoptotici si riscontra nelle malattie neoplastiche.<sup>79</sup>

Nella *malattia epatica, sia acuta che cronica*, il processo apoptotico rappresenta un meccanismo di difesa particolarmente efficiente nei confronti dei danni indotti da agenti virali, farmaci, tossine, sostanze chimiche, disordini metabolici, ecc.

Generalmente la malattia epatica acuta si sviluppa in seguito all'esposizione di agenti virali, di farmaci o tossine che inducono tossicità o come conseguenza del rigetto dopo il trapianto di fegato. Diversamente la malattia cronica è la conseguenza di una continua esposizione ad alcol, sostanze chimiche, persistenza virale, disordini metabolici o colestatici. Molti studi hanno evidenziato un eccesso di processi apoptotici nelle epatiti virali acute e croniche, nella colestasi, nell'epatite alcolica e nella steatopatie non alcolica (NASH). Questa eccessiva apoptosi contribuirebbe alla persistenza dell'infiammazione e promuoverebbe la fibrogenesi epatica. Dall'altra parte una ridotta apoptosi è stata associata allo sviluppo e progressione dei tumori nel fegato.

### 2.1 Epatopatie

***Epatite virale*** I virus B e C dell'epatite rappresentano la principale causa dell'epatite virale. HBV e HCV, appartenendo a famiglie virali diverse (Hepadnavirus ed Hepacivirus), sono due virus strutturalmente (genoma a DNA ed RNA rispettivamente) e biologicamente differenti. Tuttavia la storia naturale delle relative infezioni croniche nell'uomo presenta un comune quadro patogenetico che include lo sviluppo di epatite cronica che può evolvere a cirrosi e successivamente ad epatocarcinoma (HCC). Nell'infezione cronica i virus C e B dell'epatite sono in grado di persistere nel tessuto epatico dell'ospite per anni contribuendo alla cronicizzazione dell'infiammazione intraepatica. Il conseguente elevato grado di



distruzione e rigenerazione cellulare contribuisce ad aumentare il rischio di sviluppo del carcinoma epatocellulare. Il danno epatocellulare indotto dai virus patitici sarebbe il risultato della risposta immunitaria dell'ospite contro gli epatociti infettati che esprimono sulla loro superficie gli antigeni virali. La persistenza dell'infezione sarebbe pertanto il risultato di una deficitaria risposta immune.

Studi recenti in vitro hanno dimostrato il coinvolgimento delle proteine virali nel processo apoptotico. La proteina X di HBV (HBX), che regola l'espressione delle proteine virali, è in grado di modificare il processo apoptotico sia inducendolo che inibendolo. Infatti è stata dimostrata la capacità di HBX di inibire l'apoptosi indotta da p53 (fattore nucleare che regola la trascrizione di molti geni cellulari), TGF- $\beta$ , FasL,<sup>80</sup> Fas<sup>81,82</sup> e Bid<sup>83</sup> ma è stata anche documentata un'azione di induzione dell'apoptosi e di sensibilizzazione delle cellule agli stimoli pro-apoptotici.<sup>84,85</sup> HBX è in grado di neutralizzare gli effetti inibitori di Bcl-2 contro la citotossicità indotta da Fas,<sup>86</sup> e promuove l'apoptosi epatocitaria regolando l'espressione del Fas/FasL, Bax/Bcl-2, Bcl-xL e c-Myc<sup>87-89</sup> ed upregolando l'espressione della survivina (un membro della famiglia delle proteine inibitorie dell'apoptosi).<sup>90</sup>

HBX modula la proliferazione cellulare, anche attraverso la regolazione dei meccanismi apoptotici. Alti livelli di HBX, quali quelli osservati nelle fasi iniziali dell'infezione, comporterebbero una azione pro-apoptotica, mentre bassi livelli, quali quelli presenti nelle infezioni croniche, sarebbero associati ad una attività anti-apoptotica.

La proteina core del virus C dell'epatite ha la capacità di modulare l'espressione di geni cellulari (c-myc, c-fos, p53). Possiede anche attività trasformante in linee cellulari di epatoma promuove l'apoptosi indotta da Fas<sup>91</sup> e da TNF- $\alpha$ <sup>92</sup> inibendo la via di NF-kB<sup>93</sup>. La proteina C<sup>94</sup> inibisce l'apoptosi aumentando l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-xL,<sup>95</sup> mentre l'interazione del TGF- $\beta$  con la proteina Smad3<sup>96</sup> attiva la via antiapoptotica del NF-kB.<sup>97,98</sup>

Nell'**epatite alcolica**, l'apoptosi epatocitaria indotta d'alcol coinvolgerebbe l'induzione del CYP2E1, la produzione di specie reattive di ossigeno (ROS) e di lipidi perossidi.<sup>99,100</sup> Il sistema Fas/FasL risulta inoltre fortemente espresso negli epatociti di soggetti con epatite alcolica. Questo aumenterebbe la sensibilità dei linfociti T citotossici (CTL) di indurre apoptosi.<sup>101,102</sup> L'aumento di FasL può essere mediato sia dai ROS<sup>103</sup> che dal TNF- $\alpha$  dopo attivazione del NF-kB che upregola la trascrizione sia del

Fas che di FasL.<sup>104</sup> Soggetti con epatite alcolica presentano elevati livelli sierici di TNF- $\alpha$  suggerendo un ruolo importante del sistema TNF- $\alpha$ /TNFR1 nella morte cellulare.<sup>105,106</sup>

Anche nella **steatopatie non alcolica (NASH)** l'espressione dei recettori di morte, Fas/TNFR1 sono significativamente aumentati rispetto ai livelli osservati nei pazienti con malattia epatica alcolica.<sup>107,108</sup> Inoltre studi recenti hanno mostrato un ruolo importante degli acidi grassi liberi.<sup>109</sup> Il trattamento delle cellule in vitro con acidi grassi liberi a lunga catena portano alla traslocazione del Bax nei lisosomi e al rilascio di enzimi lisosomiali nel citoplasma.<sup>110</sup>

Nella **colestasi** gli acidi biliari inducono apoptosi epatocitaria attivando la via dei recettori di morte in una maniera indipendente dal ligando.<sup>111-113</sup>

L'esposizione degli acidi biliari tossici porta all'oligomerizzazione di Fas (ligando indipendente) ma anche di altre vie recettoriali come TRAIL-R2.<sup>112</sup>

Con la persistenza del danno epatico, indipendentemente dall'eziologia, si ha l'attivazione del processo di fibrosi che può evolvere a **cirrosi**. L'elevato grado di apoptosi riscontrato nell'epatite virale, colestasi, epatite alcolica e non alcolica porterebbe ad un aumento della produzione di corpi apoptotici. Questa aumentata produzione comporterebbe la saturazione del processo di fagocitosi da parte delle cellule di Kupffer con conseguente rilascio di mediatori proapoptotici quali FasL e di citochine proinfiammatorie quali TNF- $\alpha$ .<sup>38G</sup> Dall'altra parte anche l'attivazione delle cellule stellate da parte dei corpi apoptotici ed il conseguente rilascio di matrice extracellulare contribuirebbe alla fibrosi epatica. Non bisogna dimenticare l'eventuale autolisi dei corpi apoptotici con rilascio di mediatori proinfiammatori, che contribuirebbero ulteriormente alla promozione di fenomeni di fibrogenesi.

Il **carcinoma epatocellulare (HCC)** insorge come complicanza tardiva di una cirrosi correlata all'infezione cronica da parte dei virus epatitici. La cirrosi rappresenta di per sé un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza di epatocarcinoma. L'ipotesi più accreditata prevede un processo a più tappe, in cui epatociti maturi acquisiscono alterazioni genetiche successive in un microambiente epatico in cui il coesistere di necrosi, infiammazione e rigenerazione porta alla selezione di popolazioni monoclonali ed alla formazione di noduli displastici. I noduli con displasia di elevato grado rappresentano vere e proprie lesioni pre-neoplastiche che evolvono in epatocarcinoma.

Non è però ancora noto quali siano gli eventi critici dell'induzione del tumore versus la progressione. È stato pertanto ipotizzato che le alterazioni del processo apoptotico possono avere un ruolo nella cronicizzazione dell'infezione virale e anche nell'insorgenza e progressione dei tumori nel fegato.

L'eccessiva apoptosi causa inoltre persistenza dell'infiammazione e promuove la fibrogenesi. Dall'altra parte una ridotta apoptosi è stata associata allo sviluppo e progressione dei tumori nel fegato.

Moltissimi studi in letteratura riportano l'importanza del p53 nell'HCC.<sup>114,115</sup> p53 può indurre apoptosi con upregolazione trascrizionale delle BH3 only protein, del Bax, dei recettori di morte e dei loro ligandi (TRAIL-R1, Fas/FasL).<sup>116-118</sup> Una disfunzione del p53 permette alla cellula tumorale di sfuggire dall'apoptosi ed ha come risultato lo sviluppo del cancro. La perdita di Fas, spesso viene accompagnata da espressione di FasL e rappresenta un adattamento vantaggioso delle cellule tumorali visto che permette a loro non solo di sopravvivere all'attacco indotto da FasL espresso nei CTL e nelle cellule natural killer ma anche di uccidere attivamente le cellule immuni.<sup>119-121</sup>

## 2.2 Apoptosi epatocitaria

In corso di danno epatico, le cellule endoteliali, gli epatociti e i colangiociti vengono danneggiati dall'accumulo di metabolici tossici, ROS (radicali liberi dell'ossigeno) ed acidi biliari. Questo porta all'attivazione delle cellule di Kupffer con conseguente reclutamento di leucociti e linfociti che rilasciano citochine proinfiammatorie e fattori di crescita. Nella malattia acuta e cronica gli epatociti vengono così esposti ad aumentati livelli di citochine [TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ )], stress ossidativo ed acidi biliari.<sup>122</sup> Tutto questo porta alla morte delle cellule epatiche con conseguente perdita della funzione dell'organo per la quale non esistono attualmente terapie efficaci. Gli epatociti sono cellule dotate di meccanismi cellulari atti a favorire la sopravvivenza cellulare ma nel danno cronico si ha la perdita del delicato equilibrio tra meccanismi di sopravvivenza e meccanismi di morte cellulare a favore di quest'ultimi.

La via estrinseca e quella intrinseca sono strettamente correlate perché la via mitocondriale è spesso necessaria per amplificare il relativamente debole segnale apoptotico indotto dai recettori di morte negli epatociti. La

produzione del TNF- $\alpha$  è uno dei primi eventi osservato in molti tipi di danno epatico. Anche se TNF- $\alpha$ , può agire come un potente attivatore sia delle vie proinfiammatorie che di quelle proapoptotiche, queste vie di segnale interagiscono in una rete complessa a molti livelli, e l'attivazione di una via spesso dipende dall'attivazione di un'altra via, suggerendo che le cellule sono capaci di dirigere il segnale indotto dal TNF- $\alpha$  verso la risposta adatta. La stimolazione degli epatociti con TNF- $\alpha$  in vitro induce segnali di morte cellulare o alternativamente vie di sopravvivenza per tollerare il danno epatico. La neutralizzazione del TNF- $\alpha$  previene infatti l'attivazione di "early immediate gene" come quelli regolati dal fattore di trascrizione NF-kB ed AP-1 coinvolti nella proliferazione cellulare. Perciò conoscere le vie intracellulari che mediano una risposta cellulare opposta al TNF- $\alpha$  nelle cellule "resting" ci può aiutare a capire come queste citochine possono esercitare un tale effetto pleiotropico nel fegato.



### 3. Scopi della tesi

Sulla base di queste premesse lo scopo dello studio è stata l'identificazione dei meccanismi estrinseci ed intrinseci del processo apoptotico in corso di malattia epatica: dall'epatite cronica alla cirrosi, all'evoluzione ad epatocarcinoma. Il raggiungimento dell'obiettivo ha previsto uno studio su tessuti epatici di pazienti con differente grado di severità di malattia ed uno studio "in vitro" in cui sono state utilizzate colture primarie di epatociti umani.

La prima fase dello studio prevedeva la:

- 1) quantificazione dell'espressione di RNA messaggeri di Fas/FasL, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bax, Bad, BI-1 ed NF-kB in campioni di fegato ottenuti da pazienti con epatite cronica, cirrosi ed HCC
- 2) valutazione del ruolo svolto dal tipo di infezione virale (HBV o HCV indotta) nella modulazione di fattori pro ed anti apoptotici.
- 3) determinazione dell'espressione proteica mediante tecnica di Western Blot in campioni di fegato di soggetti con HCC

La seconda fase dello studio prevedeva:

- 4) allestimento di colture primarie di epatociti
- 5) valutazione delle diverse vie di attivazione dell'apoptosi nelle colture epatocitarie umane dopo stimolazione con:
  - a) TNF- $\alpha$ , principale citochina proinfiammatoria presente ad elevati livelli nei processi infiammatori, durante la malattia epatica;
  - b) Staurosporina (STS) potente inibitore delle proteine tiroxina/serina chinasi con attività antiproliferativa ed anti-apoptotica;
  - c) LY294002, inibitore sintetico delle PI3K (Fosfatidil inositol-3-chinasi)



## 4. Materiali e metodi

### 4.1 Casistica

Sono stati studiati 59 pazienti con malattie epatiche croniche di grado diverso.

- a) Il primo gruppo comprende 39 pazienti con epatite cronica (EC) di cui 31 con epatite HCV correlata (8M, 5F) con età media di  $38,9 \pm 12$  anni (range 21-55) e 8 con epatite HBV correlata (7M, 1F) con età media di  $39,5 \pm 10,7$  anni (range 28-59). La diagnosi di epatite cronica HCV correlata è stata formulata in base alla persistente positività di anticorpi anti-HCV da almeno sei mesi, alla presenza di RNA virale su tessuto, ai criteri clinici, ai dati bioumorali e al quadro istologico.
- b) Il secondo gruppo è costituito da 7 pazienti con cirrosi di cui 6 con cirrosi (CIRR) HCV correlata (5M) con età media di  $46,2 \pm 15,7$  anni (range 33-69) ed 1 con cirrosi HBV correlata (F) di 56 anni.
- c) Il terzo gruppo include 13 pazienti con carcinoma epatocellulare (HCC) insorto in tessuto cirrotico. L'eziologia della cirrosi era in 7 casi virale [6 HCV correlata: (4M, 2F) con età media  $56,83 \pm 16,94$ , (range 23-69); ed 1 HBV correlata (1M) di 55 anni ] e in 6 casi (3M, 2F) con età media  $61 \pm 10,98$  (range 46-72) non virus correlata.
- d) il gruppo di controllo (Contr) è costituito da 3 pazienti sottoposti a colecistectomia esenti da infezione virale e presenza di neoplasie.

### 4.2 Tessuti

I tessuti epatici erano costituiti da biopsie epatiche, effettuate a scopo diagnostico, in pazienti con epatite cronica di vario grado o con cirrosi, e da campioni chirurgici tumorali e



peritumorali, prelevati durante resezione chirurgica per tumore in pazienti con carcinoma epatocellulare

I tessuti epatici provenienti dagli interventi chirurgici sono stati tagliati in piccoli pezzi ed immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

Nei pazienti con HCC il tessuto peritumorale (PHCC) è stato prelevato ad almeno 1 cm dal margine di resezione del tessuto tumorale; inoltre, per escludere nel tessuto peritumorale la presenza di cellule tumorali infiltranti, sono state allestite sezioni istologiche, colorate con ematossilina ed eosina (H&E) e valutate indipendentemente da due patologi.

Gli epatocarcinomi sono stati classificati in ben differenziati, moderatamente e poco differenziati, secondo i criteri di Edmonson e Steiner.<sup>123</sup>

Il grado di attività delle epatiti croniche è stato valutato secondo la classificazione di Ishak.<sup>124</sup>

I tessuti venivano congelati immediatamente in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

### **4.3 Estrazione dell'RNA totale**

L'RNA totale è stato estratto usando il metodo descritto da Chomczynski e Sacchi.<sup>125</sup> Le biopsie e i tessuti chirurgici, conservati a -80°C, sono stati omogenati in 1 mL di una soluzione di isotiocianato di guanidina 4M, Sarcosil 0,5 % e mercaptoetanolo 0,1 M in tampone di citrato di sodio 0,025 M a pH 7 (soluzione D). All'omogenato sono stati aggiunti 50 µL di acetato di sodio 2M, a pH 4, 500 µL di fenolo (saturato con acqua) e 100 µL di una soluzione fredda di cloroformio ed alcol isoamilico (24:1). I campioni sono stati lasciati in ghiaccio per 15 min. e successivamente centrifugati a 12.000 rpm per 20 min. a +4°C. Al termine della centrifugazione è stata raccolta la fase acquosa alla quale sono stati aggiunti 500 µL di isopropanolo conservato a -20°C. Dopo 2 ore a -20°C, i campioni sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 20 min a +4°C. Dopo

aver eliminato il sopranatante, il pellet è stato risospeso in 300  $\mu$ L della soluzione D e successivamente sono stati aggiunti 400  $\mu$ L di isopropanolo conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al termine dell'incubazione per almeno 2 ore a  $-20^{\circ}\text{C}$ , i campioni sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 20 min a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Il pellet è stato risospeso in 20  $\mu$ L di acqua DEPC (diethylpirocarbonato).

Per ogni campione di RNA sono state effettuate letture spettrofotometriche a 320, 280 e 260 nm. La contaminazione da parte di proteine è stata valutata considerando il rapporto  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ . La concentrazione dell'RNA è stata calcolata in base all'assorbanza a 260 nm. Un  $\mu\text{g}$  di RNA è stato sottoposto ad elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2% in presenza di bromuro di etidio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), in TBE 1X (Tris 0.44 M, acido borico 0.44 M, EDTA 10 mM) come tampone di corsa e xilene cianolo (5 kb) e blu di bromofenolo (0,5 kb) come marcatori di corsa. L'osservazione del gel al transilluminatore, ha permesso di escludere la contaminazione dei campioni con DNA genomico e ha dimostrato l'integrità dell'RNA estratto.<sup>126</sup>

#### **4.4 RT-PCR**

Per ottenere il cDNA, 2  $\mu\text{g}$  di RNA totale sono stati sottoposti a retrotrascrizione enzimatica. La reazione è stata condotta in un volume di 40  $\mu\text{L}$  in presenza di tampone Tris-HCL 10 mM pH 8,3, KCL 50 mM, desossinucleotidi trifosfati (dNTPs) 1 mM, random esameri 2.5  $\mu\text{M}$ , inibitore delle RNasi 1 U/ $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (5.0 mM) e trascrittasi inversa MuLV 2,5 U/ $\mu\text{L}$ .

I campioni sono stati lasciati per 10 min a temperatura ambiente prima di essere sottoposti a retrotrascrizione. Per l'allestimento del controllo negativo, l'aliquota di RNA totale è stata sostituita con un uguale volume di  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC. La reazione è stata condotta in un termociclatore (Gene AMP PCR System 2400 - Perkin Elmer) a  $42^{\circ}\text{C}$  per 15 min, a  $99^{\circ}\text{C}$  per 5 min e al termine a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il cDNA è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Dal cDNA sono state amplificate con primers specifici le sequenze di RNA messaggero per  $\beta$ -actina, Bcl-2 e BI-1.

