



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

Scuola di dottorato di ricerca in

BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

Indirizzo SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

CICLO XX

Ruolo del fattore di trascrizione Snail1 nel processo d'attivazione delle cellule stellate epatiche

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore : Ch.mo Dott. Diego Martines

Co-supervisore : Ch.mo Prof. Ignazio Castagliuolo

Dottorando : Melania Scarpa

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

INDICE

ABSTRACT	5
1. SOMMARIO	7
2. INTRODUZIONE	9
2.1 La fibrosi epatica	9
2.1.1 Il processo di fibrogenesi epatica	12
2.1.2 Popolazioni di cellule miofibroblastiche coinvolte nella fibrosi epatica	14
2.2 Le cellule stellate epatiche (HSC)	17
2.2.1 Il processo d'attivazione delle HSC	18
2.2.2 Regolazione trascrizionale dell'attivazione delle HSC	23
2.3 Il fattore di trascrizione Snail1	25
2.3.1 Snail1 e fibrosi	26
3. SCOPO	27
4. MATERIALI E METODI	29
4.1 Induzione della fibrosi epatica sperimentale	29
4.2 Valutazione della severità della fibrosi epatica	29
4.3 Isolamento e coltura delle cellule stellate epatiche (HSC) murine	30
4.3.1 Caratterizzazione delle HSC murine	31
4.4 Estrazione dell'RNA totale	31
4.5 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)	32
4.6 Allestimento di curve standard per PCR quantitativa	32
4.6.1 Ligazione del prodotto di PCR nel vettore pGEM [®] -T (TA cloning)	32
4.6.2 Caratteristiche del vettore pGEM [®] -T	33
4.6.3 Trasformazione in cellule batteriche	34
4.6.4 Verifica del clonaggio	35
4.6.5 Sequenziamento genico	35
4.6.6 Preparazione della curva standard per PCR quantitativa	36
4.7 Determinazione dei livelli di mRNA mediante RT-PCR Real-Time	36
4.8 Immunofluorescenza (IF) ed immunistochemica (IHC)	37
4.9 Western Blotting (WB)	38
4.10 Produzione di vettori adenovirali per silenziamento genico	39
4.10.1 Caratteristiche del plasmide pAd/BLOCK-iT [™] -DEST e del plasmide di trasferimento pENTR [™] /U6	39
4.10.2 Progettazione degli oligonucleotidi codificanti per i shRNA	40
4.10.3 Generazione degli oligonucleotidi a doppio filamento (ds oligo)	40
4.10.4 Ligazione dei ds oligo nel vettore di trasferimento pENTR [™] /U6	41
4.10.5 Trasformazione di cellule batteriche competenti <i>E.coli</i> One Shot [®] TOP10	41
4.10.6 Verifica del clonaggio di ds oligo nel vettore di trasferimento pENTR [™] /U6	42
4.10.7 Verifica dell'efficacia di silenziamento	42
4.10.8 Ricombinazione LR per la produzione di costrutti adenovirali ricombinanti	43
4.10.9 Transfezione del genoma adenovirale ricombinante in cellule di packaging	43
4.10.10 Amplificazione dell'adenovirus ricombinante	44
4.10.11 Titolazione dell'adenovirus ricombinante mediante metodo Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID ₅₀)	44
4.11 Saggio d'infettività su HSC	45
4.12 Silenziamento di Snail1 in HSC mediante AdshRNA	45

4.13 Campioni di tessuto epatico umano _____	46
4.14 Analisi statistica _____	46
5. RISULTATI _____	47
5.1 Caratterizzazione di HSC murine in coltura: il modello d'attivazione <i>in vitro</i> _____	47
5.2 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 in HSC attivate <i>in vitro</i> _____	49
5.3 Valutazione dell'espressione di Snail1 nella fibrosi epatica sperimentale _____	51
5.4 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 in HSC attivate <i>in vivo</i> _____	53
5.5 Costruzione di vettori adenovirali per il silenziamento di Snail1 mediante shRNA _____	56
5.6 Effetto del silenziamento di Snail1 in HSC _____	57
5.7 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 nella fibrosi epatica umana _____	60
6. DISCUSSIONE _____	61
7. ABBREVIAZIONI _____	65
8. BIBLIOGRAFIA _____	67
9. RINGRAZIAMENTI _____	81

ABSTRACT

Liver fibrosis, the final consequence of several types of chronic hepatic injuries, results from chronic damage to the liver in conjunction with the accumulation of fibrillar collagens and ECM proteins, that alters the hepatic architecture. Hepatic stellate cells (HSC) play a pivotal role in the fibrogenic process. These perisinusoidal cells normally contribute to the maintenance of liver homeostasis by secreting growth factors, storing Vitamin A and regulating ECM turnover, and therefore play a key role to maintain the integrity of the space of Disse. Following liver injury, HSC undergo a process of activation, characterized by morphological and functional changes and acquire a myofibroblast-like phenotype. Activated HSC proliferate and alter ECM composition both qualitatively and quantitatively. The individuation of factors responsible for HSC transdifferentiation is therefore a fundamental step to understand the physiopathology of hepatic fibrosis.

Snail1 belongs to the Snail gene family of transcription factors, best known for its ability to trigger epithelial-mesenchymal transition (EMT), converting epithelial cells into mesenchymal cells with migratory properties. Snail genes influence both tissue formation during embryonic development and the acquisition of invasive properties in epithelial tumors. Snail1 is also a potent survival factor. A number of studies have reported Snail1 overexpression in several pathological conditions associated with the deposition of fibrotic tissue induced by TGF-beta, a potent Snail1 activator and profibrogenic cytokine for HSC. We therefore started examining Snail1 involvement in the hepatic fibrosis process.

To verify if HSC *in vitro* activation was associated to an increase of Snail1 expression, HSC purified from mice livers have been seeded on uncoated plastic and maintained in culture up to 10 days; mRNA levels of Snail1 and of the activation marker genes α -SMA and Col1 α 1 have been assessed by quantitative Real Time RT-PCR. This analysis evidenced that Snail1 expression augments proportionally to the activation state of HSC. Furthermore, we analysed Snail1 localization in HSC by immunocytochemistry, examining cells in culture up to 10 days: we could detect Snail1 nuclear translocation in cells in culture from at least 4 days. Next, we characterized Snail1 expression *in vivo* using CCl₄ treatment as chronic liver injury model. Fibrosis progression has been evaluated by histology and quantitative Real Time RT-PCR for α -SMA and Col1 α 1. Fibrosis development was associated to a significant increase of Snail1 mRNA. Double staining for Snail1 and α -SMA in fibrotic livers showed their co-localization in fibrotic septa, suggesting that activated HSC express Snail1 *in vivo*. Moreover, in *in vivo* activated HSC Snail1 resulted significantly up-regulated compared to quiescent HSC, and immunocytochemistry analysis revealed a nuclear localization. Thus, we started functional studies by RNAi and we optimized Snail1 knockdown in primary cultures of HSC with adenoviral vectors coding shRNA. The data obtained support the role of Snail1 in HSC activation process, since its silencing results in a decrease of mRNA levels of the activation markers α -SMA and Col1 α 1 and of genes involved in the activation process such as ILK and

MMP-9. Preliminary data highlight an increase of Snail1 specific transcripts in human fibrotic liver samples compared to healthy controls.

All in all, our data support a role for Snail1 in the development of hepatic fibrosis and evidence its involvement in HSC activation process.

1. SOMMARIO

La fibrosi epatica è considerata il meccanismo di riparazione delle ferite che si instaura in seguito a danno epatico cronico ed è caratterizzata dall'eccessiva deposizione di collagene fibrillare e proteine della matrice extracellulare. La trasformazione delle cellule stellate epatiche (HSC) da uno stato quiescente ad uno stato attivato è ritenuta un evento di fondamentale importanza per lo sviluppo e la progressione di tale processo. Questa transizione è caratterizzata da cambiamenti sia morfologici sia funzionali nelle HSC, inclusa la perdita di vitamina A, l'acquisizione di un fenotipo simile ai miofibroblasti, l'aumento della proliferazione e della secrezione di proteine della matrice extracellulare.

Snail1 fa parte della famiglia di fattori di trascrizione Snail, nota soprattutto per la capacità d'innescare la EMT (epithelial-mesenchymal transition), convertendo cellule epiteliali in cellule mesenchimali con proprietà migratorie. Snail1 influenza sia la formazione dei tessuti durante lo sviluppo embrionale che l'acquisizione di proprietà invasive in tumori epiteliali. Si tratta inoltre di un potente fattore di sopravvivenza. Diversi studi hanno riportato che Snail1 è sovra-espressa in varie condizioni patologiche associate alla deposizione di tessuto fibroso ed indotte dal TGF- β , un potente attivatore di Snail1 e citochina con attività profibrogenica per le HSC. Abbiamo pertanto iniziato ad esaminare il ruolo di Snail1 nel processo di fibrogenesi epatica.

Per verificare se l'attivazione *in vitro* delle HSC fosse associata con un aumento dell'espressione di Snail1, HSC estratte dal fegato di topi sono state seminate su supporto plastico e mantenute in coltura per 10 giorni, ed i livelli di mRNA relativi a Snail1 e a marcatori d'attivazione quali α -SMA e Col1 α 1 sono stati misurati per mezzo di Real-Time RT-PCR quantitativa. Tale analisi ha evidenziato che l'espressione di Snail1 aumenta proporzionalmente al grado d'attivazione delle cellule stellate. Inoltre, mediante immunocitochimica effettuata su cellule in coltura per 1, 4 e 10 giorni è stata analizzata la localizzazione di Snail1 nelle HSC e si è potuta osservare la sua traslocazione nel nucleo in cellule in coltura da almeno 4 giorni. Abbiamo in seguito caratterizzato l'espressione di Snail1 *in vivo*, utilizzando come modello murino di danno epatico cronico la somministrazione di tetracloruro di carbonio. La progressione della fibrosi è stata valutata mediante istologia e Real-Time RT-PCR quantitativa per i marcatori d'attivazione α -SMA e Col1 α 1. Lo sviluppo di fibrosi è risultato accompagnato da un aumento significativo dei livelli di trascritto per Snail1. Inoltre la doppia marcatura per α -SMA e Snail1 nel fegato fibrotico ne ha rivelato la colocalizzazione a livello dei setti fibrotici, suggerendo che le HSC attivate effettivamente esprimono Snail1. Anche nelle HSC estratte dai fegati fibrotici (attivate *in vivo*) Snail1 risulta significativamente sovraespresso rispetto a HSC estratte da fegati sani e l'immunocitochimica ne evidenzia la localizzazione nucleare. Abbiamo dunque iniziato degli studi di tipo funzionale mediante RNA interference (RNAi); a tal fine abbiamo messo a punto la metodica per il knockdown di Snail1 in colture primarie di HSC con vettori adenovirali codificanti shRNA. I

dati preliminari da noi ottenuti supportano il ruolo di Snail1 nel processo d'attivazione delle HSC, in quanto il silenziamento di tale fattore di trascrizione nelle HSC risulta in una diminuzione dei livelli di mRNA dei marcatori d'attivazione α -SMA e Col1 α 1 e di geni coinvolti nel processo d'attivazione quali ILK e MMP-9. Dati del tutto preliminari evidenziano inoltre un aumento dei trascritti specifici per Snail1 in campioni di fegato fibrotico umano rispetto a campioni di fegato sano.

