

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,
CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: Metodologia Clinica, Scienze Endocrinologiche e Diabetologiche
CICLO: XXV

**SERPINB3 INIBISCE IL PORO DI TRANSIZIONE DELLA PERMEABILITA'
MITOCONDRIALE ATTRAVERSO LA REGOLAZIONE DELLA PRODUZIONE
DI ROS MITOCONDRIALI E INCREMENTA LA RESISTENZA AI
TRATTAMENTI CHEMIOTERAPICI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Co-Supervisore: Prof.ssa Patrizia Pontisso

Co-Supervisore: Dott. Andrea Rasola

Dottorando: Francesco Ciscato

INDICE

Indice	I
Riassunti	V
Riassunto	VII
Abstract	IX
Introduzione	1
1. Epatocarcinoma	3
1.1. Stadiazione e Trattamento	3
1.2 Meccanismi molecolari	5
1.3 Resistenza ai trattamenti	6
2. Apoptosi ed Epatocarcinoma	8
2.1 Resistenza all'apoptosi nell'epatocarcinoma	9
2.2 Infiammazione e resistenza all'apoptosi nell'epatocarcinoma	11
2.3 Meccanismo d'azione dei principali chemioterapici	11
3. Mitocondri, Poro di Transizione della Permeabilità Mitocondriale ed Epatocarcinoma	13
3.1 I Mitocondri	13
3.2 Il Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale	16
3.3 Regolazione dell'mPTP	16
3.4 mPTP ed Epatocarcinoma	18
3.5 Mitocondri e ROS	18
3.5.1 La Catena Respiratoria Mitocondriale	20
3.5.2 Complesso I	21
4. SERPINB3 ed Epatocarcinoma	22
Scopo dello Studio	25
Materiali e Metodi	29
Colture cellulari	31

Saggio di vitalità in vitro (saggio MTS)	31
Citofluorimetria	31
Isolamento dei mitocondri	32
Western Blot	32
Misurazione dei ROS con Diclorofluoresceina	33
Immunoprecipitazione	33
Misurazione dell'attività del Complesso I della catena respiratoria <i>in vitro</i>	34
Misurazione del consumo di Ossigeno <i>in situ</i>	34
Misurazione della Capacità di Ritenzione del Calcio (CRC) da parte dei mitocondri	34
Risultati	37
1. Modelli sperimentali	39
2. SERPINB3 e morte cellulare	39
2.1 Trattamenti chemioterapici	39
2.2 Localizzazione sub-cellulare di SERPINB3	41
2.3 SERPINB3 e stress ossidativo	42
3. SERPINB3 e mitocondrio	44
3.1 SERPINB3 e stress ossidativo mitocondriale	45
3.2 Modello animale	46
4. Meccanismo molecolare di SERPINB3	48
4.1 Interazione con il Complesso I	48
4.2 Modulazione attività Complesso I	49
4.3 Monitoraggio consumo di Ossigeno Complesso I-dipendente	50
5. SERPINB3: prove funzionali	51
5.1 Produzione di ROS mediata dal Complesso I	52
5.2 Il Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale e SERPINB3	53
Discussione	57
Bibliografia	65

Riassunti

RIASSUNTO

L'epatocarcinoma (HCC) è la quinta forma di cancro più diffusa nel mondo ed è caratterizzato da un'alta proliferazione cellulare e da un'alta resistenza ai trattamenti chemioterapici. Negli ultimi anni l'associazione tra la ov-serpina SERPINB3 (precedentemente conosciuta anche come SCCA1) e la progressione della patologia epatica e lo sviluppo di HCC si è fatta sempre più stretta, portando ad ipotizzare che questa proteina possa giocare un ruolo importante nella biologia del tumore epatico. SERPINB3 è in grado di inibire la morte cellulare in sistemi cellulari di tipo epiteliale, ma non si conosce ancora il suo esatto meccanismo d'azione molecolare né la sua funzione nel fegato.

Lo scopo dello studio è stato verificare il ruolo di SERPINB3 nella morte cellulare indotta da trattamenti chemioterapici in un modelli epatici sperimentali e di indagarne l'azione a livello molecolare.

Esprimendo SERPINB3 in una linea di epatoma (HepG2), si è messo in evidenza come la presenza della proteina riduce la morte cellulare dopo trattamento con Cisplatino e Doxorubicina, ma non dopo trattamento con Etoposide o 5-FluoroUracile. Esperimenti successivi hanno documentato come la resistenza alla morte sia associata ad un diminuito stress ossidativo, definito come riduzione dei livelli di ROS, nelle cellule che esprimono SERPINB3. E' stato dimostrato che la diminuzione dei livelli di ROS si associa alla presenza di SERPINB3 a livello mitocondriale. Utilizzando l'EM20-25, un composto che fa parte della famiglia dei chemioterapici BH3-mimetici, è stato confermato che la protezione viene conferita a livello mitocondriale in quanto viene diminuita l'attività del Complesso I della catena respiratoria con conseguente diminuzione dei livelli di ROS. Questo meccanismo molecolare è stato confermato mediante la documentazione dell'inibizione del Poro di Transizione di Permeabilità mitocondriale da parte di SERPINB3, che è considerato un regolatore chiave dell'innescamento della morte cellulare.

Dato che SERPINB3 non è presente nel fegato sano, ma la sua espressione progressivamente aumenta in corso di infiammazione cronica e di cirrosi, la sua azione antiossidante, inizialmente protettiva, potrebbe contribuire alla sopravvivenza di cellule trasformate e allo sviluppo di tumore. Nell'ambito dell'epatocarcinoma SERPINB3 potrebbe contribuire alla resistenza ai trattamenti chemioterapici, nota caratteristica di questa forma tumorale epatica.

ABSTRACT

Resistance to chemotherapeutic agents is well known in patients with hepatocarcinoma. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) is a crucial step in tumor cell resistance to apoptosis induced by anticancer drugs. Since SERPINB3 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and has an anti-apoptotic activity, aim of the study was to assess the role of this serpin on PTP modulation during treatment with chemotherapeutic agents.

HepG2 cells stably transfected with SERPINB3 were assayed for cell death induced by Cisplatin, Doxorubicin, Etoposide and 5-Fluorine Uracil. Reactive Oxygen Species (ROS) were detected with dichlorofluorescein. Threshold of PTP opening was evaluated by CRC assay and Complex I activity was determined by spectrophotometric assay.

After cell death induction by Cisplatin and Doxorubicin, HepG2 cells expressing SERPINB3 showed a significant increase in viability compared to controls, while there was no difference in cell death after Etoposide and 5-FU treatments. The addition of the antioxidant N-acetyl cysteine abrogated cell death induction by Cisplatin and Doxorubicin, suggesting that SERPINB3 protects from death through an antioxidant activity. Since Cisplatin and Doxorubicin induce mitochondrial oxidative stress and favor PTP opening, cells were treated with the PTP inducer EM20-25 that acts at mitochondrial level. In presence of SERPINB3 the effect of EM20-25 resulted in PTP opening inhibition and decreased ROS formation. Subcellular localization analysis revealed that a fraction of SERPINB3 was located in mitochondria and that it increased after death-promoting treatments. Mitochondrial SERPINB3 was found associated to respiratory chain Complex I by immunoprecipitation experiments. In vitro analysis confirmed the inhibition by SERPINB3 of Complex I activity, known as one of the main sources of mitochondrial ROS.

In conclusion, SERPINB3 acts at mitochondrial level protecting cells from chemotherapeutic-induced oxidative stress and consequent cell death. This antioxidant function could represent a relevant advantage for a transformed cell to balance its ROS equilibrium and for SB3-expressing cells exposed to anticancer treatments.

Introduzione

1. Epatocarcinoma

L'epatocarcinoma o carcinoma epatocellulare (HCC) è un tumore maligno del fegato ed è la quinta forma di cancro più frequente nel mondo (Sherman M., 2010). Questa patologia è spesso diagnosticata in stadi avanzati e questo la rende la terza causa di morte in ambito oncologico (Llovet *et al.*, 2003a) con un'incidenza in aumento (Parkin *et al.*, 2005). Generalmente l'insorgenza dell'epatocarcinoma è associata ad una malattia epatica pregressa, infatti circa l'80% dei tumori epatici si sviluppano in fegati affetti da epatiti croniche o da cirrosi. L'eziologia dell'HCC è eterogenea, ma è ben caratterizzata in base ai diversi fattori di rischio: il principale è l'infezione virale cronica, infatti l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) è la causa più comune e viene riscontrata nel 52% circa dei casi di HCC, mentre l'infezione da virus dell'epatite C (HCV) nel 20% (Beasley *et al.*, 1981). Altre cause riconosciute, anche se responsabili solamente di una frazione minore degli HCC, sono: la cirrosi alcolica, l'assunzione prolungata di aflatossina B1 con il cibo, l'emocromatosi genetica, il deficit di α 1-antitripsina e altre malattie metaboliche rare (Sherman M., 2010). Almeno uno tra questi fattori di rischio è possibile riscontrarlo nel 90% degli HCC (a volte sono presenti in combinazione tra loro) e la loro presenza varia a seconda dell'origine geografica dei pazienti (Montalto, 2002): in Asia, ad esempio, sono diagnosticati il 76% dei casi mondiali di HCC e il fattore di rischio più diffuso è l'HBV (Sherman M., 2010). HBV, HCV e alcool sono considerati i principali carcinogeni del fegato infatti la presenza di cirrosi di qualsiasi origine eziologica aumenta il rischio di epatocarcinoma. L'epatocarcinogenesi è un processo a fasi successive in cui, come per la maggior parte dei tumori, si ha un accumulo di alterazioni genetiche e delle vie del segnale a livello molecolare che porta alla proliferazione di cellule aberranti, formazione della massa tumorale, angiogenesi e infine alla diffusione del tumore nel parenchima epatico o metastatizzazione in altri organi. La formazione dell'HCC è spesso preceduta da lesioni pre-neoplastiche come i foci e i noduli displastici (Teoh *et al.*, 2009) che derivano dallo stato di necro-infiammazione cronica, fibrogenesi e accentuata rigenerazione tissutale tipiche dei fegati cirrotici. Il 60-80% degli epatocarcinomi si sviluppano da una cirrosi cronica (Chiesa *et al.*, 2000) e l'incidenza annuale di HCC nei pazienti con cirrosi è compresa tra l'1 e il 6% a seconda dei gruppi studiati: l'insorgenza dipende da età del paziente, durata ed eziologia della cirrosi e dal genere (Sherman M., 2010). In quasi tutte le popolazioni analizzate c'è una maggiore prevalenza di HCC nei maschi rispetto alle femmine con rapporti che variano tra 2:1 a 4:1 e la stessa differenza è stata dimostrata

sperimentalmente sui topi, infatti i maschi murini sviluppano da 2 a 8 volte più epatocarcinomi rispetto alle femmine (ElSerag *et al.*, 2007). Queste differenze possono essere dovute a esposizione diversa ai differenti fattori di rischio, alla diversa massa epatica o anche all'azione degli ormoni sessuali: per esempio uno dei principali mediatori della risposta infiammatoria epatica quale l'interleuchina 6 (IL-6), è prodotta in quantità maggiore nei maschi (Prieto J., 2008).

1.1 Stadiazione e Trattamento

Il sistema di stadiazione maggiormente utilizzato è diventato il Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging System anche se non ricalca perfettamente tutte le varie situazioni cliniche esistenti (Fig. 1).

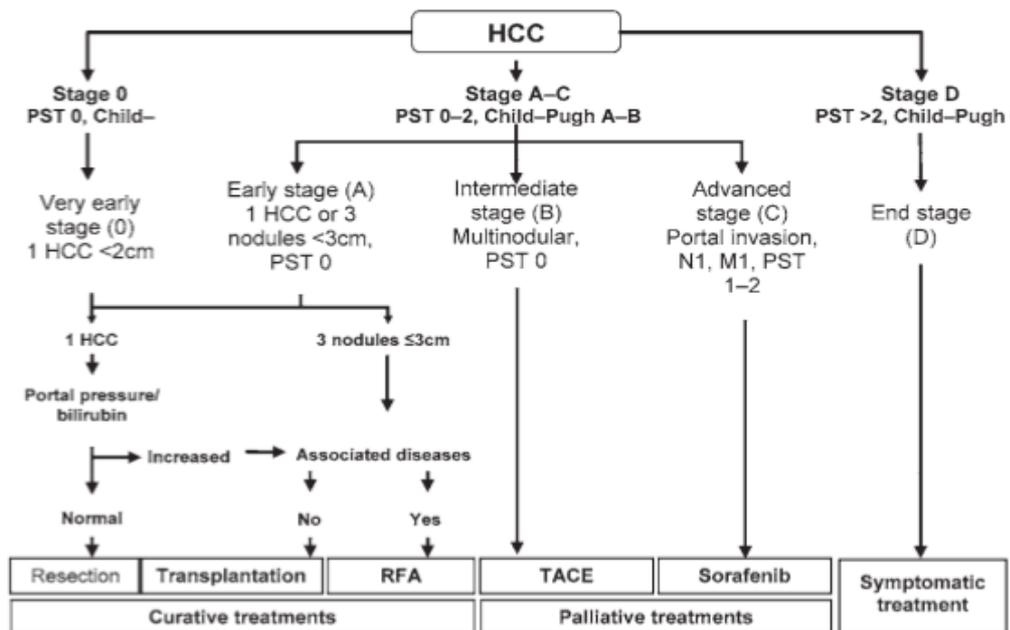


Figura 1. Da Bruix *et al.*, 2011; Stadiazione dell'HCC secondo il BCLC.

Secondo questo metodo di stadiazione l'HCC si divide in 5 stadi (0, A, B, C, D) a seconda delle caratteristiche tumorali, della funzionalità epatica e alle caratteristiche del paziente. Negli stadi precoci della malattia (BCLC-0 e A) a seconda della tipologia del tumore è possibile intervenire chirurgicamente attraverso trapianto di fegato o resezione parziale o attraverso l'ablazione per radiofrequenza aumentando l'aspettativa di vita fino a 5 anni nel 60-70% dei casi (Llovet *et al.*, 2003b). Per lo stadio intermedio (BCLC-B) invece è possibile controllare la crescita tumorale attraverso la TACE (Trans-arterial chemoembolisation) (Lencioni *et al.*, 2010) aumentando l'aspettativa di vita fino a 20-25

mesi (Llovet *et al.*, 2003b). Negli stadi avanzati (BCLC-C), nei quali non è possibile effettuare trattamenti radicali, se lo stadio di malattia lo consente, lo “standard of care” è il trattamento chemioterapico con Sorafenib che è l’unica terapia approvata per i pazienti con stadio avanzato (Wilhelm *et al.*, 2008), anche se non è scevra da effetti collaterali importanti (Villanueva *et al.*, 2011).

Tutte queste strategie terapeutiche spesso però risultano poco efficaci, data l’aggressività di questo tipologia tumorale: l’HCC dopo 5 anni dal trattamento con tecniche ablative o resezione presenta un tasso cumulativo di ricorrenza del 70% (Llovet *et al.*, 2005); il trattamento con Sorafenib aumenta il tempo di sopravvivenza medio nei pazienti con tumore da 7,9 a 10,7 mesi (Crowell *et al.*, 2009). D’altra parte, la maggior parte dei trattamenti con chemioterapici standard sperimentati negli ultimi decenni è risultato inefficace, data l’alta resistenza alla morte cellulare che caratterizza l’HCC.

1.2 Meccanismi molecolari

L’epatocarcinoma si sviluppa a seguito di un danno epatico cronico, caratterizzato da uno stato infiammatorio persistente che determina sia la proliferazione cellulare, specie della componente staminale epatica, che l’accumulo progressivo di mutazioni genomiche. Gli studi effettuati negli ultimi anni per identificare un eventuale pattern comune di geni espressi nell’HCC non ha portato all’identificazione di un profilo genico comune, ma è stato messo in evidenza che vengono frequentemente iper-espressi geni che promuovono mitosi e proliferazione cellulare, e questa situazione si associa a prognosi più infausta, indipendentemente dall’eziologia del tumore (Teoh *et al.*, 2009). In un fegato sano gli epatociti si trovano nella fase G₀ del ciclo cellulare e generalmente non si replicano, infatti da un fegato sano raramente si sviluppa un epatocarcinoma (ElSerag *et al.*, 2007). Il legame tra danno cronico al fegato, con conseguente attivazione della componente staminale cellulare per ripristinare la massa danneggiata, e le condizioni di stress che favoriscono l’accumulo di modificazioni pro-tumorigeniche, sembra quindi essere molto forte.

Laurent-Puing *et al.*, 2006, suddividono in due gruppi le alterazioni genetiche presenti nell’HCC: 1) fattori di rischio associati al tumore come mutazioni inattivanti il gene oncosoppressore p53 a causa dell’aflatossina, mutazioni attivanti l’oncogene KRAS dovute al cloruro di vinile, integrazione di HBV nel genoma cellulare e mutazioni nella linea germinale che predispongono la prole all’epatoblastoma; 2) fattori indipendenti

dall'eziologia, come attivazione della via di WNT/ β -catenina, alterazioni di p53, TGF- β e Myc, attivazione di RB1, p16 e IGFR2.

Un altro studio molto importante che suddivide gli epatocarcinomi in base alle loro caratteristiche molecolari è rappresentato in Fig. 2 (Hoshida *et al.*, 2009)

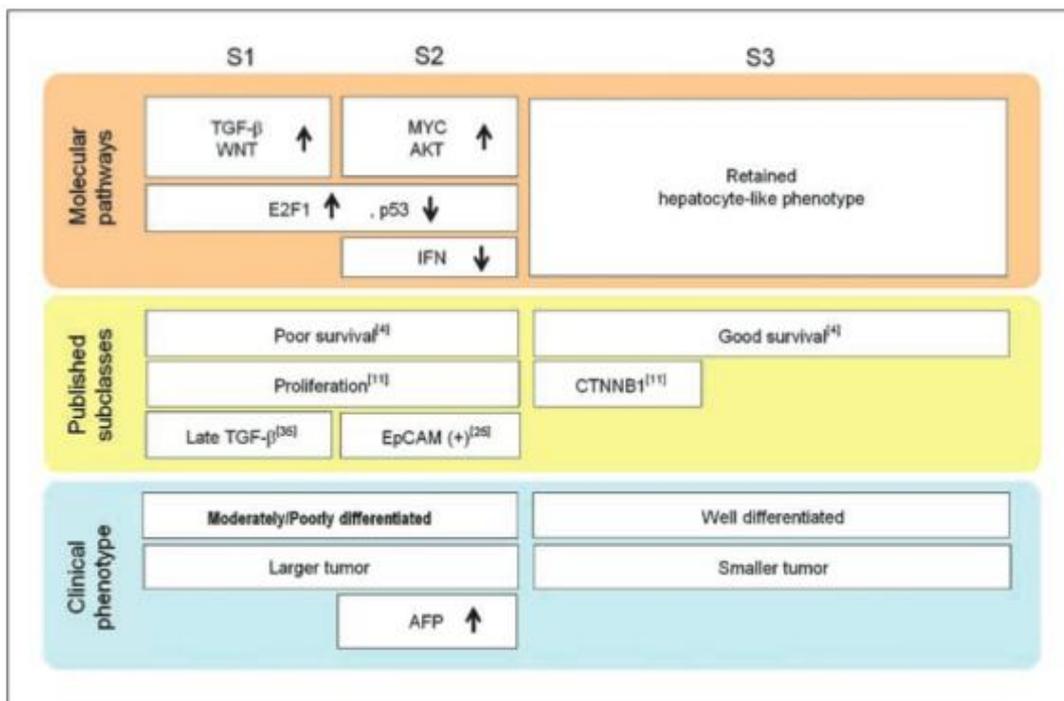


Figura 2. Subclassi di HCC secondo Hoshida *et al.*, 2009

in cui è chiaro il coinvolgimento di vie del segnale come quelle del TGF- β , WNT β -catenina, MYC e PI3K/AKT nei tumori più aggressivi e meno differenziati.