## 4.5 PCR

I primers usati per la PCR semequantitativa e la real time PCR assoluta sono rappresentati nelle tabelle 1 e 2

## 4.6 PCR primers

Le sequenze specifiche per la costruzione dei primers sono state ottenute da GenBank sequence database del National Center for Biotechnology Information ed Ensembl Human Genome, database del The Wellcome Trust Sanger Institute. I primers sono stati disegnati usando il software Primers Express (version 1.0, Applied Biosystems). I primers sono stati sintetizzati purificati dalla ditta Primm (Biomedical Science Park, MI). (Tabelle 1 e Tabella2)

## 4.7 PCR Semiquantitativa

PCR per  $\beta$ -actina: reazione condotta a 95°C per 2 min, per 25 cicli a 94°C per 45 sec, 60°C per 45 sec, 72°C per 2 min ed infine a 72°C per 7min.

PCR per Fas: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 31 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min. 30 sec. ed infine a 72°C per 7min.

PCR per FasL: reazione condotta a 95°C per 2 min, per 35 cicli a 94°C per 45 sec, 65°C per 45 sec, 72°C per 2 min ed infine a 72°C per 7min.

PCR per IL-1 $\beta$ : reazione condotta a 95°C per 2 min, per 35 cicli a 94°C per 45 sec, 60°C per 45 sec, 72°C per 2 min ed infine a 72°C per 7min.

PCR per TNF- $\alpha$ : reazione condotta a 95°C per 2 min, per 35 cicli a 94°C per 45 sec, 60°C per 45 sec, 72°C per 2 min ed infine a 72°C per 7min.

## 4.8 Preparazione Curve Standard per Real Time PCR

PCR per  $\beta$ -actina. Sono stati usati 50 ng di cDNA. La reazione è stata condotta in un volume totale di 50  $\mu$ L in presenza di: DNA polimerasi AmpliTaq® (0.04 U/ $\mu$ L, 2 nM), anticorpo TaqStart™ (56 nM), primers (0.4  $\mu$ M ciascuno), dNTPs (0.2 mM ciascuno), MgCl<sub>2</sub> (3.0 mM), tampone Tris-

HCl (10mM, pH 8.3) e KCl (50mM). Per il controllo negativo l'aliquota di cDNA è stata sostituita da un uguale volume di acqua DEPC. La miscela di reazione è stata posta nel termociclatore a 95°C per 2 min, per 28 cicli a 94°C per 45 sec, 60°C per 45 sec e 72°C per 2 min, ed infine a 72°C per 7 min.

PCR per Bcl-2: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 30 cicli a 94°C per 20 sec, 65°C per 10 sec e 70°C per 30 sec, ed infine a 72°C per 7 min.

PCR per Bax: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 25 cicli a 94°C per 20 sec, 60°C per 10 sec e 65°C per 30 sec, ed infine a 72°C per 7 min.

PCR per Bad: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 28 cicli a 94°C per 20 sec, 65°C per 10 sec e 70°C per 30 sec, ed infine a 72°C per 7 min.

PCR per Bcl-1: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 25 cicli a 94°C per 20 sec, 60°C per 10 sec e 65°C per 30 sec, ed infine a 72°C per 7 min.

Tutti gli ampliconi sono stati conservati a + 4°C.

PCR per TGF- $\beta$ 1: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 30 cicli a 94°C per 20 sec, 65°C per 10 sec, 70°C per 30 sec ed infine a 72°C per 7min.

PCR per NF- $\kappa$ B: reazione condotta a 94°C per 2 min, per 30 cicli a 94°C per 20 sec, 65°C per 10 sec e 65°C per 30 sec, ed infine a 72°C per 7 min.

L'anticorpo TaqStart™ è stato fornito dalla ditta Clontech. HotMaster TaqDNA Polimerasi e il 10X HotMaster TaqBuffer con Mg<sup>++</sup> sono stati forniti dalla ditta Eppendorf. Tutti gli altri reattivi sono stati forniti dalla ditta Applied Biosystems. La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400).

#### **4.9 Purificazione del DNA**

Gli amplificati di DNA sono stati purificati mediante assorbimento su membrana in presenza di alte concentrazioni di sali, ottenendo così elevate concentrazioni di DNA purificato. L'entità dell'assorbimento del DNA sulla membrana è in funzione del pH. In genere è dell' 80 % se il pH

è < 7.5, ed è ridotto drasticamente a pH più alto. La colonnina permette di ottenere piccoli prodotti di PCR double-stranded da 70 pb, e la rimozione di primers di 40 nucleotidi. Per la purificazione degli ampliconi è stato utilizzato il MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Valencia , CA, USA) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. In breve: 250 µl di tampone, fornito dal kit, vengono aggiunti a 50 µl di amplificato di PCR e vortexati. Segue trasferimento della soluzione sulla colonnina, incubazione per 1 min e trasferimento della colonnina in una provetta da 2 mL dove si aggiungono 750 µl di un secondo tampone fornito dal kit. Dopo due centrifugazioni per 1 min a 13000 rpm seguite da trasferimento in una nuova provetta, si aggiungono 10 µl di tampone (10mM Tris-Cl, pH 8,5) e si lascia per 1 min in incubazione. Segue centrifugazione per 1 min e recupero del prodotto purificato.

#### **4.10 Quantificazione spettrofotometrica del DNA purificato**

La quantità purificata dell'amplicone, portata ad un volume finale di 140 µL con acqua milliQ sterile, è stata sottoposta a lettura con biofotometro Eppendorf a 230nm / 260nm / 280nm / 320nm. La contaminazione da parte di proteine è stata valutata considerando il rapporto OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>.

#### **4.11 Quantificazione fluorimetrica del DNA purificato**

Per una maggiore determinazione della quantità di DNA purificato si è proceduto ad una lettura fluorimetrica del DNA mediante l'uso di PicoGreen, intercalante fluorescente, altamente sensibile per la quantificazione di dsDNA, che permette di quantificare piccole quantità, a partire da 25 pg/mL di dsDNA. Con questa tecnica è stato possibile quantificare il DNA, che poi è stato opportunamente diluito ( $10^{11}$ ,  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  cop/µl) per costruire le curve standard da processare in Real Time. Viene utilizzato il Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 ) per la diluizione di PicoGreen e per la diluizione della curva standard e dei

campioni da quantificare. Poiché il PicoGreen è un reagente estremamente sensibile di rilevazione per il dsDNA, è di importanza fondamentale che la soluzione di TE usata sia esente da contaminazione di acidi nucleici. La soluzione di Picogreen ricostituita in DMSO (dimetilsolfossido) è stata diluita in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 ). Per la costruzione della curva standard è stato utilizzato il DNA estratto da sperma di salmone (Sigma) alla concentrazione iniziale di 1,5 mg/mL. Sono state quindi allestite diluizioni scalari alla concentrazione di: 25 ng/mL, 15 ng/mL, 2.5 ng/mL, 250 pg/mL, 25pg/mL, in un volume finale di 1mL. Anche i campioni da determinare sono stati portati ad un volume finale di reazione di 1 ml (50 µl di campione + 950 µl di TE). 1 ml della soluzione di PicoGreen è stato aggiunto agli standard ed ai campioni. Dopo un'incubazione di 2-5 minuti a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce, si è proceduto alla lettura fluorimetrica con  $\lambda$  di eccitazione di 480 nm e  $\lambda$  di emissione a 520 nm, usando un fluorimetro LS-5 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer, Foster City, CA). La concentrazione dei campioni è stata estrapolata dall'intensità di fluorescenza relativa a ciascun campione riportata sulla curva standard, costruita con le riportate diluizione del DNA standard, previa sottrazione del bianco a ciascuna lettura.

#### **4.12 Elettroforesi su gel di poliacrilamide**

I prodotti di PCR ottenuti prima e dopo purificazione con il kit della ditta Qiagen (MinElute PCR Purification) e i prodotti di PCR in Real-Time sono stati caricati su gel di poliacrilamide. Le bande sono state evidenziate dopo colorazione con nitrato d'argento (silver stain).I gel di poliacrilamide al 7% sono stati preparati con una miscela acrilamide-bisacrilamide (29:1) e glicerolo (5%) e con uno spessore di 0.75mm. Per la preparazione e come tampone di corsa è stato usato TBE 1X. Con gli amplificati venivano caricati anche un marker per la lunghezza del frammento a DNA digerito ( $\phi$ X174 / Hae III) e due coloranti come marcatori di corsa. La corsa veniva

condotta a 100 V fino al raggiungimento della base del gel da parte del primo colorante (xilene di cianolo, 5 kb).

Dopo la corsa elettroforetica, i gel venivano colorati prima con bromuro di etidio (0.5 µg/mL) per 20 min., osservati al transilluminatore e quindi fotografati per la documentazione e successivamente colorati con nitrato di argento: dopo due lavaggi in H<sub>2</sub>O, in etanolo al 10% v/v per 5 min., in presenza di HNO<sub>3</sub> al 1% per 3 min., AgNO<sub>3</sub> 12 mM per 20 min e in una soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.28 M e formalina 0.019% per 4 min. Dopo 2 min in acido acetico al 10% v/v e un lavaggio di 2 min, i gel colorati, venivano fissati su lastre di vetro, tra due pellicole di cellophane, e lasciati essiccare.

#### **4.13 Analisi densitometrica**

Le immagini dei gel sono state acquisite in trasparenza con uno scanner GS-710 Calibrated Imaging Densitometer BIO-RAD. La determinazione dell'intensità delle bande è stata effettuata con il programma Quantità One-4.1.0. Questo programma permette di rilevare la densità ottica della banda complessiva e di sottrarre il background. Il valore della quantità relativa di mRNA della proteina di interesse è stato ottenuto come rapporto tra il valore della banda del Fas, FasL, IL-1α e TNF-α sul valore della banda della β-actina. La β-actina è stata scelta come house keeping gene. Il rapporto tra le OD di Fas/FasL/IL-1β TNF-α e le rispettive OD della β-actina rende confrontabili i dati dei vari pazienti.

#### **4.14 SYBR Green I Real Time PCR**

La Real Time PCR è stata condotta utilizzando un ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl in presenza di SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) contenente DNA polimerasi AmpliTaq Gold, dNTPs e dUTP, SYBR Green, in 1X buffer e

primers specifici alla concentrazione finale di 300 nM ciascuno. La reazione è stata condotta in una piastra a 96 pozzetti per 45 cicli di amplificazione alle seguenti condizioni: 50°C per 2 min, 95°C per 10 min, e 94°C per 45 sec e a 60°C per 45 sec per  $\beta$ -actina, Bax ed NF- $\kappa$ B, a 62°C per 45 sec per Bcl-2, Bcl-1 e TGF  $\beta$ -1 e a 65°C per 45 sec per Bad. Alla fine della PCR la temperatura è stata aumentata da 60 a 95 °C alla velocità di 2°C/min ed la fluorescenza è stata misurata ogni 15 sec al fine di costruire la curva di melting. In ogni seduta di amplificazione è stato inserito come controllo negativo un campione in cui il cDNA è stato sostituito con H<sub>2</sub>O. Tutte le determinazioni sono state condotte in triplicato per valutare la riproducibilità.

#### **4.15 Analisi dei dati di PCR**

Al termine della amplificazione i dati sono stati elaborati con il software'ABI 7900 SDS. Il software determina 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 la curva standard fornendo tutti i parametri che permettono il calcolo dell'efficienza della reazione di amplificazione.<sup>127</sup> Le concentrazioni dei campioni vengono estrapolate sulla curva standard. I risultati vengono espressi come numero assoluto di copie per  $\mu$ L. Successivamente l'espressione dei geni di nostro interesse viene normalizzata con la concentrazione di  $\beta$ -actina usata come housekeeping gene ottenendo così un rapporto relativo dell'espressione geni, calcolato però su valori di concentrazione.

#### **4.16 Analisi di proteine**

##### **Omogeneizzazione del tessuto**

Per l'analisi delle proteine sono stati usati tessuti tumorali e peritumorali conservati a -80°C. I campioni sono stati omogeneizzati in tampone di lisi



RIPA (Tris-HCl 1M, pH 7.4, NaCl 1M, EDTA 0.1M, Niaproof, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200mM, SDS 10%) contenente un cocktail di inibitori delle proteasi Roche Complete (Chymotrypsin 1.5 µg/ml, Thermolysin 0.8µg/ml, Papain 1mg/ml, Pronase, 1.5 µg/ml, Pancreatic extract 15µg/ml, Trypsin 0.2 µg/ml) in ghiaccio. Dopo centrifugazione per 20 min a 14000 rcf a 4°C, il soprannatante è stato raccolto e conservato a -80°C.

### **Dosaggio delle proteine**

Per la determinazione della concentrazione proteica dei lisati è stato usato il BIO-RAD *protein assay* (BIO-RAD). Le determinazioni spettrofotometriche, effettuate a 655 nm, sono riferite ad una retta di taratura costruita utilizzando come standard l'albumina da siero bovina (BSA), saggiata in quantità da 0,125 mg/mL a 1,5 mg/mL.

### **Separazione elettroforetica e trasferimento**

Gli omogenati proteici sono stati sciolti in una soluzione di Tris-HCl 0.25M pH 6.8, glicerolo 20%, SDS 4%, DTT 0.1M e blu di bromofenolo 1% e sottoposti ad ebollizione per 5 minuti. I campioni sono quindi stati caricati su gel al 10% e la corsa è stata effettuata a 80V.

Il trasferimento del gel su filtro di nitrocellulosa è stato avvenuto elettricamente per 1h a 80V di corsa raffreddando l'apparecchio.

### **Immunoblotting**

Dopo il trasferimento, la membrana è stata sottoposta a lavaggi con H<sub>2</sub>O distillata e TPBS (PBS 1X-Tween 20) e trattata con tampone di saturazione contenente latte scremato al 5% per 1h a temperatura ambiente per bloccare tutti i siti di legame.

In seguito, dopo tre lavaggi di quindici minuti ciascuno con TPBS e H<sub>2</sub>O distillata la membrana viene incubata con l'anticorpo primario.

L'immunorivelazione di *NF-kB p65* è stata eseguita utilizzando come anticorpo primario, l'anticorpo monoclonale di topo (Santa Cruz, California, USA) diluito 1:1000. Dopo questo periodo di incubazione, la membrana è stata sottoposta all'incubazione con l'anticorpo secondario, diluito 1:5000 in TPBS, per un'ora.

L'immunorivelazione di *β-actina* è stata eseguita utilizzando come anticorpo primario, l'anticorpo monoclonale di topo (Santa Cruz, California,

USA) diluito 1:1000. L'anticorpo secondario, è stato diluito 1:10000 in TPBS, per un'ora.

Come anticorpo secondario, sono state usate immunoglobuline anti-topo prodotte in capra coniugate a perossidasi di rafano (ECL Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species specific whole antibody (from sheep), GE Healthcare).

### **Chemiluminescenza**

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, le membrane sono state nuovamente lavate con H<sub>2</sub>O distillata e TPBS; le bande proteiche sono state evidenziate mediante chemiluminescenza utilizzando il Kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Trattando le membrane con una soluzione al 50% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50% di luminolo.

La perossidasi legata all'anticorpo secondario reagisce con l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ed il luminolo libera un fotone per ogni sito di reazione; i fotoni liberati vanno ad impressionare una lastra radiografica posta sulle membrane. Lo sviluppo delle lastre permette di visualizzare le bande in corrispondenza del loro peso molecolare. L'intensità delle bande sulla lastra radiografica è stata determinata mediante analisi densitometrica dopo acquisizione delle lastre con uno scanner GS-710 Calibrated Imaging Densitometer BIO-RAD.

L'intensità delle proteine è stata espressa come rapporto tra l'intensità del housekeeping gene ( $\beta$ -actina) ed NF- $\kappa$ B.

## **4.17 Colture epatocitarie**

### **4.17a Allestimento di colture cellulari**

Le colture primarie di epatociti umani sono state ottenute da fegati umani privi di requisiti indispensabili per il trapianto di fegato. Dopo perfusione del fegato con collagenasi sono state allestite colture epatocitarie alla [3x10<sup>6</sup>] in 2 ml di terreno in piastre da 6 pozzetti del diametro di 3cm contenenti biomatrice acellulare.

Gli epatociti sono stati mantenuti in coltura per 4h dall'isolamento in terreno contenente siero fetale, antibiotici, desametazone ed insulina e per le successive 24h in terreno contenente solo antibiotici e siero fetale.

Successivamente tutte le stimolazioni sono state condotte in terreno privo di siero fetale.

Le colture sono state poste in un incubatore a 37°C in atmosfera al 95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub> per successive altre 48h.

#### **4.17b Stimolazione delle colture cellulari**

Gli epatociti sono stati trattati per 4h, 8h, 12h, 24h e 48h con:

- 1) solo medium
- 2) TNF- $\alpha$ , principale citochina proinfiammatoria sempre presente nei siti infiammatori in corso di danno epatico alla concentrazione di 10 ng/mL
- 3) staurosporina (STS), inibitore a ampio spettro delle proteine tirosina e serina chinasi in grado di esercitare attività antiproliferative e apoptotiche in molte cellule tumorali alla concentrazione di 10mM,
- 4) LY294002, composto sintetico disegnato quale specifico inibitore del fosfatidil inositol-3-chinasi (PI3K) alla concentrazione di 10mM,
- 5) sono stati eseguiti esperimenti pretrattando per 1h gli epatociti in coltura con STS e LY294002 e successiva stimolazione con TNF- $\alpha$  per 4, 8, 12, 24 e 48h.

Tutte le tecniche utilizzate per lo studio nei tessuti umani, sono state utilizzate anche per questo studio in vivo. Molto brevemente, al termine dei trattamenti e delle stimolazioni, si è proceduto a:

- Estrazione dell'RNA totale dalle cellule in coltura prima e dopo trattamento con TNF- $\alpha$ , STS, LY294002
- RT-PCR per la sintesi di cDNA
- Real Time PCR e PCR semiquantitativa per i mediatori coinvolti nel processo apoptotico (Fas/FasL, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bax, Bad, BI-1 ed NF-kB)

## **5. Risultati**

### **5.1 Cinetiche**

Lo studio delle cinetiche di amplificazione ha permesso di determinare il numero di cicli in cui la reazione di amplificazione avviene in fase esponenziale. Nella fase esponenziale sono stati scelti 35 cicli di amplificazione del FasL, 31 cicli per il Fas , 31 cicli per l'IL-1 $\beta$ , 31 cicli per il TNF- $\alpha$  e 25 cicli per la  $\beta$ -actina.

### **5.2 Curve standard**

I risultati relativi alle curve standard ottenuti in Real time PCR per  $\beta$ -actina, Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, NF-kB e TGF- $\alpha$  sono riportati rispettivamente nelle figure: Fig.2 (a, b, c, d), Fig.3 (a, b, c, d), Fig.4 (a, b, c, d) e nella tabella n.1.

### **5.3 Real-Time PCR**

La tecnica di Real Time PCR e le condizioni di lavoro messe a punto, hanno permesso di raggiungere una elevata sensibilità e specificità, in campioni di piccole dimensioni quali sono le biopsie epatiche (vedi Tabella 3).