Complessivamente, i dati ottenuti supportano un ruolo per Snail1 nello sviluppo della fibrogenesi epatica e ne provano il coinvolgimento nel processo di attivazione di HSC.

2. INTRODUZIONE

2.1 La fibrosi epatica

La fibrosi epatica è stata storicamente interpretata come un processo passivo ed irreversibile dovuto al collasso del parenchima epatico ed alla sua sostituzione con tessuto ricco in collagene. Attualmente, è considerata un meccanismo di riparazione tessutale che si instaura in risposta ad un danno epatico cronico e alcuni dati clinici ne hanno dimostrato la potenziale reversibilità [1].

Storia naturale La fibrosi epatica è una condizione comune a molte patologie croniche del fegato caratterizzate dalla presenza di danno parenchimale o infiammazione quali l'epatite cronica virale, la steatoepatite associata ad abuso alcolico o obesità, patologie parassitarie (es. schistosomiasi), epatiti autoimmuni, epatiti da sovraccarico di metalli come il morbo di Wilson e l'emocromatosi, condizioni d'infiammazione cronica (es. sarcoidosi), epatiti tossiche da farmaci o anomalie congenite. L'attivazione cronica della risposta di riparazione tessutale può concludersi con la cirrosi e l'insufficienza epatica. La cirrosi è definita come lo stadio terminale della fibrosi, caratterizzato dalla formazione di noduli rigenerativi di parenchima epatico separati da setti fibrotici e conseguente sovvertimento dell'architettura epatica. Le principali complicanze cliniche della cirrosi comprendono ipertensione portale, ascite, encefalopatia epatica, sindrome epatorenale ed epatocarcinoma. Solo una minoranza (~25-30%) dei pazienti affetti da epatopatia cronica ha probabilità di sviluppare fibrosi significativa e cirrosi [2]. La storia naturale della fibrosi epatica infatti è influenzata da fattori genetici ed ambientali. In generale, è stato dimostrato che le seguenti caratteristiche cliniche possono essere predittive per lo sviluppo di fibrosi significativa, o almeno, di una più rapida progressione a cirrosi: (a) sesso maschile (età <50 anni); (b) età al momento dell'infezione (in particolare da HCV); (c) obesità e diabete mellito; (d) assunzione d'alcol, indipendentemente dall'eziologia dell'epatopatia; (e) il contenuto epatico di ferro [3,4]. Inoltre, studi epidemiologici hanno identificato polimorfismi in geni candidati (coinvolti nel metabolismo, nella risposta immunitaria e fibrogenica) che possono influenzare la progressione della fibrosi [5]. Questi fattori genetici potrebbero spiegare l'ampio spettro di risposte allo stesso agente eziologico osservato in pazienti con patologia epatica cronica. In generale, nelle patologie croniche del fegato che progrediscono a cirrosi, si osserva un accumulo significativo di matrice extracellulare fibrillare solo dopo un decorso clinico di diversi anni o anche decenni. Tuttavia, ci sono almeno due entità cliniche caratterizzate da una rapida evoluzione della fibrosi, definite "fulminanti". Una si osserva in bambini affetti da atresia biliare o colestasi intraepatica familiare progressiva, e l'altra, più comune, si manifesta in un sottogruppo di pazienti sottoposti a trapianto di fegato per cirrosi HBV- o

HCV-associata. In questi casi l'intervallo di tempo tra re-infezione del fegato trapiantato e comparsa di cirrosi può essere di 2-3 anni [2].

Diagnosi La biopsia epatica rappresenta il metodo gold-standard per la diagnosi della fibrosi epatica. L'esame istologico è utile sia per identificare l'eziologia della patologia epatica che per stabilire l'estensione delle lesioni necrotico-infiammatorie (grading) e valutare la fase di evoluzione della malattia verso la cirrosi (staging). I sistemi di quantificazione più utilizzati per la classificazione della fibrosi sono il Metavir (stadio F0-F4) e l'Ishak (stadio 0-6). La biopsia epatica è tuttavia una procedura invasiva, soggetta a possibili complicanze, con diverse limitazioni. In primo luogo sono possibili errori di campionamento, specialmente quando vengono analizzate piccole biopsie (<2,5 cm); inoltre l'esame istologico è esposto a variabilità intra- ed inter-osservatore e non fornisce alcun dato relativo alla progressione della patologia [6]. Si presenta quindi la necessità di sviluppare metodi diagnostici non invasivi ed affidabili per la fibrosi epatica.

Negli ultimi anni si è cercato di individuare dei marcatori sierologici che, attraverso un semplice prelievo di sangue, consentissero una valutazione indiretta della fibrosi epatica. Si tratta di indici di reattività acuta (α 2-macroglobulina, ApoA1), di fibrinolisi (chitinasi, MMPs), di fibrogenesi (collagene IV, procollagene, laminina, acido ialuronico), di prodotti della risposta infiammatoria o della deposizione di collagene (TIMPs, inibitori della degradazione della matrice) ed indici clinici (piastrine, bilirubina, GGT, AST, ALT) [7]. Lo studio di questi marcatori ha portato alla costruzione di indici o scores di fibrosi formulati considerando marcatori diversi con "peso" diagnostico diverso. Diversi sono i test oggetto di studio ed alcuni hanno avuto una validazione clinica (es. Fibrotest, Forns) [7]. Tuttavia ancora oggi non si dispone di test di facile esecuzione e sufficientemente attendibili per determinare il grado di fibrosi. Pertanto la valutazione dei marcatori sierologici non è di grande utilità nella pratica clinica quotidiana, pur avendo interessanti prospettive soprattutto se usati in combinazione con le altre metodiche diagnostiche.

La fibrosi epatica può essere valutata anche mediante tecniche di imaging: l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (MRI) danno un'informazione accurata soprattutto per quanto riguarda gli aspetti sia morfologici che funzionali delle strutture epatiche (neoformazioni, vascolarizzazione arteriosa, venosa, vie biliari, ecc.). Tuttavia per quanto riguarda la valutazione della fibrosi hanno il limite che ancora non vi sono parametri che consentano una quantificazione corretta nelle forme iniziali e intermedie, per cui le tecniche di imaging sono poco utili per la diagnostica delle epatiti croniche, mentre hanno una importanza prevalente per la diagnostica della cirrosi e delle sue complicanze. Inoltre richiedono personale di particolare esperienza ed hanno un costo elevato [1].

Tra le nuove metodiche diagnostiche della fibrosi epatica si è inserito da qualche anno anche l'esame Fibroscan o elastografia transitoria, come una delle tecniche più interessanti. Il test è stato messo a punto nel 2003, da un gruppo di ricerca francese [8]. Il Fibroscan è un esame che consente di valutare il grado di rigidità del fegato, secondo il presupposto che la fibrosi altera l'elasticità epatica determinando una progressiva rigidità

dell'organo. Il principio fisico che lo sostiene consiste nel generare un'onda meccanica che attraversa il fegato e misurarne poi la velocità di propagazione tramite un fascio di ultrasuoni. La velocità di propagazione dell'onda è proporzionale alla rigidità del fegato: quanto più il fegato è rigido tanto più velocemente si propaga l'onda meccanica. L'unico limite è rappresentato dal fatto che l'esame non può essere eseguito nei pazienti con ascite e obesi.

Aspetti istologici Il processo fibrogenico consegue all'azione di vari agenti eziologici in grado di danneggiare il parenchima epatico. La composizione e la quantità di matrice depositata in corso di fibrosi risultano simili nelle varie forme di patologia epatica ma la localizzazione del tessuto fibrotico nel lobulo epatico può variare in base alla natura ed al sito dell'insulto. Così in corso di patologia colestatica cronica il processo fibrogenico inizia nella zona periportale, sede dell'infiammazione, e tende ad estendersi tra spazi portalici adiacenti, formando ponti fibrosi porto-portalici che circoscrivono il lobulo (fibrosi porto-portalici o fibrosi perilobulare). Il pattern di fibrosi dell'epatite cronica virale invece è il risultato della necrosi a ponte porto-centrale che dà origine a setti fibrotici porto-centrali. Questa forma d'evoluzione del processo fibrotico è inoltre caratterizzata dalla presenza d'epatite d' "interfaccia", dallo sviluppo di setti porto-portalici e dalla rapida disorganizzazione delle connessioni vascolari con il sistema portale. Nell'epatite alcolica e nella NASH invece la deposizione di componenti della matrice extracellulare inizia nella zona pericentrale e si estende tra i sinusoidi e gli epatociti (fibrosi pericellulare e perisinusoidale). Infine, lo sviluppo di fibrosi da una vena centrolobulare ad un'altra adiacente è un evento più raro e generalmente secondario a problemi di flusso venoso (es. insufficienza cardiaca cronica) [2].

Terapia Attualmente non esiste alcun trattamento standard per la fibrosi epatica. La rimozione della causa dell'epatopatia, quando possibile, è l'intervento più efficace. Per pazienti con cirrosi e complicanze cliniche, invece, il trapianto rappresenta l'unico approccio curativo [6].

La terapia anti-fibrotica ideale dovrebbe essere epato-specifica, ben tollerata se somministrata per periodi prolungati ed efficace nell'attenuare l'eccessiva deposizione di collagene senza alterare la normale sintesi di matrice extracellulare (*extracellular matrix*, ECM). Sebbene studi sperimentali condotti su roditori abbiano rivelato bersagli molecolari utili per prevenire la progressione della fibrosi, l'efficacia della maggior parte dei trattamenti non è stata dimostrata nell'uomo. Infatti, il disegno di sperimentazioni cliniche risulta difficile in quanto sono necessari studi di follow-up a lungo termine, data la generale lenta evoluzione della fibrosi epatica, e ripetute biopsie per valutare accuratamente i cambiamenti del quadro istologico [1].

Le principali strategie terapeutiche attualmente in studio prevedono l'uso di: (a) agenti in grado di ridurre l'infiammazione e la risposta immunitaria (es. corticosteroidi, colchicina, IL-10); (b) agenti in grado di ridurre l'attivazione delle cellule che producono la matrice extracellulare e le loro proprietà pro-fibrogeniche (es. inibitori dell'endotelina-1, del TGF- β 1 e dell'angiotensina, INF α , antagonisti dei PPARs); (c) agenti antiossidanti (es.

vitamina E, silymarin, fosfatidilcolina, S-adenosil-L-metionina); (d) agenti in grado di aumentare la degradazione della ECM fibrillare (es. metalloproteinasi, uPA) [2].

2.1.1 Il processo di fibrogenesi epatica

La fibrogenesi epatica è considerata un processo patologico progressivo e dinamico che insorge in seguito ad un danno parenchimale e che si conclude con la deposizione eccessiva di componenti della ECM.