1.3 Resistenza ai trattamenti

Nel trattamento dell'epatocarcinoma l'approccio di tipo chirurgico è preferito negli stadi precoci della malattia perché questo tumore è caratterizzato da una scarsa risposta ai trattamenti chemioterapici più diffusi. Gli approcci terapeutici tentati nei tumori epatici non resecabili con agenti chemioterapici in monoterapia o in combinazione tra di loro, sono risultati inefficaci o scarsamente efficaci come riportato ad esempio nella revisione di Zhu A.X., 2006 (Fig. 3):

Table 2. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma (single agents)

Study	Agent	No. of patients	Response rate (%)
Johnson et al. [103]	Doxorubicin	44	32
Sciarrino et al. [31]	Doxorubicin	109	0
Melia et al. [104]	VP-16	24	13
Hochster et al. [35]	Epirubicin	18	17
Lai et al. [105]	Mitoxantrone	20	0
Falkson et al. [106]	Cisplatin	35	17
Chao et al. [45]	Paclitaxel	20	0
Patt et al. [49]	Capecitabine	37	11
Yang et al. [47]	Gemcitabine	28	18
Fuchs et al. [48]	Gemcitabine	30	0
O'Reilly et al. [46]	Irinotecan	14	7
Halm et al. [50]	Pegylated liposomal doxorubicin	16	0
Stuart et al. [52]	Nolatrexed	26	8
Leung et al. [55]	T138067	21	10
Falcon-Lizaraso et al. [107]	Irofulven	29	7

Table 3. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma (combination regimens)

Study	Regimen	No. of patients	Response rate (%)
Al-Idrissi et al. [108]	Doxorubicin, 5-FU, mitomycin C	40	13
Ravry et al. [109]	Doxorubicin, bleomycin	60	16
Patt et al. [63]	5-FU, interferon	28	14
Ji et al. [110]	Cisplatin, interferon	30	13.3
Bobbio-Pallavicini et al. [111]	Epirubicin, etoposide	36	39
Leung et al. [59]	PIAF	50	26
Taieb et al. [58]	GEMOX	21	19
Lee et al. [112]	Cisplatin, doxorubicin	37	18.9
Ikeda et al. [113]	Mitoxantrone, 5-FU, cisplatin	51	27

Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; GEMOX, gemcitabine and oxaliplatin; PIAF, cisplatin, interferon, doxorubicin, and 5-fluorouracil.

Figura 3. Tabelle estratte da Zhu A.X., 2006: revisione dei principali studi clinici effettuati somministrando chemioterapici in monoterapia o in combinazione tra loro con rispettive percentuali di risposta da parte di pazienti HCC.

L'epatocarcinoma presenta anche una resistenza ai trattamenti ormonali come il Tamoxifen, un analogo degli estrogeni che si era ipotizzato utile per contrastare la crescita tumorale, dato che la replicazione degli epatociti in parte dipende anche dagli stimoli ormonali (Lopez P.M., 2006).

L'unico farmaco che è stato approvato dalla FDA come trattamento dell'epatocarcinoma allo stadio BCLC-C, è il Sorafenib. Approvato nel 2007, rappresenta lo "standard of care" per gli HCC in fase avanzata (Llovet *et al.*, 2008a) dato che tutti gli altri chemioterapici testati non sono risultati efficaci. Il Sorafenib è un inibitore multichinasico che è stato disegnato per inibire vie del segnale come la via di RAS-MAPK e dei recettori VEGFR e PDGFR che promuovono sia la proliferazione delle cellule che l'angiogenesi tumorale, anche se non si sa ancora di preciso quale effetto farmacologico sia in grado di rallentare la crescita tumorale (Villanueva *et al.*, 2011). Anche il trattamento con il Sorafenib però

non risulta risolutivo per la patologia dato che aumenta la sopravvivenza media dei pazienti da 7,9 a 10,7 mesi (Crowell *et al.*, 2009), ma non è generalmente in grado di eliminare il tumore. La caratteristica principale che contraddistingue l'epatocarcinoma rimane quindi una intrinseca resistenza ai trattamenti chemoterapeutici sistemici che rendono inefficaci le cure nei tumori avanzati.

2. Apoptosi ed Epatocarcinoma

L'apoptosi o morte cellulare programmata è un fenomeno che normalmente avviene nei vari organi per mantenere costanti dimensioni o il numero di cellule ed evitare una crescita di masse anomale o il proliferare di cellule danneggiate. A livello embrionale, ad esempio, è un processo fondamentale che consente la formazione di strutture come le dita di mani e piedi.

L'apoptosi può essere innescata attraverso due vie:

- 1) la *via estrinseca*, che vede coinvolta l'interazione dei recettori di morte (Fas/CD95, TNFR e TRAIL-R1) con i loro rispettivi ligandi (FasL, TNF- α e TRAIL) sulla superficie cellulare per dare inizio ad una trasduzione del segnale nel citosol che porta all'attivazione delle caspasi effettrici attraverso la caspasi-8;
- 2) la *via intrinseca*, che viene generalmente innescata in risposta a stress intracellulari quali danno al DNA (ad esempio attraverso p53) o forte stress ossidativo.

Cuore di questo meccanismo è il mitocondrio che riceve segnali pro- e anti-apoptotici e li integra dando come *output* l'innescamento o meno della morte cellulare. Quest'ultima generalmente viene iniziata con l'apertura del Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale (mPTP) nella membrana interna che porta alla perdita di funzionalità da parte dei mitocondri, al rilascio dei fattori pro-apoptotici quali Citocromo c (Cyt c), Apaf-1 e AIF (Apoptosis Inducing Factor) dallo spazio intermembrana e all'attivazione della caspasi-9 che innesca a sua volta le caspasi effettrici.

Nel tessuto epatico i fenomeni apoptotici sono molto importanti perché permettono di eliminare le cellule in eccesso (la massa epatica è direttamente proporzionale alla massa corporea) che vengono prodotte durante lo sviluppo del fegato oppure durante la rigenerazione epatica. D'altra parte, una mancata apoptosi nel fegato è associata allo sviluppo e alla progressione dei tumori epatici (Guicciardi M.E. *et al.*, 2005).

L'epatocarcinoma, come le altre forme tumorali, presenta delle modificazioni dei

meccanismi pro- e/o anti-apoptotici che spostano il punto di equilibrio che esiste tra replicazione e morte cellulare programmata verso la sopravvivenza delle cellule trasformate (Fabregat I. *et al.*, 2007).

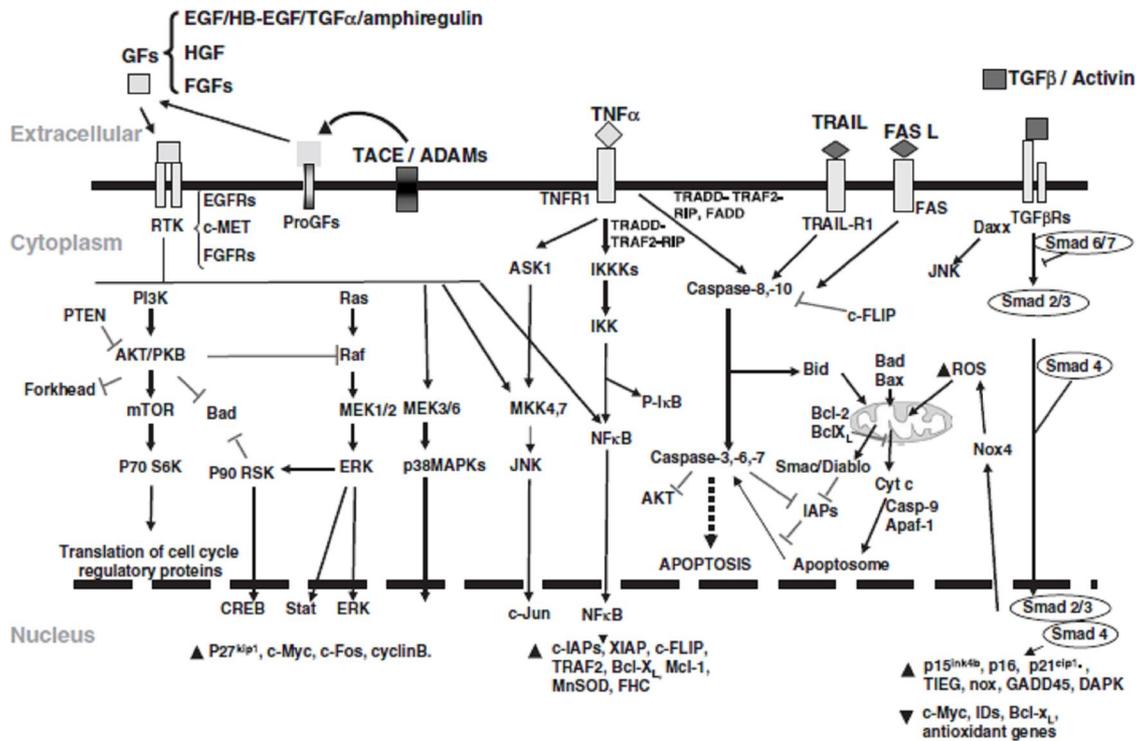


Figura 4. Fattori intra- ed extracellulari che controllano la morte cellulare negli epatociti (Fabregat I. *et al.*, 2007).

2.1 Resistenza all'apoptosi nell'epatocarcinoma

Le principali vie del segnale che portano alla diminuzione della morte cellulare alterate nell'HCC sono raccolte e riviste in Fabregat I. *et al.*, 2007 e Fabregat I., 2009:

- la via del segnale dell'oncosoppressore p53; comunemente deregolata nella maggior parte dei tumori, è una delle principali alterazioni riscontrate negli epatocarcinomi. Questo gene (TP53) presenta degli *hotspots* di mutagenesi e viene spesso mutato a seguito di esposizione prolungata ad aflatoossina B1 o in caso di infezione cronica da HBV e/o HCV. La sua mutazione nelle cellule epatiche può influenzare diversi stadi dell'epatocarcinogenesi: può contribuire all'instaurarsi del tumore, favorirne la proliferazione e anche contribuire alla resistenza alla chemioterapia dato che la maggior parte dei chemioterapici necessitano del contributo di p53 per indurre la morte cellulare.
- la via del segnale di TGF-beta; negli epatociti TGF-beta1 è in grado di regolare la crescita cellulare inibendo la proliferazione e inducendo l'apoptosi, ma nelle cellule tumorali può favorirne la sopravvivenza e l'invasione. Sembra quindi essere vantaggioso per una

cellula tumorale epatica eliminare gli effetti antiproliferativi di questa via del segnale e accendere i geni antiapoptotici e pro-invasione controllati dal TGF- β . Infatti è stato dimostrato che bloccando il TGF- β nelle cellule di epatocarcinoma vengono ridotte sia proliferazione che invasione (Fransvena E. *et al.*, 2008).

c) la via dei recettori di morte Fas e TNF; la maggior parte degli epatocarcinomi sono insensibili alla morte indotta attraverso lo stimolo diretto dei recettori di morte (Fas e TNF) con i rispettivi ligandi (Fas ligand e TRAIL) dato che all'interno della cellula questi segnali vengono spenti attraverso vari meccanismi.

d) alterazioni nell'espressione o nella funzione di proteine regolatrici della morte cellulare; la morte cellulare è regolata a livello mitocondriale da una famiglia di proteine chiamate "Bcl-2 family" che spesso sono deregolate negli HCC. Ad esempio l'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bax o BCL-Xs è ridotta nelle forme di tumore epatico che presentano alterazioni della via di segnale di p53, oppure proteine anti-apoptotiche come Bcl-XL e Mcl-1 sono iper-esprese in una buona parte dei tumori epatici. Anche gli inibitori delle caspasi (X-linked inhibitor-of-apoptosis proteins, X-IAPs) sono iper-espressi in circa il 90% degli HCC avanzati e questi inibitori potrebbero giocare un ruolo importante contrastando direttamente la parte di effetti pro-apoptotici indotti da TGF- β . Infine la proteina Survivina riesce a favorire la crescita tumorale sia inibendo l'apoptosi che favorendo la proliferazione cellulare.

e) iper-attivazione di vie di segnale di fattori di crescita epatici; le cellule di epatocarcinoma iper-esprimono i ligandi per EGFR (recettore per il fattore di crescita epatocitario) come EGF e IGF-1 creando un *loop* autocrino e paracrino che protegge le cellule tumorali epatiche dalla morte.

f) attivazione di chinasi o fattori coinvolti nella trasduzione del segnale; c-Src è attivata negli epatocarcinomi e la sua attivazione conferisce resistenza alla morte cellulare; l'oncogene Ras, la via di PI3K e l'attivazione del fattore di trascrizione STAT3 sono altri tre esempi di vie del segnale che si possono ritrovare attive negli HCC favorendo la resistenza all'apoptosi e la proliferazione tumorale.

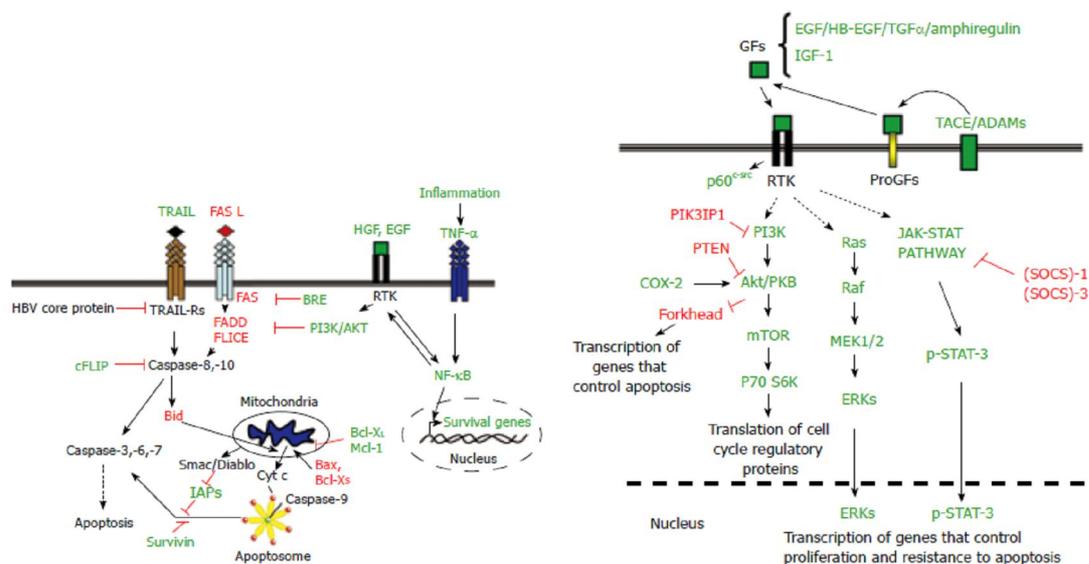


Figura 5. Schema dei principali meccanismi molecolari alterati frequentemente negli epatocarcinomi: in verde le proteine iper-esprese e/o iper-attivate, in rosso le *down*-regolazioni (Fabregat I., 2009).

2.2 Infiammazione e resistenza all'apoptosi nell'epatocarcinoma

L'infiammazione epatica è stata oggetto di ricerca per anni in quanto viene ritenuta una situazione favorente l'insorgenza dell'epatocarcinoma. Negli ultimi anni si sono sviluppate le conoscenze sui meccanismi molecolari attivati dallo stato infiammatorio cronico che favoriscono la sopravvivenza di cellule pre-cancerose (riassunto e revisionato in Fabregat I., 2009): i dati ottenuti recentemente sembrano supportare l'ipotesi che l'infiammazione promuova l'epatocarcinogenesi e che l'attivazione del fattore di trascrizione NF-κB sia al centro di questo processo. NF-κB può essere attivato tramite citochine, chemochine e interleuchine prodotte nello stato infiammatorio e tra i suoi geni target ci sono ad esempio Bcl-2, Bcl-XL e le proteine XIAP, tutti fattori antiapoptotici che possono avere un effetto citoprotettivo per le cellule neoplastiche.

2.3 Meccanismo d'azione dei principali chemioterapici

La maggior parte degli epatocarcinomi e degli epatoblastomi non resecabili risultano essere resistenti all'azione dei chemioterapici tradizionali che agiscono inibendo la replicazione del DNA e quindi sulle cellule in attiva proliferazione. All'origine della resistenza ai trattamenti chemioterapici tradizionali possono esserci alcuni dei meccanismi descritti precedentemente, anche se questi ultimi non sono riscontrabili in tutti gli epatocarcinomi vista l'eterogeneità eziologica e molecolare degli HCC. Questi chemioterapici agiscono prevalentemente a livello nucleare e di seguito è riportato il

meccanismo d'azione delle principali molecole testate in passato anche per il trattamento dell'HCC:

- il 5-FluoroUracile (5-FU) viene incorporato nella catena in allungamento dell'RNA causando disfunzioni e/o bloccando la traduzione delle proteine, inoltre inibisce l'enzima timidilato sintetasi che è coinvolto nella sintesi dei nucleotidi necessari per la replicazione del DNA (Longley D.B. *et al.*, 2003);
- l'Etoposide inibisce l'attività della Topoisomerasi II, enzima deputato al rilassamento dei superavvolgimenti del DNA che si creano durante la fase di replicazione del genoma, senza l'azione di questo enzima la replicazione cellulare non può proseguire (Pommier Y. *et al.*, 2010);
- la Doxorubicina inibisce anch'essa l'attività della Topoisomerasi II (Pommier Y. *et al.*, 2010), ma agisce anche direttamente sul DNA formando addotti con esso (Cutts S.M. *et al.*, 2005);
- il Cisplatino è un chemioterapico noto fin dagli anni '60 per formare addotti con il DNA causando rottura del doppio filamento e innescando la via intrinseca di apoptosi.

In generale un danno a livello del DNA nucleare innesca i meccanismi di riparo deputati a mantenere l'integrità del genoma e nel caso il danno sia esteso entrano in gioco meccanismi come quello di p53 che portano alla morte la cellula danneggiata. Tuttavia, nella maggior parte dei tumori questi sistemi sono alterati e la morte cellulare avviene in maniera meno efficiente causando la resistenza all'azione del chemioterapico.

Chemioterapici come Cisplatino e Doxorubicina agiscono anche sul DNA non nucleare presente nella cellula e cioè a livello mitocondriale (Podratz J.L. *et al.*, 2011). Nel mitocondrio entrambi i composti inducono stress ossidativo e quindi produzione di ROS, ma il loro meccanismo di azione in questo comparto sino ad oggi non è stato particolarmente studiato in quanto considerato un effetto secondario nelle cellule tumorali. Negli ultimi anni però è stato dimostrato che lo stress ossidativo indotto a livello mitocondriale dal cisplatino è responsabile dell'ototossicità e della nefrotossicità di questo chemioterapico (Chirino Y.I. and Pedraza-Chaverri J., 2009), mentre per la Doxorubicina è stata identificata una tossicità a carico dei cardiomiociti (Octavia Y. *et al.*, 2012).