Utilizzando tale metodica è stato possibile quantificare le molecole di Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, NF-kB e TGF $\beta$ -1 in frammenti di tessuto ottenuti da pazienti con epatopatie di vario grado, durante l'esecuzione di biopsia epatica a scopo diagnostico o durante interventi chirurgici di resezione di tumore epatico. Per contenere i costi delle nostre determinazioni abbiamo optato per l'uso del SYBR Green I quale sistema di rivelazione del prodotto di amplificazione . Quando il SYBR Green I è legato al solco minore della doppia elica di DNA ( dsDNA), l'intensità di fluorescenza aumenta più di 100 volte. La quantificazione si ottiene misurando l'incremento della fluorescenza al di sopra del livello basale (baseline)

generato durante i primi cicli di PCR (background).<sup>128</sup> Il Ct o ciclo soglia fornisce la quantificazione precisa della fluorescenza del campione; tale valore si ottiene dall'intersezione del segnale di fluorescenza con la threshold (aumento di fluorescenza al di sopra della baseline) durante la fase esponenziale della reazione. Il legame del SYBR Green I al dsDNA avviene in maniera indipendente dalla sequenza nucleotidica, vale a dire in modo aspecifico. Pertanto, per identificare gli ampliconi aspecifici, eventualmente presenti nei prodotti di PCR, si procede all'analisi delle curve di melting<sup>129</sup> (Fig 2c) che visualizzano la presenza di picchi diversi dal pico atteso in corrispondenza alle differenti temperature di melting dovute alla diversa lunghezza dei prodotti aspecifici.<sup>130</sup> I prodotti di PCR, ottenuti dopo i 45 cicli di amplificazione, sono stati inoltre analizzati su gel di poliacrilamide riscontrando concordanza tra i risultati delle curve di melting ed i gel di poliacrilamide (Fig 2d).

## 5.4 Espressione di mRNA nei tessuti epatici

I risultati relativi all'espressione dei messaggeri per Fas, FasL, IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  mediante PCR semiquantitativa sono riportati nella Fig3: a, b, c, d, mentre i risultati relativi all'espressione di Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, NF-kB e TGF- $\beta$ -1 mediante Real Time PCR assoluta sono riportati nella figura: Fig.4 : a, b, c, d, e, f.

### 5.4a Espressione di mRNA di Fas

È stata evidenziata una differenza statisticamente significativa (Kruskal-Wallis Test  $p=0,026$ ) nell'espressione di mRNA per Fas tra i cinque gruppi di pazienti inclusi nello studio (CONTR, EC, CIRR, PHCC, HCC). In particolare i tessuti di controllo esprimevano una minore quantità di mRNA per FasL statisticamente significativa rispetto ai tessuti con EC ( $p=0,015$ ), CIRR ( $p=0,016$ ), PHCC ( $p=0,009$ ) ed HCC ( $p=0,05$ ).

Confrontando i campioni patologici, i tessuti CIRR esprimevano i più alti livelli di trascritti per Fas statisticamente significativamente rispetto all'HCC ( $p=0,026$ ). Nessuna differenza è stata osservata tra i tessuti CIRR ( $1,315 \pm 0,7$ ) e i tessuti PHCC ( $0,948 \pm 0,6$ ), né tra i tessuti PHCC ed i tessuti con HCC ( $0,652 \pm 0,3$ ). Non è emersa nessuna differenza

statisticamente significativa tra i tessuti ottenuti da pazienti con malattia HBV o HCV correlata

#### **5.4b Espressione di mRNA di FasL**

L'espressione dei messaggeri per FasL rappresentano un andamento simile all'espressione di Fas. Una differenza statisticamente significativa ( $p=0,0003$ ) è stata osservata mediante il Kruskal Wallis test tra i vari gruppi considerati. Nei tessuti di controllo è stata osservata una minor espressione di mRNA per FasL rispetto sia ai tessuti con EC ( $0,426 \pm 0,1$ ;  $p=0,004$ ) che a quelli CIRR ( $0,592 \pm 0,1$ ;  $p=0,033$ ) mentre non è stata trovata nessuna differenza in confronto con i tessuti PHCC ( $0,352 \pm 0,2$ ) e quelli HCC ( $0,229 \pm 0,2$ ).

I tessuti cirrotici senza tumore esprimevano i più alti livelli di mRNA per FasL in maniera statisticamente significativa rispetto ai tessuti con EC ( $p=0,025$ ), quelli PHCC ( $p=0,013$ ) ed HCC ( $p=0,005$ ).

Differenze statisticamente significative sono state inoltre osservate tra CH vs HCC ( $p=0,0008$ ) e tra PHCC vs HCC ( $p=0,04$ ).

Nessuna differenza nell'espressione di FasL è stata trovata tra i tessuti HBV-correlati ed HCV-correlati.

#### **5.4c Espressione di mRNA di IL-1 $\beta$**

I livelli dei trascritti per IL-1 $\beta$  risultavano significativamente elevati nei tessuti PHCC ( $2,101 \pm 1,3$ ) rispetto ai tessuti con EC ( $p<0,0001$ ), con CIRR ( $p=0,005$ ) e con HCC ( $p=0,05$ ).

Suddividendo i tessuti ottenuti da pazienti con EC in base al tipo di infezione virale HBV- ed HCV-correlati, i livelli dei trascritti per IL-1 $\beta$  erano più alti in maniera statisticamente significativa nei tessuti HCV-correlati ( $1,076 \pm 0,4$ ;  $p=0,01$ ) rispetto a quelli HBV-correlati ( $0,631 \pm 0,3$ ) (Fig.5a).

#### **5.4d Espressione di mRNA di TNF- $\alpha$**

Sia nei tessuti PHCC che in quelli con HCC è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa di TNF- $\alpha$  rispetto ai tessuti

cirrotici senza tumore ( $p=0,038$ ,  $p=0,05$  rispettivamente). Livelli statisticamente significativi sono stati osservati anche tra CH vs PHCC ( $p<0,0001$ ).

Suddividendo i tessuti sulla base del tipo di infezione virale, i tessuti con EC HCV-correlati ( $6,11 \pm 3,45$ ) mostravano una differenza statisticamente significativa rispetto alle EC HBV-correlate ( $3,83 \pm 0,96$ ;  $p<0,001$ ). (Fig.5b).

#### **5.4e Espressione di mRNA di TGF $\beta$ -1**

Nei tessuti con EC sono stati osservati i più bassi livelli di mRNA per TGF $\beta$ -1, statisticamente significativi rispetto sia ai tessuti con HCC ( $p=0,014$ ) che a quelli PHCC ( $p=0,028$ ).

Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra ECA HBV correlate ed ECA HCV correlate.

#### **5.4f Espressione di mRNA di Bcl-2**

I più alti livelli di trascritti per Bcl-2 sono stati osservati nei tessuti PHCC ( $7.12 \pm 3,56$ ). Questi risultavano statisticamente significativi rispetto ai tessuti di controllo ( $3,22 \pm 0,919$ ;  $p=0,0264$ ), ai tessuti con EC ( $3,84 \pm 1,12$ ;  $p=0,0004$ ) ed ai tessuti CIRR ( $4,29 \pm 0,88$ ;  $p=0,05$ ).

Una differenza statisticamente significativa è stata inoltre osservata tra i tessuti tumorali ( $5.05 \pm 3,32$ ) e i tessuti con EC ( $3,84 \pm 1,12$ ;  $p=0,05$ ).

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra ECA HBV correlate ed ECA HCV correlate, né tra cirrosi HCV correlate e cirrosi HBV correlate e neppure tra HCC HCV correlate ed HCC HBV correlate.

#### **5.4g Espressione di mRNA di Bax**

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nell'espressione di Bax nei tessuti considerati.

#### **5.4h Espressione di mRNA di Bad**

I più alti livelli di trascritti per Bad sono stati riscontrati nei tessuti di controllo ( $8,03 \pm 5,05$ ). Tali livelli erano statisticamente maggiori rispetto a tutti gli altri tessuti considerati: Contr vs EC ( $4,32 \pm 1,87$ ;  $p=0,006$ ); Contr vs PHCC ( $2,20 \pm 0,75$ ;  $p=0,0005$ ); Contr vs HCC ( $2,20 \pm 1,46$ ;  $p=0,002$ ).

I messaggeri per Bad mostravano una differenza significativa tra i tessuti con EC vs PHCC ( $p=0,00006$ ) e tra EC vs HCC ( $p=0,0007$ ).

Significativa era inoltre la differenza tra i tessuti cirrotici senza tumore e i tessuti cirrotici peritumorali ( $p=0,023$ ).

Inoltre, suddividendo i tessuti in base al tipo di infezione virale (HCV o HBV) è stato osservato un aumento dei trascritti di Bad nei tessuti con EC HBV-correlati ( $5,84 \pm 2,08$ ) rispetto a quelli HCV-correlati ( $3,93 \pm 1,63$ ;  $p=0,018$ ) (Fig.5c).

#### **5.4i Espressione di mRNA di BI-1**

I maggiori livelli di mRNA per BI-1 sono stati osservati nelle epatiti croniche ( $989,83 \pm 351,96$ ). Tali livelli erano significativamente elevati rispetto ai tessuti CIRR ( $685,34 \pm 270,88$ ;  $p=0,033$ ), ai PHCC ( $543,10 \pm 345,47$ ;  $p<0,001$ ) ed agli HCC ( $365,92 \pm 185,52$ ;  $p<0,001$ ).

I tessuti tumorali (HCC) esprimevano la minore quantità di livelli di mRNA per BI-1 anche rispetto ai tessuti CIRR ( $p=0,019$ ).

Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra ECA HBV correlate ed ECA HCV correlate, ne tra cirrosi HCV correlate e cirrosi HBV correlate e neppure tra HCC HCV correlate ed HCC HBV correlate.

#### **5.4j Espressione di mRNA di NF-kB**

I tessuti di controllo ( $0,58 \pm 0,37$ ) presentavano i più bassi livelli di trascritti per NF-kB statisticamente significativi rispetto ai tessuti con EC ( $2,24 \pm 2,16$ ;  $p=0,05$ ) ed ai tessuti PHCC ( $3,38 \pm 2,46$ ;  $p=0,05$ ).

Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa tra ECA HBV correlate ed ECA HCV correlate.

#### **5.5 Espressione proteica di NF-kB**



Nei tessuti con HCC ( $0,97 \pm 0,67$ ) si osservava una diminuita espressione proteica di NF-kB rispetto ai tessuti PHCC ( $1,82 \pm 1,61$ ) senza tuttavia raggiungere la significatività statistica. (Fig.6:a, b).

## **5.16 Risultati colture epatocitarie**

### **5.16a Effetti delle condizioni di coltura sull'espressione dei trascritti Fas/FasL, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, Bcl-2, Bax, Bad, BI-1 ed NF-kB.**

L'RNA totale, estratto dagli epatociti umani in coltura dopo 4, 8, 12, 24 e 48h di incubazione, è stato retrotrascritto in cDNA e successivamente processato in PCR semiquantitativa e in Real Time PCR quantitativa assoluta specifica per l'analisi dei membri apoptotici ed anti-apoptotici. I livelli di trascritti per Bcl-2, Bax, Fas, ed NF-kB in presenza di solo medium esprimevano gli stessi livelli da 4h fino a 48h.

Al contrario i trascritti di Bad erano aumentati rispetto ai valori osservati dopo 4 e 8h di incubazione. Soltanto per IL-1 $\beta$  sono stati osservati i più bassi livelli di mRNA a 48h rispetto a 4, 8 e 12h d'incubazione.

Dopo 48h di coltura solo TGF- $\beta$  e BI-1, aumentano in presenza di solo medium.

Sulla base di questi dati abbiamo deciso di stimolare le colture cellulari fino a 48h di incubazione.

### **5.16b Stimolazione con TNF- $\alpha$**

Le cellule epatocitarie sono state preliminarmente stimolate con dosi diverse di TNF- $\alpha$  in un terreno privo di siero fetale per tempi diversi d'incubazione (0, 5, 10, 30 minuti e per 1, 4, 12, 24 e 48h). Per ciascuna concentrazione utilizzata e per tutti i tempi di stimolazione è stato applicato l'MTT test. Nei nostri esperimenti il TNF- $\alpha$  da solo, non induce apoptosi nelle colture cellulari. Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo condotto tutti gli esperimenti utilizzando 10 ng/ml di TNF- $\alpha$ . Abbiamo valutato l'espressione dei livelli di mRNA per i mediatori intrinseci ed estrinseci coinvolti nel processo apoptotico mediante PCR semiquantitativa per Fas, FasL e IL-1 $\beta$  (Fig 7: a, b, c), e Real Time PCR per Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, NF-kB e TGF $\beta$ -1 $\beta$  (Fig 8: a, b, c, d, e, f).

### **Espressione di mRNA**

Nelle colture primarie di epatociti umani stimolati con TNF- $\alpha$  alla concentrazione di 10 ng/mL è stata osservata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di **FasL** soltanto a 12h rispetto alle cellule con solo medium ( $p < 0,05$ ). TNF- $\alpha$  non sembra avere fino a 24h di incubazione nessun effetto sull'espressione di **Fas**). Induce una forte stimolazione statisticamente significativa invece dell' **IL-1 $\beta$**  a partire da 4h fino a 24h ( $p < 0,01$ ).

L'espressione di **Bcl-2**, un mediatore ben noto per la sua funzione anti-apoptotica risulta fortemente stimolato rispetto alle cellule con solo medium dopo 4h ( $1.313 \pm 0.2$  vs  $0.706 \pm 0.2$ ,  $p = 0,035$ ) e 24h ( $1.081 \pm 0.3$  vs  $0.662 \pm 0.02$ ,  $p = 0,015$ ). Aumentati livelli di mRNA per Bcl-2 sono stati inoltre osservati a 12h e 48h, senza tuttavia raggiungere la significatività statistica. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata nell'espressione di **BI-1** e **Bax** ai vari tempi d'incubazione (4, 12, 24 e 48h). Le colture cellulari non stimolate a 4, 8 e 12h di incubazione mostravano i stessi livelli per **Bad**. Solo dopo 24h e 48h di incubazione gli epatociti umani mostravano rispetto alla presenza di solo medium un aumento statisticamente significativo dei trascritti di Bad ( $15.919 \pm 2.815$  vs  $9.55 \pm 3.33$ ,  $p = 0,0049$  e  $15.07 \pm 2.26$  vs  $10.59 \pm 3.03$ ,  $p = 0,05$ , rispettivamente). Infine TNF- $\alpha$  è stato in grado di stimolare **TGF $\beta$ -1** ed **NF-kB** a 24h ( $p = 0.0152$  e  $p = 0.0175$  rispettivamente) e a 48h ( $p = 0.05$ ) di incubazione.

### **5.16c Stimolazione con Staurosporina (STS):**

Epatociti stimolati con STS esprimono bassi livelli di Bcl-2 statisticamente significativi rispetto alle cellule incubate con solo medium solo a 8h ( $0.347 \pm 0.06$  vs  $0.932 \pm 0.3$ ,  $p = 0.028$ ) e 24h ( $0.404 \pm 0.07$  vs  $0.662 \pm 0.02$ ,  $p = 0.028$ ). Nessuna differenza sempre rispetto al medium per quanto riguarda l'espressione di TGF $\beta$ -1, Bax, ed NF-kB. Mentre si osserva un aumentata espressione di Bad solo a 12h ( $p = 0.0242$ ) e di BI-1 a 8h ( $p = 0.0167$ ) e 24h ( $p = 0.033$ ).

### **5.16d Stimolazione con LY294002:**

L'incubazione degli epatociti con LY294002 rispetto agli epatociti incubati con solo medium induceva inibizione fino a 12h di Bcl-2 [4h ( $0.182 \pm 0.06$  vs  $0.706 \pm 0.2$ ,  $p=0.0079$ ); 8h ( $0.179 \pm 0.13$  vs  $0.932 \pm 0.3$ ,  $p=0.02$ ); 12h ( $0.361 \pm 0.03$  vs  $0.829 \pm 0.3$ ,  $p=0.028$ ). Mentre nessuna differenza è stata osservata nell'espressione di TGF $\beta$ -1, Bax ed NF-kB mentre sono stati trovati aumentati i trascritti di Bad a 12, 24 e 48h ( $p=0.0121$ ;  $p=0.0121$  e  $p=0.05$  rispettivamente) e di BI-1 a partire da 8 fino a 48h ( $p=0.0167$ ;  $p=0.0167$  e  $p=0.0167$  e  $p=0.05$  rispettivamente) .

### **5.16e Pretrattamento con STS e LY294002:**

Il pretrattamento delle cellule con LY294002 per un ora e la successiva stimolazione con TNF- $\alpha$  inibisce in maniera statisticamente significativa l'espressione di Bcl-2 a 4h ( $p=0.0079$ ). Tale inibizione risulta essere completamente risolta dopo 48h di stimolazione.  $\beta$

Solo i trascritti di Bad e di BI-1 dopo 24h di stimolazione ( $p=0,044$  e  $p=0,0167$  rispettivamente) mostravano livelli aumentati statisticamente significativi nelle cellule pretrattate con LY294002 rispetto alla sola stimolazione con TNF- $\alpha$ .

Nessuna differenza statisticamente significativa si osserva nell'espressione di TGF $\beta$ -1 ed NF-kB.

Mentre nelle cellule pretrattate con STS soltanto i trascritti di BI-1 sono stati trovati aumentati fino a 24h [4h ( $p=0.0476$ ), 8h ( $p=0.0167$ ), 12h ( $p=0.033$ ) e 24h ( $p=0.0167$ ),

Tutti i risultati sono riportati nelle figure Fig 9: a, b, c, d,e ,f.

### **5.17 Analisi statistica**

Per l'elaborazione dei dati e per l'analisi statistica è stato usato il software StatsDirect Version 2, 3.3. I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. I dati sono stati esaminati statisticamente mediante Mann-Whitney U test ed è stato ritenuto significativo un valore di  $p < 0.05$ . La rappresentazione dei dati è stata fatta con l'uso di istogrammi.

## 6. Discussione

L'epatocarcinoma, nella maggior parte dei casi, costituisce una complicanza tardiva dell'epatite cronica e della cirrosi. I meccanismi alla base delle interrelazioni tra infezioni virali, cirrosi e sviluppo di HCC sono stati intensivamente studiati ma diversi aspetti sono ancora sconosciuti o compresi solo in parte. Negli ultimi anni allo studio dei meccanismi della regolazione della proliferazione cellulare si è affiancato quello delle possibili disfunzioni dei meccanismi adibiti al controllo dell'apoptosi.

Alterazioni nel bilancio tra questi due meccanismi sembrano infatti dare un contributo diretto alla trasformazione neoplastica. È stato pertanto ipotizzato che una disregolazione del processo apoptotico nelle cellule infettate da virus possa determinare la cronicizzazione dell'infezione, la mancata risposta al trattamento con antivirali e la trasformazione neoplastica.