In seguito a danno epatico di tipo acuto e transitorio, i meccanismi di rigenerazione tessutale consentono una completa risoluzione della lesione con la degradazione del materiale fibrotico depositato. Invece, in seguito ad insulti ripetuti e cronici i meccanismi fibrogenici di riparazione tessutale risultano persistentemente attivati producendo e depositando elevate quantità di ECM. Il processo di fibrogenesi viene quindi a prevalere sulla rigenerazione parenchimale, sbilanciando il rapporto parenchima/stroma in favore di quest'ultimo e sfociando nella disorganizzazione epatica e nell'instaurarsi della cirrosi [9] [Figura 2.1].

In condizioni fisiologiche, la matrice extracellulare costituisce lo 0,5% del peso umido del fegato: la matrice ad alta densità è prevalentemente confinata nelle aree portali e nella capsula di Glisson, mentre lo spazio di Disse contiene una matrice a bassa densità. Quest'ultima è composta da collagene fibrillari di tipo I, III e V, collagene microfibrillare di tipo VI, collagene della membrana basale di tipo IV e XVIII, glicoproteine quali fibronectina, laminina, tenascina-C, vitronectina ed undulina e proteoglicani come eparan-solfato e condroitin-solfato [10]. Il collagene di tipo IV, definito per la sua struttura tridimensionale "collagene a maglie aperte", forma una struttura non fibrillare che consente alle cellule del parenchima un ottimale scambio di soluti con la circolazione sinusoidale. Il collagene di tipo I e III invece formano fasci di fibre di largo diametro aventi la funzione di rinforzare l'architettura dello spazio perisinusoidale [11].

Nel fegato fibrotico avvengono dei cambiamenti significativi nella composizione della matrice extracellulare sia a livello qualitativo che quantitativo, prevalentemente nelle zone periportali e perisinusoidali, tali che la quantità di collagene e proteoglicano in un fegato cirrotico può essere fino a sei volte superiore rispetto a quella di un fegato sano [12]. Il tessuto fibrotico è costituito prevalentemente da collagene fibrillare di tipo I e III, proteoglicani, fibronectina ed acido ialuronico. La principale conseguenza nel fegato è l'alterazione dell'anatomia dello spazio di Disse [13], in cui la matrice extracellulare a bassa densità ed "a maglie aperte" viene sostituita da una matrice ricca di collagene fibrillare e fibronectina. Tale fibrosi subendoteliale causa la perdita delle fenestrazioni delle cellule endoteliali a cui consegue un mancato scambio di soluti con il sistema sinusoidale, un'alterata funzionalità degli epatociti e delle cellule non parenchimali [14].

La matrice extracellulare non è una struttura statica ma è soggetta ad un continuo rinnovamento in cui la sintesi di nuovi componenti è associata alla contemporanea lenta degradazione delle proteine che la compongono. Questa degradazione è catalizzata dalle metalloproteinasi (MMP), una famiglia di endopeptidasi calcio- e zinco-dipendenti suddivisa a seconda della specificità di substrato in collagenasi, gelatinasi, stromelisine, matrilisine e

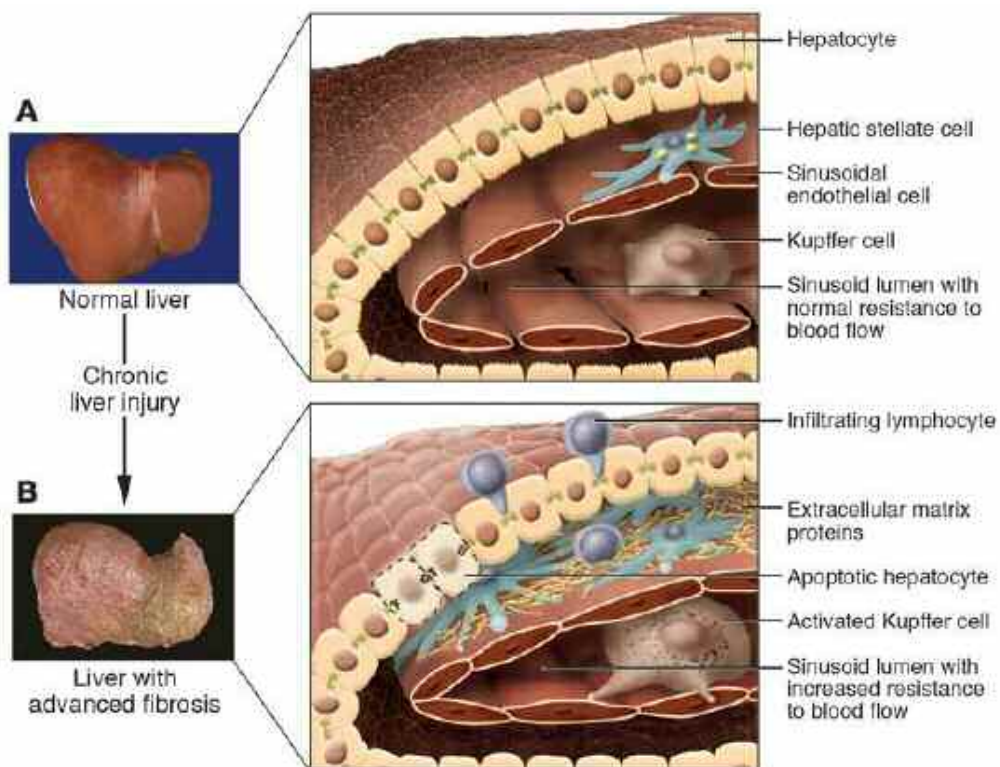


Figura 2.1 Cambiamenti dell'architettura epatica associati al progredire della fibrosi (*J Clin Invest* 2005 [1]).

metalloproteinasi di membrana (MT-MMP) [15]. L'attività enzimatica delle MMP è controllata da un'altra famiglia di enzimi, gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP), che interagiscono in maniera non covalente con i siti attivi delle MMP in rapporto stechiometrico 1:1 bloccandone la capacità proteolitica ed impedendo così un'esagerato riarrangiamento tissutale ed un'incontrollata distruzione della matrice extracellulare [16]. Una fine regolazione del rapporto MMP-TIMP è necessaria per assicurare l'appropriata omeostasi del fegato. In seguito ad un insulto pro-fibrogenico, tale rapporto viene alterato. In corso d'attivazione, le cellule stellate epatiche (HSC), oltre ad aumentare la sintesi e la secrezione di ECM come il collagene di tipo I, aumentano inizialmente la produzione delle collagenasi interstiziali MMP-1 (nell'uomo) [17], e -13 (nel ratto) [18] e della stromelisinasi MMP-3 [19]. Tuttavia, i livelli d'espressione diminuiscono man mano che l'attivazione progredisce, mentre il livello della maggior parte delle altre MMP rimane relativamente costante, ad eccezione delle gelatinasi MMP-2 e -9 [18]. L'aumento dell'attività dell'MMP-2 s'ipotizza sia associata all'aumento della distruzione della normale architettura epatica, favorendo l'ulteriore attivazione delle HSC [15]. Le HSC attivate inoltre aumentano l'espressione e secrezione di TIMP-1 e TIMP-2 [20,21]. TIMP-1 non solo impedisce la degradazione della ECM in rapido aumento bloccando la funzione delle MMP, ma inibisce anche l'apoptosi delle HSC attivate [22], la principale sorgente cellulare di collagene. L'effetto netto del rapido aumento della sintesi di ECM, in combinazione con l'aumentata attività di TIMP-1, è la formazione del tessuto cicatriziale fibrotico. Tale fenomeno è ulteriormente inasprito dall'incapacità del

tessuto di degradare la ECM accumulata, dal momento che l'espressione delle MMP rimane alquanto statica.

Studi recenti hanno dimostrato che se la causa del danno epatico viene eliminata, la fibrosi può regredire [23]. Uno dei principali meccanismi di risoluzione della fibrosi è l'aumentata attività collagenolitica: i collageni fibrillari vengono degradati dalle collagenasi interstiziali, la cui attività risulta aumentata in seguito alla rapida diminuzione dei livelli d'espressione di TIMP-1. Si verifica la parziale degradazione di ECM fibrillare e l'interazione alterata tra HSC attivate e ECM ne favorisce l'apoptosi [24]. Tuttavia l'eventualità che anche la cirrosi avanzata possa regredire ad un'architettura epatica normale o quasi rimane una questione dibattuta [25]. Studi sperimentali su ratti hanno dimostrato che anche in seguito ad un periodo protratto di guarigione il rimodellamento della cirrosi avanzata è limitato ed il fegato rimane cirrotico. Le aree di fibrosi che non subiscono rimodellamento sono caratterizzate da esteso *cross-linking* della ECM; inoltre, un'altra caratteristica della fibrosi irreversibile è che il tessuto cicatriziale è relativamente ipocellulare, suggerendo che la degradazione incompleta della ECM sia dovuta all'assenza degli appropriati mediatori cellulari [24].

2.1.2 Popolazioni di cellule miofibroblastiche coinvolte nella fibrosi epatica

Quale fosse la popolazione cellulare responsabile della produzione di matrice extracellulare nel fegato fibrotico è stato argomento controverso per diversi anni. Poiché le prime fasi della cascata della fibrogenesi epatica si verificano nello spazio subendoteliale di Disse, molti studi si sono focalizzati sulle cellule che circondano tale regione, e a tutt'oggi le cellule stellate epatiche sono considerate la principale sorgente di tessuto fibrotico nel fegato. Tuttavia, negli ultimi anni è emerso come altre popolazioni cellulari distinte dalle cellule stellate, ognuna con una diversa localizzazione ed un fenotipo caratteristico, contribuiscano alla fibrosi epatica [26,27] [Figura 2.2]:

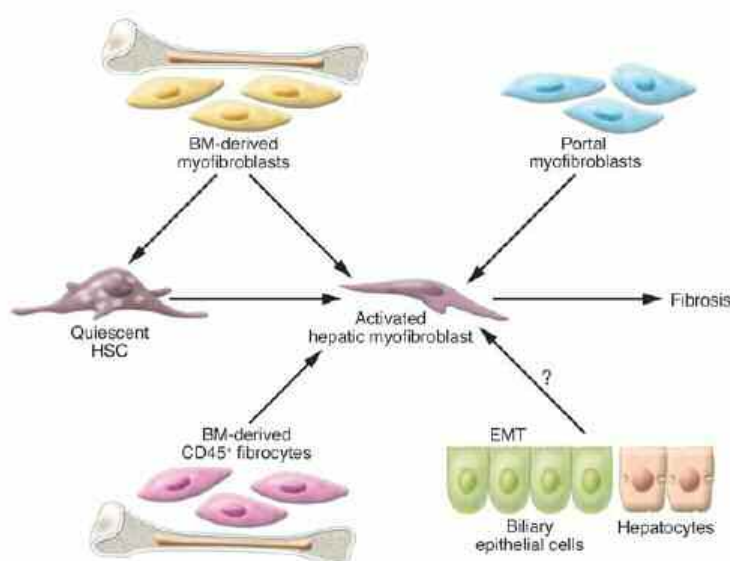


Figura 2.2 Rappresentazione schematica delle popolazioni miofibroblastiche coinvolte nella fibrosi epatica (Iredale JP. *J Clin Invest* 2007; 117:539-548).