3. Mitochondri, Poro di Transizione della Permeabilità Mitochondriale ed Epatocarcinoma

3.1 I Mitochondri

I mitocondri sono organelli intracellulari con un proprio genoma, un proprio apparato trascrizionale e traduzionale, formati da due membrane fosfolipidiche a diversa concentrazione proteica, uno spazio intermembrana e un compartimento interno detto matrice mitocondriale dove risiedono le copie del genoma mitocondriale. La membrana interna presenta una struttura ben organizzata con numerose invaginazioni della membrana stessa dette *cristae* mitocondriali: questa particolare ultra-struttura della membrana interna permette di aumentarne la superficie. I mitocondri sono principalmente deputati alla produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa, ultimo passaggio del catabolismo del glucosio, che avviene attraverso i complessi della catena respiratoria e l'ATP sintasi. I complessi della catena respiratoria (Complesso I, II, III, IV) e l'ATP sintasi sono inseriti nella membrana mitocondriale interna e sono deputati alla creazione ed al mantenimento del potenziale elettro-chimico, detto potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), necessario alla sintesi di ATP. Ma questa non è la loro unica funzione, i mitocondri sono sede di altri importanti processi cellulari come parte del metabolismo degli acidi grassi, sintesi dell'Eme, omeostasi del Ca^{2+} intracellulare, modulazione dello stato redox e prendono parte ad entrambi i meccanismi apoptotici (Fig 6).

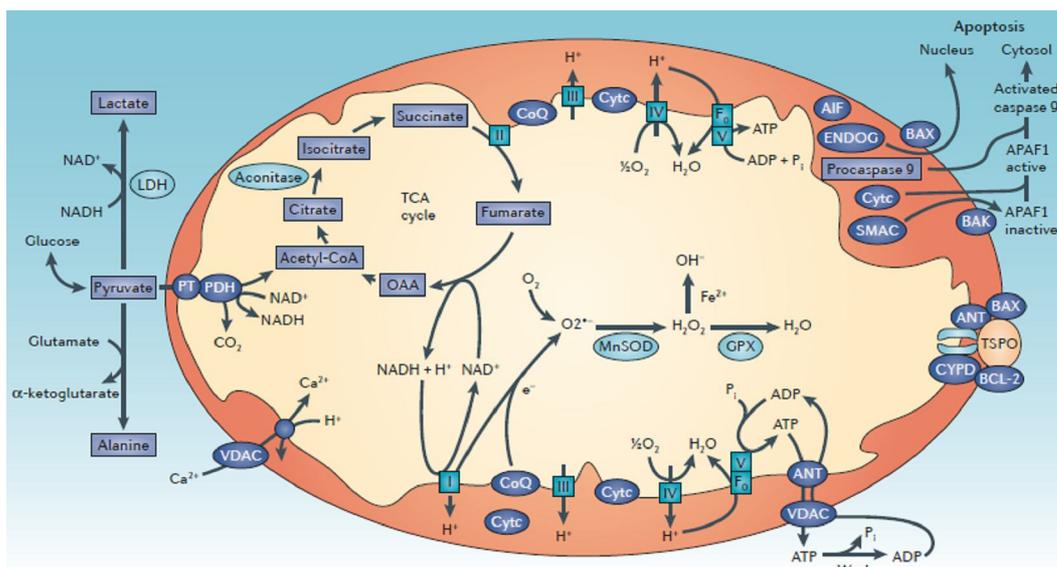


Figura 6. Mitochondrio: illustrazione delle principali funzioni mitocondriali e delle proteine coinvolte (Wallace D.C., 2012).

Il mitocondrio è l'attore principale della via intrinseca dell'apoptosi, esso funge da

centrale di integrazione e rielaborazione dei vari stimoli pro- e anti-apoptotici che ad esso convergono (riassunto e revisionato in Rasola A. and Bernardi P., 2007). Il risultato di questa integrazione diventa la morte o la sopravvivenza della cellula stessa a seconda dell'intensità e/o della persistenza degli stimoli che arrivano al mitocondrio. Nel caso in cui gli stimoli che convergono al mitocondrio siano sbilanciati verso l'innescamento della morte cellulare, nel mitocondrio avvengono una serie di cambiamenti a livello morfologico e funzionale che generalmente segnano il punto di non ritorno dalla morte cellulare: il mitocondrio depolarizza (il potenziale di membrana viene dissipato), comincia ad idrolizzare ATP anziché produrlo, si rigonfia a seguito della permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna ed infine rilascia i fattori pro-apoptotici come il Cyt c, Apaf-1 e AIF. Questa serie di eventi precede sia fenomeni di apoptosi che di necrosi: nel caso tutti i mitocondri diventassero disfunzionali e depolarizzati si innesca la necrosi dato che il processo apoptotico non potrebbe essere alimentato. L'apoptosi è un processo che richiede energia quindi alcuni mitocondri devono mantenere la loro funzionalità per sostenere il processo apoptotico attraverso la produzione di ATP (Rasola A. and Bernardi P., 2011) come evidenziato in Fig. 7. Il ruolo chiave di questo processo è attribuito al Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale, un canale multi ionico, che diventa quindi il principale regolatore dell'innescamento della morte cellulare (sia necrotica che apoptotica) a seguito di stress mitocondriali (Bernardi *et al.*, 1992).

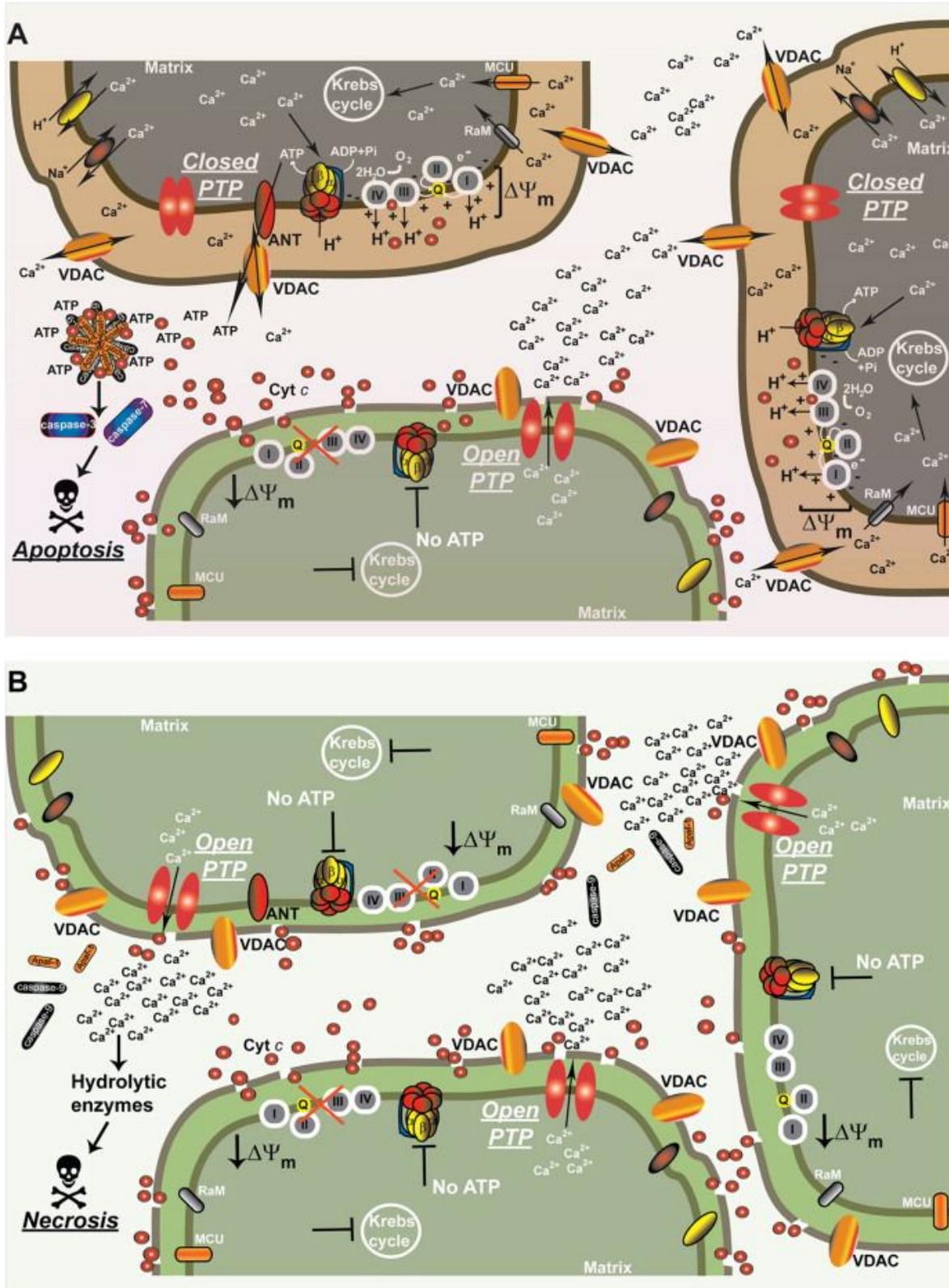


Figura 7. Morte cellulare e Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale (Rasola A. and Bernardi P., 2011); A) innescò dell'apoptosi a seguito dell'apertura dell'mPTP in alcuni mitocondri; B) la perdita della funzionalità mitocondriale in tutti i mitocondri comporta l'apertura dell'mPTP, ma il processo innescato è di tipo necrotico perché non c'è più produzione di ATP a sostenere il processo apoptotico.

3.2 Il Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale

Il Poro di Transizione della Permeabilità Mitocondriale (mPTP) è definito come un megacanal ad alta conduttanza presente nella membrana mitocondriale interna, dipendente da voltaggio e Ca^{2+} e sensibile alla Ciclosporina A (CsA): la sua apertura porta alla permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna a soluti con una massa molecolare fino a 1500 Da (Rasola A. *et al.*, 2010). Un'apertura prolungata del mPTP porta alla dissipazione del gradiente protonico tra spazio intermembrana e matrice mitocondriale, al disaccoppiamento della respirazione mitocondriale con conseguente produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). A questi eventi segue il rigonfiamento del mitocondrio e il rilascio dei fattori pro-apoptotici (Cyt c e Apaf-1) contenuti nello spazio intermembrana e l'avvio della cascata apoptotica attraverso l'attivazione della caspasi-9. L'mPTP presenta una determinata probabilità di apertura definita anche come soglia di apertura dell'mPTP, a seconda delle condizioni cellulari in cui si trova e dei meccanismi molecolari che lo regolano in quelle condizioni: più è bassa la soglia di apertura dell'mPTP più è alta la probabilità che esso si apra e inneschi la morte cellulare. La composizione molecolare di questo canale non è ancora nota anche se si conosce molto sulla sua funzione e regolazione. La rilevanza del mPTP è riconosciuta anche in ambito patologico, in particolare in malattie neurodegenerative o nelle distrofie, dove un'aumentata morte cellulare è causa della malattia, si osserva che l'mPTP è sensibilizzato all'apertura favorendo così la morte cellulare; mentre recentemente una ridotta sensibilizzazione all'apertura di questo canale è stata associata a diverse forme tumorali evidenziando così la sua importanza anche nei processi tumorigenici. Capire l'esatta composizione molecolare e investigare a fondo quali fattori ne influenzano l'apertura/chiusura nelle diverse condizioni patologiche diventa quindi essenziale per eventualmente progettare nuovi approcci terapeutici atti a far morire le cellule cancerose soprattutto in tumori fortemente resistenti alla chemioterapia come gli epatocarcinomi.

3.3 Regolazione dell'mPTP

L'mPTP è regolato da diversi fattori, condizioni cellulari, piccole molecole e proteine. Il primo fattore che regola l'apertura o la chiusura dell'mPTP è il potenziale di membrana sostenuto dal gradiente protonico instaurato dalla catena respiratoria mitocondriale: una caduta del potenziale di membrana abbassa la soglia di apertura dell'mPTP. Direttamente relazionato al gradiente protonico è il pH della matrice mitocondriale; è stato osservato

che ad un pH della matrice di 7,4 l'apertura dell'mPTP è favorita rispetto a valori superiori o inferiori (Bernardi *et al.*, 1992). Altro elemento fondamentale che regola la soglia di apertura è il Ca^{2+} presente nella matrice mitocondriale, i mitocondri possono accumulare Ca^{2+} nella matrice grazie alla proteina uniporto MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter, De Stefani *et al.*, 2011) e il Ca^{2+} presente nella matrice funge da fattore permissivo per l'induzione dell'apertura dell'mPTP da parte di altri fattori/condizioni. La Ciclosporina A è una piccola molecola e rappresenta uno dei maggiori inibitori dell'mPTP, essa lega la proteina di matrice Ciclofilina D (Cyp D; proteina associata all'mPTP) inibendone la sua attività, questo comporta un aumento della soglia di apertura dell'mPTP. Altre proteine regolatrici sono le proteine della famiglia delle Bcl-2 che possono inibire o favorire l'apertura dell'mPTP a seconda del loro effetto pro- o anti-apoptotico. Inoltre anche vie della trasduzione del segnale chinasiche come JNK, Akt ed ERK possono regolare con fosforilazioni la soglia di apertura dell'mPTP.

I ROS sono tra i principali induttori dell'mPTP: un aumento deregolato della loro produzione a livello mitocondriale (a seguito di danno cellulare/mitocondriale) induce l'mPTP all'apertura a causa del forte stress creato. D'altra parte, un aumento nei meccanismi delle difese antiossidanti (enzimi come catalasi e superossido dismutasi) o la somministrazione di composti che favoriscono la rimozione dei ROS come il Glutatione ridotto (GSH) o l'N-acetil-cisteina (NAC), favoriscono la chiusura dell'mPTP in condizioni di stress ossidativo mitocondriale.

Rasola A. e Bernardi P. (Apoptosis, 2007) hanno ipotizzato che l'apertura dell'mPTP sia alterata nei tumori, dato che: a) la resistenza ai trattamenti chemioterapici è associata ad un minor rilascio del Ca^{2+} ; b) le cellule tumorali sopravvivono all'ipossia e al distacco dalla matrice extracellulare, entrambe condizioni che innescano l'apertura dell'mPTP in cellule normali e c) i lipidi vegetali interattori dell'mPTP (i jasmonati) riescono ad indurre l'apoptosi solo nelle cellule tumorali. L'osservazione più rilevante per la resistenza ai trattamenti chemioterapici del tumore epatico riguarda i ROS: considerando che l'apertura dell'mPTP può essere sia causa che conseguenza della iper-produzione di ROS e il fatto che negli epatocarcinomi c'è un aumento delle difese antiossidanti, la modulazione dell'apertura dell'mPTP potrebbe rappresentare un sistema di protezione dalla morte cellulare indotta dai trattamenti chemioterapici.

3.4 mPTP ed Epatocarcinoma

Già nel 2003 il gruppo del professor Bernardi aveva dimostrato che durante le prime fasi dell'epatocarcinogenesi indotta alimentando i ratti con 2-acetilaminofluorene (2-AAF) si osserva un'inibizione dell'mPTP nel parenchima epatico prima dell'insorgenza del tumore (Klohn PC. *et al.*, 2003). Questo dimostra che l'inibizione della morte cellulare attraverso l'innalzamento della soglia di apertura dell'mPTP è uno dei primi fenomeni nel processo di progressione tumorale epatica e questo effetto potrebbe favorire la sopravvivenza di cellule trasformate. A parziale conferma di questo, anche la proteina HBx (Hepatitis B virus X protein) espressa da HBV è in grado di inibire sia l'apoptosi spontanea che quella indotta da TNF- α negli epatociti primari andando ad inibire il Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale (Clippinger A.J. *et al.*, 2009). Altri autori inoltre riportano che la stessa proteina (HBx) è in grado di proteggere dalla morte indotta da staurosporina, etoposide, deprivazione di siero, TGF- β , e Fas-mediata in modelli tumorali epatici e non (Clippinger A.J. *et al.*, 2009)

L'inibizione dell'mPTP si configura pertanto come un meccanismo rilevante nella carcinogenesi epatica, in particolare in condizioni di stato infiammatorio cronico, che si ritrovano nella maggior parte dei tumori del fegato. Il controllo dell'inibizione dei ROS e dell'mPTP da parte delle cellule tumorali epatiche si profila pertanto come un meccanismo da indagare e approfondire nell'ambito della resistenza ai chemioterapici che caratterizza le forme tumorali più avanzate.

3.5 Mitocondri e ROS

I mitocondri sono una delle sedi di produzione di stress ossidativo nella cellula e, come descritto precedentemente, questo fenomeno è rilevante soprattutto nel processo di morte cellulare per l'apertura dell'mPTP. Una iper-produzione di ROS comporta generalmente l'innescò della morte cellulare per apoptosi o per necrosi se lo stress indotto è molto forte (Fig. 8). In condizioni fisiologiche un discreto incremento nella produzione di ROS è necessario per stimolare la replicazione cellulare o la risposta a danni cellulari indotti ad esempio dallo stato infiammatorio. Nei sistemi tumorali lo stress ossidativo a cui sono sottoposte le cellule è una condizione persistente ed infatti le cellule degenerate per difendersi spesso up-regolano anche a livello mitocondriale i meccanismi di difesa che consistono in antiossidanti enzimatici (catalasi e superossido dismutasi) o GSH. Nel mitocondrio la principale sede di produzione di ROS è la catena respiratoria ed in

particolare i Complessi I e III (C-I e C-III). Il corretto funzionamento della catena respiratoria e dei loro sistemi di regolazione è quindi importante per mantenere bassi i livelli di ROS. Essi infatti aumentano in maniera indiscriminata se complessi come il C-I e il C-III cominciano a trasferire elettroni in maniera degenerata direttamente all'O₂ anziché convogliarli all'interno della catena respiratoria per sostenere il potenziale mitocondriale e la produzione di ATP.

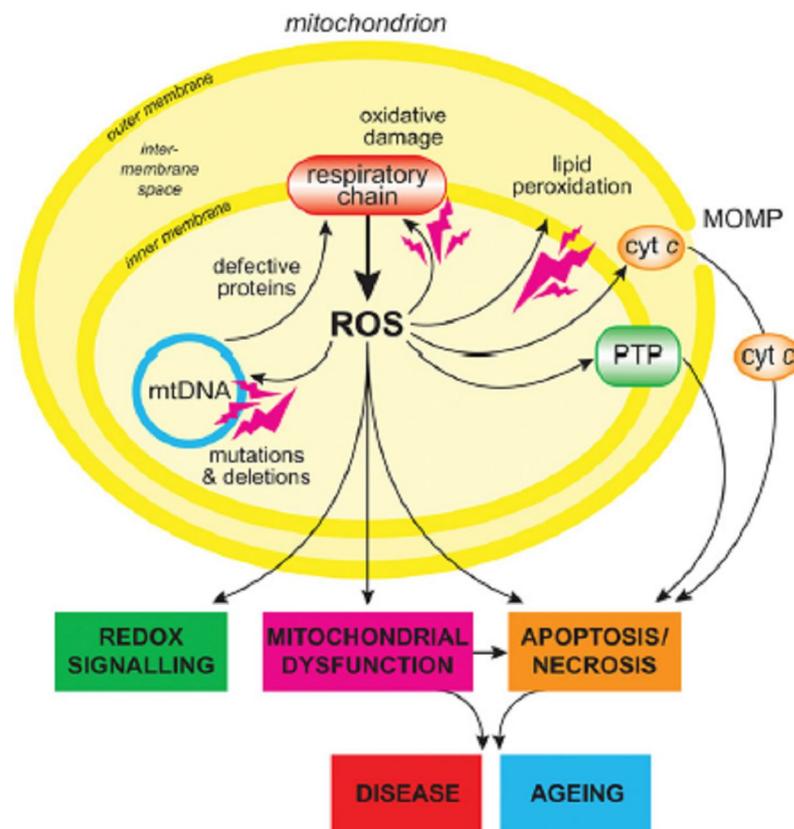


Figura 8. Produzione di ROS a livello mitocondriale e principali conseguenze (Murphy M.P., 2009).