Il sistema **Fas/FasL** è una via importante del processo apoptotico nel fegato. I dati ottenuti mostrano un progressivo incremento della sua espressione con la severità della malattia epatica dall'EC a CIRR, seguita da una diminuzione nell'HCC. La correlazione positiva statisticamente significativa tra i livelli di trascritti di Fas e FasL confermano il forte coinvolgimento del sistema Fas in tutti i stadi della malattia epatica. La cirrosi è il risultato di un'inflammazione e danno cronico del fegato in cui il processo apoptotico e la risposta immune sono fondamentali per la clearance e/o la persistenza dell'infezione virale e la carcinogenesi. Particolarmente inaspettata è stata, a tal proposito, la diversa espressione, statisticamente significativa, dei livelli FasL nei tessuti cirrotici senza tumore ed nei tessuti cirrotici peritumorali. Questo ha portato ad ipotizzare che le cellule maligne siano capaci di garantire la loro proliferazione, crescita e diffusione attraverso la modulazione della risposta immunitaria. La diminuita espressione del sistema Fas/FasL nell'HCC sembra infatti supportare tale l'ipotesi.<sup>131</sup> Dall'altra parte, dati della letteratura riportano che una parziale o totale soppressione del processo apoptotico è fondamentale per lo sviluppo e la crescita dell'HCC. Il sistema Fas/FasL risulta iperespresso nei tessuti con danno epatico cronico, raggiungendo un picco nei pazienti con cirrosi. L'insorgenza del cancro non è associata ad un ulteriore aumento, ma a un shut-down di questo sistema, il quale è particolarmente evidente nei tessuti tumorali. Questa constatazione può almeno in parte giustificare l'inibizione del processo apoptotico che

caratterizza l'HCC. La diminuita espressione del Fas/FasL nei tessuti con HCC rispetto a quelli PHCC, può essere infatti legata ai meccanismi di difesa adottati dalle cellule tumorali per evadere la risposta immune.

Nessuna differenza significativa nell'espressione di Fas e FasL è stata trovata tra i tessuti HBV-correlati ed HCV-correlati nei vari stadi della malattia epatica, mentre è stata osservata una differenza statisticamente significativa nell'espressione dell'**IL-1 $\beta$** , nei tessuti ottenuti da pazienti con EC HBV- ed HCV-correlata. I tessuti dei pazienti con EC HBV-correlata presentavano la più bassa espressione dei trascritti di mRNA per IL-1 $\beta$ , rispetto ai tessuti con EC HCV-correlata. L'infezione cronica da HBV o HCV sembra dipendere da una clearance virale incompleta per una debole attivazione dei linfociti citotossici CD8+,<sup>132,133,134</sup> seppure attraverso meccanismi differenti. Per il momento, è noto che FasL è chemiotattico per i neutrofili, inducendo secrezione di IL-1 $\beta$ .<sup>135</sup> Entrambi HBV ed HCV sono coinvolti in un equilibrio delicato tra soppressione ed induzione di apoptosi, attraverso l'attivazione di varie vie apoptotiche (Bcl-2, NF-kB, p53 ecc) indotte dalle diverse proteine virali (proteina X, preS dell'HBV, NS5A e proteina core dell'HCV) che interferiscono con il ciclo cellulare.<sup>136-138</sup> I più alti livelli di mRNA per IL-1 $\beta$  sono stati osservati nei tessuti cirrotici peritumorali, forse come risultato di un aumentato numero di cellule CD3+ (linfociti attivati) e CD68+ (monociti/macrofagi), come osservato in un nostro studio precedente,<sup>139</sup> pertanto la conseguente infiammazione cronica potrebbe contribuire all'induzione di mutazioni oncogeniche responsabili dell'inizio e/o promozione di tumore epatico

Contrariamente all'espressione dell'IL-1 $\beta$ , l'espressione di **TNF- $\alpha$**  è diminuita nei tessuti PHCC. Il TNF- $\alpha$  come l'IL-1 $\beta$ , è una citochina proinfiammatoria prodotta principalmente dai macrofagi e neutrofili sebbene diversi tipi cellulari in determinate situazioni siano in grado di produrla. Le cellule di Kupffer, cellule macrofagiche residenti del fegato, risultano implicate in diverse fasi della malattia epatica, nel danno indotto da endotossine, nel danno da ischemia-riperfusion e nell'epatite indotta dai farmaci.<sup>140-142</sup> La perdita della funzione fagocitica delle cellule di Kupffer, soprattutto negli stadi avanzati della malattia, sembra dare un forte contributo all'evoluzione e cronicizzazione del danno.

Queste cellule esprimono in aggiunta al TNF- $\alpha$ , altri ligandi di morte quali TRAIL e Fas-ligand.<sup>141,143-145</sup>

L'apoptosi, in condizioni patologiche è un processo proinfiammatorio. Nelle patologie quali l'epatite virale, l'epatite alcolica e non alcolica e nella colestasi epatica è presente un elevato grado di apoptosi. Recentemente è stato ipotizzato che quest'elevata apoptosi epatica porti ad un aumento della produzione dei corpi apoptotici responsabile della saturazione del processo di fagocitosi da parte delle cellule di Kupffer con conseguente rilascio di mediatori proapoptotici, soprattutto di FasL e di citochine proinfiammatorie, come TNF- $\alpha$ , accelerando così l'apoptosi epatocitaria e conseguente incremento del processo infiammatorio.<sup>146</sup> Nei tessuti con epatite cronica HCV- correlata è stata osservata una maggior espressione dei livelli di mRNA per TNF- $\alpha$  rispetto ai tessuti con EC HBV-correlati. Questa differente espressione del TNF- $\alpha$  e dell' IL-1 $\beta$  osservata nei tessuti HBV- ed HCV-correlati potrebbe dipendere da una diversa modulazione della risposta immunitaria e/o dall'attivazione di vie apoptotiche diverse.

I tessuti con HCC e quelli cirrotici peritumorali presentavano livelli maggiori di trascritti per **TGF $\beta$ -1** rispetto ai tessuti con epatite cronica. TGF $\beta$ -1 è una citochina profibrogenica con attività proapoptotica nel fegato. I nostri dati confermano i dati riportati in letteratura dove è stata riscontrata un'iperespressione di mRNA per TGF $\beta$ -1 nei tessuti con HCC. Trascritti di TGF $\beta$ -1 sono stati osservati anche nelle cellule mononucleate del sangue periferico di tutti i pazienti con HCC e con metastasi extraepatiche.<sup>147</sup> L'iperespressione dell'mRNA di TGF $\beta$ -1 potrebbe pertanto essere un marker utile per la diagnosi precoce e la prognosi dell'HCC.

L'infiammazione cronica associata alla persistenza dell'infezione da virus è la prima causa dell'induzione della fibrosi epatica e del cancro. Tuttavia non sono ancora ben noti i meccanismi molecolari con i quali l'infiammazione cronica causa fibrosi epatica ed infine HCC. TGF $\beta$ -1 può inibire la crescita delle cellule epiteliali agendo come un soppressore del tumore<sup>148</sup> ed è inoltre un regolatore chiave della transizione epitelio-mesenchimale (EMT).<sup>149</sup> La via principale di segnale del TGF $\beta$ -1 coinvolge le proteine Smad<sup>150,151</sup> e studi recenti hanno identificato che per la transizione di una cellula epiteliale in un fenotipo mesenchimale sono richieste in particolare le proteine Smad3.<sup>152</sup> Il TGF $\beta$ -1 attiva non solo il recettore di tipo I (T $\beta$ RI) ma anche la c-Jun N-terminal kinase (JNK), la quale converte la Smad3 in due distinte isoforme: la C-terminally phosphorylated Smad3 (pSmad3C) e la linker-phosphorylated Smad3

(pSmad3L).<sup>153</sup> La via T $\beta$ RI/ pSmad3C sopprime la crescita delle cellule epiteliali, mentre il segnale mediato da JNK/pSmad3L promuove la deposizione della matrice extracellulare.<sup>154</sup> Inibitori specifici per la via JNK/pSmad3L potrebbero sopprimere la progressione sia della fibrosi epatica che del cancro.<sup>155</sup> Quindi lo studio di altri mediatori coinvolti nella via di segnale del TGF $\beta$ -1 e soprattutto delle proteine Smad potrebbe aiutarci a capire meglio il meccanismo d'azione del fattore di crescita trasformante.

Considerando i mediatori intrinseci del processo apoptotico, nella nostra casistica solo i tessuti cirrotici peritumorali presentavano un'espressione di **Bcl-2** significativamente piú elevata rispetto ai tessuti di controllo, ai tessuti con epatite cronica ed ai tessuti cirrotici senza tumore. Mentre non sono state osservate differenze tra tessuti cirrotici peritumorali e tessuti tumorali.

Studi condotti mediante tecniche di ibridizzazione "in situ" su biopsie di pazienti con epatite cronica HCV e HBV correlata, hanno evidenziato l'espressione di mRNA per Bcl-2 nei linfociti portalì e intralobulari, nelle cellule epiteliali dei dotti biliari e nelle zone fibrotiche; mentre negli epatociti periportalì Bcl-2 si evidenziava solo nelle sezioni che presentavano stadi avanzati di fibrosi. Si ipotizza pertanto che Bcl-2 possa essere coinvolto principalmente durante gli ultimi stadi della progressione del danno epatico (presenza di elevati livelli di fibrosi e/o cirrosi).<sup>156</sup> L'iperespressione, osservata anche da noi nei tessuti cirrotici peritumorali, permette di ipotizzare che Bcl-2 possa ostacolare il processo apoptotico delle cellule epatiche, danneggiate da insulti diversi (virus, alcol, tossici, etc) contribuendo alla proliferazione cellulare incontrollata. Nell'HCC proteggerebbe invece le cellule cancerose dall'apoptosi (ad esempio: Fas-indotta) contribuendo alla loro sopravvivenza e replicazione. Tali ipotesi sarebbero inoltre supportate da esperimenti condotti in modelli animali in cui lo sviluppo di HCC era inibito dall'uso di oligonucleotidi antisense di Bcl-2.

L'inibizione del processo apoptotico si confermerebbe quindi come importante fattore nello sviluppo dell'epatocarcinoma.

I tessuti con epatite cronica presentavano i maggiori livelli di trascritti di **BI-1**, inibitore del fattore pro-apoptotico Bax. L'espressione di BI-1 presenta un andamento completamente opposto rispetto all'espressione di Bcl-2, si osserva infatti una diminuzione progressiva, statisticamente significativa, dell'espressione di trascritti di BI-1 con la progressione del danno epatico

da epatite cronica a cirrosi fino all'epatocarcinoma (Fig.6a). L'aumentata espressione del BI-1 osservata nei tessuti con epatite cronica potrebbe proteggere le cellule infettate da virus dall'apoptosi, mentre i bassi livelli di questo fattore anti-apoptotico, osservati nei tessuti con HCC, potrebbero essere coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi. Il dato interessante è che a seconda del tipo cellulare in cui BI-1 viene espresso questo mediatore mostra effetti diversi. È infatti in grado di sopprimere la proliferazione cellulare ma anche d'inibire il processo apoptotico. Attualmente in letteratura sono riportati pochi studi riguardanti l'espressione di BI-1 nel fegato. Tuttavia a differenza della bassa espressione di BI-1 nei tessuti con HCC, osservata in questo studio, dati della letteratura riportano una iperespressione di BI-1 nel cancro della prostata e della mammella, nell'adenocarcinoma polmonare ed in altri tipi di tumore.

La diminuzione dei livelli di BI-1 osservata con la progressione del danno epatico, suggerisce l'importanza di questo mediatore nella modulazione dell'apoptosi, tanto che potrebbe essere considerato come un nuovo regolatore del processo apoptotico nelle malattie croniche epatiche.

Per quanto riguarda l'espressione di **Bax** non abbiamo osservato nessuna differenza statisticamente significativa nei tessuti considerati.

Non sono state inoltre osservate differenze statisticamente significative nell'espressione di Bcl-2, BI-1 e Bax nei tessuti ottenuti da pazienti con EC HCV-correlata rispetto a quelli dei pazienti con EC HBV-correlata, suggerendo che nella nostra casistica i virus B e C dell'epatite non sembrano essere direttamente coinvolti nell'espressione dei trascritti per quanto riguarda Bcl-2 e BI-1.

Non è stato possibile valutare la differenza dovuta al tipo di infezione virale nei tessuti cirrotici, nei peritumorali e negli HCC, data la scarsa numerosità, nella nostra casistica, di pazienti con infezione da HBV.

L'iperespressione di **Bad** osservata invece nelle epatiti croniche sembra essere rilevante nell'induzione dell'apoptosi soprattutto nei tessuti epatici con infezione da HBV, suggerendo un coinvolgimento delle proteine di HBV principalmente nelle fasi iniziali della malattia epatica.

**Bad e Bax** sono entrambi membri pro-apoptotici, tuttavia i loro livelli, dai risultati emersi, mostrano un andamento diverso e questo può essere spiegato dal fatto che alla base esistono differenti meccanismi apoptotici Bad e Bax indotti. C'è da tener presente inoltre che queste proteine pro-apoptotiche mostrano dei domini di omologia diversi. Bad è una BH-3 only,



mentre Bax contiene i domini BH1, BH2 e BH3. I membri della famiglia Bcl-2 pertanto, sono in grado di formare attraverso i loro domini di omologia degli omo- ed eterodimeri indirizzando gli eventi finali del segnale apoptotico verso la morte o verso la sopravvivenza della cellula.

Accanto a questi mediatori intracellulari, abbiamo preso in considerazione anche il meccanismo del NF- $\kappa$ B. L'elevata espressione dei livelli di mRNA per **NF- $\kappa$ B** nei vari stadi della malattia epatica ma non nei tessuti con HCC sembra essere dovuta ad uno stato di infiammazione cronica con conseguente aumento del rischio di fibrosi epatica e sviluppo di HCC. Le correlazioni inverse tra NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  nei tessuti con EC HCV-correlata e tra NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$  nei tessuti con EC HBV-correlata suggerirebbero un ruolo importante delle vie dipendenti da questi tre mediatori nel regolare la sopravvivenza o la morte cellulare degli epatociti infettati da virus. Studi in letteratura riportano che l'espressione della proteina core del virus C dell'epatite attiva il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B che è coinvolto nella regolazione della risposta immunitaria.<sup>157,158</sup> E' stato visto inoltre che gli epatociti di pazienti affetti da epatite C virale cronica mostrano elevati livelli della proteina NF- $\kappa$ B ed un aumento dell'attività di legame al DNA per NF $\kappa$ B.<sup>159</sup> Infine, Pikarsky et al, utilizzando un modello animale di topo con epatite (Mdr2-knockout model) hanno osservato che la sopravvivenza degli epatociti e la loro trasformazione in cellule neoplastiche è regolata dal NF- $\kappa$ B e che l'attivazione del fattore nucleare  $\kappa$ B e la sua localizzazione nella cellula può essere regolata dal TNF- $\alpha$ , prodotto dalle cellule infiammatorie vicine. La delezione di NF- $\kappa$ B negli epatociti o l'inibizione del TNF- $\alpha$  prodotto dalle cellule stromali, indurrebbe apoptosi degli epatociti trasformati e conseguentemente riduzione dell'incidenza di tumori epatici. L'attivazione di NF- $\kappa$ B non sembra inoltre importante negli stadi iniziali della crescita del tumore ma di fondamentale importanza invece nella trasformazione neoplastica.

Sulla base dei risultati ottenuti dallo studio dei tessuti epatici, abbiamo trasferito lo studio di questi mediatori estrinseci ed intrinseci sia pro che anti-apoptotici in colture epatocitarie umane. Sono state allestite colture primarie di epatociti umani ed è stato valutato l'effetto indotto dal trattamento con TNF- $\alpha$ . Il TNF- $\alpha$  è la più importante citochina proinfiammatoria, sempre presente nel sito infiammatorio.

Nelle nostre condizioni sperimentali non abbiamo osservato fenomeni apoptotici negli epatociti di soggetti sani trattati per 48h con TNF $\alpha$ . Questo conferma quanto riportato in letteratura sulla resistenza degli epatociti di

ratto e topo in coltura all'apoptosi indotta dal TNF- $\alpha$ . D'altra parte il trattamento con fattori che inducono arresto della trascrizione quali actinomicina D (ActD) o D+galattosamina, inducono rapidamente apoptosi negli epatociti stimolati con TNF- $\alpha$ . Questo indica che gli epatociti sono refrattari all'apoptosi indotta dal TNF- $\alpha$  per la loro capacità di indurre trascrizione di geni essenziali per l'effetto protettivo.

La stimolazione delle colture primarie di epatociti umani con TNF- $\alpha$ , induce liberazione di IL-1 $\beta$  e suggerendo che la presenza del TNF- $\alpha$  nel microambiente epatico possa contribuire all'incremento di IL-1 $\beta$  e conseguentemente all'intensificazione dei processi infiammatori. È stata inoltre osservata un'iperespressione di FasL ma non di Fas. Questo confermerebbe in parte quanto osservato nei tessuti di pazienti cirrotici in cui si osservano elevati livelli di TNF- $\alpha$ , Fas e FasL. È pertanto ipotizzabile che l'iperespressione di Fas osservata nei tessuti cirrotici dipenda anche da altri fattori in grado di modularne l'espressione quali ad esempio le proteine virali. Per quanto riguarda l'espressione di fattori intrinseci dell'apoptosi, in colture di epatociti umani, TNF- $\alpha$  induce espressione di Bcl-2. L'iperespressione di questo fattore antiapoptotico potrebbe spiegare la resistenza dall'apoptosi indotta dal TNF- $\alpha$ . Anche NF-kB, fattore di trascrizione nucleare risulta attivato in seguito al trattamento con TNF- $\alpha$  suggerendo l'attivazione contemporanea di più vie intracellulari coinvolte nel processo di trasduzione del segnale. Studi recenti hanno inoltre evidenziato l'importanza dell'attivazione e/o inibizione di NF-kB nelle diverse popolazioni cellulari epatiche e nelle diverse fasi del danno epatico. L'attivazione di NF-kB negli epatociti sembra essere essenziale per la protezione dell'apoptosi indotta dal TNF- $\alpha$ , mentre l'attivazione di NF-kB nelle cellule non parenchimali del fegato sarebbe essenziale per la stimolazione della proliferazione epatocitaria durante la rigenerazione epatica. Poiché sia la proliferazione che l'inibizione del processo apoptotico rappresentano importanti caratteristiche del cancro, non sorprende come l'attivazione di NF-kB nel fegato sia stata recentemente associata all'aumentato rischio di epatocarcinogenesi. D'altronde anche l'angiogenesi, l'invasione tissutale e la metastasi caratteristiche funzionali tipiche delle cellule cancerose sono riportate essere, almeno in parte, dipendenti da segnali mediati da NF-kB.

Il trattamento degli epatociti con gli inibitori STS e LY924002 abolisce completamente l'espressione dei trascritti di Bcl-2. Contrariamente a Bcl-2 l'espressione di Bad, fattore proapoptotico sembra addirittura aumentare.