Fibroblasti portalì e periduttali Il tessuto connettivo portale del fegato sano contiene fibroblasti quiescenti (fibroblasti portalì, PF), caratterizzati a livello fenotipico dalla presenza di vimentina e desmina e dalla mancanza di GFAP. È stato dimostrato, per lo meno nelle fasi iniziali, il coinvolgimento dei PF intorno alle strutture biliari nella fibrosi biliare indotta dalla legatura dei dotti biliari (BDL). Infatti, la proliferazione delle strutture biliari indotta dalla BDL è accompagnata dalla proliferazione dei PF, che formano strutture "a cipolla" attorno le strutture biliari. Questi PF acquisiscono un fenotipo miofibroblastico e sono coinvolti nella deposizione iniziale di ECM nelle zone portalì [28,29]. Le HSC vengono coinvolte in seguito, quando le aree portalì iniziano ad invadere il parenchima. Inoltre, le cellule epiteliali dei dotti biliari si trovano a stretto contatto con uno strato di fibroblasti periduttali (PDF), separati da esse solo da una membrana basale continua. I PDF sono stati associati a fibrosi secondaria a colestasi o danno biliare immuno-mediato [30].

Miofibroblasti derivanti dal midollo osseo Diversi studi hanno indicato il midollo osseo come una sorgente di cellule immature multipotenti in vari organi. Le cellule del midollo osseo hanno la capacità di differenziarsi in epatociti, colangiociti, cellule sinusoidali endoteliali e cellule di Kupffer se è presente l'adeguato microambiente epatico [31,32]. Questo fenomeno è stato recentemente esteso alle HSC ed ai miofibroblasti in condizioni sperimentali e cliniche. Trapiantando cellule di midollo osseo esprimenti il gene reporter GFP o cellule di midollo osseo maschili in femmine di topo, è stato dimostrato che fino al 30% delle HSC nel fegato originano dal midollo osseo ed acquisiscono un fenotipo miofibroblastico in condizioni di danno epatico [33]. Un altro studio indica che fino al 68% delle HSC ed il 70% dei miofibroblasti del fegato di topi resi cirrotici mediante somministrazione di CCl₄ derivano dal midollo osseo [34]. Anche nella fibrosi epatica umana è stato dimostrato un contributo significativo del midollo osseo alla popolazione di cellule miofibroblastiche, ma non è chiaro quale tipo specifico di cellula del midollo osseo o cellula staminale mesenchimale sia rilevante per la generazione di miofibroblasti epatici [35]. D'altra parte, l'*homing* di cellule del midollo osseo nel fegato fibrotico sembra avere un effetto positivo sulla risoluzione della fibrosi epatica, poiché queste cellule producono metalloproteinasi, che aumentano la degradazione della matrice extracellulare fibrotica [36].

Fibroblasti I fibrociti rappresentano una fonte sistemica di miofibroblasti contrattili in varie lesioni fibrotiche, quali la fibrosi polmonare, i cheloidi, lo scleroderma e la fibrosi renale [37]. Si tratta di una sottopopolazione di leucociti circolanti, caratterizzati da un fenotipo di superficie unico CD45⁺ (origine emopoietica), CD34⁺ (cellula progenitrice) e collagene di tipo I⁺ (capacità di sintetizzare matrice) [38], ed esibiscono potenti attività immunostimolanti [39]. Uno studio sperimentale ha dimostrato che i fibrociti sono coinvolti anche nel processo di fibrogenesi epatica e che possono differenziarsi in miofibroblasti produttori collagene in risposta al TGFβ *in vitro* [40]. Utilizzando come modello di fibrosi la BDL, tale studio ha provato che il 5-10% delle cellule produttori collagene di tipo I nel fegato fibrotico sono fibrociti che originano dal midollo osseo.

Epatociti e colangiociti Un numero crescente di studi sperimentali indica un altro meccanismo per l'accrescimento del *pool* di fibroblasti residenti (locali) durante la fase di riparazione del danno, ad esempio nel rene e nel polmone [41]. Questo processo, denominato transizione epitelio-mesenchima (EMT), è ben noto nel contesto dello sviluppo embrionale, ma viene attualmente analizzato come importante meccanismo nella generazione dei fibroblasti durante la fibrogenesi nei tessuti adulti [42]. Le principali molecole induttrici dell'EMT sono il TGF- β , il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita insulino-simile-II (IGF)-II ed il fattore di crescita fibroblastico 2 (FGF)-2.

Studi recenti hanno analizzato l'EMT anche nella fibrogenesi epatica, dopo che è stata verificata la transizione di epatociti albumina-positivi a fibroblasti albumina-negativi e proteina fibroblasto-specifica1 (FSP1)-positivi *in vitro*. Tale studio ha dimostrato in un modello sperimentale di fibrogenesi epatica che circa il 40% dei fibroblasti presenti nel fegato fibrotico deriva dagli epatociti [43]. Un altro studio molto recente prova l'EMT d'epatociti murini maturi *in vitro* e della linea cellulare murina AML12 [44]. Lo stato di EMT è stato indicato dalla forte *upregulation* dell'espressione dell'mRNA del procollagene $\alpha 1(I)$ e dalla deposizione di collagene di tipo I. L'induzione dell'EMT per azione del TGF- β negli epatociti murini è stata dimostrata avvenire mediante l'attivazione della fosforilazione delle Smad2/3, inibizione di Smad4 mediante siRNA ed induzione del fattore di crescita Snail1 [44]. Il TGF- β induce EMT solo degli epatociti che resistono all'effetto pro-apoptotico di questa citochina [45,46]. La sottopopolazione di epatociti che sopravvive in seguito a stimolazione con il TGF- β mostra una sovraespressione di Snail che conferisce resistenza alla morte cellulare programmata.

Anche i colangiociti (cellule epiteliali dei dotti biliari) sono stati coinvolti nel processo di EMT nella fibrogenesi epatica. Nella cirrosi biliare primitiva è stato dimostrato che le cellule dei dotti biliari esprimono FSP-1 e la vimentina, marcatori precoci di fibroblasti [47]. Conseguenze dell'EMT dei colangiociti sono la duttopenia e l'ampliamento del *pool* di fibroblasti portalari, che contribuiscono significativamente alla fibrosi portale. Studi *in vitro* con colangiociti umani hanno confermato le osservazioni cliniche descritte. Perciò, l'EMT rappresenta un principio di patogenesi generale delle malattie colestatiche croniche del fegato [48]. Ciò sottolinea l'origine eterogenea dei miofibroblasti nella fibrogenesi ed enfatizza l'importanza della patologia epatica fibrotica sottostante [49].

Altre cellule fibrogeniche Miofibroblasti "*second-layer*", localizzati intorno le vene centrolobulari e descritti da Bhunchet e Wake [50], fibroblasti presenti nella capsula di Glisson (fibroblasti capsulari) e cellule vascolari potrebbero essere coinvolte nella fibrogenesi. Ad esempio, le cellule vascolari presenti sulle pareti delle venule e delle arterie portalari sono state implicate nella tipica fibrosi portale/peroportale osservata nella schistosomiasi cronica [51].

2.2 Le cellule stellate epatiche (HSC)

Le cellule stellate epatiche (hepatic stellate cells, HSC) furono per la prima volta descritte nel 1876 da Carl Von Kupffer che, utilizzando come metodo di colorazione il cloruro d'oro, rivelò una popolazione di cellule a forma di stella localizzate perisinusoidalmente e le interpretò inizialmente come cellule perivascolari del tessuto connettivo, poi come fagociti. La funzione di queste cellule rimase tuttavia ignota fino al 1952, quando Toshio Ito osservò al microscopio ottico cellule perisinusoidali contenenti granuli lipidici in fegati umani e le chiamò cellule "fat-storing". Nel 1971, Kenjiro Wake concluse che le cellule descritte da Kupffer erano identiche a quelle descritte da Ito e dimostrò inoltre che l'autofluorescenza delle goccioline lipidiche così come la loro reattività con il cloruro d'oro era dovuta alla presenza di vitamina A. Successivamente Kent e Popper dimostrarono che le cellule stellate epatiche sono strettamente associate alla patogenesi della fibrosi epatica. Da allora, queste cellule sono state studiate in dettaglio [52].

Le cellule stellate epatiche costituiscono circa 1/3 della popolazione cellulare non parenchimale del fegato e rappresentano il 5-8% dell'intera popolazione cellulare epatica. Nel fegato umano vi sono approssimativamente 10 cellule stellate ogni 100 epatociti e la distanza nucleo-nucleo media è di 40 μm . Esse si localizzano a livello dello spazio di Disse a stretto contatto con gli epatociti e le cellule endoteliali che delimitano il sinusoidale epatico. Le cellule stellate compaiono nel fegato umano durante la seconda metà del terzo mese di sviluppo embrionale ed alla nascita non hanno ancora raggiunto la forma e la grandezza definitiva [52]. L'origine embrionale delle HSC non è stata tuttavia ancora risolta, dato che esprimono marcatori tipici di tutti e tre i foglietti germinativi: alcuni studi favoriscono un'origine mesenchimale, altri una endodermica ed altri ancora una neuro-ectodermica [53].

Dal punto di vista morfologico le HSC sono caratterizzate da lunghe estroflessioni citoplasmatiche, che conferiscono la tipica forma a stella, e dalla presenza di numerosi granuli lipidici di vitamina A del diametro di 1-2 μm , ritenuta per molto tempo l'unica caratteristica morfologica e funzionale di tali cellule [54]. Si tratta di una popolazione cellulare eterogenea, le cui caratteristiche (contenuto di vitamina A, proteine citoscheletriche) possono variare a seconda della localizzazione nel lobulo epatico e della specie animale d'appartenenza. Così le HSC situate nella zona periportale (zona 1 del lobulo epatico) hanno processi citoplasmatici più corti e contengono granuli di vitamina A di piccole dimensioni. Le HSC presenti invece nella zona 2 evidenziano abbondanti depositi di granuli lipidici che tendono nuovamente a ridursi procedendo verso la zona centrolobulare (zona 3), dove le HSC assumono anche una forma allungata [55].

Queste cellule perisinusoidali normalmente contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del fegato tramite la secrezione di fattori di crescita, l'immagazzinamento di vitamina A e la produzione di componenti della matrice essenziali per l'integrità strutturale dello spazio di Disse, quali il collagene di tipo IV, la laminina e, in piccole quantità, il collagene di tipo I e III [52]. Le HSC partecipano inoltre al turnover della ECM epatica mediante la secrezione di metalloproteinasi (MMP-2,-3,-10,-13,-14) e dei loro inibitori (TIMP-1,-2) [56, 57].