Eventi che causano questa deregolazione possono essere molteplici come ad esempio mutazioni in geni chiave per il funzionamento dei complessi, soppressione della trascrizione di alcune subunità, vie del segnale pro-apoptotiche che convergono al mitocondrio, azione di farmaci o chemioterapici come il Cisplatino e Doxorubicina (Podratz J.L. *et al.*, 2012; Octavia Y. *et al.*, 2012). Ad esempio, il Cisplatino legandosi al DNA mitocondriale ne inibisce la trascrizione diminuendo la traduzione di proteine del C-I e comportando probabilmente un funzionamento difettoso del complesso stesso; inoltre, il Cisplatino si lega al GSH determinandone una parziale deplezione e privando il mitocondrio e la cellula di un importantissimo meccanismo di difesa antiossidante.

3.5.1 La Catena Respiratoria Mitocondriale

La Catena Respiratoria Mitocondriale è un insieme di 4 complessi (Complessi I-II-III-IV) inseriti nella membrana mitocondriale interna che catalizzano l'ossidazione di equivalenti di riducenti (principalmente NADH) usando come accettore finale degli elettroni l'ossigeno molecolare (O₂) per formare acqua (Lenaz G. e Genova. M.L., 2010). Gli elettroni derivanti dal catabolismo di macromolecole (principalmente glucosio, ma anche acidi grassi) servono per immagazzinare l'energia necessaria alla formazione di ATP sottoforma di potenziale elettrochimico (Fig. 9). Questa differenza di potenziale tra il lato esterno ed interno della matrice mitocondriale viene creato dall'attivo pompaggio di ioni H⁺ da parte dei complessi della catena respiratoria ed utilizzato dall'enzima ATP sintasi per la produzione finale di ATP.

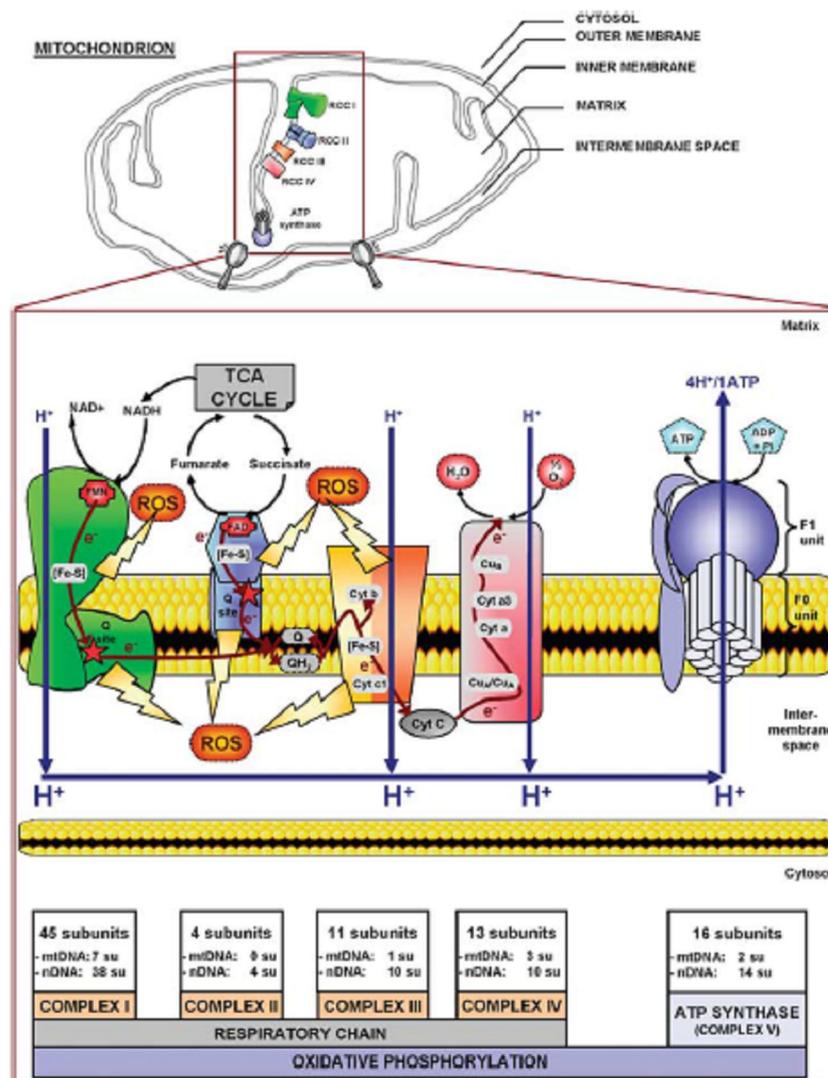


Figura 9. Rappresentazione della Catena Respiratoria e del suo meccanismo d'azione (Lemarie A. and Grimm S., 2011).

La catena respiratoria oltre ad essere fondamentale per la produzione di ATP è anche un importante sito di produzione di stress ossidativo a livello mitocondriale; i Complessi I-II e III sono i principali responsabili della produzione di ROS. I meccanismi di produzione di ROS da parte di questi complessi è molteplice e cambia a seconda delle situazioni: la presenza di mutazioni in subunità chiave, un cambio del metabolismo cellulare o l'innescio di fenomeni come l'apoptosi (per approfondimento: Lemarie A. and Grimm S., 2011). Il Complesso I è ritenuto, all'interno della catena respiratoria, il maggior produttore di ROS nel caso la sua struttura o funzionalità venga alterata (Lenaz G. *et al.*, 2010).

3.5.2 Complesso I

Il Complesso I della catena respiratoria è un supercomplesso formato da 45 subunità del peso di circa 980 kDa e catalizza la reazione di ossidazione del NADH (nicotinammide-adenina-dinucleotide) a NAD^+ trasferendo due elettroni al Coenzima Q_{10} (CoQ o Q_{10}). Il C-I ha una forma ad L ed è costituito da due braccia: il primo è inserito nella membrana mitocondriale interna e le sue subunità transmembrana gli permettono di essere a contatto sia con la matrice mitocondriale che con lo spazio intermembrana; il secondo invece sporge nella matrice mitocondriale dove avviene l'ossidazione del NADH (Fig.10).

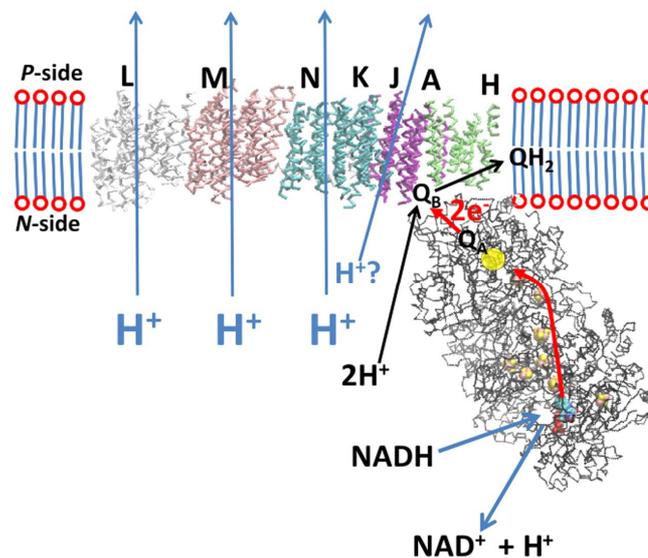


Figura 10. Struttura del Complesso I della catena respiratoria (Wikström M. *et al.*, 2012)

Gli elettroni che vanno dal NADH al Q_{10} passano attraverso il complesso proteico grazie a due molecole di FMN (flavin-mononucleotide) e sei centri ferro-zolfo (Fe-S) contenuti nel braccio di matrice permettendo così nell'altro braccio il pompaggio dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana di circa due protoni (H^+) per ogni elettrone che

deriva dall'ossidazione del NADH. Il Complesso I è ritenuto la maggiore fonte di ROS a livello mitocondriale, il sito principale di produzione è la molecola di FMN che accetta direttamente gli elettroni dal NADH; nel caso gli elettroni non vengano convogliati correttamente attraverso il complesso, essi possono essere donati direttamente all'O₂ formando anione superossido (O₂^{• -}). Questo succede quando il C-I è completamente inibito ad esempio dal Rotenone (inibitore specifico del C-I) o se l'attività di questo complesso viene aumentata.

4. SERPINB3 ed Epatocarcinoma

Le due forme dello Squamous Cell Carcinoma Antigen (SERPINB3 o SCCA1 e SERPINB4 o SCCA2) sono antiproteasi espresse fisiologicamente negli epiteli squamosi quali ad esempio cervice uterina, epidermide, esofago, ma vengono iper-espresse nei tumori maligni di origine epiteliale (Cataltepe *et al.*, 2000). La loro espressione è stata associata anche ai tumori del fegato come l'epatocarcinoma e l'epatoblastoma (Pontisso *et al.*, 2004; Turato *et al.*, 2011). Lo studio di Pontisso *et al.* del 2004 ha messo in evidenza come nell'85% degli HCC analizzati presentino queste due forme di SCCA, mentre il parenchima epatico normale non esprime queste proteine. Guido *et al.*, (2008) hanno invece dimostrato che noduli displastici e il tessuto cirrotico circostante presentano un'elevata espressione delle SCCA, suggerendo che la sua presenza possa essere un evento che precede lo sviluppo tumorale.

Le SCCA sono proteine che normalmente localizzano nel citoplasma, ma sono state ritrovate anche nel siero di pazienti affetti da tumori di origine squamocellulare. Nei pazienti affetti da epatopatie croniche evolutive e da epatocarcinoma le SCCA sono state rilevate sotto forma di immunocomplesso associato a IgM circolanti (SCCA-IgM), con livelli più alti in pazienti con tumore (Beneduce *et al.*, 2005). Uno studio retrospettivo ha dimostrato inoltre un incremento progressivo del complesso SCCA-IgM nel siero dei pazienti cirrotici che avevano sviluppato HCC nei 4 anni successivi dall'inizio del *follow-up* rispetto ai pazienti di controllo (Pontisso P. *et al.*, 2006).

Nel caso specifico di SERPINB3, la sua trascrizione è stata dimostrata essere dipendente dal fattore trascrizionale STAT3 in modelli *in vitro* di tumore epiteliale. STAT3 attiva la trascrizione della proteina sia se viene attivato dalla via del segnale dell'interleuchina-6 sia da quella dell'interleuchina-22 (Ahmed *et al.*, 2009; Naher L. *et al.*, 2012), entrambe

interleuchine fondamentali e coinvolte nella risposta infiammatoria a livello del fegato. È stato inoltre dimostrato che SERPINB3 in cellule tumorali di origine epatica è in grado di aumentare la proliferazione cellulare e di indurre la transizione epitelio-mesenchimale (Quarta *et al.*, 2010). In topi transgenici che esprimono la forma umana di SERPINB3 è stata osservata che dopo epatectomia parziale i topi transgenici presentano minor attività della caspasi-3, maggior indice proliferativo e una massa epatica maggiore a sette giorni dall'intervento di resezione (Villano *et al.*, 2010). Queste funzioni di SERPINB3 possono rivelarsi importanti nell'ambito dell'epatocarcinogenesi dato che favorendo la replicazione epatocitaria e diminuendo il numero di cellule apoptotiche potrebbero sostenere la crescita tumorale. In letteratura esistono altre indicazioni ottenute in diversi modelli che suggeriscono come SERPINB3 possa essere considerata una molecola antiapoptotica (Suminami *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2005; Katagiri *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2009), ma gli stessi studi non ne definiscono con precisione il meccanismo molecolare. Uno studio recente di Ullman *et al.*, (2011) dimostra che SERPINB3 presenta un comportamento opposto a seconda della maniera in cui viene indotta la morte: da una parte favorisce l'apoptosi dopo stress al reticolo endoplasmatico aumentando l'attività della caspasi-8 in maniera indipendente dai recettori di morte, mentre dall'altra preserva dall'apoptosi dopo danno lisosomiale. Nonostante i lavori pubblicati in questi ultimi anni, il meccanismo molecolare, la funzione e la rilevanza biologica di SERPINB3 in ambito tumorale rimangono ancora da definire con chiarezza.

Scopo dello Studio

SCOPO DELLO STUDIO

L'inibitore di proteasi SERPINB3 è considerata una molecola che favorisce la sopravvivenza in numerosi modelli cellulari, anche se in alcune condizioni eccezionali ne può favorire la morte. SERPINB3 non è presente nel parenchima epatico sano, ma la sua espressione aumenta con il progredire del danno e raggiunge i livelli più elevati nel contesto tumorale. Questo tipo di neoplasia è caratterizzato da una particolare resistenza alla morte cellulare indotta da trattamenti chemioterapici. Sulla base di queste premesse, è stato ipotizzato che SERPINB3 possa svolgere un ruolo rilevante nei meccanismi molecolari che determinano la sopravvivenza cellulare.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato determinare il coinvolgimento di SERPINB3 nei meccanismi di sopravvivenza della cellula epatica e la sua possibile influenza sulla resistenza alla morte indotta da chemioterapici.

Materiali e Metodi

Colture cellulari

Le cellule HepG2 sono state mantenute in coltura con terreno MEM (Minimum Essential Medium-Sigma) addizionato di: 10% di Siero Fetale Bovino (FBS - Invitrogen), glutammina 2mM (Sigma), MEM not essential amino acids (Sigma), penicillina 100 unità/ml, streptomina 100 µg/ml (Invitrogen), e incubate in atmosfera umidificata a 37°C con il 5% di CO₂. Le cellule sono state trasfettate con il vettore pCDNA3.1 o con lo stesso vettore contenente il cDNA di SERPINB3 e il promotore CMV come descritto in Quarta *et al.*, 2010. Per la selezione dopo trasfezione è stato utilizzato G418 (0.5 mg/ml; Sigma).

Saggio di vitalità *in vitro* (saggio MTS)

Per testare la vitalità cellulare è stato utilizzato il CellTiter 96® AQueous One Solution che si basa su un nuovo composto del tetrazolio (MTS) migliorato e stabilizzato (Promega). Le cellule HepG2 trasfettate con SERPINB3 sono state seminate su piastra da 96 pozzetti alla concentrazione di 20.000 cellule/pozzetto e dopo 24 ore sono state sincronizzate in terreno di coltura privo di FBS per 24 ore. Al momento del trattamento il terreno senza FBS è stato sostituito con il mezzo di coltura standard addizionato con concentrazioni scalari di Cisplatino, Doxorubicina, 5-FluoroUracile e Etoposide. Dopo 24 o 48 ore, in base al chemioterapico utilizzato, il terreno è stato rimosso, i pozzetti lavati con PBS ed è stata aggiunta una soluzione formata da HBSS con MTS, secondo le istruzioni del protocollo. Le piastre sono state incubate a 37°C per un'ora prima di essere lette in un lettore di piastre alla lunghezza d'onda di 540nm.

Citofluorimetria

Per valutare la morte cellulare è stato utilizzato il citofluorimetro FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson). Al termine dei trattamenti indicati in ogni esperimento, le cellule sono state staccate con tripsina, lavate in PBS e colorate a 37°C nel buffer FACS contenente 135 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM CaCl₂ e addizionato con Annessina-V coniugata con FITC (Boehringer Mannheim) per marcare le fosfatidil-serine esposte sulla superficie delle cellule apoptotiche e con Ioduro di Propidio iodide (PI, 1 µg/ml; Sigma) per identificare le cellule morte con alterazioni dell'integrità della membrana plasmatica. I campioni sono stati acquisiti e analizzati utilizzando FACSDiva software.

Isolamento dei mitocondri

Le linee cellulari e i fegati espianati dai topi sono stati omogenati con *potter* elettrici di Teflon in un buffer a pH 7.4 contenente 250 mM saccarosio, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA-Tris. Le cellule non omogenate, i nuclei e le porzioni di membrana plasmatica sono stati precipitati attraverso centrifugazione a 900g per 10min e poi eliminati. Il surnatante è stato centrifugato a 7000g per 10min per precipitare i mitocondri. Il pellet mitocondriale è stato lavato e ri-precipitato per due volte nello stesso Buffer di isolamento ed infine risospeso. Quando necessario, la frazione mitocondriale isolata è stata trattata con Tripsina a 4°C per un'ora. La digestione con tripsina è stata bloccata con un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma).

Western Blot

Le cellule o i mitocondri sono stati lisati in ghiaccio fondente per un'ora in un buffer composto da 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 10% glicerolo, 1% Triton X-100, con l'aggiunta di cocktails di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma). I campioni sono stati chiarificati con una centrifugazione a 13000g per 30 min a 4°C prima della quantificazione proteica. Le proteine sono state quantificate seguendo il protocollo del kit Protein Assay Kit (Thermo Scientific-Pierce). Dopo quantificazione o immunoprecipitazione ai campioni è stato aggiunto il Laemmli buffer riducente contenente β -mercaptoetanolo e questi sono stati quindi riscaldati a 100°C per 5 min. Le corse elettroforetiche sono state effettuate in gel di poliacrilamide-SDS e il trasferimento delle proteine è stato effettuato su membrane di nitrocellulosa Hybond-C Extra membranes (Amersham). Dopo aver saturato le membrane, l'incubazione con gli anticorpi primari è stata effettuata *overnight* a 4°C e gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano sono incubati per 1 ora a temperatura ambiente. Lo sviluppo delle bande proteiche è stato effettuato tramite chemiluminescenza usando il substrato fornito da Millipore secondo le istruzioni del prodotto. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti TRAP1 (sc-13557) e Cyp-D (AP1035) (Calbiochem); anticorpo anti IgG di topo (Thermofisher); anti COXII (12C4F12) (MitoSciences); Total OXPHOS Human Antibody Cocktail, MS601); anticorpo monoclonale anti Complesso I (MitoSciences).

Misurazione dei ROS con Diclorofluoresceina

I livelli di ROS nelle cellule o su mitocondri isolati sono stati misurati utilizzando la Diclorofluoresceina (DCF), un composto sensibile alle specie reattive ossidanti che sviluppa fluorescenza in seguito alla loro interazione. Le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 20.000 cellule/pozzetto e dopo 24 ore l'esperimento è stato fatto partire cambiando il terreno con MEM privo di siero, ma addizionato di DCF 1µM, glutammina 2mM (Sigma), MEM not essential amino acids (Sigma), penicillina 100 unità/ml, streptomicina 100 µg/ml (Invitrogen), con incubazione in atmosfera umidificata a 37°C con il 5% di CO₂ per il periodo di tempo indicato. Le letture sono state effettuate a fine esperimento o a intervalli regolari (nel caso delle cinetiche) su fluorimetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.). Per misurare i livelli di ROS su mitocondri isolati da fegato di topo come descritto precedentemente, 200µg di mitocondri/pozzetto sono stati risospesi in 200µl di buffer isotonicamente contenente 1µM DCF, 130mM KCl, 1mM Pi-Tris, 10mM Tris/MOPS, 100µM EGTA/Tris a pH 7,4, addizionato con Glutammato 5mM più Malato 2,5mM oppure Succinato 5mM più Rotenone 1µM, in base all'esperimento. Le letture di fluorescenza sono state effettuate mediante fluorimetria ad un'ora dall'inizio dell'esperimento.