Il pre-trattamento con STS e LY924002 ed il successivo trattamento con TNF- $\alpha$ , riduce i livelli dei trascritti di Bcl-2, in particolare dopo pretrattamento con LY924002, rispetto ai livelli ottenuti dalle cellule trattate solo con TNF- $\alpha$ . Questo confermerebbe il coinvolgimento degli inibitori delle protein chinasi ed, in particolar modo, di LY924002 nell'inibizione di fattori anti-apoptotici a favore di quelli pro-apoptotici quali Bad e Bax soprattutto dopo 24h e 48h di coltura.

Dato interessante è la stimolazione dell'espressione di BI-1, fattore anti-apoptotico, indotta dal pretrattamento e successiva costimolazione con TNF- $\alpha$ . È infatti interessante notare come in questo caso sembra esserci un' azione sinergica del TNF- $\alpha$  e STS nell'indurre l'espressione di trascritti per BI-1 in colture primarie di epatociti umani.

Lo studio dell'espressione dei messaggeri e l'analisi dell'espressione proteica di questi mediatori intrinseci ed estrinseci del processo apoptotico, porterà all'identificazione di nuovi biomarkers coinvolti nella progressione della malattia epatica da fibrosi a cirrosi fino all'evoluzione ad epatocarcinoma. Tutto questo potrà essere utile all'identificazione di nuove metodologie farmacologiche (farmacogenomica) e terapeutiche (terapia genica).

## 7. Bibliografia

- <sup>1</sup>Steller H : Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* 1995; **267**: 1445-1456.
- <sup>2</sup>Williams GT : Programmed Cell Death: Apoptosis and Oncogenesis. *Cell* 1991; **65**: 1097-1098.  
*Science* 1995; **267**: 1456-1462.
- <sup>3</sup>Benedetti A, Marucci L: The Significance of apoptosis in the liver. *Liver* 1999; **19**: 453-463.
- <sup>4</sup>Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993 Sep 10; **74**(5): 845-53.
- <sup>5</sup>Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 1992 Nov; **14**(3): 821-2.
- <sup>6</sup>Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol.* 1994; **24**(12): 3057-62.
- <sup>7</sup>Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin Km, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989 Jul 21; **245**(4915): 301-5.
- <sup>8</sup>Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989 May 1; **169**(5): 1747-56.
- <sup>9</sup>Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int.Immunol.* 1994; **6**: 15467.
- <sup>10</sup>Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *Int.Immunol.* 1995 April 15; **154**(8): 3806-13.
- <sup>11</sup>Rouvier E, Luciani MF, Golstein P, Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J.Exp.Med* 1993 Jan 1; **177**(1): 195-200.
- <sup>12</sup>Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J.Exp.Med.* 1994 Mar 1; **179**(3): 873-9.
- <sup>13</sup>Pinkoski MJ, Brunner T, Green DR, Lin T. Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **278**: G354-G366.
- <sup>14</sup>Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue cinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239-257.
- <sup>15</sup>Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985 Nov 8; **230**(4726): 630-2.
- <sup>16</sup>Muller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA. Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map closet o H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* 1987; **325**: 265-267.

- <sup>17</sup>Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin, Pennica D, Goeddel D, Gray
- <sup>18</sup>Bazzoni F, Beutker B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1717-1725.
- <sup>19</sup>Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; **104**:487-501.
- <sup>20</sup>Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner DA, Naiki T, Nozawa Y. TNF- $\alpha$ -induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J Immunol* 2001; **167**: 173-80.
- <sup>21</sup>Bemelmans MH, van Tits LJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 1996; **16**: 1-11.
- <sup>22</sup>Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; **13**: 151-153.
- <sup>23</sup>Aggarwal BB. Signaling pathways of the TNF superfamily; a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 745-756.
- <sup>24</sup>Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305-1308.
- <sup>25</sup>Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; **17**: 3261-3270.
- <sup>26</sup>Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions; secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 2004; **21**: 461-465.
- <sup>27</sup>Takada H, Chen NJ, Mirtsos C. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 4026-4033.
- <sup>28</sup>Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signalling in apoptosis. *J Clin Immunol* 1999; **19**: 350-364.
- <sup>29</sup>Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; **22**: 8543-8567.
- <sup>30</sup>Devin A, Cook A, Lin Y. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNFR-1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 2000; **12**: 419-429.
- <sup>31</sup>Adams J.M, Cory S: The Bcl-2 protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998; **281**: 1322-1326.
- <sup>32</sup>Chao D.T, Korsmeyer S.J, Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; **16**: 395-419.
- <sup>33</sup>Cory S, Adams J. M: The Bcl-2 Family: Regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 647-656.
- <sup>34</sup>Nguyen M., Millar D.G, Yong V.W, Korsmeyer S.J, Shore G.C: Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem* 1993; **268**: 25265-25268.

- <sup>35</sup>Puthalakayh H., Strasser A: Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 505-512.
- <sup>36</sup>Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1281-1292.
- <sup>37</sup>Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ: Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998; **17**: 3878-3885.
- <sup>38</sup>Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC : Bax is present as a high molecular weight oligomer/ complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11615-11623.
- <sup>39</sup>Chen M, Wang J: Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. *Apoptosis* 2002; **7**: 313-319.
- <sup>40</sup>Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, Displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995 Jan 1995; **80**: 285-291.
- <sup>41</sup> Adachi B, Zhang Y.B, Imai K. Mutation of BAD within the BH3 domain impairs its phosphorylation-mediated regulation. *FEBS Lett*, 2003; **551**: 147-152.
- <sup>42</sup>Tan Y, Ruan H, Demeter MF, Comb MJ. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem*, 1999; **274**: 34859-34867.
- <sup>43</sup>Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; **91**:231-241.
- <sup>44</sup>del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 1997; **278**: 687-689.
- <sup>45</sup>Virdee K, Parone PA, Tolkovsky AM. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel site, contributes to cell survival. *Curr. Biol* 2000; **10**: 1151-1154.
- <sup>46</sup>Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996; **87**: 629-638.
- <sup>47</sup>Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 2001; **98**: 9666-9670.
- <sup>48</sup>Bergmann A. Survival signalling goes Bad. *Dev. Cell* 2002; **3**: 607-608.
- <sup>49</sup>Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol* 2003; **39**: 615-647.
- <sup>50</sup>Xu, Q., Reed, J C: Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1998, **1** (3): 337-46.

- <sup>51</sup>Chae HJ, Ke N, Kim HR, Chen S, Godgik A, Dickman M, Reed JC: Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 2003; **323** : 101-113.
- <sup>52</sup>Bolduc N, Ouellet M, Pitre F, Brisson LF. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 2003; **216** (3): 377-86.
- <sup>53</sup>Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991 Apr 15; **77**(8):1627-52.
- <sup>54</sup>Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993; **54**:167-227
- <sup>55</sup>Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996 Mar 15; **87**(6): 2095-147
- <sup>56</sup>Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep; **25**(3): 387-408
- <sup>57</sup>Dinarello CA, Moldawer LL. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians, 2<sup>nd</sup> edn, pp.1-15. Amgen, Inc, Thousand Oaks, CA.
- <sup>58</sup>Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Jul; **72**(1): 9-14.
- <sup>59</sup>Yan Z, Deng X, Friedman E. Oncogenic Ki-ras confers a more aggressive colon cancer phenotype through modification of transforming growth factor-beta receptor III. *J Biol Chem* 2001; **276**: 1555-1563.
- <sup>60</sup>Desruisseau S, Ghazarossian-Ragni E, Chinot O. Divergent effect of TGFbeta1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int J Cancer* 1996; **66**: 796-801.
- <sup>61</sup>Perry RR, Kang Y, Greaves BR. Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 1995; **72**: 1441-1446.
- <sup>62</sup>Ananth S, Knebelmann B, Gruning W. Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 2210-2216.
- <sup>63</sup>Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1486-1490.
- <sup>64</sup>Roberts AB, Sporn MB. In Peptide Growth Factors and their Receptors- Handbook of Experimental Pharmacology (eds Sporn, MB & Roberts AB). Springer, Heidelberg 1990; 419-472.
- <sup>65</sup>Massaguè J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 753-791.

Rewiew

- <sup>66</sup>Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor- $\beta$  to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 4162-4168.
- <sup>67</sup>Gleizes PE, Beavis RC, Mazzieri R, Shen B, Rifkin DB. Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 1996; **271**: 29891-29896.
- <sup>68</sup>Saharinen J, Taipale J, Keski-Oja J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of this binding protein LTBP-1. *EMBO J* 1996; **15**: 245-253.
- <sup>69</sup>Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem* 1998; **67**: 753-791.
- <sup>70</sup>Tsuchida K, Lewis KA, Mathews LS, Vale WW. Molecular characterization of rat transforming growth factor-beta type II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191**(3): 790-795.
- <sup>71</sup>Takumi T, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF. Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF-beta and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 1995; **216**(1): 208-214.
- <sup>72</sup>Attisano L, Wrana JL, Cheifetz s, Massague J. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 1992; **68**(1): 97-108.
- <sup>73</sup> Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685-700.
- <sup>74</sup>Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by TGF- $\beta$  superfamily. *Science* 2002; **296**: 1646-1647.
- <sup>75</sup>Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- $\beta$  superfamily signaling. *FASEB J* 1999; 132105-2124.
- <sup>76</sup>Karin M. The beginning of the end: I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27399-27342.
- <sup>77</sup>Barnes BJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B, a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1066-1071.
- <sup>78</sup>Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; **45**: 7-17.
- <sup>79</sup>Thorgeirsson S, Teramoto T, Factor V. Dysregulation of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Seminars in Liver Disease* 1998; **18** (2): 115-122.
- <sup>80</sup>Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18; **275** (33):25858-64.



- <sup>81</sup>Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol*. 2001 Jan; **82** (Pt 1): 171-82.
- <sup>82</sup>Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16; **276**(11):8328-40
- <sup>83</sup>Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer*. 2001 Sep; **37**(13):1695-702.
- <sup>84</sup>Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ: Expression of Fas-ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer* 1999; **82** (4): 587-91.
- <sup>85</sup>Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R: Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995; **37**: 209-220.
- <sup>86</sup>Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoœur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002 Jan 17; **21**(3): 377-86
- <sup>87</sup>Zhang SJ, Chen HY, Chen ZX, Wang XZ. Possible mechanism for hepatitis B virus X gene to induce apoptosis of hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005 Jul 28; **11**(28): 4351-6.
- <sup>88</sup>Kim WH, Hong F, Jaruga B, Zhang ZS, Fan SJ, Liang TJ, Gao B. Hepatitis B virus X protein sensitizes primary mouse hepatocytes to ethanol- and TNF-alpha-induced apoptosis by a caspase-3-dependent mechanism. *Cell Mol Immunol* 2005 Feb; **2**(1):40-8.
- <sup>89</sup>Miao J, Chen GG, Chun SY, Lai PP. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis in hepatoma cells through inhibiting Bcl-xL expression. *Cancer Lett* 2006 May 8; **236**(1):115-24.
- <sup>90</sup>Zhang X, Dong N, Yin L, Cai N, Ma H, You J, Zhang H, Wang H, He R, Ye L. Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatoma tissues. *J Med Virol* 2005 Nov; **77**(3): 374-81.
- <sup>91</sup>Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1997 Mar 3; **229**(1): 68-76.
- <sup>92</sup>Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998 May; **72**(5): 3691-7.
- <sup>93</sup>Joo M, Hahn YS, Kwon M, Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW. Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2

expression by direct interaction with I $\kappa$ B kinase beta. *J Virol* 2005 Jun; **79**(12): 7648-57.

<sup>94</sup>Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Zhou XY, Phillips NJ, Ray R, Ray RB: Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by anti-Fas antibody in transgenic mice. *Virology* 2002; **294**: 94-105.

<sup>95</sup>Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002 Apr 25; **296**(1): 84-93.

<sup>96</sup>Pavio N, Battaglia S, Boucreux D, Arnulf B, Sobesky R, Hermine O, Brechot C. Hepatitis C virus core variants isolated from liver tumor but not from adjacent non-tumor tissue interact with Smad3 and inhibit the TGF-beta pathway. *Oncogene* 2005 Sep 8; **24**(40): 6119-32.

<sup>97</sup>Tai DI, Tsai SL, Chen YM, Chuang YL, Peng CY, Sheen IS, Yeh CT, Chang KS, Huang SN, Kuo GC, Liaw YF. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000 Mar; **31**(3): 656-64.

<sup>98</sup>Ray RB, Steele R, Basu A, Meyer K, Majumder M, Ghosh AK, Ray R. Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation. *Virus Res* 2002 Jul; **87**(1): 21-9.

<sup>99</sup>Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997 Feb; **25**(2): 368-78.

<sup>100</sup>French SW, Wong K, Jui L, Albano E, Hagbjork AL, Ingelman-Sundberg M. Effect of ethanol on cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), lipid peroxidation, and serum protein adduct formation in relation to liver pathology pathogenesis. *Exp Mol Pathol* 1993 Feb; **58**(1): 61-75.

<sup>101</sup>Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2001 Feb; **34**(2): 248-53.

<sup>102</sup>Tagami A, Ohnishi H, Moriwaki H, Phillips M, Hughes RD. Fas-mediated apoptosis in acute alcoholic hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2003 Mar-Apr; **50**(50): 443-8.

<sup>103</sup>Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem*. 1997 Nov 7; **272**(45): 28191-3.

<sup>104</sup>Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB. Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* 1999 Mar; **19**(3): 2098-108.

- <sup>105</sup>McClain C, Hill D, Schmidt J, Diehl AM. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993 May; **13**(2): 170-82.
- <sup>106</sup>Costelli P, Aoki P, Zingaro B, Carbó N, Reffo P, Lopez-Soriano FJ, Bonelli G, Argilés JM, Baccino FM. Mice lacking TNFalpha receptors 1 and 2 are resistant to death and fulminant liver injury induced by agonistic anti-Fas antibody. *Cell Death Differ* 2003 Sep; **10**(9): 997-1004.
- <sup>107</sup>Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003 Aug; **125**(2): 437-43.
- <sup>108</sup>Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol* 2003 Dec; **39**(6): 978-83.
- <sup>109</sup>Nehra V, Angulo P, Buchman AL, Lindor KD. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2001 Nov; **46**(11): 2347-52.
- <sup>110</sup>Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004 Jul; **40**(1): 185-94.
- <sup>111</sup>Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999 Jan; **103**(1): 137-45.
- <sup>112</sup>Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 2001 Oct 19; **276**(42): 38610-8
- <sup>113</sup>Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003 Nov; **38**(5): 1188-98.
- <sup>114</sup>Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991 Jul 5; **253**(5015): 49-53.
- <sup>115</sup>Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993 Oct 28; **329**(18): 1318-27.
- <sup>116</sup>Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY. p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 2004 Aug 1; **64**(15): 5078-83.
- <sup>117</sup>Lin P, Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G. Tissue-specific regulation of Fas/APO-1/CD95 expression by p53. *Int J Oncol* 2002 Aug; **21**(2): 261-4.
- <sup>118</sup>Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 1998 Dec 7; **188**(11): 2033-45.

- <sup>119</sup>Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996 Nov 22; **274**(5291): 1363-6
- <sup>120</sup>Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996 Dec; **2**(12): 1361-6.
- <sup>121</sup>Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995 Nov 17; **270**(5239):1189-92.
- <sup>122</sup>Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002 Feb; **65**(2): 166-76.
- <sup>123</sup>Edmonson HA, Steiner PE: Primary carcinoma of the liver: A study of 100 cases among 48900 necropsies. *Cancer* 1954; **7**: 462-503.
- <sup>124</sup>Ishak k, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmeets V, Korb G, MacSween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatology* 1995; **22**: 696-699.
- <sup>125</sup>Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *AnalBiochem* 1987; **162**: 156-159.
- <sup>126</sup>Maggi A: Biologia molecolare manuale pratico. Ed. Masson 1990.
- <sup>127</sup>SA Bustin: Absolute quantification of mRNA using Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* (2000) **25**, 169-193.
- <sup>128</sup>reeman WM, Walker SJ, Vrana KE: Quantitative PCR: Pitfall end potential. *Biotechniques* 1999; **26**(1): 124-125
- <sup>129</sup>Al-Robaiy S, Eschrich K: Rapid competitive PCR using melting curve analysis for DNA quantification. *Biotechniques* 2001 Dec; **31**(6): 1382-6,1388.
- <sup>130</sup>Ririe KM, Rasmussen RP & Wittwer CT. Product differentiation by analysis of Dna melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1997; **245**: 154-160.
- <sup>131</sup>Yano H, Fukuda K, Karamaki M, Momosaki S, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinomacell line. *J Hepatology* 1996; **25**: 454-464.
- <sup>132</sup>bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003; **38**(1): 4-13.
- <sup>133</sup>Iken K, Huang L, Bekele H, Schmidt EV, Koziel Mj. Apoptosis of activated CD4+ and CD8+ T cell is enhanced by co-culture with the hepatocytes

expressing hepatitis C virus (HCV) structural proteins through FasL induction. *Virology* 2006; **346**:363-372.

<sup>134</sup>Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ. Differential CD4+ and CD8+ T cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; **33**: 267-276.

<sup>135</sup>Bossu P, Del Grosso E, Cesaroni MP, Maurizi G, Balestro N, Stoppaccioaro A, del Giudice E, Ruggiero P, Boraschi D. Balance between autocrine interleukin-1 beta and caspases defines life versus death of polymorphonuclear cells. *Eur Cytokine Netw* 2001; **12**(1): 177-186.

<sup>136</sup>Majumber M, Ghoh AK, Steele R, Zhou XY, Philips NJ, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by anti-Fas antibody in transgenic mice. *Virology* 2002; **294**: 94-105.

<sup>137</sup>Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-XI expression. *Virology* 2002 Apr 25; **296**(1): 84-93.

<sup>138</sup>Zhu N, Ware CF, Lai MM,. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 2001 May 10; **283**(2): 178-187.

<sup>139</sup>Bortolami M, Venturi C, Giacomelli L, Scalerta R, Bacchetti S, Marino F, Floreani A, Lise M, Naccarato R, Farinati F. Cytokine, infiltrating macrophages and T cell-mediated response to development of primary and secondary human liver cancer. *Dig Liver Dis* 2002; **34**: 794-801.

<sup>140</sup>Souto EO, Miyoshi H, Dubois RN, Gores GJ. Kupffer cell-derived cyclooxygenase-2 regulates hepatocyte Bcl-2 expression in choledoco-venous fistula rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **280**: G805-G811.

<sup>141</sup>Kojima Y, Suzuki S, Tsuchiya Y, Konno H, Baba S, Nakamura S. Regulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses by kupffer cells in endotoxin-enhanced reperfusion injury after total hepatic ischemia. *Transpl Int* 2003; **16**: 231-240.

<sup>142</sup>Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, Gabele E. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol induced liver disease. *Free radic Biol Med* 2001; **31**: 1544-1549.

<sup>143</sup>Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; **9**: 489-497.

<sup>144</sup>Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Haussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; **123**: 845-861.