Recenti lavori inoltre attribuiscono alle HSC un ruolo attivo nel processo flogistico epatico e una possibile funzione di periciti. Infatti, sono in grado di produrre NO, varie citochine proinfiammatorie e sostanze chemotattiche, richiamando cellule mononucleate nel tratto portale e nel lobulo epatico in corso di infiammazione [58, 59]. In vitro, la stimolazione di HSC con sostanze vasocostrittrici quali trombassano, prostaglandina F₂, endotelina-1, angiotensina II, vasopressina e sostanza P induce una risposta di tipo contrattile, suggerendo quindi un possibile coinvolgimento di tali cellule nella patogenesi dell'ipertensione portale [60, 61]. Studi recenti hanno proposto le HSC come cellule presentanti antigene (APC) intraepatiche professionali, in grado di attivare linfociti T e di modularne la risposta specifica contro antigeni di natura proteica e lipidica [62, 63].

Altre proprietà di queste cellule sono state scoperte di recente: circa il 20-40% delle HSC sono caratterizzate da un fenotipo di cellule progenitrici CD133⁺ capaci di differenziarsi in cellule endoteliali ed epatociti suggerendone un importante ruolo nella rigenerazione epatica e nella riparazione [64], sono coinvolte nell'endocitosi delle cellule parenchimali apoptotiche [65], favoriscono la rigenerazione epatica stimolando la proliferazione epatocitaria in seguito a differenziazione supportata dal recettore p75^{NTR} [66], e sono implicate nella regolazione dell'angiogenesi e del rimodellamento vascolare mediante la secrezione di fattori angiogenici [67]. Alcune di queste funzioni, tuttavia, non sono espresse nelle HSC allo stato quiescente ma sono conseguenza della loro attivazione innescata da mediatori infiammatori in seguito a danno epatico.

2.2.1 Il processo d'attivazione delle HSC

In corso di danno epatico, le HSC vanno incontro ad un processo d'attivazione acquisendo un fenotipo simile ai miofibroblasti [68]. La transdifferenziazione delle HSC, documentata in numerosi studi in vivo ed in vitro, è un processo graduale ed è caratterizzata dalla perdita dei granuli di vitamina A e da un aumento dell'espressione di miofilamenti quali l' α -actina del muscolo liscio. Le HSC attivate inoltre perdono la tipica forma a stella, acquistano una marcata capacità proliferativa e contrattile ed evidenziano un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso, indice di attivazione dei sistemi di sintesi [68]. La transdifferenziazione delle HSC comporta, infatti, un drammatico aumento della sintesi di collagene di tipo I e III, fibronectina e TIMP.

L'attivazione in vivo delle HSC viene vista come un meccanismo a cascata in tre fasi finemente regolato [Figura 2.3]. Durante l'iniziazione (o fase pre-infiammatoria) avvengono rapidi cambiamenti nell'espressione genica e nel fenotipo che rendono le HSC responsive alle citochine ed a stimoli locali. Gli epatociti danneggiati rilasciano sostanze ad azione mitogena che agendo in maniera paracrina danno inizio alla proliferazione delle HSC al fine di rimarginare il danno nel parenchima. Nella successiva fase di infiammazione, le HSC pre-attivate sono ulteriormente stimulate in maniera paracrina dalle cellule di Kupffer e dall'infiltrato infiammatorio, responsabili del rilascio di citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le cellule endoteliali invece producono una variante di splicing della fibronectina cellulare (isoforma EIIIA) che favorisce l'attivazione delle HSC e, attivando la plasmina, convertono il TGF- β 1 latente nella forma fibrogenica. L'attivazione delle HSC

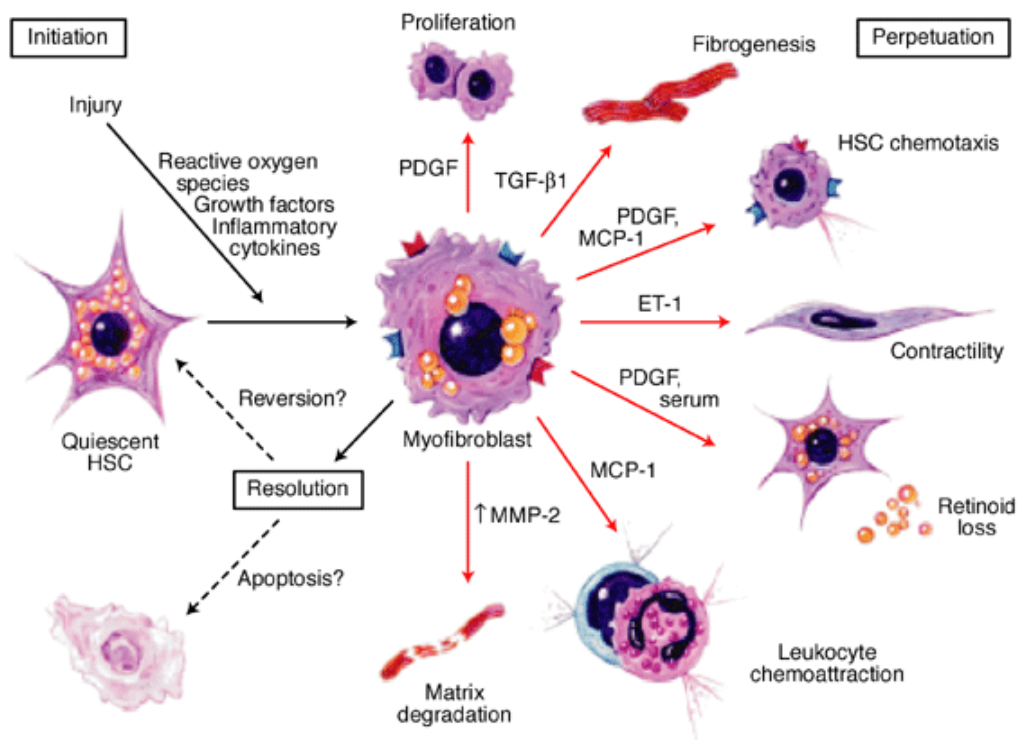


Figura 2.3 Caratteristiche fenotipiche delle cellule stellate epatiche attivate in corso di danno epatico (Hui AY. *Exp Rev Mol Med* 2003; 5: 1-23).

viene in seguito perpetuata durante la fase post-infiammatoria (perpetuazione), quando vari fattori di crescita agiscono in maniera autocrina sulle stesse HSC già attivate o in modo paracrino su HSC ancora allo stato quiescente. Durante questa fase anche il continuo rimodellamento della ECM contribuisce significativamente alla progressione dell'attivazione delle HSC [69].

L'attivazione e la transdifferenziazione delle HSC è dunque il risultato di molteplici interazioni con diverse popolazioni cellulari, residenti o infiltranti il fegato, che sintetizzano e rilasciano fattori solubili. I mediatori cellulari più rilevanti sono le specie reattive dell'ossigeno (radicali idrossilici, radicali dell'ossigeno, anione superossido, perossido d'idrogeno) prodotte dalle cellule di Kupffer [70], dall'attività della NAD(P)H ossidasi nelle HSC [71], dal metabolismo dell'etanolo mediato dal citocromo P4502E1 (CYP2E1) negli epatociti [72] e dai leucociti [73]. Inoltre, anche l'acetaldeide prodotta dal metabolismo dell'etanolo dagli epatociti [74] e l'ipossia tissutale [75] supportano l'attivazione delle HSC. Tra i mediatori peptidici, il TGF- β è la citochina pro-fibrogenica più importante [76]. Altre citochine e fattori di crescita coinvolti nel processo d'attivazione sono il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), l'endotelina-1 (ET-1), diversi fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-I), il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , le adipochine (leptina, adiponectina) ed altri fattori in parte legati alla ECM [77]. La matrice infatti funge da "spugna" per diversi fattori di crescita fissati in maniera covalente e non alla fibronectina, ai proteoglicani ed al collagene, impedendone così la degradazione e presentandoli per l'interazione con recettori cellulari di membrana, portando alla stimolazione

di vie di segnale intracellulare. Queste cascate di segnale essenzialmente controllano l'induzione dell'espressione genica e della risposta fibrogenica delle HSC durante la fibrosi epatica [Figura 2.4].

Il PDGF è il più potente fattore mitogeno per le HSC, poiché promuove la proliferazione e la migrazione di HSC isolate da ratto, topo o uomo. Il PDGF è un dimero costituito da due catene polipeptidiche, A e B, che si possono assemblare formando tre possibili forme (AA, BB o AB). Sono state inoltre riportate due subunità recettoriali per il PDGF: la α , in grado di legare sia la catena A che B, e la β , specifica per il peptide BB [78]. Nonostante tutte le isoforme del PDGF siano attive, il PDGF-AA è meno attivo rispetto a PDGF-BB o AB nelle HSC, suggerendo un'espressione predominante del recettore PDGF- β sulla superficie di tali cellule; i recettori del PDGF risultano aumentati in seguito all'attivazione delle HSC [79]. Questi recettori, che hanno attività tirosin-chinasica intrinseca, dimerizzano e si autofosforilano in seguito a legame con il loro ligando. In questa conformazione il recettore diventa sito d'ancoraggio per molte molecole di segnale intracellulare quali Grb2 che recluta mSos, seguita dall'attivazione di Ras e la traslocazione di Erk al nucleo, che media la proliferazione e la chemiotassi nelle HSC in coltura [80]. L'inibizione dell'attività di Erk sopprime completamente la mitogenesi indotta dal PDGF, insieme all'attività di legame al DNA di AP-1 e STAT1, e riduce parzialmente la chemiotassi indotta dal PDGF. PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) è un'altra molecola reclutata dal recettore PDGF- β . Mediante PI3K diverse molecole quali PKC e c-Akt vengono attivate inducendo vie di segnale che mediano la mitogenesi e la migrazione ERK-indipendente. La risposta proliferativa al PDGF richiede inoltre il consumo di $[Ca^{2+}]_i$ proveniente dallo spazio extracellulare e l'aumento del pH intracellulare [81].