Immunoprecipitazione

I mitocondri isolati sono stati lisati e quantificati come descritto nella sezione precedente. Per ogni immuno-precipitazione (IP), le proteine dei vari campioni (1µg) sono state pre-chiarificate incubandole per 1 ora a 4°C con proteina A- Sepharose (Sigma). Parallelamente, 1µg di anticorpo monoclonale anti-SERPINB3 (Santa Cruz) è stato pre-coniugato alle biglie di proteina A-Sepharose. Per immuno-precipitare il Complessi-I è stato utilizzato il kit commerciale "mouse monoclonal anti Complex I immunocapture antibody" (Mitosciences). Ogni IP è stata effettuata in un volume finale di 1ml, in continua agitazione *overnight* a 4°C. I controlli negativi sono stati effettuati utilizzando biglie coniugate con anticorpo IgG anti-mouse.

Misurazione dell'attività del Complesso I della catena respiratoria *in vitro*

Per misurare l'attività del Complesso I della catena respiratoria nei mitocondri delle linee

cellulari, le cellule sono state raccolte al 50-60% di confluenza, mentre i mitocondri derivati da fegato di topo sono stati isolati come descritto precedentemente. Dopo quantificazione proteica, 50µg di proteine per traccia sono incubate a 37°C in un buffer contenente 25mM K-Pi pH 7.4, 3mg/ml BSA, 500µM sodio azide, 5µM Alameicina, 1µM Antimicina, 6,5µM Coenzima Q1 (CoQ1) e in alcuni campioni Rotenone 1 µM. La attività della reazione, iniziata dall'aggiunta del NADH, è stata effettuata mediante spettrofotometria alla lunghezza d'onda di 340nm, registrando il consumo del NADH da parte di tutte le NADH deidrogenasi presenti nel campione. Successivamente la misurazione è stata ripetuta su un'aliquota dello stesso campione in presenza di Rotenone (inibitore specifico del C-I) per valutare il consumo di NADH da parte delle altre NADH deidrogenasi. E' stata quindi calcolata la quota di consumo di NADH Rotenone-sensibile che corrisponde all'attività del C-I. La misurazione dell'attività del C-I è stata normalizzata per l'attività della Citrato Sintasi, valutata mediante la formazione di Citrato, quantificato come incremento di assorbanza a 420nm a 37°C in buffer di reazione composto da 100mM Tris-HCl pH 8.0, 100µM DTNB, 300µM Acetil -CoA, 500µM Ossalacetato in un volume finale di 1ml.

Misurazione del consumo di Ossigeno *in situ*

Il consumo di ossigeno cellulare è stato misurato su monostrato adeso di cellule a confluenza usando l'XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences). Le cellule, 80.000 per pozzetto, sono state seminate 24 ore prima dell'esperimento con terreno di coltura standard. Un'ora prima dell'esperimento le cellule sono state incubate a 37°C in 5% CO₂ e il terreno è stato sostituito con DMEM senza FBS, contenente 25mM glucosio, 2mM glutammina e 1mM sodio piruvato. Il saggio di misura è stato condotto secondo i protocolli indicati (Seahorse Biosciences).

Misurazione della Capacità di Ritenzione del Calcio (CRC) da parte dei mitocondri

La Capacità di Ritenzione del Calcio è utilizzata per testare la sensibilità di apertura dell'mPTP dopo aggiunte sequenziali e discrete di *pulses* di Ca²⁺ e si basa sul fatto che l'accumulo di Ca²⁺ (*overload*) nella matrice funge da fattore induttore l'mPTP. Nel caso l'mPTP sia sensibilizzato da qualche altro fattore all'apertura, sarà necessario solo un piccolo accumulo di Ca²⁺ nella matrice per innescare l'apertura dell'mPTP rispetto alla

quantità di Ca^{2+} necessaria per farlo aprire in condizioni standard. Ne consegue che, più i mitocondri in una determinata condizione sono in grado di accumulare Ca^{2+} , meno è probabile che l'mPTP si apra e inneschi il processo di morte cellulare.

In questo saggio il Ca^{2+} extramitocondriale è stato monitorato a 25°C attraverso l'utilizzo del Calcium Green-5N (1 μM ; Molecular Probes): questo composto è sensibile al Ca^{2+} , diventa fluorescente quando lo lega (λ ecc: 505nm; λ emiss: 535nm) e non è permeabile nei mitocondri. È stato possibile quindi monitorare l'*uptake* di Ca^{2+} da parte dei mitocondri come diminuzione della fluorescenza emessa dal Calcium Green-5N a 535nm attraverso lo strumento Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.). Il buffer CRC utilizzato era composto da 130mM KCl, 1mM Pi-Tris, 10mM Tris/MOPS, 100 μM EGTA/Tris a pH 7,4. Il saggio di CRC è stato effettuato su cellule permeabilizzate con digitonina, un detergente non ionico, che è altamente selettivo per le membrane arricchite in colesterolo e non danneggia le membrane mitocondriali. Le cellule sono state staccate e lavate due volte nel buffer CRC e poi permeabilizzate con digitonina 150mM per 15min a 4°C nel buffer CRC modificato (1mM EGTA/Tris). La digitonina in eccesso è stata rimossa mediante due lavaggi in buffer CRC e le cellule sono state contaminate prima di essere seminate su piastre da 96 pozzetti. Sono stati seminati 2 milioni di cellule per pozzetto in 200 μl di buffer CRC con 5mM Glutammato, 2.5mM Malato e 1 μM Calcium Green-5N. La piastra è stata introdotta nel Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.) per la lettura della fluorescenza in continuo e le aggiunte sequenziali di Ca^{2+} . Al termine dell'esperimento è stata calcolata la quantità di Ca^{2+} accumulata da ogni campione prima dell'apertura dell'mPTP (visualizzata come incremento di fluorescenza/ Calcium Green-5N). I campioni sono stati infine normalizzati per la quantità di Ca^{2+} immagazzinato dai mitocondri delle cellule in condizioni di coltura standard prima dell'apertura dell'mPTP.

Risultati

1. Modelli sperimentali

Per studiare il ruolo di SERPINB3 nella morte cellulare è stato utilizzato un modello *in vitro* derivato da cellule di epatoma (HepG2) e un modello murino di topi C57BL/6 transgenici per il gene umano SERPINB3, precedentemente caratterizzati (Quarta S. *et al.* 2010 e Villano G. *et al.* 2010). Le cellule HepG2 non esprimono livelli dosabili di SERPINB3 e sono state trasfettate con un vettore di espressione vuoto (pcDNA3.1) o con un vettore contenente il gene di SERPINB3 in modo da creare un modello esprimente la proteina di interesse ed il relativo controllo. Il modello di topo transgenico è stato utilizzato come supporto della parte mitocondriale dello studio: da topi di controllo e transgenici per SERPINB3 sono stati isolati i mitocondri derivati dal fegato e utilizzati come conferma dei risultati ottenuti negli esperimenti *in vitro*.

2. SERPINB3 e morte cellulare

In letteratura SERPINB3 è riportata come proteina antiapoptotica in numerosi sistemi cellulari (Suminami *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2005; Katagiri *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2009) anche se in alcuni studi (Ullman *et al.*, 2011) viene differenziata in azione anti- e pro-apoptotica, a seconda dei casi. I modelli utilizzati in questi lavori non utilizzano cellule ottenute da tessuto epatico, quindi si è reso necessario utilizzare un sistema cellulare derivante da epatociti per capire l'attività di SERPINB3 nei confronti della morte cellulare in questo contesto. Per l'induzione della morte in questo sistema è stato utilizzato un pannello di quattro chemioterapici con azione nucleare sulla replicazione cellulare, ma con differenti meccanismi d'azione: Cisplatino, Doxorubicina, Etoposide e 5-FluoroUracile.

2.1 Trattamenti chemioterapici

Per i trattamenti chemioterapici in grado di indurre morte cellulare nella linea HepG2 sono state utilizzate concentrazioni e tempistiche diverse per i singoli composti, come descritto in letteratura. Per quanto riguarda il Cisplatino e la Doxorubicina il periodo di trattamento prima del test MTS è stato di 24 ore, mentre per Etoposide e 5-FU è stato di 48 ore. In Fig. 11 sono riportati i risultati della vitalità cellulare ottenuti dopo i vari trattamenti: i valori sono stati normalizzati ed espressi come rapporto sul controllo sperimentale non trattato che rappresenta la situazione in cui tutte le cellule sono vitali.

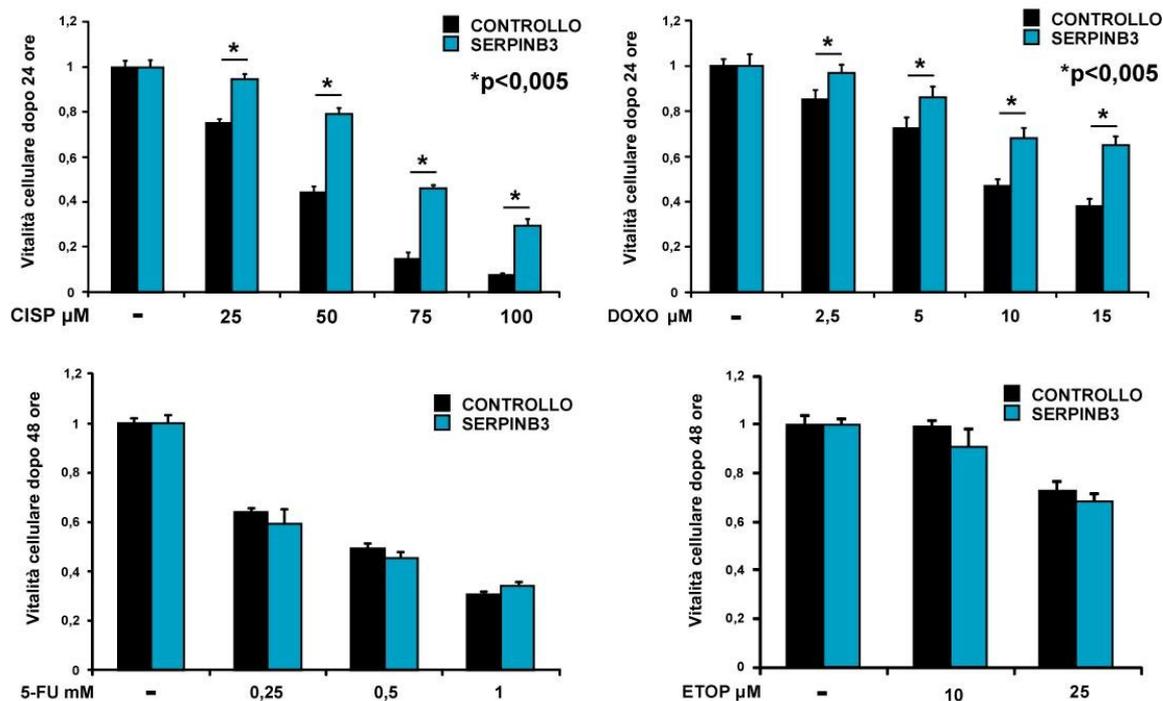


Figura 11. Saggio di vitalità cellulare MTS: le cellule sono state seminate su piastre da 96 pozzetti e successivamente depletate di FBS per 24 ore. I trattamenti sono stati effettuati in presenza di FBS 10%; quelli con Cisplatino e Doxorubicina hanno durata di 24 ore mentre quelli con 5-FU ed Etoposide di 48. Alla fine del trattamento il terreno è stato sostituito con una soluzione di HBSS contenente MTS e dopo un'ora le piastre sono state lette a 540nm. I grafici in figura sono rappresentativi dei valori medi \pm DS ottenuti in 3 o 4 esperimenti separati effettuati in sestuplicato.

Dall'analisi dei risultati emerge che le cellule esprimenti SERPINB3 presentano una maggior vitalità dopo trattamento con Cisplatino e Doxorubicina rispetto alle cellule di controllo, mentre non ci sono differenze se la morte viene indotta con Etoposide o 5-FU. Nel trattamento con il Cisplatino la differenza è significativa in tutte le concentrazioni, ma è più evidente alla concentrazione di Cisplatino di 50 μ M (incremento vitalità: 35%). Analoghi risultati sono stati ottenuti con la Doxorubicina, anche se la percentuale in termini di differenza di vitalità tra le due linee cellulari è risultata lievemente inferiore (25% alla concentrazione di 15 μ M).

SERPINB3 è in grado di proteggere dalla morte cellulare, ma la protezione conferita risulta essere stimolo-dipendente. I meccanismi d'azione dei quattro chemioterapici sono caratteristici di ogni composto, ma presentano azioni parzialmente sovrapposte. Il Cisplatino presenta un meccanismo d'azione principale che è il danno al doppio filamento attraverso la formazione di addotti con il DNA e uno secondario che è l'effetto di stress ossidativo mitocondriale (vedi Introduzione). La Doxorubicina presenta due meccanismi d'azione principali: l'inibizione della Topoisomerasi II e gli addotti con il DNA, oltre ad

uno secondario che anche in questo caso è rappresentato da stress ossidativo mitocondriale. L'inibizione della Topoisomerasi II è comune anche all'Etoposide e i risultati dimostrano che SERPINB3 non protegge dalla morte indotta dall'inibizione di questo enzima. Il danno e la deficienza alla replicazione del DNA causato dal 5-FU inducono la morte anche nelle cellule esprimenti SERPINB3 facendo ipotizzare che SERPINB3 non sia in grado di proteggere le cellule da un danno alla replicazione del DNA. Il danno al DNA, seppur diverso nei meccanismi, è presente anche nei trattamenti con Cisplatino e Doxorubicina, ma questi due chemioterapici inducono anche stress ossidativo a livello mitocondriale che è in grado di far aprire l'mPTP e indurre la morte cellulare in diverse linee cellulari (Chirino Y.I. and Pedraza-Chaverri J., 2009; Octavia Y. *et al.*, 2012).

Considerando che la protezione dal danno nucleare sembra non essere il meccanismo molecolare attraverso il quale SERPINB3 riesce a proteggere dalla morte cellulare, si può ipotizzare che la protezione sia conferita a livello mitocondriale, dato che Cisplatino e Doxorubicina agiscono sensibilizzando l'mPTP all'apertura.

Risulta pertanto importante chiarire la localizzazione di SERPINB3: in letteratura è descritta come una proteina citosolica e/o secreta, ma non è mai stata indagata una possibile sua localizzazione a livello mitocondriale. Ulteriore punto di interesse è costituito dalla valutazione del possibile coinvolgimento di SERPINB3 nella modulazione della morte cellulare indotta da stress ossidativo.

Per rispondere a queste domande è stato utilizzato il Cisplatino come stimolo per caratterizzare il sistema, dato che la sua attività a livello mitocondriale e il suo rapporto con l'mPTP in letteratura è stato descritto in modo più approfondito.

2.2 Localizzazione sub-cellulare di SERPINB3

Per documentare la possibile localizzazione mitocondriale di SERPINB3, cellule esprimenti e non SERPINB3 sono state frazionate in condizioni di coltura standard e dopo un trattamento di 18 ore con Cisplatino 50 μ M. Per ottenere i mitocondri completamente purificati, i campioni sono stati digeriti con tripsina al fine di eliminare i contaminanti. Nel pannello di sinistra della Fig. 12, che rappresenta la frazione mitocondriale non digerita con tripsina, è possibile riscontrare la presenza di SERPINB3. Dopo la digestione della stessa preparazione mitocondriale (pannello a destra) si conferma la localizzazione mitocondriale di SERPINB3: le proteine del reticolo

(CALNESSINA usata come marker reticolare) e citosoliche/associate alla membrana esterna mitocondriale come Bax sono state degradate dalla tripsina, mentre i mitocondri integri, confermati dalla presenza della proteina mitocondriale TRAP1, risultano ancora positivi per SERPINB3.

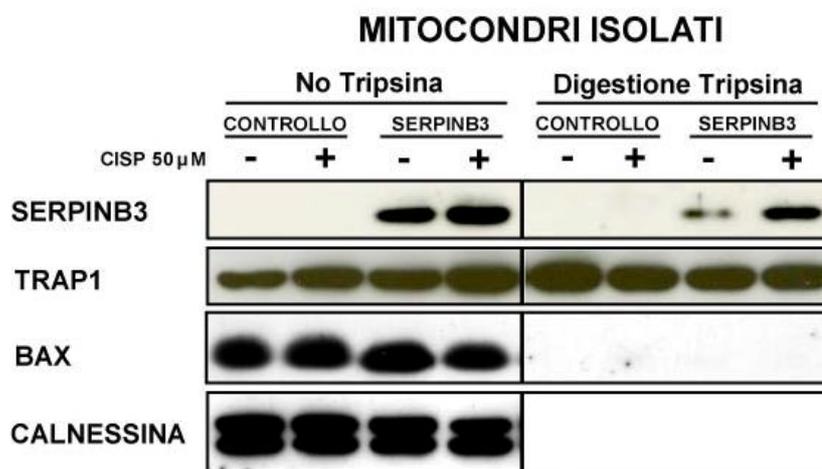


Figura 12. Frazionamento sub-cellulare: analisi della frazione mitocondriale: le cellule sono state trattate con Cisplatino 50 μ M e i mitocondri isolati come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Una parte dei mitocondri ottenuti è stata digerita con tripsina per eliminare i contaminanti extramitocondriali ed infine aliquote di 50 μ g sono state caricate su SDS-PAGE. Il Western Blot in figura è rappresentativo dei risultati ottenuti con 3 preparazioni mitocondriali diverse.

È possibile notare come le bande corrispondenti a SERPINB3 si riducano di intensità dopo digestione con tripsina. Questo risultato era atteso in quanto il trattamento ha eliminato la frazione citosolica di SERPINB3. È inoltre interessante notare come la frazione presente all'interno del mitocondrio aumenta dopo trattamento con Cisplatino, rispetto alla condizione basale, suggerendo che il reclutamento di SERPINB3 potrebbe avere un ruolo nella risposta al danno indotto dal Cisplatino e che lo stesso reclutamento mitocondriale è un processo dinamico che avviene in risposta a stimoli.

2.3 SERPINB3 e stress ossidativo

Per verificare se lo stress ossidativo mitocondriale indotto dal Cisplatino è un meccanismo di danno che favorisce la morte in questo sistema, è stata utilizzata l'N-AcetilCisteina (NAC) in associazione al trattamento. NAC è composto ad azione antiossidante indiretta, in particolare favorisce il ripristino del glutathione ridotto, uno dei meccanismi antiossidanti fondamentali anche a livello mitocondriale. Le cellule sono state trattate per 24 ore con 50 μ M di Cisplatino e con 500 μ M di NAC e poi analizzate al citofluorimetro come descritto in Materiali e Metodi. Nella Fig. 13 è riportata l'analisi

ottenuta dei campioni trattati con il Cisplatino e NAC.