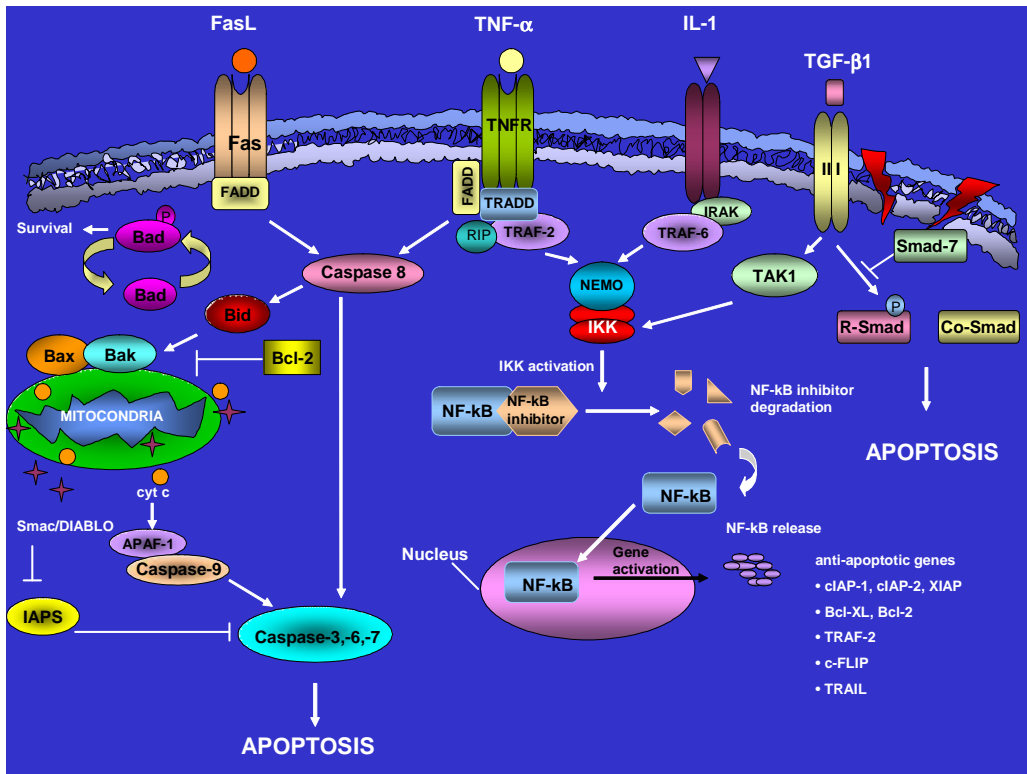
<sup>145</sup>Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; **20**: 453-460.

- <sup>146</sup>Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003; **38**: 1188-1198.
- <sup>147</sup>Dong ZZ, Yao DF, Zou L, Yao M, Qiu LW, Wu XH, Wu W. An evaluation of transforming growth factor-beta1 in diagnosing hepatocellular carcinoma and metastasis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2007; **15**(7): 503-508.
- <sup>148</sup>Moses HL, Yang EY, Pietsenpol JA. TGF- $\beta$  stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990; **63**: 245-247.
- <sup>149</sup>Zavadil J, Bottlinger EP. TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; **24**: 5764-5774.
- <sup>150</sup>Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; **390**: 465-471.
- <sup>151</sup>Wrana JL. Crossing Smads. *Sci STKE* 2000; **23**:RE1.
- <sup>152</sup>Saika S, Kono-Saika S, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A. Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol* 2004; **164**: 651-663.
- <sup>153</sup>Matsuzaki K. Smad3 phosphoisoform-mediated signaling during sporadic human colorectal carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2006; **21**: 645-662.
- <sup>154</sup>Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F. Transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol* 2005; **166**: 1029-1039.
- <sup>155</sup>Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K, Seki T. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor  $\beta$  signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; **46**(1): 48-57.
- <sup>156</sup>Tsamandas AC, Thomopoulos K, Zolota V, Kourelis T, Karatzas T, Ravazoula P, Tepetes K, Petsas T, Karavias D, Karatza C, Bonicos DS, Gogos C: Potential role of Bcl-2 and Bax mRNA and protein expression in chronic hepatitis type B and C: a clinicopathologic study. *Mod. Pathol* 2003 Dec; **16**(12): 1273-88.
- <sup>157</sup>Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649-83.
- <sup>158</sup>Zhu N, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 2001 May 10; **283**(2):178-87
- <sup>159</sup>Tai DI, Tsai SL, Chen YM, Chuang YL, Peng CY, Sheen IS, Yeh CT, Chang KS, Huang SN, Kuo GC, Liaw YF. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2000 Mar; **31**(3): 656-64.

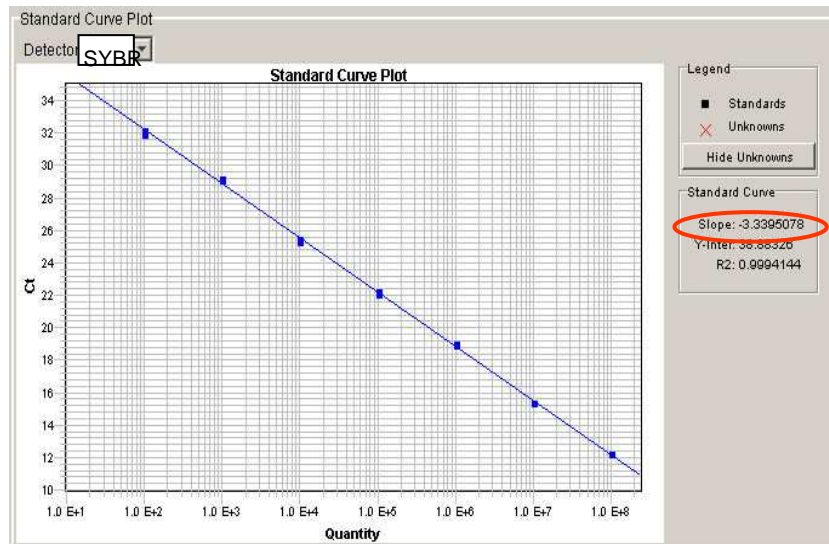


## **8. Figure e tabelle**

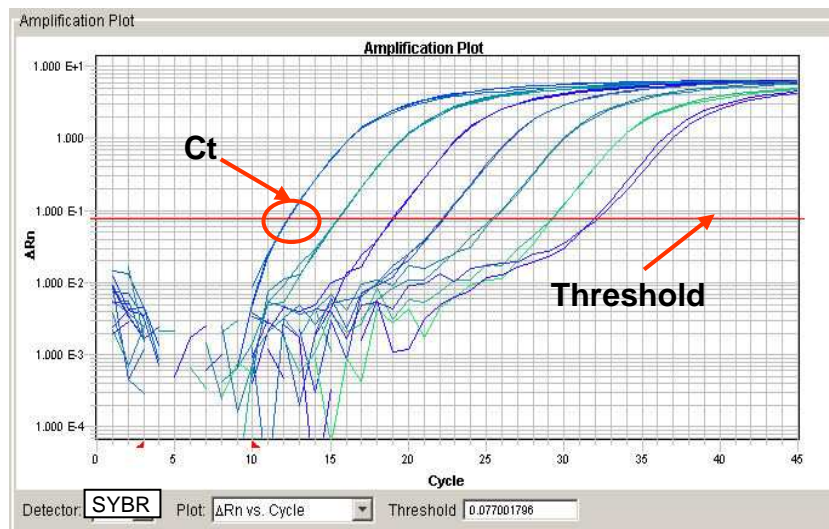




**Fig.1:** Principali vie di attivazione del processo apoptotico cellulare

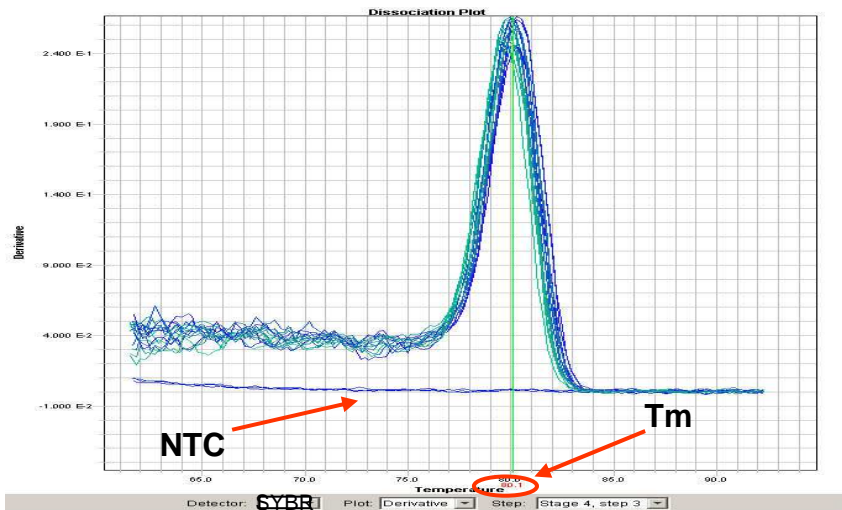


**Fig.2a: Curva standard della  $\beta$ -actina** costruita con diluizioni scalari pari a  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10$  copie/ $\mu$ l del DNA standard. Per ciascun punto della curva standard i valori di Ct, in ordinata, sono stati plottati versus il log del numero di copie di template. L'analisi di regressione lineare determina la pendenza, valore che permette di calcolare l'efficienza dell'amplificazione



**Fig.2b: Plot di amplificazione logaritmica**

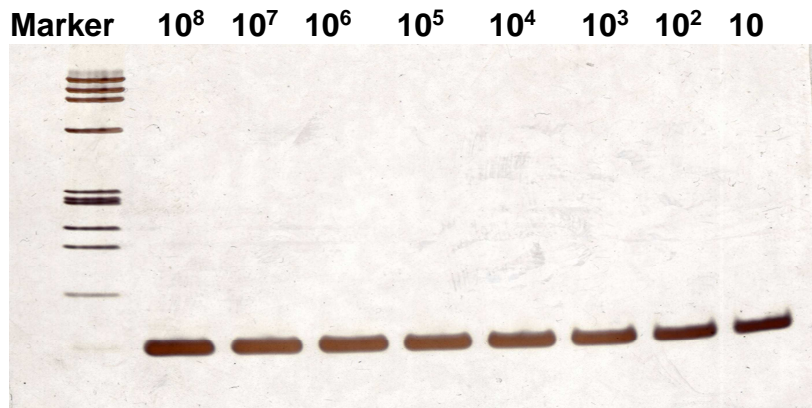
Rappresentazione grafica del plot di amplificazione ottenuta con diluizioni scalari pari a  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10$  copie/ $\mu$ l del DNA standard; in ordinata il log degli incrementi di fluorescenza ( $\Delta Rn$ ), in ascissa il numero di cicli. Per ogni reazione di amplificazione la regione lineare rappresenta la fase esponenziale dell'amplificazione. Il valore di fluorescenza relativo alla threshold fornisce il punto di riferimento sul quale viene calcolato il ciclo soglia (Ct). Per  $\beta$ -actina la threshold è stata fissata a 0,0770.



### Fig.2c: Analisi della curva di dissociazione di $\beta$ -actina

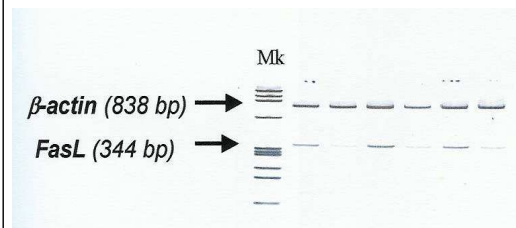
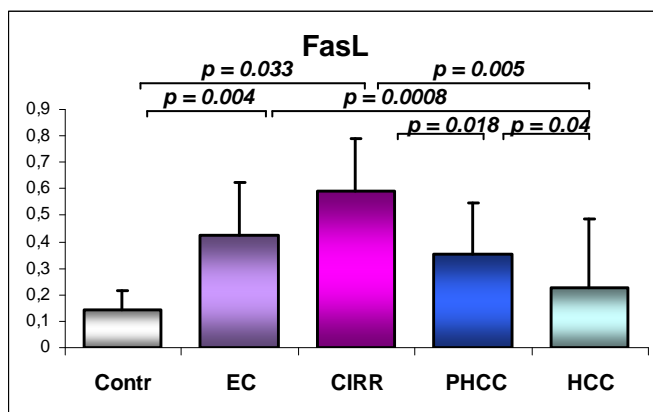
La curva di dissociazione effettuata dopo 45 cicli di amplificazione. I dati sono raccolti durante gli incrementi di temperatura da 60°C a 95°C con continua registrazione di valori di fluorescenza. L'aumento di temperatura induce denaturazione dei campioni, processo accompagnato da una diminuzione della fluorescenza dai campioni contenenti SYBR Green I. Il valore della temperatura di melting  $T_m$  rappresenta la condizione in cui il 50% del prodotto di amplificazione è presente in singola e doppia elica. Graficamente i profili della temperatura di melting dei diversi campioni permettono di verificare l'assenza e/o presenza di prodotti aspecifici.

NTC=no template control,  $T_m$ =temperatura di melting

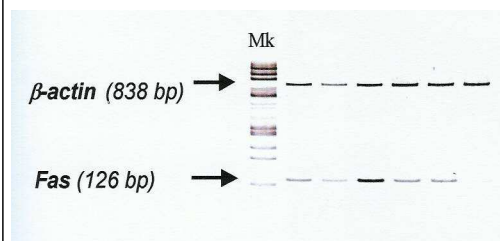
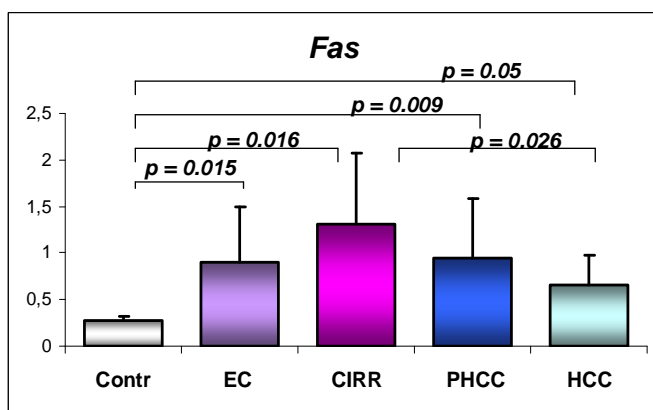


### Fig.2d: Gel di poliacrilamide dei prodotti di amplificazione

Gli ampliconi ottenuti, dopo 45 cicli di amplificazione in Real Time sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide al fine di identificare l'assenza e/o presenza di prodotti aspecifici. Dopo colorazione del gel, con nitrato d'argento, si osservano solo la bande relative all'amplificazione del gene di interesse confermando l'assenza di prodotti aspecifici o eventuali dimeri. Marker:  $\phi$ X174 DNA/Hae III;  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 copie/ $\mu$ l del DNA standard.

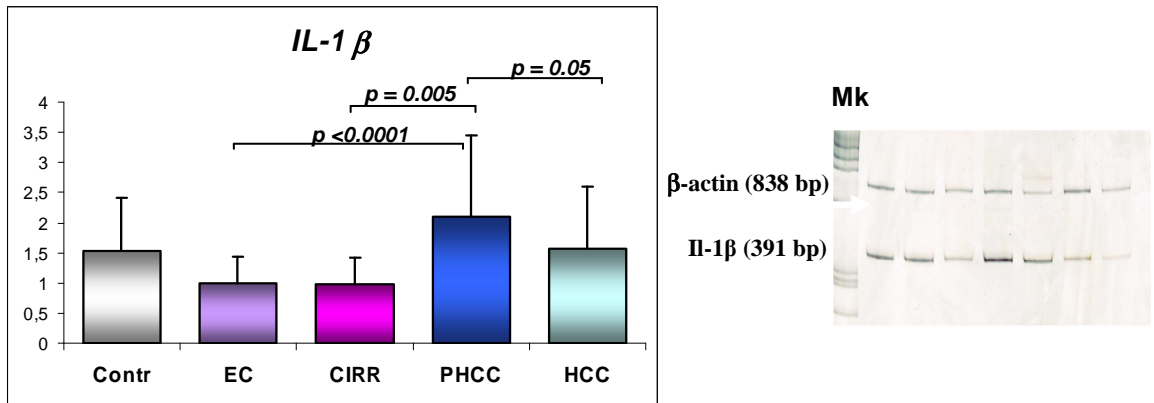


**Fig.3a**

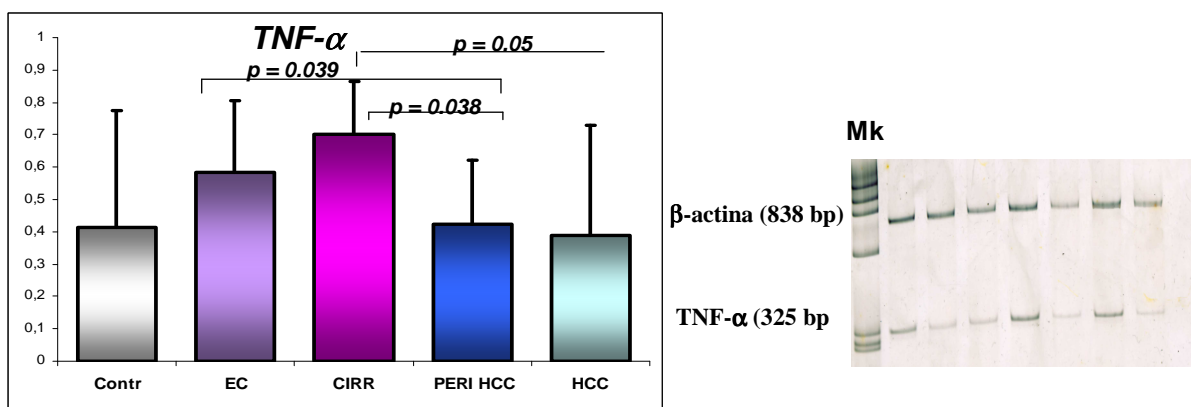


**Fig.3b**

**Fig.3:** Risultati dell'analisi densitometrica (su gel di poliacrilamide) in tessuti ottenuti da soggetti:  
 Contr= controllo  
 EC= epatite cronica  
 CIRR= cirrosi,  
 PHCC= tessuti cirrotici peritumorali  
 HCC= carcinoma epatocellulare  
 L'espressione dell'mRNA è riportata come rapporto tra la densità ottica di FasL (**3a**), Fas (**3b**) e della  $\beta$ -actina.  
 I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard