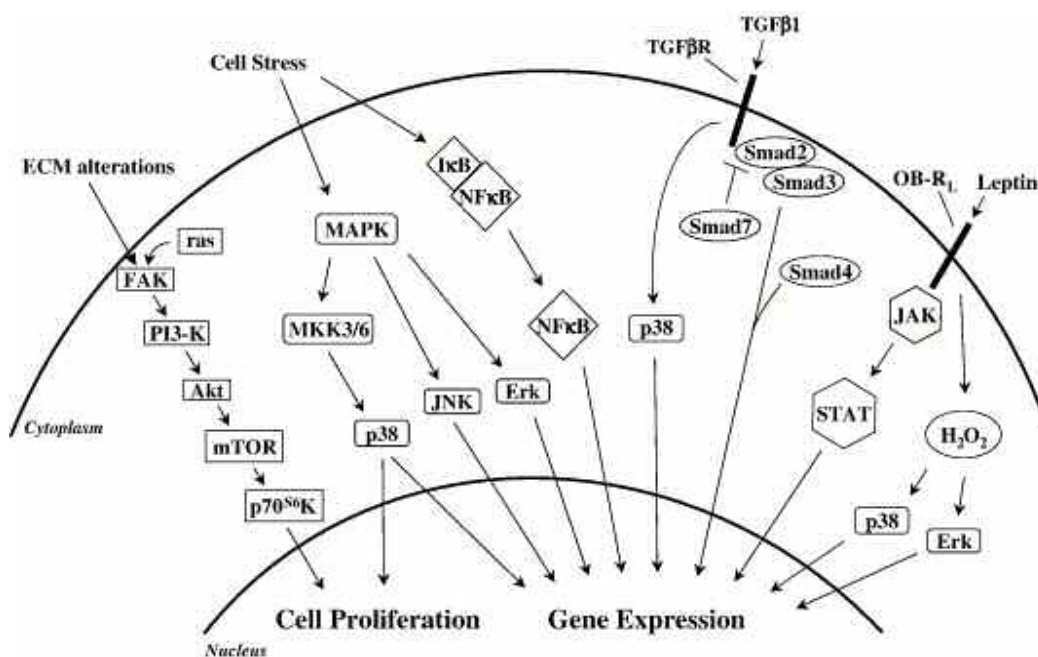


Figura 2.4 Rappresentazione schematica delle principali cascate di segnale in funzione nelle cellule stellate epatiche attivate (Tsukada S. *Clin Chim Acta* 2006; 364:33-60).

Anche l'espressione di tutte e tre le isoforme del TGF- β , la più potente citochina pro-fibrogenica per le HSC, ed i suoi recettori risultano aumentati nelle HSC attivate [82]. Gli effetti pro-fibrogenici o proliferativi del TGF- β sono mediati da specifici recettori (TGF β RI e TGF β RII) che regolano l'attivazione di proteine della famiglia Smad mediante fosforilazione [83]. In seguito ad attivazione, il complesso proteico Smad 2/3-Smad4 trasloca nel nucleo dove è coinvolto nella regolazione dei fattori di trascrizione dei geni target del TGF- β come il collagene di tipo I. Il TGF- β è in grado di attivare anche Ras e Raf-1, a cui segue l'attivazione di Erk nelle HSC di ratto con un meccanismo PDGF-indipendente. Il TGF- β può inoltre attivare la via di segnale p38 MAPK, mediata a monte da TGF- β -activated kinase-1 (TAK1) e MKK3/6 [84]. Il TGF- β , che viene secreto in forma inattiva latente dalle HSC attivate, dalle cellule endoteliali sinusoidali, dalle cellule di Kupffer, dagli epatociti e dalle piastrine [85, 86] non solo inizia l'attivazione delle HSC, ma aumenta anche l'espressione genica di componenti della ECM, riduce la loro degradazione diminuendo l'espressione di MMP-1 e aumentando quella della TIMP-1, induce l'apoptosi di epatociti [87, 88], ed inibisce la proliferazione cellulare epatica [89, 90]. L'attivazione extracellulare del TGF- β latente da parte di proteasi, radicali dell'ossigeno, trombospondina di tipo I e di integrine α v β 6 è una fase importante nella regolazione della biodisponibilità del TGF- β [91]. Nelle HSC attivate inoltre il TGF- β induce la produzione del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), un peptide in grado di stimolare la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi di matrice extracellulare e sovraespresso nel fegato fibrotico [92]. La produzione di CTGF aumenta durante l'attivazione cellulare delle HSC in vitro e ne influenza la migrazione, la proliferazione e l'adesione [93].

Oltre ai cambiamenti che avvengono in seguito all'attivazione delle HSC che direttamente contribuiscono alla natura fibrogenica di tali cellule, si verificano diversi altri cambiamenti che partecipano allo sviluppo della patologia epatica. L'attivazione delle HSC è associata ad un aumento della contrattilità cellulare, che rappresenta un importante meccanismo sottostante l'aumentata resistenza portale in corso di epatopatia cronica. L'endotelina-1 (ET-1), un potente vasocostrittore, è il principale stimolo contrattile ed induce fibrogenesi mediante il suo recettore di tipo A (ETA) [94]. Tra le citochine vasoattive, l'angiotensina II sembra avere un ruolo importante nella fibrogenesi, dato che induce la proliferazione, la migrazione, la secrezione di citochine pro-infiammatorie e la sintesi di collagene nelle HSC attivate. L'angiotensina II è un peptide effettore del sistema renina-angiotensina, che partecipa alla regolazione dell'omeostasi della pressione arteriosa nell'uomo. Componenti chiave di questo sistema sono espressi localmente durante epatopatia cronica, e HSC attivate generano de novo angiotensina II [95].

Anche le adipochine, che sono citochine derivanti principalmente dal tessuto adiposo, contribuiscono alla regolazione della fibrogenesi epatica. La leptina in particolare potrebbe avere un ruolo diretto nella fibrosi epatica associata a steatosi. Le HSC producono leptina e la sua sintesi aumenta in seguito ad attivazione. Le azioni della leptina sono mediate dal suo recettore Ob-R, che esiste in forma lunga (Ob-RL) o breve (Ob-RS) [96]. L'espressione del recettore Ob-RL aumenta nelle HSC attivate ed in seguito a legame con la leptina trasmette il segnale attraverso la via JAK-STAT [97], inducendo la proliferazione e favorendo la

sopravvivenza delle HSC coltivate mediante la sovraespressione del recettore del PDGF e la fosforilazione di ERK1/2 e Akt [98, 99].

Una delle più recenti scoperte nella biologia delle HSC riguarda il loro possibile ruolo nel processo infiammatorio che precede o coesiste con la fibrogenesi. L'infiltrazione dello spazio portale e del lobulo epatico da parte di cellule mononucleate è una delle caratteristiche principali dell'epatite cronica e consegue all'espressione di fattori solubili in grado di promuovere il reclutamento e la differenziazione di cellule infiltranti. Le HSC attivate sono in grado di produrre fattori chemiotattici quali il peptide chemiotattico per i monociti (MCP)-1, un monomero di 76 aminoacidi, significativamente sovraespresso nel tessuto epatico di pazienti con epatite cronica attiva ma assente nel fegato normale [100]. Oltre a MCP-1, le HSC umane attivate esprimono e secernono in vitro altre citochine pro-infiammatorie quali interleuchina (IL)-6, IL-1 α , IFN- γ e TNF- α [101]. Tra questi fattori solubili, IL-6 è una proteina di fase acuta che gioca un ruolo importante nelle risposte non specifiche del sistema immunitario contro agenti infettivi o insulti tissutali di varia origine. Le HSC isolate dal fegato di ratti sani o con cirrosi indotta sperimentalmente esprimono mRNA codificante IL-6 e rilasciano il corrispondente peptide attivo nel terreno di coltura in maniera dose e tempo dipendente in seguito a stimolazione con lipopolisaccaride, IL-1 β e TNF- α [102, 103]. HSC in coltura esprimono e secernono costitutivamente anche il fattore stimolante i macrofagi (M-CSF), che promuove la sopravvivenza, la proliferazione e l'attività dei fagociti una volta migrati nel sito di infiammazione. Inoltre le HSC sono in grado di produrre anche elevate quantità di fattore attivante le piastrine (PAF) che facilita la migrazione delle cellule infiammatorie dopo la loro adesione alla parete del sinusoidale [104].

Quando il danno epatico cronico non è chiaramente associato ad un abbondante infiltrato infiammatorio, altri agenti solubili possono supportare l'attivazione delle HSC mediante vie di segnale specifiche per un particolare tipo di danno. Prove di stress ossidativo sono state rilevate in quasi tutte le patologie croniche a diversa eziologia e diverso tasso di progressione della fibrosi, spesso in associazione con una diminuzione delle difese antiossidanti. Molecole associate allo stress-ossidativo come gli intermedi delle specie reattive dell'ossigeno e le aldeidi possono agire come mediatori in grado di modulare gli eventi responsabili della progressione della fibrosi epatica. L'acetaldeide, il principale metabolita dell'etanolo, prodotti della perossidazione lipidica generati dall'esposizione all'etanolo o il sovraccarico di ferro possono contribuire alla perpetuazione dell'attivazione delle HSC.

Non è noto se le HSC una volta attivate possano ritornare ad uno stato quiescente in vivo, sebbene tale fenomeno sia stato osservato in vitro. Difatti HSC attivate coltivate su Matrigel per almeno quattro giorni mostrano segni di deattivazione quali la diminuzione dell'espressione di marcatori d'attivazione (α -SMA, TIMP-1, collagene di tipo I) e della capacità proliferativa, mentre aumenta la capacità d'immagazzinare vitamina A [105, 106]. Un altro stimolo che potrebbe controllare la regressione allo stato quiescente è l'interleuchina-10 (IL-10), una citochina anti-infiammatoria che aumenta l'attività delle collagenasi interstiziali [107]. L'IL-10 è indotta durante l'attivazione delle HSC, fornendo un segnale autocrino a feedback negativo. È probabile invece che l'apoptosi rappresenti il

principale destino delle HSC attivate durante la guarigione. L'apoptosi delle HSC associata alla riduzione dell'espressione di TIMP-1 è stata infatti osservata durante la fase di regressione della fibrosi indotta sperimentalmente [108].

2.2.2 Regolazione trascrizionale dell'attivazione delle HSC

L'attivazione delle HSC è un processo associato a numerosi cambiamenti nel pattern d'espressione genica, controllato da variazioni nell'espressione e/o attività di molecole regolatrici della trascrizione. Molti studi si sono perciò focalizzati sulla caratterizzazione di fattori di trascrizione implicati nell'iniziazione e perpetuazione dello fenotipo attivato delle HSC. Tra le principali famiglie di fattori di trascrizione che regolano le proprietà profibrogeniche delle HSC vi sono:

NFκB Il fattore nucleare κB è composto da etero- o omo-dimeri di proteine appartenenti alla famiglia Rel (p65, p50, p52, c-Rel e RelB). Il livello d'attività cellulare di NFκB è determinato dai suoi inibitori naturali, tra i quali IκB-α è quello meglio caratterizzato [109]. IκB-α regola l'attività di NFκB sequestrando nel citoplasma il fattore di trascrizione mediante interazione diretta. Diversi stimoli tra i quali citochine, specie reattive dell'ossigeno e stress cellulare sono in grado di iniziare una cascata di trasduzione del segnale che si conclude con la degradazione mediata dal proteasoma di IκB-α ed il rilascio di NFκB attivo, che così può traslocare nel nucleo dove stimola la trascrizione di geni contenenti *NFκB DNA binding motifs* (GGGRNNYYCC) [110].

Diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione delle HSC è associata ad un aumento dell'attività basale di NFκB e ad una persistente riduzione dell'espressione di IκB-α. Le HSC attivate esprimono principalmente il complesso p65:p50 ed a livelli inferiori anche l'omodimero p65 ed un terzo complesso NFκB non ancora definito [111, 112]. Di conseguenza, vengono espressi geni quali l'IL-6, la molecola d'adesione intracellulare-1 (ICAM-1), la ciclossigenasi 2 (COX-2) e l'IL-8. NFκB inoltre conferisce resistenza all'apoptosi indotta dal TNF-α, favorendo così la perpetuazione dello stato attivato delle HSC [113].