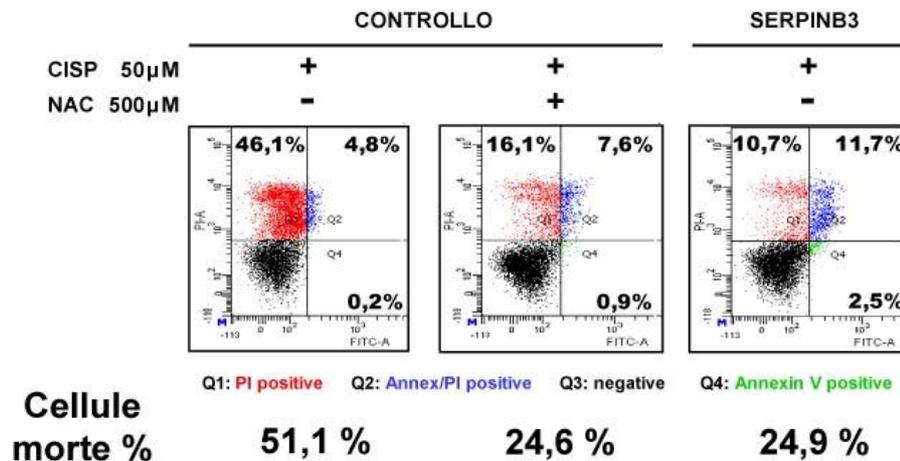


Figura 13. Analisi al citofluorimetro della morte cellulare: dopo trattamento con Cisplatino e NAC preceduto da sincronizzazione con deplezione di FBS, le cellule sono state colorate con Propidio Ioduro e Annessina V-FITC per analizzare la morte cellulare. Le percentuali indicate nei vari pannelli rappresentano, partendo dal riquadro in alto a sinistra in senso orario, le cellule positive per il Propidio Ioduro (PI), le cellule positive per il PI e per l'Annessina V-FITC e le cellule positive solo per l'Annessina V-FITC. Le cellule positive per la colorazione al PI rappresentano le cellule morte, le cellule colorate in FITC con l'Annessina V rappresentano cellule in cui è stato irreversibilmente innescato il processo apoptotico. I risultati riportati in questi pannelli sono rappresentativi di 4 esperimenti separati condotti in duplicato.

Il trattamento con NAC diminuisce la morte cellulare nelle cellule di controllo di circa un 30%, stessa percentuale di protezione ottenuta nelle cellule che esprimono SERPINB3. Questi esperimenti confermano la minor sensibilità alla morte delle cellule esprimenti SERPINB3 e, se associati al fatto che SERPINB3 è presente nel mitocondrio, mettono in evidenza la possibilità che questa proteina possa giocare un ruolo nella protezione dallo stress ossidativo mitocondriale.

Il Cisplatino 50µM presenta un picco di produzione di ROS a livello mitocondriale nelle prime ore dall'inizio del trattamento nella linea cellulare HepG2. Per questo motivo sono stati misurati i ROS prodotti nelle prime 6 ore dal trattamento alle concentrazioni di 25 e 50µM di Cisplatino in presenza o meno di NAC 500µM. Nella Fig. 14 è rappresentata la fluorescenza emessa da Diclorofluoresceina (DCF) che è proporzionale alla quantità di ROS prodotti nello stesso arco di tempo.

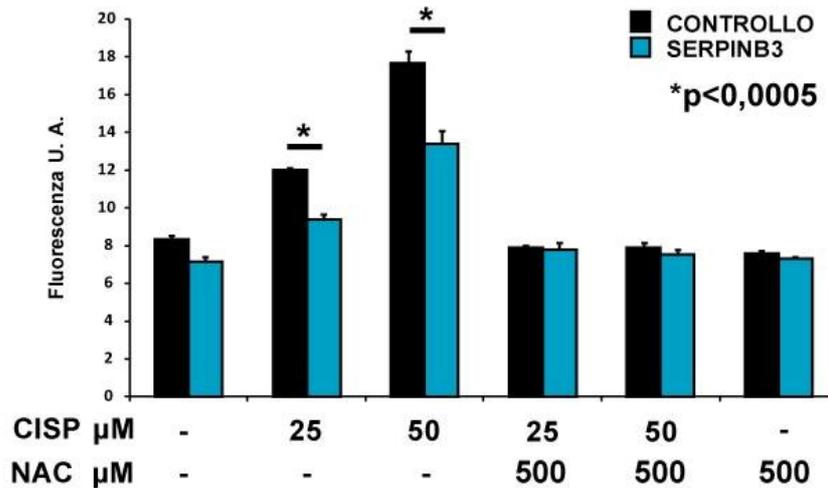


Figura 14. Misurazione dei livelli di ROS con DCF: durante il trattamento con Cisplatino e NAC preceduto da sincronizzazione con deplezione di FBS, le cellule sono state incubate con DCF in assenza di FBS per 6h. La fluorescenza è stata registrata con Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.) ed espressa in unità arbitrarie (20'000 cellule/pozzetto). Il grafico è rappresentativo di 3 esperimenti separati.

Dopo trattamento con Cisplatino, sia a concentrazione di 25 μM che di 50 μM i livelli di ROS sono risultati più alti rispetto alle cellule non trattate. Nelle cellule esprimenti SERPINB3 i livelli di ROS sono risultati significativamente più bassi rispetto ai livelli delle cellule di controllo ad entrambe le concentrazioni di Cisplatino. La NAC, come atteso, ha mantenuto a livelli basali i ROS anche dopo trattamento.

Questo esperimento conferma che SERPINB3 è in grado di ridurre lo stress ossidativo innescato dal Cisplatino.

3. SERPINB3 e mitocondrio

Alla luce di questi nuovi dati sull'azione di SERPINB3, è stato approfondito il meccanismo molecolare implicato nella riduzione dello stress ossidativo e della resistenza alla morte cellulare indotta da Cisplatino.

E' stato pertanto utilizzato il composto EM20-25, appartenente alla famiglia dei BH3-mimetici, che sono composti in grado di spiazzare l'interazione tra BCL-2 e Bax innescando così la morte cellulare direttamente agendo sul mitocondrio. Questo composto è stato caratterizzato anch'esso come induttore dell'mPTP (Milanesi E. *et al.*, 2006) e agisce rapidamente inducendo la morte cellulare entro 3 ore dal trattamento. Nella Fig. 15 è riportata l'analisi al citofluorimetro del trattamento con EM20-25 in presenza o meno di NAC effettuato sulle cellule esprimenti o meno SERPINB3.

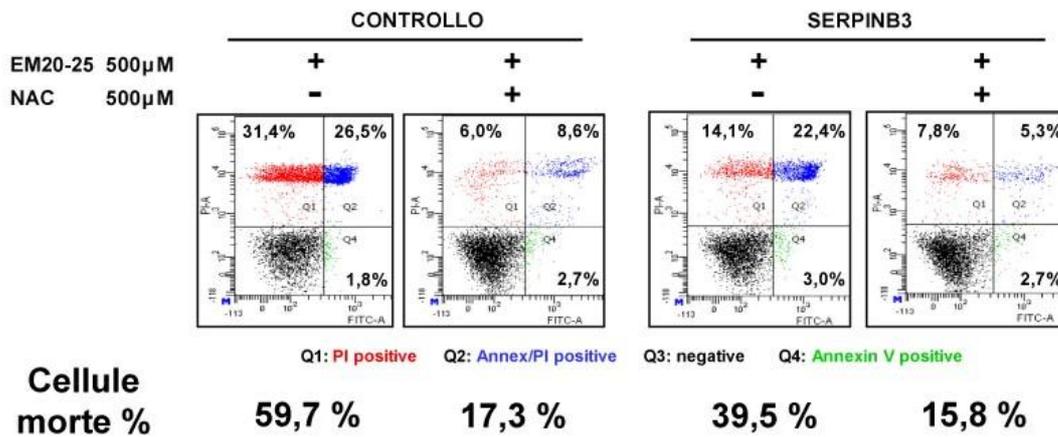


Figura 15. Analisi al citofluorimetro della morte cellulare: dopo trattamento con EM20-25 e NAC in terreno senza FBS le cellule sono state processate e analizzate come descritto in Fig. 13 per analizzare la morte cellulare. Questi pannelli sono rappresentativi di 3 esperimenti separati condotti ognuno in duplicato o triplicato.

SERPINB3 è risultata protettiva dalla morte cellulare indotta dall'innesco dell'mPTP da parte di EM20-25 (sopravvivenza circa 60%). Il trattamento con NAC è risultato protettivo con sopravvivenza quasi completa delle cellule, indicando che il danno indotto dall'EM20-25 è totalmente stress ossidativo mediato. Da questi esperimenti possiamo concludere che SERPINB3 protegge le cellule dalla morte indotta a livello mitocondriale a conferma del suo effetto protettivo nei confronti di questo organello. L'altra informazione nuova che emerge da questo esperimento è che il danno innescato dall'EM20-25 è dato da un aumentato stress ossidativo mitocondriale, cosa che finora non era ancora stata dimostrata. Considerando il lavoro di Milanesi E. *et al.* (2006) in cui si lega l'azione dell'EM20-25 all'induzione dell'mPTP, è possibile ipotizzare che siano direttamente i ROS a favorire l'apertura dell'mPTP e quindi l'innesco della morte cellulare.

3.1 SERPINB3 e stress ossidativo mitocondriale

La misura dei livelli di ROS durante il trattamento con EM20-25 in entrambe le linee cellulari diventa quindi fondamentale per confermare che anche in questo caso SERPINB3 favorisce la riduzione dello stress ossidativo. Nella Fig. 16 è rappresentata l'intensità di fluorescenza della DCF monitorata fino a due ore dopo l'inizio del trattamento con EM20-25.

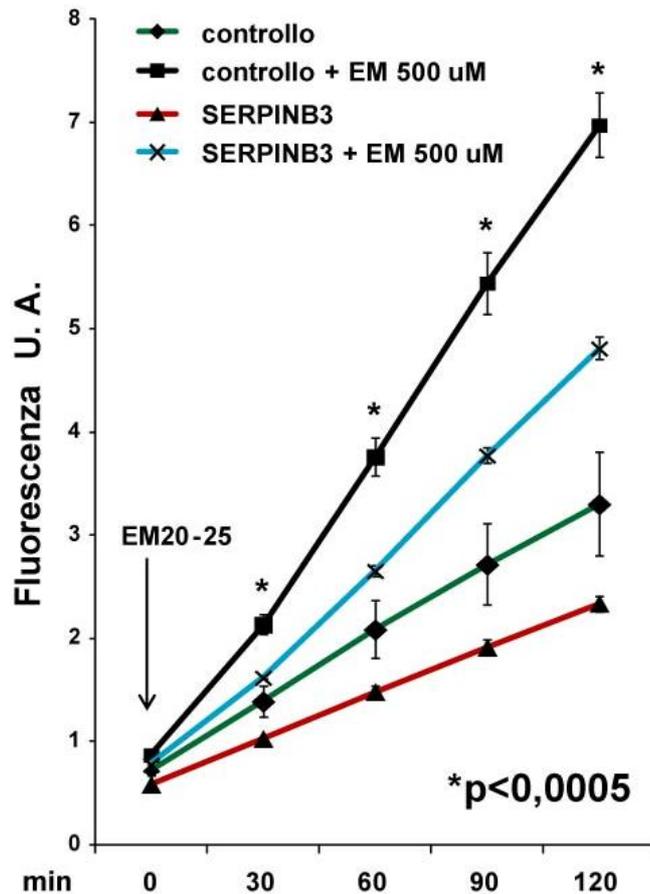


Figura 16. Misura dei livelli di ROS con DCF: le cellule seminate su piastra da 96 pozzetti sono state incubate con o senza EM20-25 per 2 ore in presenza di DCF in terreno senza FBS. La fluorescenza emessa da DCF è stata registrata con Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.) ed è espressa in unità arbitrarie a parità di cellule (20'000 cellule/pozzetto). Il grafico è rappresentativo di 3 esperimenti separati.

L'analisi cinetica ci permette di apprezzare come l'EM20-25 induca un precoce (dopo 30min) innalzamento dei livelli di ROS nelle due linee cellulari, ma nelle cellule esprimenti SERPINB3 questo incremento è significativamente minore rispetto alle cellule di controllo e la differenza diventa ancora più evidente nei punti sperimentali successivi (60-90-120min). Questo risultato conferma l'azione di SERPINB3 come meccanismo di controllo dello stress ossidativo mitocondriale.

3.2 Modello animale

Per confermare ulteriormente l'azione di SERPINB3 a livello mitocondriale, sono stati utilizzati topi transgenici per SERPINB3 che la esprimono anche a livello epatico. I topi sono stati sacrificati per l'espanto dei fegati da cui sono stati estratti i mitocondri e dopo purificazione con tripsina, sono stati caricati su gel per l'analisi mediante WB (Fig. 17).

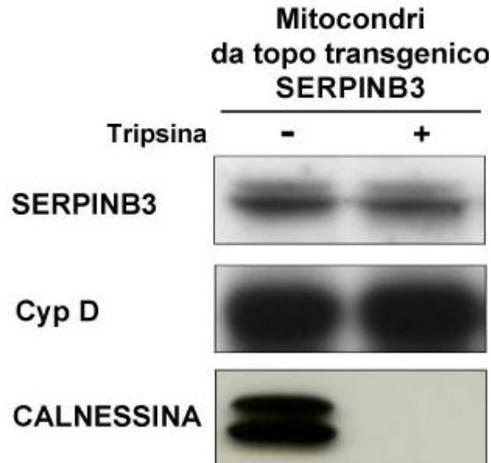


Figura 17. Isolamento dei mitocondri da fegato di topo transgenico per SERPINB3 e analisi WB: i mitocondri sono stati isolati da fegato come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Una parte dei mitocondri ottenuti è stata digerita con tripsina per eliminare i contaminanti extramitocondriali ed infine aliquote di 50µg di mitocondri sono state caricate su SDS-PAGE per analisi WB. La figura è rappresentativa di 3 preparazioni mitocondriali diverse.

Come si può osservare, una frazione di SERPINB3 è presente nei mitocondri anche dopo purificazione con tripsina confermando il fatto che SERPINB3 ha la possibilità di essere indirizzata al mitocondrio nonostante si trovi in un sistema esogeno. La conferma della localizzazione mitocondriale deriva dal fatto che sono stati digeriti dalla tripsina i contaminanti extramitocondriali come la CALNESSINA mentre proteine localizzate nel mitocondrio come Cyp D non vengono degradate al pari di SERPINB3. In questo caso nel WB compaiono due bande riconosciute dall'anticorpo anti-SERPINB3 e la seconda banda potrebbe essere spiegata con modificazioni post-traduzionali della proteina di partenza. Questo aspetto non è stato approfondito in quanto non rientra negli scopi di questo progetto.

La fase successiva è stata quella di verificare se SERPINB3 presenta la stessa inibizione nei confronti della produzione di ROS nel modello animale. Per questo motivo i mitocondri isolati dai fegati di topi *wild-type* e transgenici per SERPINB3 sono stati incubati con EM20-25, NAC e DCF, come descritto in Fig. 18.

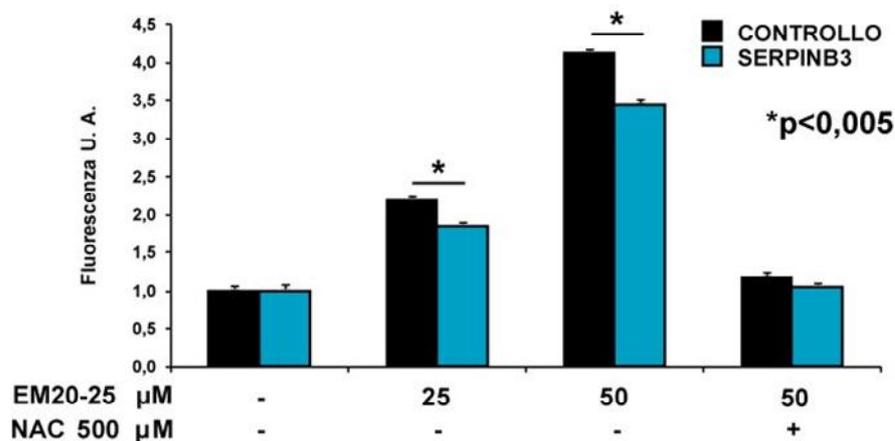


Figura 18. Misura dei livelli di ROS con DCF su mitocondri isolati di topo: i mitocondri sono stati isolati da fegato come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I mitocondri sono stati trattati su piastra da 96 pozzetti (200 μg /pozzetto) con EM20-25 e NAC come indicato in figura. La fluorescenza emessa da DCF è stata registrata con Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.) ed è espressa in unità arbitrarie a parità di quantità di mitocondri. Il grafico è rappresentativo di 3 esperimenti separati condotti in triplicato.

L'esperimento è stato bloccato dopo un'ora dall'inizio del trattamento e, come si vede nella figura, EM20-25 aumenta i livelli di ROS sia nei fegati dei topi transgenici per SERPINB3 che nei controlli e come atteso la NAC riduce a livelli basali i ROS. Anche in questo contesto esogeno SERPINB3 mantiene la sua azione di riduzione dello stress ossidativo. Questo esperimento condotto su mitocondri isolati conferma ulteriormente che l'azione antiossidante di SERPINB3 è esercitata a livello mitocondriale.

4. Meccanismo molecolare di SERPINB3

4.1 Interazione con il Complesso I

La caratterizzazione del meccanismo molecolare attraverso il quale SERPINB3 porta alla riduzione dello stress ossidativo mitocondriale potrebbe diventare importante per comprendere come questa molecola possa contribuire alla resistenza ai trattamenti chemioterapici descritti nei primi esperimenti di questo progetto.

Nei mitocondri il sito di elezione come sorgente di ROS è il Complesso I della Catena Respiratoria mitocondriale. Partendo dal presupposto che il Cisplatino va ad interferire con la trascrizione del genoma mitocondriale (Podratz J.L. *et al.*, 2011) causando una disfunzione al C-I con probabile produzione di ROS, è stato ipotizzato che SERPINB3 mitocondriale possa interagire con il C-I. Per verificare questa ipotesi sono state effettuate immunoprecipitazioni da mitocondri isolati sia da linee cellulari che da fegati di topo

(Fig. 19) e successivamente analizzate mediante WB.

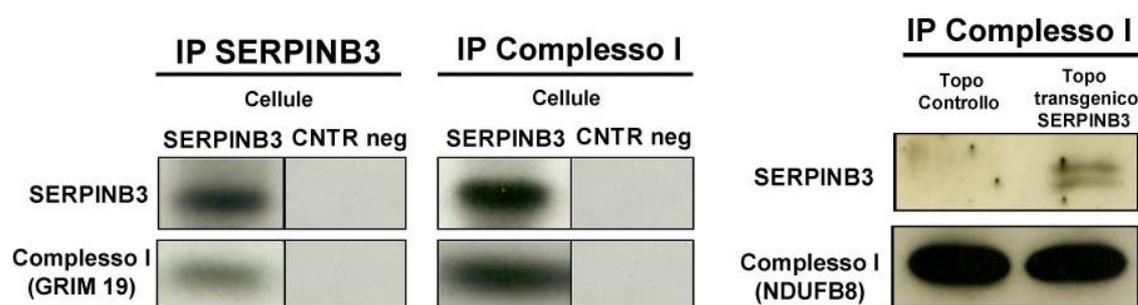


Figura 19. Immunoprecipitazione e analisi WB dopo isolamento dei mitocondri da linee cellulari e da fegato di topo: i mitocondri sono stati isolati e gli immunoprecipitati sono stati denaturati con Laemmli buffer a 100°C per 5 min essere successivamente caricati su SDS-PAGE per analisi WB. Il WB in figura è rappresentativo di 3 immunoprecipitazioni diverse da 3 campioni diversi.

Immunoprecipitando SERPINB3 da mitocondri isolati da linee cellulari esperimenti stabilmente SERPINB3 è stata ottenuta una prima indicazione sul fatto che essa possa interagire con il C-I. Nel primo pannello da sinistra vediamo che co-immunoprecipita con SERPINB3 la subunità del C-I denominata Grim 19. Invertendo l'approccio e immunoprecipitando il C-I grazie ad un pool di anticorpi specifici, la frazione immunoprecipitata risulta positiva per SERPINB3 (pannello centrale). La conferma definitiva dell'interazione tra la proteina in esame e il C-I è stata ottenuta utilizzando mitocondri di fegato di topi transgenici: dopo aver immunoprecipitato il C-I, SERPINB3 risulta come proteina che co-immunoprecipita. Anche in questo caso è possibile osservare come le bande riconosciute dall'anticorpo siano due, suggerendo che l'eventuale modificazione post-traduzionale che avviene nei topi non sia fondamentale per l'interazione con questo complesso.