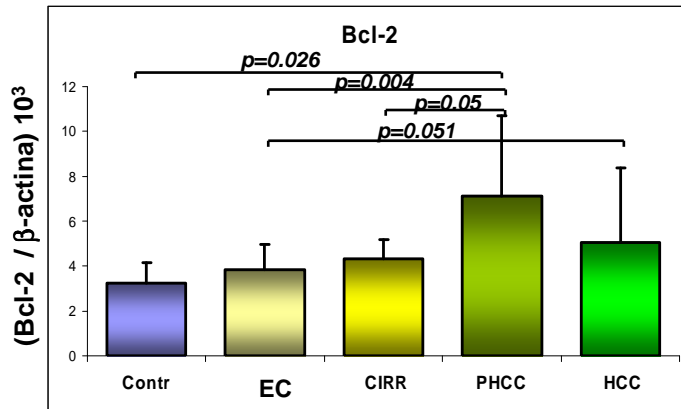


**Fig.3c**

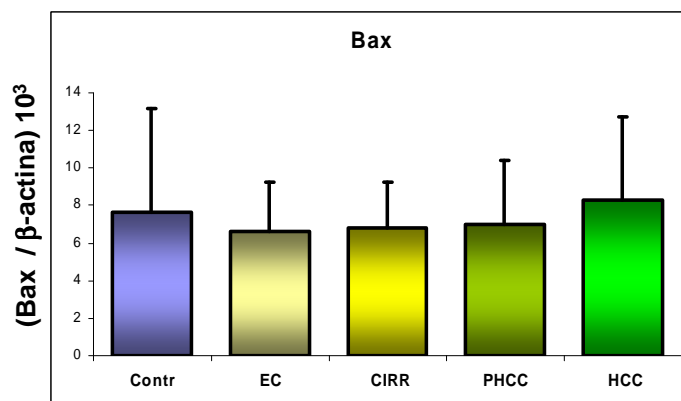
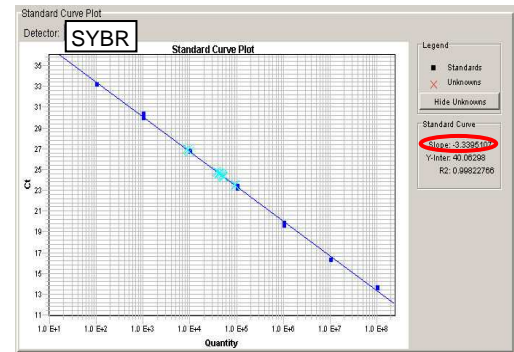


**Fig.3d**

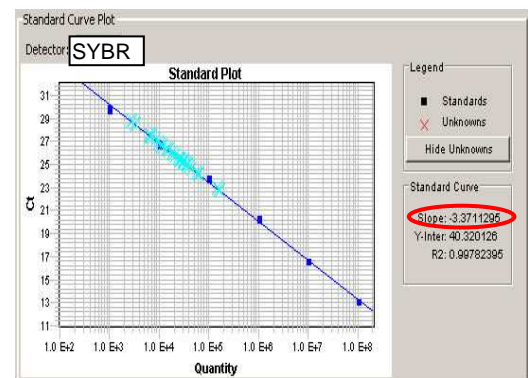
**Fig.3:** Risultati dell'analisi densitometrica (su gel di poliacrilamide) in tessuti ottenuti da soggetti:  
 Contr= controllo  
 EC= epatite cronica  
 CIRR= cirrosi,  
 PHCC= tessuti cirrotici peritumorali  
 HCC= carcinoma epatocellulare  
 L'espressione dell'mRNA è riportata come rapporto tra la densità ottica di IL-1 $\beta$  (**3c**), TNF- $\alpha$  (**3d**) e della  $\beta$ -actina.  
 I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard



**Fig.4a**



**Fig.4b**



**Fig.4:** Risultati dell'espressione di mRNA per Bcl-2 (4a), Bax (4b) mediante Real Time PCR assoluta in tessuti ottenuti da soggetti:

Contr= controllo

EC= epatite cronica

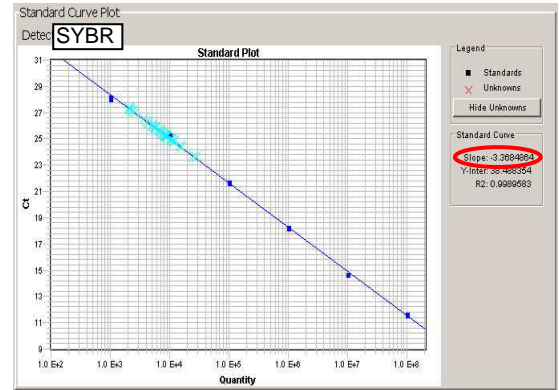
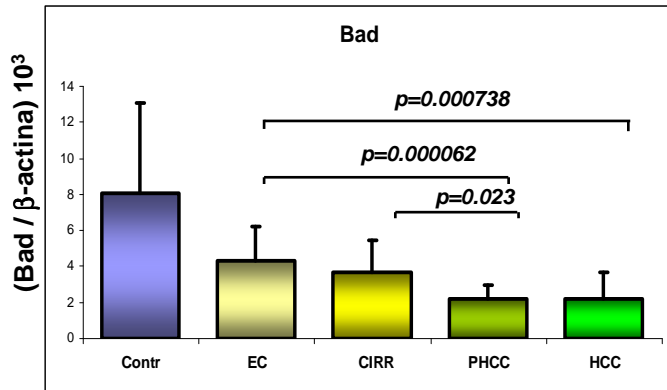
CIRR= cirrosi,

PHCC= tessuti cirrotici peritumorali

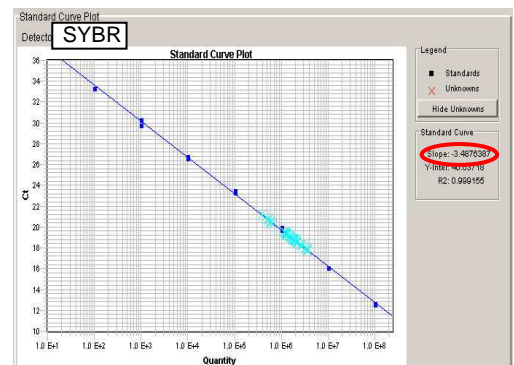
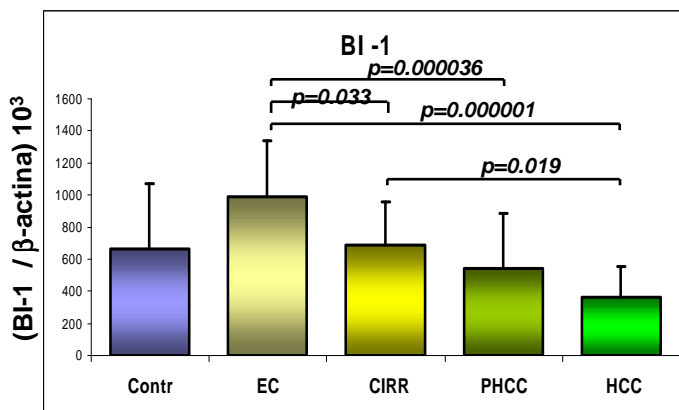
HCC= carcinoma epatocellulare

I risultati sono stati estrapolati dalla curva standard ed espressi come rapporto tra la densità ottica di Bcl-2 (4a), Bax (4b) sulla β-actina.

I risultati sono stati espressi come media ± deviazione standard



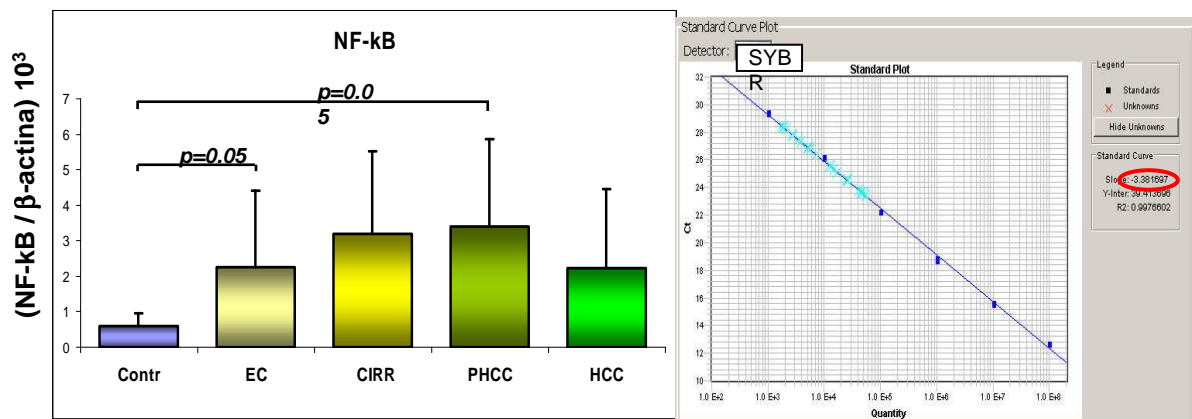
**Fig.4c**



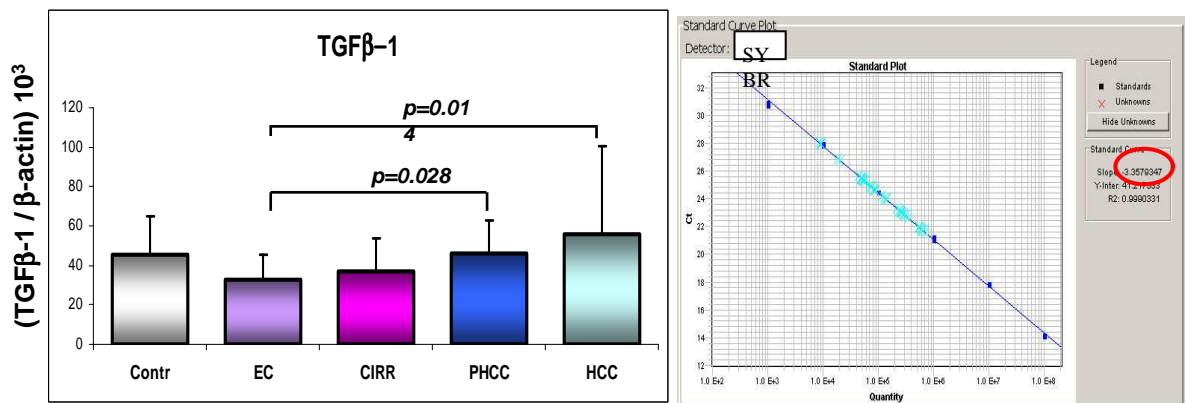
**Fig.4d**

**Fig.4:** Risultati dell'espressione di mRNA per Bad (**4c**), BI-1 (**4d**) mediante Real Time PCR assoluta in tessuti ottenuti da soggetti:  
 Contr= controllo  
 EC= epatite cronica  
 CIRR= cirrosi,  
 PHCC= tessuti cirrotici peritumorali  
 HCC= carcinoma epatocellulare  
 I risultati sono stati estrapolati dalla curva standard ed espressi come rapporto tra la densità ottica di Bad (4c), BI-1 (4d) e la  $\beta$ -actina.  
 I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard





**Fig.4e**



**Fig.4f**

**Fig.4:** Risultati dell'espressione di mRNA perNF-kB (4e), TGF- $\beta$ 1(4f) mediante Real Time PCR assoluta in tessuti ottenuti da soggetti:

Contr= controllo

EC= epatite cronica

CIRR= cirrosi,

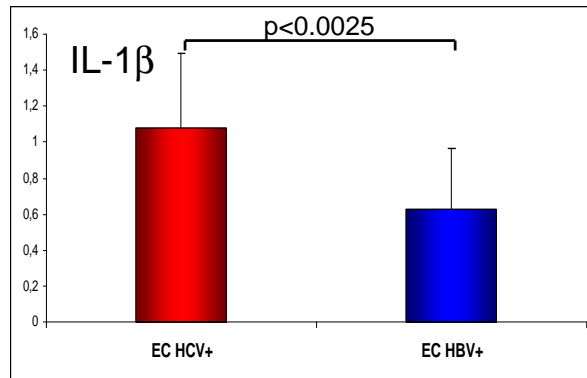
PHCC= tessuti cirrotici peritumorali

HCC= carcinoma epatocellulare

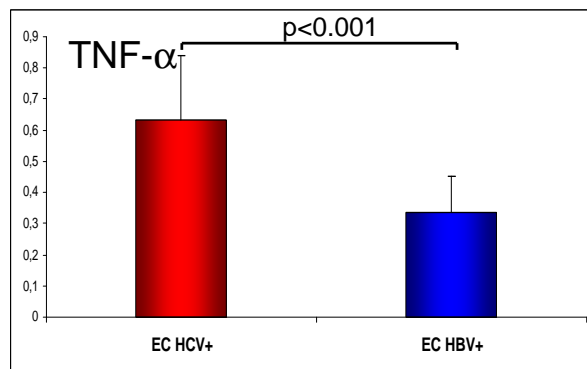
I risultati sono stati estrapolati dalla curva standard ed espressi come rapporto tra la densità ottica di Bad (4c), BI-1 (4d) e la  $\beta$ -actina.

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard

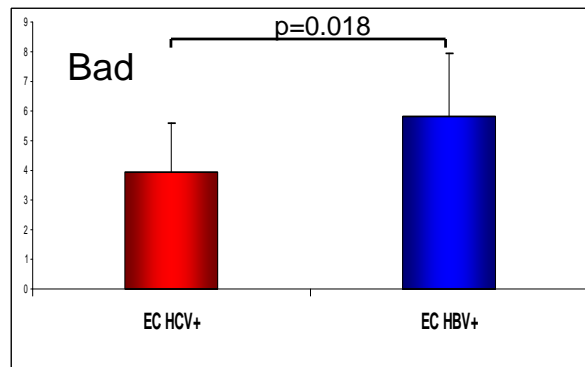




**Fig.5a**

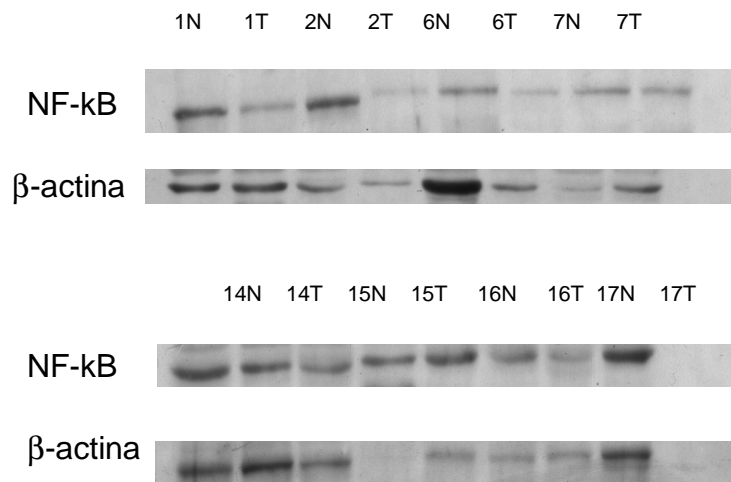


**Fig.5b**

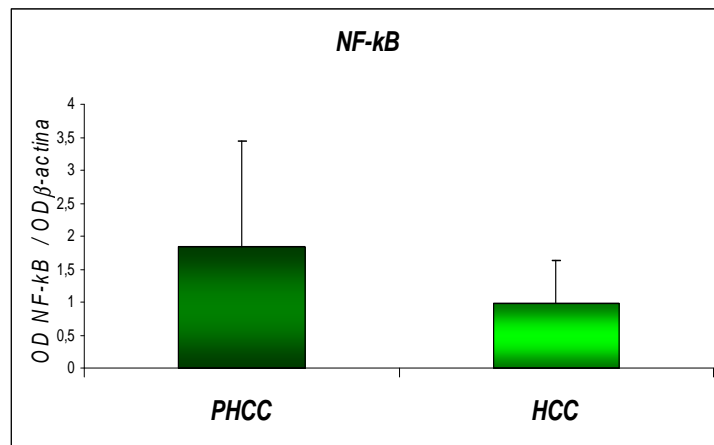


**Fig.5c**

**Fig.5:** Espressione di mRNA per IL-1 $\beta$  (5a), TNF- $\alpha$  (5b) e Bad (5c) nei tessuti con epatite cronica (EC) HBV-correlata ed HCV-correlata mediante Real Time PCR assoluta. I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard

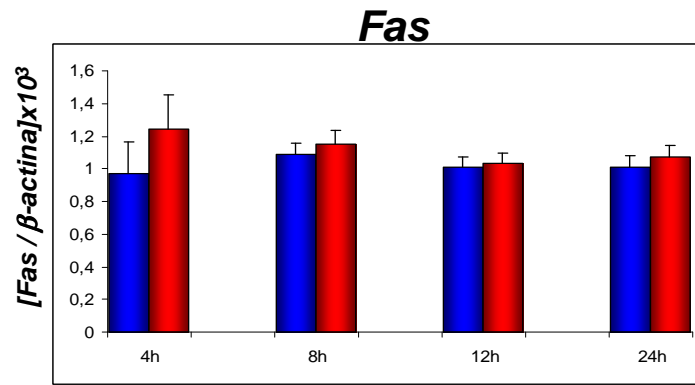


**Fig.6a**

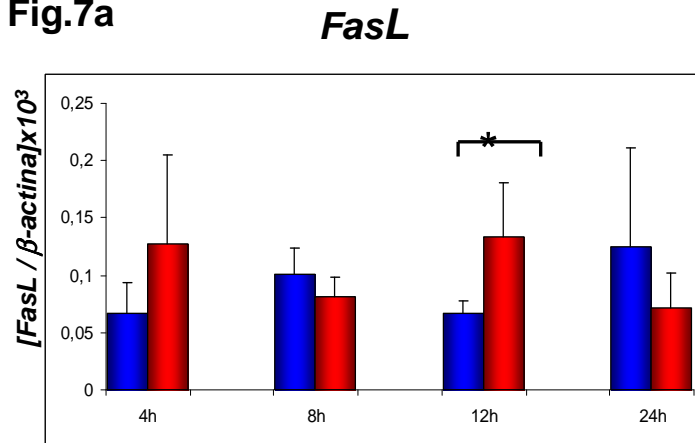


**Fig.6b**

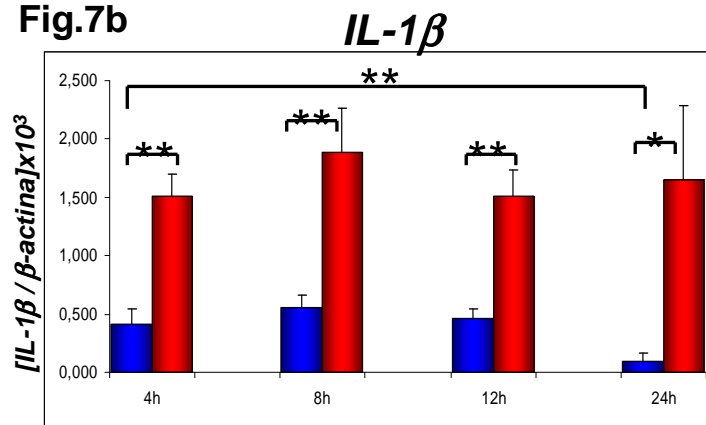
**Fig.6:** Espressione proteica di NF-kB (**6a**) in tessuti cirrotici peritumorali (PHCC) e tumorali (HCC) mediante tecnica di Western Blot. Analisi densitometrica delle lastre radiografiche ottenute dal rapporto tra NF-kB e  $\beta$ -actina. I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard delle densità ottiche ottenute dal rapporto tra NF-kB e  $\beta$ -actina (**6b**).