AP-1 Il fattore di trascrizione AP-1 è costituito da proteine della famiglia Jun (c-Jun, JunB e JunD) che possono formare omodimeri oppure eterodimeri con un'altra proteina Jun o con un membro della famiglia Fos (c-Fos, FosB, ΔFosB, Fra1 e Fra2). AP-1 lega sequenze palindromiche del DNA del tipo TGAC/GTCA, comunemente presenti nei promotori di geni coinvolti nel controllo della crescita, divisione e differenziazione cellulare [114].

AP-1 non è attivo in HSC quiescenti ma durante attivazione *in vitro* vengono espresse in maniera transiente c-Fos, Fra1, c-Jun e JunB, che nelle HSC attivate vengono poi sostituite in maniera costitutiva da Fra2, FosB e JunD [115]. JunD rappresenta il componente funzionalmente più importante di AP-1 nelle HSC attivate, in quanto necessario per l'induzione della trascrizione di TIMP-1 ed IL-6 [116]. L'attività costitutiva di AP-1 delle HSC attivate può essere ulteriormente stimolata e modificata in termini d'espressione di specifici fattori Jun e Fos dall'acetaldeide, citochine e fibronectina [117]. Questi agenti possono promuovere l'espressione e l'attivazione (mediante stimolazione di MAPK e di JNK) di

omodimeri c-Jun e/o eterodimeri c-Jun:Fos, che sono stati implicati nella regolazione trascrizionale di collagenasi (MMP-1 ed -13) e stromelisine (MMP-3) [118].

KLF Sequenze ricche in GC e GT o CACCC boxes sono presenti in molte regioni regolatrici di diversi geni profibrogenici espressi nelle HSC attivate. Queste sequenze rappresentano i siti di riconoscimento della famiglia di fattori di trascrizione Kruppel-simile (KLF). Le HSC attivate ne esprimono almeno tre membri: SP1, BTEB1 e KLF6, tutti in grado di regolare la trascrizione del gene del collagene $\alpha 1(I)$ [119]. KLF6 in particolare viene indotto nelle prime fasi d'attivazione delle HSC e la sua espressione viene mantenuta dal fenotipo miofibroblasto-simile. KLF6 è in grado di regolare diversi componenti della via di segnale del TGF β 1, tra i quali il TGF β 1 stesso ed i suoi recettori di tipo I e II [120].

C/EBP Anche membri della famiglia di fattori di trascrizione CCAAT/enhancer binding protein sono stati implicati come regolatori dell'espressione del collagene $\alpha 1(I)$. Sia il TGF β 1 che l'acetaldeide sono in grado di aumentare l'espressione di collagene di tipo I nelle HSC promuovendo la formazione di H₂O₂ [121, 122]. L'accumulo intracellulare di H₂O₂ stimola l'espressione dell'isoforma p35 di C/EBP β che va ad aumentare il tasso di trascrizione del collagene $\alpha 1(I)$ nelle HSC murine. D'altra parte il TNF- α induce uno spostamento nell'espressione di C/EBP β verso l'isoforma p20 che, priva di dominio di transattivazione, agisce come repressore trascrizionale del gene del collagene [123].

Fattori di trascrizione E-box Gli elementi E-box sono costituiti da motivi CANNTG e legano membri della famiglia di fattori di trascrizione basic helix-loop-helix (bHLH) [124]. MyoD fa parte di questa famiglia e agisce in cooperazione con fattori di trascrizione miogenici quali Myf5, myogenin, MRF4 e MEF2 per regolare la differenziazione di cellule del muscolo scheletrico [125]. Recentemente è stato osservato che anche le HSC attivate umane e di ratto esprimono una forma biologicamente attiva di MyoD [126]. Fattori E-box sono stati implicati come regolatori trascrizionali del gene del mannosio 6-fosfato/ fattore di crescita insulino-simile II (M6P/IGFIIIR), importante per la fibrogenesi in quanto in grado di legare il TGF- β latente alla superficie della cellula promuovendone l'attivazione [127]. Anche il gene dell' α -SMA presenta due elementi E-box ed il più vicino al sito d'inizio di trascrizione è stato dimostrato essere sito di riconoscimento per c-Myb ed NF κ B [128]. L'inibizione dell'espressione di c-Myb mediante oligonucleotidi antisenso ha determinato il blocco del processo d'attivazione delle HSC secondo criteri morfologici.

PPARs Il PPAR- γ (peroxisome proliferators activated receptor- γ) fa parte della superfamiglia di recettori steroidei/tiroidei nucleari ormonali implicata in patologie metaboliche come il diabete ed esplica la sua funzione sottoforma di eterodimero con il retinoid X receptor (RXR) [129]. È stato dimostrato che l'attività del PPAR- γ diminuisce nelle HSC umane e di ratto attivate in coltura ed in vivo [130, 131], suggerendone quindi la possibile funzione d'inibitore dell'attivazione delle HSC. Poiché sono disponibili molti ligandi

del PPAR- γ che ne promuovono l'attività trascrizionale, esso viene considerato un possibile target terapeutico.

2.3 Il fattore di trascrizione Snail1

Il membro della superfamiglia di fattori di trascrizione Snail, *snail*, è stato descritto per la prima volta in *Drosophila melanogaster*, dove si è rivelato essenziale per la formazione del mesoderma. Da allora, sono stati identificati diversi omologhi di *snail* in varie specie. I vertebrati ne esprimono tre isoforme: Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) e Snail3 (Smuc) [132].

I fattori di trascrizione Snail sono caratterizzati da una struttura simile, contraddistinta da un dominio carbossi-terminale conservato legante il DNA e contenente da 4 a 6 ripetizioni zinc finger di tipo C₂H₂. I membri della superfamiglia Snail agiscono come repressori trascrizionali legandosi alla sequenza E-box CAGGTG, motivo bersaglio anche dei fattori di trascrizione del tipo basic helix-loop-helix. Per molti membri della famiglia Snail, un dominio SNAG (Snail/Gfi) localizzato nella regione ammino-terminale aumenta l'attività di repressione trascrizionale [133] [Figura 2.5].

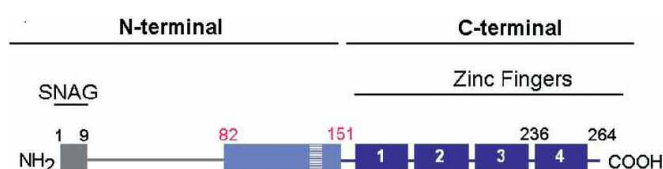


Figura 2.5 Rappresentazione grafica della struttura di Snail1 (*Mol Cell Biol* 2003 [148])

Snail1 è stato ampiamente studiato per il suo ruolo nella EMT durante lo sviluppo embrionale. L'espressione di Snail1 è necessaria per l'adeguata formazione del mesoderma: topi knock-out per Snail1 formano un foglietto mesodermico con caratteristiche epiteliali e muoiono precocemente durante la gastrulazione [134]. Snail1 è necessario anche per la formazione del mesoderma mediata dall'EMT nello zebrafish e per la migrazione delle cellule della cresta neurale nel topo [133] ed in *Xenopus* [135]. L'espressione esogena di Snail1 porta sia alla sottoespressione di geni epiteliali quali desmoplakina [136], Muc-1, citocheratina-18 [133, 137], occludine e claudine [138], sia all'induzione di marcatori mesenchimali, come vimentina [136], fibronectina [136, 139] e MMPs [139]. Il gene bersaglio di Snail maggiormente studiato è l'E-caderina, una caderina di tipo 1 e una delle principali componenti delle giunzioni intercellulari epiteliali. Snail1 reprime direttamente la trascrizione della E-caderina legandosi all'E-box del suo promotore [140], provocando la downregulation della E-caderina e la conseguente disgregazione delle giunzioni intercellulari E-caderina-dipendenti [136, 140]. Snail1 è risultato inoltre un potente fattore di sopravvivenza: cellule che lo esprimono restano in vita sebbene private di fattori di sopravvivenza e sono resistenti a stimoli apoptotici diretti e a danni al DNA [141-143].

Snail1 è dunque una proteina pleiotropica che necessita di una fine regolazione. A livello trascrizionale, è stato dimostrato che la sua espressione è regolata dall'attività di vie di segnale quali ERK2, GSK-3 β /NF κ B e PI3K [144-146]. Inoltre, Snail1 è in grado di inibire la propria espressione, creando un *loop a feed-back* negativo, legandosi ad una sequenza E-box presente nel proprio promotore [147]. A livello post-trascrizionale, è stato recentemente

dimostrato *in vitro* che l'attività di Snail1 è regolata da fosforilazione, che, a sua volta, ne regola la localizzazione intracellulare [148-150]. L'esportina CRM1, che controlla la traslocazione di proteine dal nucleo al citoplasma, è coinvolta nell'esportare Snail1 fosforilata, inibendo così l'attività del fattore trascrizionale [148]. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), una chinasi coinvolta nelle vie di segnale PI3K, Wnt e MAPK, regola Snail1 mediante fosforilazione in due *consensus motif* diversi: uno (*motif 2*; ₁₀₇SPAPSSFSSTSASSLE) ne promuove l'esportazione dal nucleo, l'altro (*motif 1*; ₉₅DSGKSSQPPS) ne induce la degradazione [149]. Secondo questo modello inizialmente GSK-3 β si lega e fosforila Snail1 sul *motif 2* inducendone l'esportazione dal nucleo; in seguito nel citoplasma GSK-3 β fosforila il *motif 1* inducendo l'associazione di Snail1 con β -Trcp e la conseguente degradazione proteasomica. Snail1 può essere fosforilata anche da p21-activated kinase-1 (PAK1) [151] o dallo *zinc transporter* LIV-1 [152]. PAK1 promuove la localizzazione nucleare di Snail1 fosforilandola in Ser246. Sebbene il meccanismo mediante il quale LIV-1 dirige Snail1 al nucleo non sia stato ancora chiarito, LIV-1 è un target a valle di STAT3, che può essere attivato da Src o attivato costitutivamente da recettori tirosin-chinasici mutati [153]. La sovraespressione di PAK1, LIV-1 o di entrambe aumenta l'attività di repressore trascrizionale di Snail1 concentrandola nel nucleo.

La maggior parte delle vie di segnale che inducono Snail1 e l'EMT durante lo sviluppo embrionale hanno la loro controparte in processi patologici come la progressione tumorale. Difatti, l'induzione dell'EMT costituisce la prima fase del processo che porta alla formazione di metastasi, permettendo alle cellule di delaminare dal tumore primario e di intravasare nei vasi linfatici e sanguigni. Perciò, l'attivazione patologica di Snail1 porta all'acquisizione di proprietà invasive da parte di tumori epiteliali. L'analisi di biopsie tumorali provenienti da vari tessuti (mammella, stomaco, fegato, colon) ha confermato che l'espressione di Snail1 è correlata con la diminuzione dell'espressione di E-caderina, con la dedifferenziazione e l'invasività [132, 154].