4.2 Modulazione attività Complesso I

Il successivamente si è andati a valutare se l'interazione fisica possa risultare anche in una regolazione funzionale del Complesso I. È stata pertanto misurata l'attività del C-I utilizzando un saggio *in vitro* specifico e i risultati dei saggi per l'attività del C-I effettuati su cellule o su mitocondri provenienti dai topi *wild-type* e transgenici (dettagli in Materiali e Metodi) sono rappresentati in Fig. 20 dove è riportata l'attività massima del C-I.

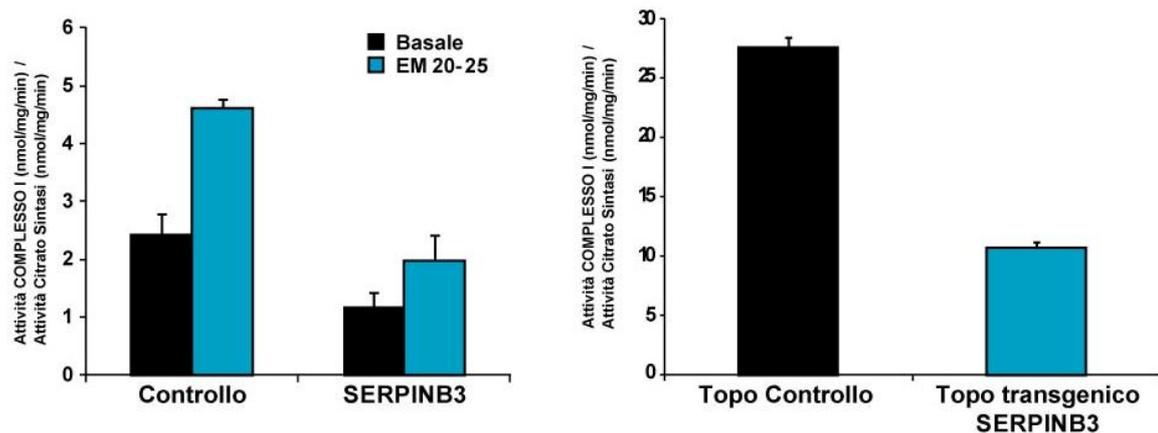


Figura 20. Misura dell'attività del Complesso I della catena respiratoria: i mitocondri sono stati isolati da fegato come descritto nella sezione Materiali e Metodi. L'attività del C-I è stata misurata allo spettrofotometro come consumo di NADH ed è rappresentata nei grafici la quota Rotenone sensibile del consumo di NADH normalizzata per l'attività dell'enzima Citrato Sintetasi. E' stata anche effettuata una incubazione con EM20-25 per verificare se questo composto possa influenzarne l'attività. Ogni barra è il risultato della media di 3 o 4 preparazioni separate fatte in giorni diversi.

L'attività del C-I nei mitocondri estratti da fegato e da cellule non trattate risulta essere differente in entrambi i casi; la presenza di SERPINB3 riduce significativamente l'attività massima del Complesso I *in vitro* in tutti e due i sistemi analizzati. Nelle cellule trattate con EM20-25 si registra un aumento dell'attività del C-I nelle linee cellulari esprimenti SERPINB3 e nei controlli, ma nelle cellule con SERPINB3 l'incremento nell'attività massima del C-I è minore e in termini assoluti raggiunge solo il livello basale delle cellule di controllo.

Questi risultati suggeriscono che la differenza nella regolazione dell'attività massima del Complesso I dovuta a SERPINB3 potrebbe avere un ruolo rilevante se interpretata nell'ottica di produzione di ROS da parte del Complesso I stesso.

4.3 Monitoraggio consumo di Ossigeno Complesso I-dipendente

L'attività massima del Complesso I, seppur molto indicativa, rimane sempre una condizione ottenuta *in vitro*. Per questo motivo è stato deciso di utilizzare anche un altro tipo di approccio per confermare e consolidare il dato osservato. E' stato pertanto valutato il consumo di ossigeno delle cellule di controllo ed esprimenti SERPINB3 al fine di capire se la diminuzione dell'attività del C-I si potesse riflettere anche in un minore consumo di ossigeno, dato che diminuendo l'apporto di elettroni da parte di uno dei complessi della catena respiratoria, generalmente diminuisce anche il consumo di ossigeno. In Fig. 21 è riportato il consumo di ossigeno delle cellule, l'Acido 3-NitroPropionico (inibitore specifico irreversibile del Complesso II della catena

respiratoria, 3-NPA) è stato utilizzato per inibire il C-II al fine di lasciare “acceso” solo il C-I come porta d’entrata degli elettroni nella catena respiratoria.

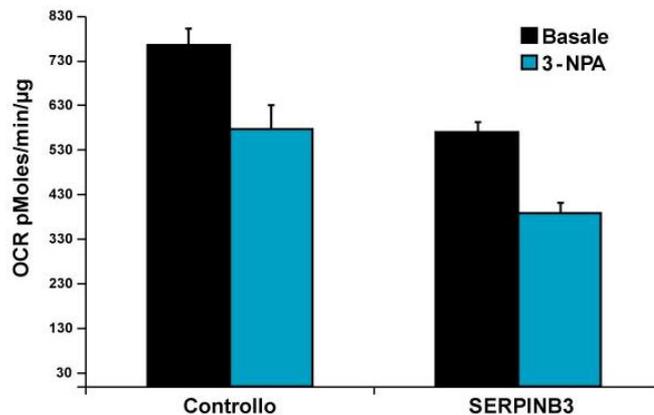


Figura 21. Misura del consumo di Ossigeno su cellule vitali: le cellule sono state piastrate in modo da raggiungere un monostrato uniforme al momento dell’esperimento; il consumo di ossigeno è stato misurato dallo strumento XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences) secondo le indicazioni del costruttore. Una parte delle cellule è stata pre-trattata per 90 min con 3-NPA. L’esperimento in figura è rappresentativo di 3 esperimenti separati condotti in quadruplicato.

Il consumo di ossigeno è risultato significativamente minore nelle cellule esprimenti SERPINB3, indicando una riduzione nell’attività della catena respiratoria. Il 3-NPA è stato utilizzato in quanto spegne irreversibilmente il C-II lasciando solo il C-I ad alimentare la catena respiratoria: in queste condizioni la respirazione in entrambe le linee cellulari risulta ridotta in media di circa 190 pMol/min/µg da cui possiamo dedurre che il C-II non è differentemente regolato dalla presenza di SERPINB3 e che la respirazione dovuta all’azione del Complesso I è invece realmente diminuita dalla presenza di SERPINB3. Con questo esperimento è stata ottenuta la conferma che anche in un sistema *in situ* dove le cellule sono vitali è presente una regolazione nell’attività del C-I da parte di SERPINB3.

5. SERPINB3: PROVE FUNZIONALI

Gli esperimenti condotti finora portano ad ipotizzare che una regolazione nell’attività del Complesso I della catena respiratoria da parte di SERPINB3 possa ridurre la morte cellulare abbassando i livelli di ROS mitocondriali. Questo presuppone che il Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale, che nelle cellule di controllo è innescato dallo stress ossidativo, è meno sensibilizzato all’apertura nelle cellule con SERPINB3. Un altro punto da approfondire e legare funzionalmente alla produzione di ROS è il

coinvolgimento del C-I in questo aumento di stress ossidativo dato che, finora, è stata dimostrata solo l'interazione con SERPINB3 che ne determina una sua minore attività.

5.1 Produzione di ROS mediata dal Complesso I

Per dimostrare che la produzione di ROS è C-I mediata sono stati utilizzati i mitocondri estratti dai fegati di topi *wild-type* e transgenici per SERPINB3 in quanto: a) dal punto di vista della produzione di ROS rispondono al trattamento con EM20-25 come il sistema cellulare HepG2; b) i mitocondri isolati possono essere messi nelle condizioni di far funzionare solo il C-I o solo il C-II per alimentare la catena respiratoria. Questo è possibile perché i mitocondri isolati possono essere incubati con substrati "indiretti" come il Glutammato più il Malato, in grado di alimentare il trasferimento degli elettroni da parte del C-I oppure con il Succinato che è il substrato diretto del C-II. Questo permette di poter misurare nelle due differenti condizioni la quantità di ROS prodotti dai mitocondri durante trattamento con EM20-25 il quale è stato dimostrato aumentare sia i livelli di ROS che l'attività del C-I *in vitro*. L'esperimento è stato disegnato per misurare i livelli di ROS con DCF: una parte dei mitocondri isolati da ogni fegato è stata incubata con i substrati del C-I e una parte con quelli del C-II; in entrambi i casi sono stati misurati i livelli di ROS ad un'ora dall'inizio del trattamento con EM20-25 e NAC come indicato in Fig. 22.

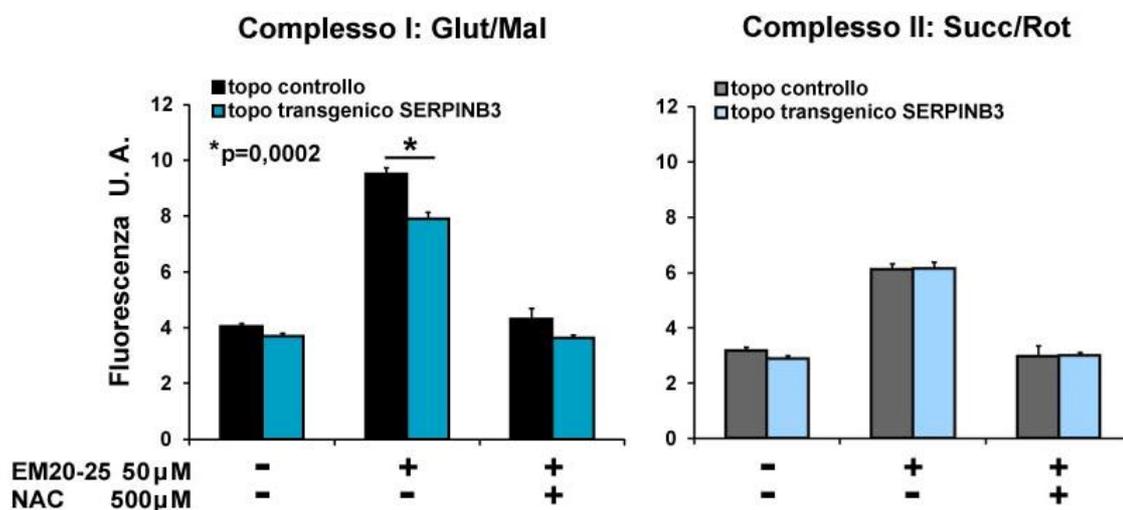


Figura 22. Misura dei livelli di ROS con DCF su mitocondri isolati: i mitocondri sono stati isolati da fegato come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I mitocondri sono stati trattati su piastra da 96 pozzetti (200µg/pozzetto) ed energizzati con substrati diversi: Glutammato/Malato per energizzare i mitocondri con il C-I della catena respiratoria e con Succinato per energizzarli con il C-II. I trattamenti con EM20-25 e NAC in presenza di DCF sono stati effettuati come indicato in figura per un'ora. La fluorescenza emessa da DCF è stata registrata con Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.) ed è espressa in unità arbitrarie a parità di quantità di mitocondri. Il grafico è rappresentativo di 3 esperimenti separati condotti in triplicato.

Nella parte sinistra della figura si può notare come il trattamento con EM20-25 in presenza del C-I funzionante produca un innalzamento dei livelli di ROS e come la presenza di SERPINB3 nei mitocondri ne riduca significativamente i livelli. Anche quando è il C-II ad alimentare la catena respiratoria vengono indotti ROS, ma in quantità inferiore e in questo contesto la presenza di SERPINB3 risulta essere ininfluente. Non è chiaro come EM20-25 agisca nei confronti del C-II, ma non è stato indagato ulteriormente dato che non rientra negli obiettivi di questa tesi. NAC, come precedentemente dimostrato, riduce lo stress ossidativo a livelli basali. Questi esperimenti confermano che il C-I è la maggiore fonte dello stress ossidativo mitocondriale e mettono in evidenza come la riduzione della sua attività da parte di SERPINB3 sia direttamente collegata alla minore produzione di ROS.

5.2 Il Poro di Transizione della Permeabilità mitocondriale e SERPINB3

Dal punto di vista tecnico è possibile misurare la soglia di apertura dell'mPTP sfruttando la capacità che hanno i mitocondri di accumulare Ca^{2+} nella matrice e il fatto che l'mPTP quando si apre libera lo stesso Ca^{2+} accumulato (per dettagli vedi Materiali e Metodi). In Fig. 23 sono rappresentati i saggi di Capacità di Ritenzione del Calcio (CRC) che sono stati condotti nelle cellule trattate con EM20-25, Cisplatino e NAC: le colonne rappresentano la quantità di Ca^{2+} accumulato dai mitocondri (CRC) nelle varie condizioni in rapporto alla quantità accumulata in condizioni standard (CRC_0) prima dell'apertura dell'mPTP che avviene per *overload* di Ca^{2+} . Il rapporto CRC/CRC_0 è indice della soglia di apertura dell'mPTP: più è basso più l'mPTP è pronò all'apertura e quindi ad innescare la morte cellulare, viceversa più è alto e più è alta la soglia di apertura dell'mPTP che determina una maggior sopravvivenza cellulare. Anche in questo saggio è possibile alimentare la catena respiratoria in maniera differenziale con i diversi substrati per cui, visto il ruolo primario del C-I, sono stati utilizzati Glutammato e Malato per mantenere la dipendenza della produzione di ROS da questo complesso.

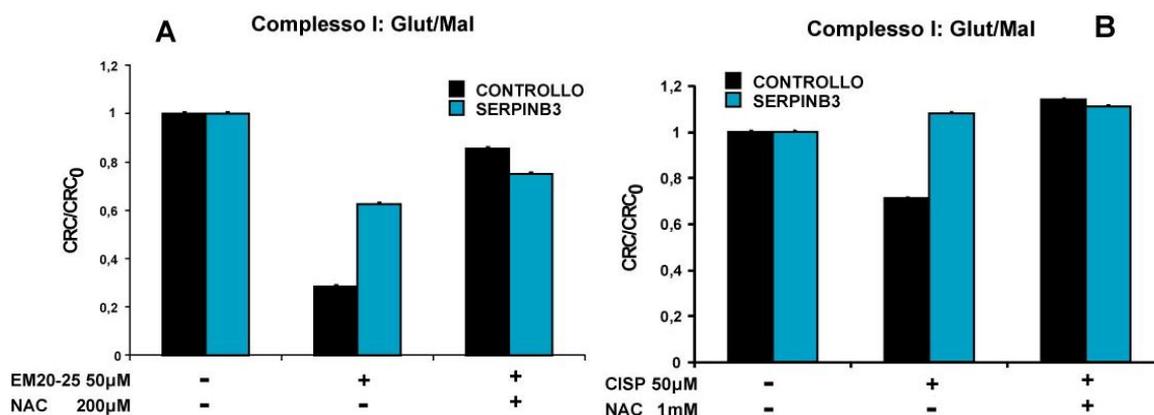


Figura 23. Misura della Capacità di Ritenzione del Calcio (CRC) su cellule permeabilizzate: le cellule dopo i trattamenti indicati in figura sono state permeabilizzate con digitonina (come descritto nella sezione Materiali e Metodi) al fine di permeabilizzare solo la membrana plasmatica per permettere ai substrati di raggiungere direttamente i mitocondri integri all'interno delle cellule. Due milioni di cellule/pozzetto sono state incubate a 25°C su piastra da 96 pozzetti ed energizzate con Glutammato/Malato con l'aggiunta di Ca²⁺ green come previsto nel protocollo descritto in Materiali e Metodi. La fluorescenza emessa da Ca²⁺ green è stata monitorata in continuo con Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corp.) durante tutte le sequenziali aggiunte di Ca²⁺ previste dal protocollo ed effettuate dallo strumento stesso. Essa è espressa come rapporto CRC/CRC₀ a parità di quantità di cellule per pozzetto. I grafici sono rappresentativi di 3 esperimenti separati condotti in triplicato.

Nel pannello A si vede chiaramente come le cellule di controllo trattate EM20-25 accumulano poco Ca²⁺ e di conseguenza sono molto più prone ad aprire l'mPTP e a morire rispetto alle cellule con SERPINB3. La presenza di NAC innalza la soglia di apertura dell'mPTP delle cellule di controllo mentre è ininfluenza sulla soglia di apertura delle cellule che esprimono SERPINB3. Lo stesso profilo CRC lo ritroviamo nelle cellule trattate per 18 ore con il Cisplatino (pannello B): solo le cellule di controllo sono sensibilizzate all'apertura dell'mPTP e anche in questo caso la presenza di NAC nel trattamento alza nuovamente la soglia di apertura solo nelle cellule di controllo.

Questi due esperimenti rappresentano una sintesi che comprende tutti gli elementi dimostrati in questo lavoro: a) la sensibilizzazione o meno dell'mPTP è dipendente dal C-I dato che i mitocondri sono energizzati da Glutammato/Malato; b) la NAC è in grado di innalzare la soglia di apertura dell'mPTP dopo i trattamenti indicando che la via di sensibilizzazione dell'mPTP all'apertura agisce attraverso la produzione di ROS; c) SERPINB3 protegge dalla morte cellulare innalzando la soglia di apertura dell'mPTP grazie alla minor produzione di ROS sia con Cisplatino che con EM20-25.

Discussione

Questo studio ha permesso di caratterizzare il meccanismo d'azione di SERPINB3 a livello mitocondriale introducendolo come elemento di novità nell'ambito epatico in cui è stato caratterizzato.

In generale SERPINB3, o meglio le due forme di SCCA (Squamous Cell Carcinoma Antigen-1 e -2) sono state utilizzate per circa vent'anni come un anonimo *marker* sierico per diagnosi e *follow-up* di tumori di origine epiteliale. Agli inizi degli anni 2000 è stato ipotizzato un possibile ruolo di SCCA-1 nel contesto tumorale in relazione alla morte cellulare (vedi Introduzione). Anche se questi studi non hanno preso in esame in dettaglio il meccanismo molecolare alla base dell'effetto, hanno messo in evidenza che SERPINB3 ha la possibilità di favorire la sopravvivenza cellulare. Lo studio più approfondito a riguardo è quello di Katagiri *et al.*, (2006) che propone che sia l'interazione tra SCCA-1 e JNK1 a bloccare l'attività pro-apoptotica di quest'ultima dopo irradiazione da raggi UV. I dati funzionali sulla riduzione della morte legata all'espressione di SERPINB3 sono solidi, ma rimane il dubbio sull'effettivo meccanismo molecolare coinvolto, dato che manca la prova funzionale con un inibitore farmacologico di JNK1 sulla morte cellulare.