**Fig.7a**



**Fig.7b**

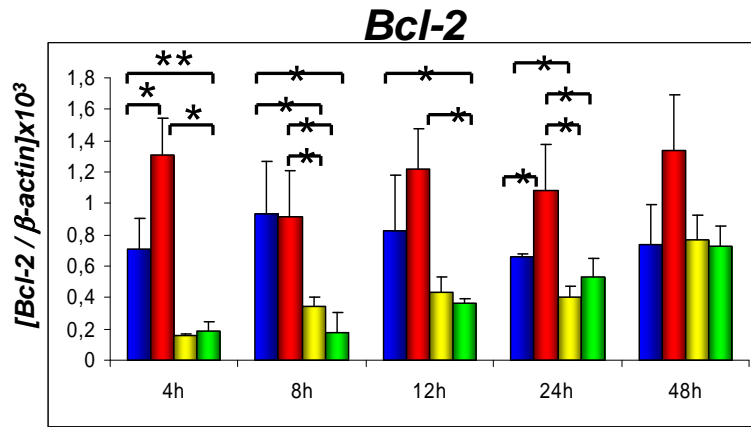


**Fig.7c**

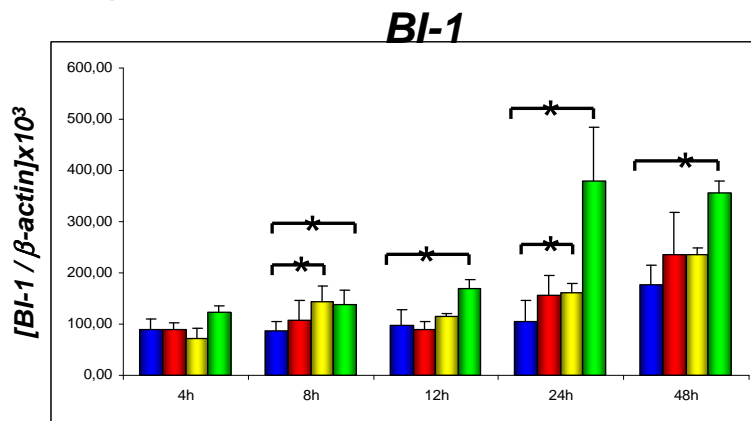
**Fig.7:** Espressione genica dei livelli di Fas (7a), FasL (7b) ed IL-1 $\beta$  (7c), in colture epatocitarie umane mediante RT-PCR semiquantitativa usando  $\beta$ -actina come housekeeping gene.

L'RNA è stato estrattato dagli epatociti umani dopo tempi diversi (4h, 8h, 12h, 24h, 48h) di coltura in presenza di solo medium ■ e TNF- $\alpha$  ■

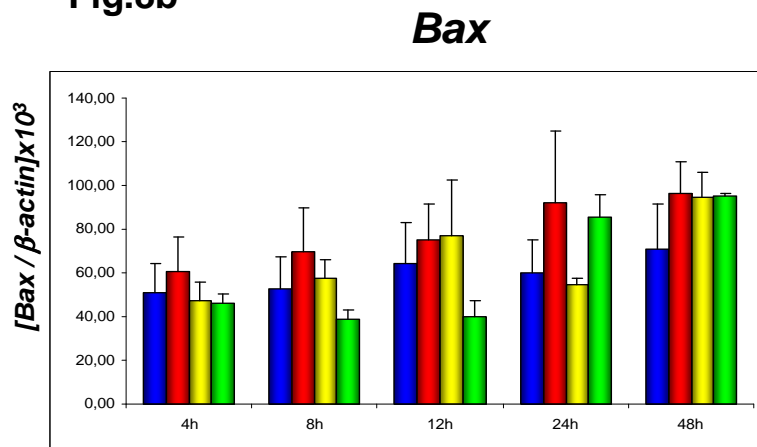
I dati sono rappresentati come media  $\pm$  deviazione standard dei valori ottenuti da 5 esperimenti, ciascun esperimento in triplicato.



**Fig.8a**



**Fig.8b**



**Fig.8c**

**Fig.8:** Espressione genica dei livelli di Bcl-2 (**8a**), BI-1 (**8b**), Bax (**8c**), mediante Real TimePCR assoluta, usando  $\beta$ -actina come housekeeping gene.

Estrazione di RNA da epatociti umani dopo tempi diversi (4h, 8h, 12h, 24h e 48h) di coltura in presenza di solo medium ■, TNF- $\alpha$  ■, STS ■, LY294002 ■. I risultati di ciascun esperimento rappresentano il valore medio dei triplicati.

### Bad

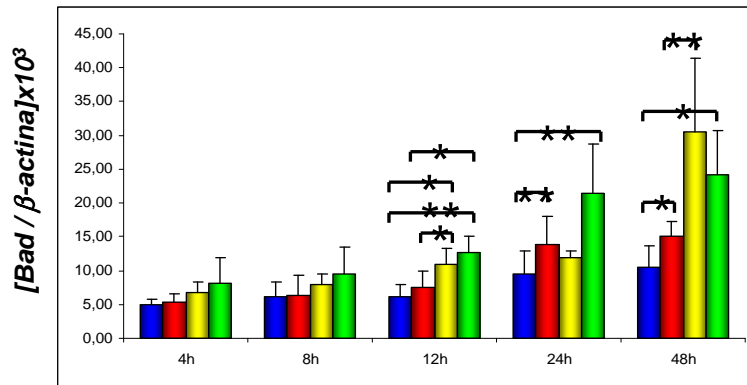


Fig.8d

### TGF-1 $\beta$

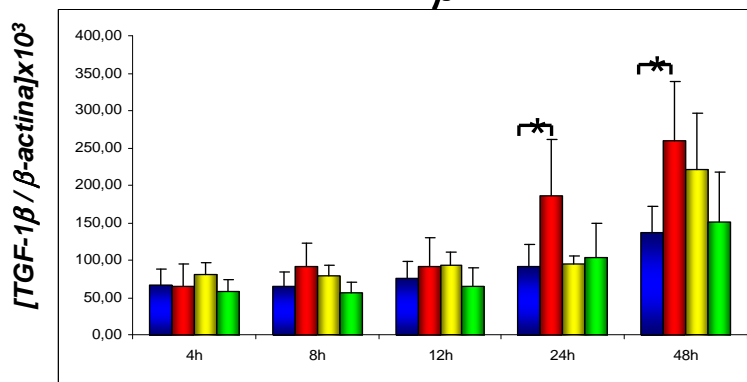


Fig.8e

### NF-kB

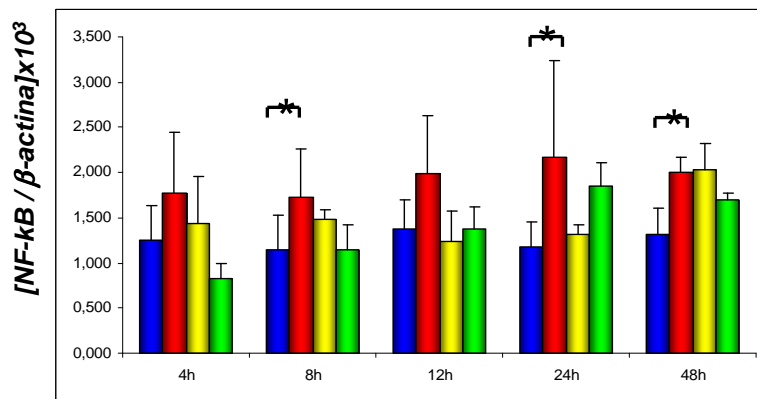
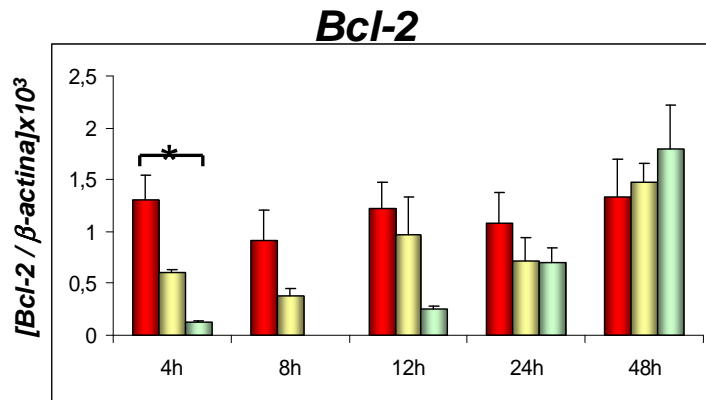
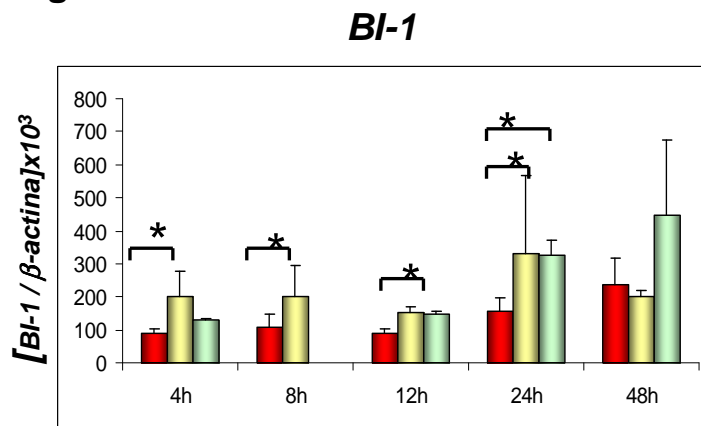


Fig.8f

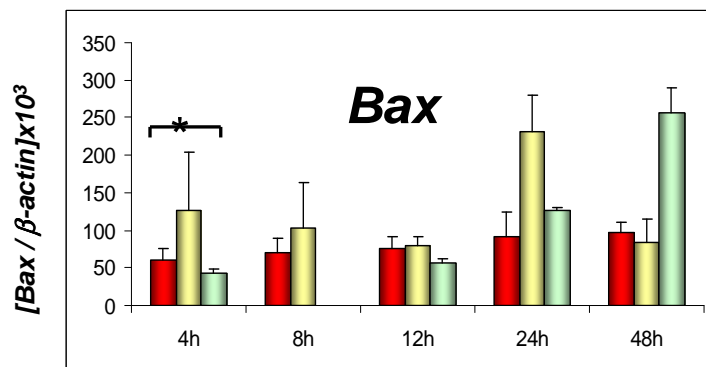
**Fig.8:** Espressione genica dei livelli di Bad (8d), TGF $\beta$ -1(8e), NF-kB (8f) con Real Time PCR assoluta, usando  $\beta$ -actina come housekeeping gene. Estrazione di RNA da epatociti umani dopo tempi diversi (4h, 8h, 12h, 24h e 48h) di coltura in presenza di solo medium ■, TNF- $\alpha$  ■ STS ■ LY294002 ■. I dati sono rappresentati come media  $\pm$  deviazione standard di 5 esperimenti. I risultati di ciascun esperimento rappresentano il valore medio dei triplicati.



**Fig.9a**



**Fig.9b**

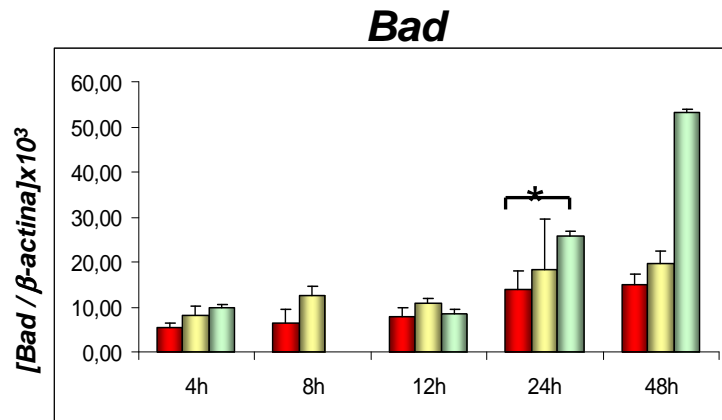


**Fig.9c**

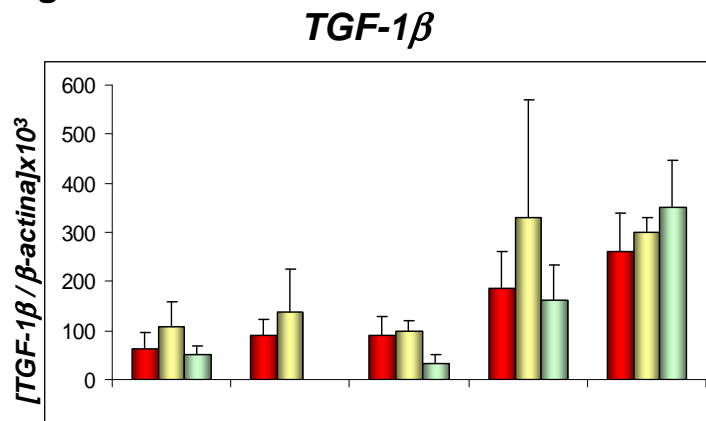
**Fig.9:** Espressione genica dei livelli di Bcl-2 (9a), BI-1(9b) e Bax (9c) mediante Real TimePCR assoluta, con  $\beta$ -actina come housekeeping gene.

Estrazione dell'RNA da epatociti umani dopo tempi diversi (4h, 8h, 12h, 24h, 48h) di coltura in presenza di TNF- $\alpha$  (red), STS+TNF- $\alpha$  (yellow) ed LY924402+TNF- $\alpha$  (green)

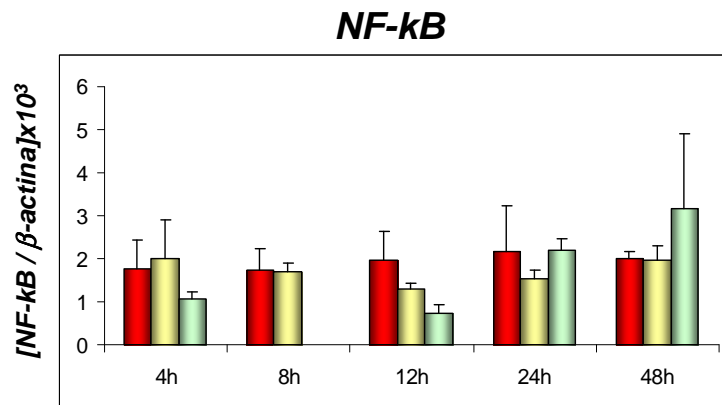
I dati sono rappresentati come media  $\pm$  deviazione standard di 5 esperimenti. I risultati di ciascun esperimento rappresentano il valore medio dei triplicati.



**Fig.9d**



**Fig.9e**



**Fig.9f**

**Fig.9:** Espressione genica dei livelli di Bad (**9d**), TGF $\beta$ -1(**9e**) ed NF-kB (**9f**) mediante Real TimePCR assoluta, usando  $\beta$ -actina come housekeeping gene.

Estrazione di RNA da epatociti umani dopo tempi diversi (4h, 8h, 12h, 24h e 48h) di coltura in presenza di TNF- $\alpha$

Estrazione dell'RNA da epatociti umani dopo tempi diversi (4h, 8h, 12h, 24h, 48h) di coltura in presenza di TNF- $\alpha$  ■, STS+TNF- $\alpha$  ■ ed LY924402+TNF- $\alpha$  ■

I dati sono rappresentati come media  $\pm$  deviazione standard di 5 esperimenti. I risultati di ciascun esperimento rappresentano il valore medio dei triplicati.

Tabella1. Sequenza degli Oligonucleotidi utilizzati in PCR-Semiquantitativa

Trascritto	Oligonucleotide	Sequenza	Amplicone (bp)
$\beta$ -actin	Forward primer	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	838
	Reverse primer	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGA TCCACATCTGC-3'	
Fas	Forward primer	5'-AAGAAGGGAAGGAGTACA-3'	126
	Reverse primer	5'-TGCACTTGGTATTCTGGGTC-3'	
FasL	Forward primer	5'-GGATTGGGCCTGGGGATGTTTCA-3'	344
	Reverse primer	5'-TTGTGGCTCAGGGGCAGGTTGTTG-3'	
IL-1 $\beta$	Forward primer	5'-AAACAGATGAA GTGCTCCTTCAGG-3'	391
	Reverse primer	5'-TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3'	
TNF- $\alpha$	Forward primer	5'-CAGAGGGAAGAGTCCCCAG-3'	325
	Reverse primer	5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'	

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction ; bp : base pairs ;



Tabella 2. Sequenza degli Oligonucleotidi utilizzati in in Real-Time PCR

Trascritto	Oligonucleotide	Sequenza	Amplicone (bp)
$\beta$ -actin	Forward primer	5'-CCTGGCACCCAGCACAA-3'	70
	Reverse primer	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'	
Bcl-2	Forward primer	5'-GGATCCAGGATAACGGAGGC-3'	147
	Reverse primer	5'-CCAGATAGGCACCCAGGGT-3'	
Bax	Forward primer	5'-CTTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'	119
	Reverse primer	5'-TTGAGACACTCGCTCAGCTTCT-3'	
Bad	Forward primer	5'GGAGGATGAGTGACGAGTTTGTG-3'	193
	Reverse primer	5'-GGGTGGAGTTTCGGGATGT-3'	
BI-1	Forward primer	5'-TCTATGCAAGTTTGGCCTTTGTA-3'	84
	Reverse primer	5'-GGCCAGCCTGAATGAAATGA-3'	
NF-kB	Forward primer	5'-GCTAGCATGGCTAAGGCAATAAC-3'	87
	Reverse primer	5'-TCGCATTAATTCCTGATAAAGCAGTA-3'	
TGF- $\beta$ 1	Forward primer	5'- AACCACAACGAAATCTATGACAAG -3'	107
	Reverse primer	5'-AGAGCAACACGGGTTTCAGGTA-3'	

**RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction ; bp : base pairs ;**

**Tabella 3 -Valori relativi alle curve standard per  $\beta$ -actina, Bcl-2, Bax, Bad, BI-1, TGF $\beta$ -1 ed NF-kB ottenute mediante Real time PCR**

<b>Gene</b>	<b>Threshold</b>	<b>Slope</b>	<b>Efficienza</b> <i>E=(10<sup>-1/slope</sup>)-1</i>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Range</b>
<b><i><math>\beta</math>-actina (n.13)</i></b>	<b>0.078</b>	<b>-3.34 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>98.85 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>0.999</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>2</sup></b>
<b><i>Bcl-2 (n.10)</i></b>	<b>0.114</b>	<b>-3.42 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>96.01 <math>\pm</math> 1.8</b>	<b>0.998</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>2</sup></b>
<b><i>Bax (n.8)</i></b>	<b>0.105</b>	<b>-3.48 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>93.79 <math>\pm</math> 2.2</b>	<b>0.998</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>3</sup></b>
<b><i>Bad (n.8)</i></b>	<b>0.106</b>	<b>-3.44 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>95.00 <math>\pm</math> 2.9</b>	<b>0.999</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>3</sup></b>
<b><i>BI-1 (n.11)</i></b>	<b>0,093</b>	<b>-3.48 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>93.48 <math>\pm</math> 1.34</b>	<b>0.999</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>2</sup></b>
<b><i>TGF<math>\beta</math>-1 (n.10)</i></b>	<b>0,112</b>	<b>-3.40 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>96.39 <math>\pm</math> 1.72</b>	<b>0.998</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>3</sup></b>
<b><i>NF-kB (n.13)</i></b>	<b>0,054</b>	<b>-3.42 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>96.05 <math>\pm</math> 2.08</b>	<b>0.998</b>	<b>10<sup>8</sup>-10<sup>2</sup></b>