Dai dati ottenuti da questo progetto di Dottorato, il meccanismo molecolare di protezione dalla morte cellulare che emerge è prettamente mitocondriale, dato che in caso di danno solo nucleare SERPINB3 non riduce la morte cellulare come dimostrato dai trattamenti con Etoposide e 5-FU (Fig. 11). Il danno da UV ha una forte componente di stress ossidativo mitocondriale oltre che dare danno diretto al DNA, esattamente come Cisplatino (Fig. 13) e Doxorubicina (Octavia Y. *et al.*, 2012). Utilizzando il Cisplatino come modello per caratterizzare l'azione di SERPINB3, emerge come essa sia in grado di inibire l'innescamento dell'mPTP e quindi della morte cellulare a seguito dell'aumento dei livelli di ROS (Fig. 23-B). La riduzione dei livelli di ROS da parte di SERPINB3 a livello mitocondriale è stata confermata sia inducendo la morte con un composto direttamente a livello mitocondriale, sia supportando il modello cellulare con mitocondri provenienti da topi transgenici per SERPINB3 umana. Il composto utilizzato è l'EM20-25 ed appartiene alla famiglia dei BH3-mimetici, categoria di farmaci che sta emergendo come promettente nella chemioterapia di alcune forme tumorali. EM20-25 è già stato caratterizzato come induttore dell'mPTP (Milanesi E. *et al.*, 2006) e dagli esperimenti condotti in questa tesi è emerso che il suo probabile meccanismo d'azione nell'indurre l'apertura dell'mPTP è quello di aumentare lo stress ossidativo (Fig. 15). Sia su cellule che su mitocondri isolati (Fig. 16 e 18) EM20-25 incrementa i livelli di ROS, ma la presenza di SERPINB3 nel mitocondrio (Fig. 12 e 17) riduce questi livelli inibendo

l'apertura dell'mPTP (Fig. 23-A) e la morte cellulare (Fig. 15). Dai dati ottenuti in questo lavoro di Tesi, EM-20-25 induce un aumento dell'attività del Complesso I della catena respiratoria (Fig. 20) e questa può essere messa in relazione all'induzione di ROS, dato che il Complesso I ne è sede di produzione a livello mitocondriale (Lenaz G. *et al.*, 2010). SERPINB3 gioca un ruolo chiave nella regolazione del Complesso I durante le condizioni di stress: a) interagisce con il Complesso I dato che dopo immunoprecipitazione in entrambi i sistemi analizzati (cellule e mitocondri da topi transgenici) è possibile metterne in evidenza la co-immunoprecipitazione (Fig. 19); b) nei saggi di attività del Complesso I *in vitro* SERPINB3 ne riduce l'attività sia nei mitocondri isolati che nelle cellule anche dopo che queste ultime sono state trattate con EM20-25 (Fig. 20); c) il consumo di ossigeno in cellule vitali (*in situ*) è diminuito da SERPINB3 e la riduzione è dovuta alla sua azione sul Complesso I (Fig. 21); d) la riduzione nei livelli di ROS su mitocondri isolati dai topi dopo trattamento con EM20-25 è presente solo quando è il Complesso I a funzionare (Fig. 22); infine e) misurando l'apertura dell'mPTP dopo trattamento con Cisplatino ed EM20-25, in condizioni dipendenti dall'attività del Complesso I, SERPINB3 previene l'apertura dell'mPTP indotta dallo stress ossidativo (Fig. 23).

L'effetto biologico di SERPINB3 mitocondriale è quello di prevenire lo stress ossidativo dovuto ad una deregolazione del Complesso I con effetto finale sull'inibizione del Poro di Transizione di Permeabilità mitocondriale e sulla sopravvivenza della cellula che la esprime.

SERPINB3 viene espressa nelle situazioni di infiammazione cronica come la cirrosi epatica o la psoriasi (vedi Introduzione ed El-Rachkidy R.G., *et al.*, 2008) probabilmente attraverso lo stimolo delle citochine infiammatorie IL-6 e IL-22 e attraverso il fattore di trascrizione STAT3 a valle dei recettori di entrambe queste interleuchine (Ahmed *et al.*, 2009; Naher L. *et al.*, 2012). IL-6 e IL-22 sono note per conferire protezione nei confronti della situazione di stress che si viene a creare nell'infiammazione: in particolare l'IL-22 agisce soprattutto su cellule epiteliali ed epatociti e in questi ultimi conferisce protezione dalla risposta immunitaria per limitare il danno tissutale (Zenewicz L.A. *et al.*, 2007). L'induzione da parte di IL-6 e IL-22 di SERPINB3 potrebbe contribuire a proteggere e a far sopravvivere le cellule che si trovano esposte al contesto infiammatorio.

I livelli di ROS possono influenzare in maniera drastica il destino di una cellula: se troppo alti inducono senescenza o direttamente morte cellulare, mentre è necessaria una produzione di ROS basale come segnale per alimentare processi quali la proliferazione e la sopravvivenza cellulare stessa. Le cellule cancerose vivono su un sottile equilibrio tra

la quantità di ROS necessaria alla loro continua replicazione e l'incremento di stress ossidativo dato dallo *switch* metabolico e dall'iperproliferazione, e nel caso questo diventasse troppo elevato, potrebbe causarne la morte. Per questi motivi le cellule tumorali nel loro processo di trasformazione acquisiscono la capacità di controllo dei livelli di ROS attraverso l'incremento delle difese antiossidanti (Cairns R.A., *et al.*, 2011). SERPINB3 è over-espressa in numerose forme tumorali, primi fra tutti i tumori squamosi (SCC – Squamous Cell Carcinoma) della testa-collo, cervice uterina, esofago etc., nei melanomi, nel tumore al seno e nei tumori epatici. Per ognuna di queste tipologie tumorali l'espressione di una proteina come SERPINB3, che è in grado di ridurre la produzione di ROS in condizione di stress, diventa un sicuro vantaggio per la sopravvivenza e quindi per la progressione tumorale e l'accumulo e l'instaurarsi di mutazioni. Infatti l'espressione di SERPINB3 è stata associata alle forme tumorali aggressive come l'epatoblastoma e dal punto di vista molecolare l'espressione di SERPINB3 è stata correlata a geni come Myc e TGF- β che solitamente vengono espressi dalle forme tumorali epatiche più aggressive (Turato C. *et al.*, 2010; Turato C. *et al.*, 2012).

SERPINB3 (le due forme di SCCA più in generale) non è espressa nel fegato sano e la sua espressione è riscontrabile durante le epatopatie croniche e la progressione della malattia epatica fino a all'epatocarcinoma dove l'85% di questi tumori sono positivi (Pontisso *et al.*, 2004). La sua presenza è stata dimostrata sia nelle cellule dei tessuti patologici sia come antigene circolante legata ad immunocomplessi IgM; questo conferma che la sua espressione è molto abbondante già negli stadi precoci del danno epatico, verosimilmente in seguito all'infiammazione in cui vi è attivazione di STAT3, IL-6 e IL-22. L'infiammazione epatica è considerata di per sé un fattore predisponente alla carcinogenesi attraverso il fattore di trascrizione NF-kB (vedi Introduzione) perché in grado di far sopravvivere cellule pre-cancerose, ma molto in questo ambito molti punti rimangono ancora da chiarire. E' proprio in questo contesto di infiammazione che si determina durante la progressione della malattia epatica che SERPINB3 mitocondriale potrebbe favorire la sopravvivenza degli epatociti per mantenere la funzionalità epatica (che è strettamente correlata alla sua massa) e al contempo essere in grado di favorire la sopravvivenza di cellule in via di trasformazione o che hanno accumulato mutazioni in geni chiave per la trasformazione neoplastica. Infatti Guido *et al.*, (2008) hanno dimostrato che nei noduli ad alto grado di displasia, che presentano un elevato rischio di degenerazione neoplastica, e nel tessuto cirrotico circostante è presente un'elevata

espressione di SCCA.

L'epatocarcinoma è altamente resistente alla maggior parte dei chemioterapici testati per il trattamento dell'HCC in fase avanzata e anche nuove molecole come gli inibitori multichinasici (es. Sorafenib) non si sono dimostrati soddisfacenti in quanto aumentano l'aspettativa di vita solo di alcuni mesi. I meccanismi molecolari che sono coinvolti in questa situazione di resistenza alla morte cellulare sono molteplici e coinvolgono elementi sia della via intrinseca che di quella estrinseca di morte cellulare (vedi Introduzione). Tra questi, è stato dimostrato che l'inibizione del Poro di Transizione di Permeabilità mitocondriale è uno dei primi eventi che avvengono durante l'epatocarcinogenesi. In modelli di carcinogenesi epatica nel topo (Klohn PC., 2003), l'mPTP è inibito dalla proteina HBx di HBV (Clippinger A.J., 2009) e più in generale esso è inibito in molte forme tumorali. Dai dati prodotti in questo lavoro anche SERPINB3 mitocondriale potrebbe inserirsi in questo quadro di meccanismo di resistenza ai trattamenti chemioterapici, dato che la riduzione dei livelli di ROS indotta da SERPINB3 comporta l'inibizione dell'mPTP e della morte cellulare a seguito di trattamenti con composti come EM20-25, Doxorubicina e Cisplatino che hanno il mitocondrio come bersaglio per l'induzione della morte cellulare.

Questa tesi di Dottorato ha messo in evidenza che l'innescò di stress ossidativo mitocondriale da parte di chemioterapici come Cisplatino e Doxorubicina, considerato "secondario" o "collaterale" e tossico per tessuti sani, possa giocare un ruolo di prim'ordine nell'innescò della morte cellulare anche nelle cellule tumorali epatiche e che verosimilmente questa azione viene contrastata dalla presenza di SERPINB3. La dimostrazione che SERPINB3 è in grado di conferire resistenza alla morte cellulare in condizioni di forte stress ossidativo mitocondriale dopo trattamento con chemioterapici ed EM20-25 diventa una conferma anche del fatto che il danno mitocondriale può essere considerato parte del meccanismo molecolare di chemioterapia.

Uno degli elementi più innovativi di questo lavoro rimane la definizione del meccanismo molecolare d'azione di SERPINB3 e della sua inibizione del Poro di Transizione di Permeabilità mitocondriale come resistenza alla morte cellulare. Queste evidenze portano alla luce come l'espressione di SERPINB3 in un tessuto sano abbia un effetto protettivo mentre, se acquisita da una cellula trasformata, possa favorire la progressione tumorale e contribuire alla resistenza ai trattamenti chemioterapici. È stato infatti recentemente dimostrato (Collie-Duguid E.S. *et al.* 2012) che l'espressione di SERPINB3 è associata ad una prognosi peggiore dopo trattamento con antracicline come ad esempio

Doxorubicina ed Epirubicina nei tumori della mammella. Inoltre, i dati recentemente pubblicati da Lim W. *et al.*, (2012) dimostrano che, in una coorte di 109 pazienti con carcinoma epiteliale dell'ovario, un'alta espressione di SERPINB3 è fattore prognostico per la resistenza al trattamento con il platino ed è un fattore associato a prognosi peggiore per la sopravvivenza. Alla luce di questi risultati gli autori concludono ipotizzando che SERPINB3 possa avere un ruolo importante nella carcinogenesi epatica e nella predizione della resistenza ai trattamenti al platino.

Considerando i dati prodotti da questa tesi e i dati presenti in letteratura qui discussi è possibile concludere che SERPINB3 gioca un ruolo rilevante nella protezione dallo stress ossidativo mitocondriale, nell'inibizione del Poro di Transizione di Permeabilità mitocondriale, nella carcinogenesi epatica e nella resistenza ai chemioterapici, caratteristica di questo tipo di tumore.

Bibliografia

Ahmed ST, Darnell JE Jr. Serpin B3/B4, activated by STAT3, promote survival of squamous carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 23;378(4):821-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.147. Epub 2008 Dec 12.

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,700 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2:1129–1133.

Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegnù L, Calabrese F, Gatta A, Pontisso P, Fassina G. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103 (12): 2558-2565.

Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabo, I., Zoratti, M. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.*1992; 267, 2934–2939.

Bruix J, Sherman M. Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-1022.

Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:299-311. doi: 10.1101/sqb.2011.76.012856. Epub 2011 Dec 12.

Cataltepe S, Gornstein ER, Schick C, Kamachi Y, Chatson K, Fries J, Silverman GA, Upton MP. Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 113-122 (2000).

Chiesa R, Donato F, Tagger A, Favret M, Ribero ML, Nardi G, Gelatti U, Bucella E, Tomasi E, Portolani N, Bonetti M, Bettini L, Pelizzari G, Salmi A, Savio A, Garatti M, Callea F: Etiology of hepatocellular carcinoma in Italian patients with and without cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:213.

Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 2009 May;61(3):223-42. doi: 10.1016/j.etp.2008.09.003. Epub 2008 Nov 4.

Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-kappaB and the mitochondrial permeability transition pore. *J Virol.* 2009 May;83(10):4718-31. doi: 10.1128/JVI.02590-08. Epub 2009 Mar 11.

Collie-Duguid ES, Sweeney K, Stewart KN, Miller ID, Smyth E, Heys SD. SerpinB3, a new prognostic tool in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr;132(3):807-18. doi: 10.1007/s10549-011-1625-9. Epub 2011 Jun 22

Croswell JM, Kramer BS. Clinical trial design and evidence-based outcomes in the study of liver diseases. *J Hepatol* 2009;50:817– 826.

Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life.* 2005 Feb;57(2):73-81.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 2011 Jun 19;476(7360):336-40.

El-Rachkidy RG, Young HS, Griffiths CE, Camp RD. Humoral autoimmune responses to the squamous cell carcinoma antigen protein family in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2008

Sep;128(9):2219-24. doi: 10.1038/jid.2008.71. Epub 2008 Apr 3.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132:2557–76.

Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2009 Feb 7;15(5):513-20.

Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver International* 2007; 19(4):683-94

Fransvea E, Angelotti U, Antonaci S, Giannelli G. Blocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2008; 47: 1557-1566

Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024-1033

Guido M, Roskams T, Pontisso P, Fassan M, Thung SN, Giacomelli L, Sergio A, Farinati F, Cillo U, Rugge M. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2008; 61:445–7.

Hashimoto, K., Kiyoshima, T., Matsuo, K., Ozeki, S. & Sakai, H. Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF-alpha-induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Tumour Biol.* 26, 165-172 (2005).

Hoshida Y, Toffanin S, Lachenmayer A, Villanueva A, Minguez B, Llovet JM. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: recent advancements. *Semin Liver Dis.* 2010 Feb;30(1):35-51. doi: 10.1055/s-0030-1247131. Epub 2010 Feb 19.

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

Klöhn PC, Soriano ME, Irwin W, Penzo D, Scorrano L, Bitsch A, Neumann HG, Bernardi P. Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 19;100(17):10014-9. Epub 2003 Aug 7.

Laurent-Puig, P. & Zucman-Rossi, J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 25, 3778-3786 (2006).

Lemarie A, Grimm S. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene.* 2011 Sep 22;30(38):3985-4003. doi: 10.1038/onc.2011.167. Epub 2011 May 30.

Lenaz G, Baracca A, Barbero G, Bergamini C, Dalmonte ME, Del Sole M, Faccioli M, Falasca A, Fato R, Genova ML, Sgarbi G, Solaini G. Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):633-40. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.025. Epub 2010 Jan 30.

Lenaz G, Genova ML. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Apr 15;12(8):961-1008.

Lencioni R. Loco-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 52:762–773.

Lim W, Kim HS, Jeong W, Ahn SE, Kim J, Kim YB, Kim MA, Kim MK, Chung HH, Song YS, Bazer FW, Han JY, Song G. SERPINB3 in the chicken model of ovarian cancer: a prognostic factor for platinum resistance and survival in patients with epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2012;7(11):e49869. doi: 10.1371/journal.pone.0049869. Epub 2012 Nov 21.

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-1917.

Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatology* 2008(b); 48(Suppl 1):S20-S37.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2008(a); 359:378–390.

Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25:181–200.

Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma--an updated analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Jun 1;23(11):1535-47.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):330-8.

Milanesi E, Costantini P, Gambalunga A, Colonna R, Petronilli V, Cabrelle A, Semenzato G, Cesura AM, Pinard E, Bernardi P. The mitochondrial effects of small organic ligands of BCL-2: sensitization of BCL-2-overexpressing cells to apoptosis by a pyrimidine-2,4,6-trione derivative. *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):10066-72. Epub 2006 Feb 14.

Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann.N. Y. Acad. Sci.* 963, 13-20 (2002).

Murakami A, Suminami Y, Hirakawa H, Nawata S, Numa F, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br. J. Cancer* 84, 851-858 (2001).

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009 Jan 1;417(1):1-13. doi: 10.1042/BJ20081386.

Naher L, Kiyoshima T, Kobayashi I, Wada H, Nagata K, Fujiwara H, Ookuma YF, Ozeki S, Nakamura S, Sakai H. STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Nov;41(5):1577-86. doi: 10.3892/ijo.2012.1594. Epub 2012 Aug 21

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jun;52(6):1213-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006. Epub 2012 Mar 21.

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

Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, Schlattau A, Lathroum L, Windebank AJ. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons.

Neurobiol Dis. 2011 Mar;41(3):661-8. doi: 10.1016/j.nbd.2010.11.017. Epub 2010 Dec 8.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 2010 May 28;17(5):421-33. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012

Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90 (4): 833-837.

Pontisso P, Quarta S, Caberlotto C, Beneduce L, Marino M, Bernardinello E, Tono N, Fassina G, Cavalletto L, Gatta A, Chemello L. Progressive increase of SCCA-IgM immune complexes in cirrhotic patients is associated with development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2006 Aug 15;119(4):735-40.

Prieto J. Inflammation, HCC and sex: IL-6 in the centre of the triangle. *J Hepatol.* 2008 Feb;48(2):380-1. Epub 2007 Dec 5.

Quarta S, Vidalino L, Turato C, Ruvoletto M, Calabrese F, Valente M, Cannito S, Fassina G, Parola M, Gatta A, Pontisso P. SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 2010; 221:343–56.

Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 2011 Sep;50(3):222-33. doi: 10.1016/j.ceca.2011.04.007. Epub 2011 May 23.

Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis.* 2007 May;12(5):815-33.

Rasola A, Sciacovelli M, Pantic B, Bernardi P. Signal transduction to the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 2010 May 17;584(10):1989-96. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.022. Epub 2010 Feb 11.

Sherman M. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2010; 78(suppl 1):7–10.

Suminami, Y. et al. Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br. J. Cancer* 82, 981-989 (2000).

Teoh, N.C. Proliferative drive and liver carcinogenesis: too much of a good thing? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 1817-1825 (2009).

Turato C, Buendia MA, Fabre M, Redon MJ, Branchereau S, Quarta S, Ruvoletto M, Perilongo G, Grotzer MA, Gatta A, Pontisso P. Over-expression of SERPINB3 in hepatoblastoma: A possible insight into the genesis of this tumour? *Eur J Cancer* (2012), doi:10.1016/j.ejca.2011.06.004.

Turato C, Calabrese F, Biasiolo A, Quarta S, Ruvoletto M, Tono N, Paccagnella D, Fassina G, Merkel C, Harrison TJ, Gatta A, Pontisso P. SERPINB3 modulates TGF-beta expression in chronic liver disease. *Lab Invest* 2010; 90:1016–23.

Ullman E, Pan JA, Zong WX. Squamous cell carcinoma antigen 1 promotes caspase-8-mediated apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress while inhibiting necrosis induced by lysosomal injury. *Mol Cell Biol.* 2011 Jul;31(14):2902-19. doi: 10.1128/MCB.05452-11. Epub 2011 May 16.

Villano G, Quarta S, Ruvoletto MG, Turato C, Vidalino L, Biasiolo A, Tono N, Lunardi F, Calabrese F, Dall'olmo L, Dedja A, Fassina G, Gatta A, Pontisso P. Role of squamous cell carcinoma antigen-1 on liver cells after partial hepatectomy in transgenic mice. *Int J Mol Med*. 2010 Jan;25(1):137-43.

Villanueva A., Llovet J.M. Target Therapies for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2011; 140:1410–1426.

Wallace D.C. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):685-98. doi: 10.1038/nrc3365.

Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, et al. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3129–140.

Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):647-59. Epub 2007 Oct 4

Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? *Oncologist*. 2006 Jul-Aug;11(7):790-800.