2.3.1 Snail1 e fibrosi

Diversi studi hanno riportato che Snail è sovra-espressa in varie condizioni patologiche associate alla deposizione di tessuto fibroso, come durante l'EMT di cellule mesoteliali nella fibrosi renale secondaria in pazienti trattati con dialisi peritoneale [155] e a seguito dell'ostruzione uretrale unilaterale in topi [156]. Questi processi patologici possono essere indotti dal TGF- β , un potente attivatore di Snail1 e citochina con attività profibrogenica per le HSC. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che l'attivazione di Snail1 è sufficiente per indurre la fibrosi renale in topi transgenici adulti e l'attività trascrizionale di Snail1 risulta aumentata in pazienti affetti da fibrosi renale [157]. Esperimenti *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che l'espressione di Snail1 può essere indotta in fibroblasti umani mediante il supplemento di siero ed è associata alla progressione del processo di *healing*, essendo espressa *in vivo* da fibroblasti attivati [158]. E' pertanto probabile che l'attivazione patologica di Snail1 possa essere coinvolta nel processo che conduce all'eccessiva deposizione di matrice extracellulare tipica delle malattie fibrotiche.

3. SCOPO

Un ruolo di primaria importanza nel processo di fibrogenesi è attribuito alle cellule stellate epatiche (HSC), che in corso di danno epatico si attivano ed acquisiscono un fenotipo simile ai miofibroblasti. Le HSC attivate proliferano e diventano la fonte principale di proteine della matrice alterando la composizione della ECM sia qualitativamente che quantitativamente. Sebbene molti sforzi siano stati rivolti alla comprensione dei meccanismi che controllano il processo fibrogenico epatico, i segnali intracellulari e i sistemi molecolari coinvolti nella transdifferenziazione delle HSC verso il fenotipo attivato rimangono incerti. Negli ultimi anni in relazione alla spiccata capacità transdifferenziativa delle HSC la ricerca si è focalizzata nell'individuazione dei meccanismi trascrizionali coinvolti nell'attivazione delle HSC. La regolazione e la funzione del fattore di trascrizione Snail1 nelle HSC non è stata ancora esaminata. Dato che studi recenti hanno dimostrato che l'aberrante attivazione di Snail1 è sufficiente per innescare il processo di fibrogenesi renale e che la sua espressione è associata al processo di riparazione tissutale (*healing*), essendo espresso *in vivo* da fibroblasti attivati, ipotizziamo che Snail1 possa essere candidata quale molecola coinvolta nel processo di transdifferenziazione delle HSC e di fibrogenesi epatica. Pertanto, in questo lavoro ci siamo proposti di:

1. caratterizzare il livello di espressione e la distribuzione di Snail1 in cellule stellate attivate e quiescenti *in vitro*
2. valutare l'espressione di Snail1 *in vivo* nel fegato durante il processo fibrogenico
3. determinare il significato fisiopatologico di Snail1 nel processo di transdifferenziazione delle cellule stellate

4. MATERIALI E METODI

4.1 Induzione della fibrosi epatica sperimentale

Per lo studio del processo di fibrogenesi epatica sono stati utilizzati topi Swiss (peso 40-45 g, età 10-12 settimane) di sesso maschile o femminile ottenuti dalla ditta Charles River e mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Anatomia Umana e Fisiologia dell'Università di Padova. Tutti gli esperimenti con animali sono stati condotti nel rispetto delle normative vigenti (L. 116/92). Per tutta la durata degli esperimenti gli animali hanno avuto libero accesso a cibo ed acqua.

La fibrosi è stata indotta per mezzo d'intossicazione da tetracloruro di carbonio (CCl_4), un modello di fibrogenesi epatica ampiamente utilizzato in letteratura per studi sulla fibrogenesi e diffusamente caratterizzato [159]. Il CCl_4 somministrato viene metabolizzato dal citocromo P450 a livello epatico nel radicale libero CCl_3° , che provoca la perossidazione dei fosfolipidi delle membrane cellulari epatiche con conseguente necrosi a livello della zona III del lobulo epatico. S'instaura quindi una risposta infiammatoria inizialmente dovuta all'attivazione dei macrofagi residenti epatici che secernono citochine, chemochine ed altri fattori pro-infiammatori. Oltre ad avere effetti citotossici diretti, questi fattori attraggono ed attivano altri monociti, neutrofili e linfociti dal torrente circolatorio che contribuiscono all'instaurarsi del danno epatico. Il danno epatico iniziale è poi seguito da una fase di riparazione caratterizzata dalla deposizione di collagene fibrillare indotta dal TGF β . Cicli ripetuti di danno, infiammazione e riparazione risultano nell'instaurarsi della fibrosi.

A tale scopo il CCl_4 è stato somministrato mediante iniezione intraperitoneale (25 μl /100 g peso corporeo, in rapporto 1:1 con olio d'oliva sterile) 2 volte a settimana per 8 settimane. Come controllo sono stati utilizzati animali a cui è stato somministrato solo olio d'oliva. Gli animali sono stati sacrificati il terzo giorno dopo l'ultima iniezione effettuata al termine del periodo previsto di somministrazione. Mediante puntura cardiaca è stato prelevato un campione di sangue, quindi si è proceduto alla rimozione del fegato da cui sono stati ottenuti vari campioni per le successive indagini sperimentali. Un frammento è stato fissato in formalina per le indagini istologiche, altri frammenti sono stati congelati in azoto liquido per le successive analisi biochimiche e molecolari. In alcuni esperimenti il fegato è stato rimosso asetticamente e riposto in opportuno liquido di trasporto (Hank's balanced salt solution senza Ca^{2+} e Mg^{2+}) per il successivo isolamento delle cellule stellate.

4.2 Valutazione della severità della fibrosi epatica

Analisi istologica I frammenti di fegato fissati in formalina 10% p/v sono stati inclusi in paraffina e sono state tagliate sezioni dello spessore di 4 μm . Le sezioni sono state poi colorate con ematossilina ed eosina o con Azan-Mallory, una colorazione istologica usata per distinguere le cellule dalla matrice extracellulare e per mettere in evidenza le fibre di

collagene del tessuto connettivo. Viene usato prima Azocarminio, un colorante acidofilo, che colora i nuclei molto intensamente di rosso e il citoplasma di rosso pallido. Poi viene usata la miscela di Mallory che contiene blu di anilina, orange G e acido ossalico, che colora intensamente di blu le fibre di collagene, di azzurro le mucine, di arancio le cellule del sangue e le fibre muscolari.

Per valutare quantitativamente la fibrosi è stata effettuata l'analisi morfometrica delle sezioni colorate con Azan-Mallory mediante software (ImageJ). Per ogni sezione sono stati analizzati 4 campi rappresentativi mediante fotocamera digitale ed è stata misurata l'area di fibrosi. Quindi è stata calcolata la percentuale di aree fibrotiche rispetto l'area totale della sezione.

Analisi molecolare I frammenti di fegato congelati in azoto liquido sono stati utilizzati per l'estrazione di RNA totale (par. 4.4) o proteine totali (par. 4.9). La presenza di fibrosi epatica è stata determinata mediante RT-PCR Real Time quantitativa (par. 4.7) per l'mRNA di geni marcatori di fibrosi quali l'alfa-actina del muscolo liscio (α -sma), la catena alfa del procollagene di tipo I (Col1 α 1) e mediante Western Blotting (par. 4.9) per α -sma.

Analisi biochimica Il sangue prelevato mediante puntura cardiaca è stato lasciato coagulare a temperatura ambiente e quindi centrifugato (1.000 xg per 10 min). Il siero è stato quindi raccolto ed è stata dosata la AST, quale marcatore di danno epatico. I test sono stati eseguiti presso il Laboratorio d'Analisi Chimico Cliniche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. I risultati sono riportati in U/l.

4.3 Isolamento e coltura delle cellule stellate epatiche (HSC) murine

Le cellule stellate epatiche (HSC) sono state isolate dal fegato di topi Swiss trattati o non trattati con CCl₄, secondo un protocollo già descritto in precedenza [160]. Per ogni estrazione di HSC, 4-5 animali sono stati sacrificati ed i fegati rimossi in condizioni asettiche. Il tessuto, dopo essere stato finemente sminuzzato, è stato digerito con 0,01% p/v di pronasi E di *Streptomyces griseus* (Merck), 0,05% p/v di collagenasi di tipo IV di *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) e 4 μ g/ml di DNAsi (Calbiochem) di pancreas bovino. La sospensione cellulare così ottenuta, è stata filtrata attraverso un setaccio con maglie di 100 μ m, lavata per 4 volte e risospesa in RPMI (Gibco®). Al fine di isolare le HSC, la sospensione cellulare è stata frazionata attraverso un gradiente di Percoll (Amersham Pharmacia Biotech AB). In particolare le cellule ottenute dalla digestione enzimatica sono state poste sotto tre soluzioni di Percoll a diversa densità (100%, 50% e 35% in RPMI). In seguito a centrifugazione a 1200 rpm per 30 min a 4°C, le HSC si stratificano all'interfaccia tra il Percoll 35% ed una soluzione di BSA 0,3% p/v (Sigma-Aldrich) in RPMI. Le cellule sono quindi state raccolte, ulteriormente lavate in RPMI e poste in coltura su plastica in terreno DMEM addizionato di 20% v/v FBS (Gibco®) inattivato per 30 minuti a 56°C, 2 mM L-glutammina, 0,1 mM di amminoacidi non essenziali, 1 mM di sodio piruvato, 100 U penicillina/100 μ g streptomina/0,25 μ g amfotericina B/ml (Gibco®). Le cellule sono state

poste in coltura in atmosfera controllata al 5% di CO₂ ed a 37°C. Il terreno è stato cambiato ogni giorno durante i primi due giorni di coltura e successivamente ogni tre giorni.

Negli esperimenti descritti in questo lavoro le HSC murine non sono state sottoposte a procedimento di tripsinizzazione e sono state utilizzate entro i primi dieci giorni di coltura. Le cellule utilizzate entro i primi 2 giorni di coltura sono state considerate "quiescenti", mentre le cellule coltivate per più di 7 giorni sono state considerate "attivate". In tutti gli esperimenti in cui sono state paragonate cellule a diverso stadio d'attivazione, le HSC provenivano da una stessa procedura di isolamento. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti con cellule isolate da animali diversi.

4.3.1 Caratterizzazione delle HSC murine

Le HSC murine isolate come sopra descritto sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico mediante microscopia a contrasto di fase, mediante colorazione con olio rosso per mettere in evidenza i depositi lipidici di vitamina A e mediante immunocitochimica con un anticorpo monoclonale diretto contro l' α -actina del muscolo liscio (α -SMA).

A tale scopo, le HSC appena estratte sono state seminate su vetrini per microscopia ed incubate in terreno completo. Ventiquattro ore dopo l'estrazione, le cellule sono state fissate per 1 ora in formalina 10% v/v a 4°C, lavate con acqua deionizzata e quindi trattate con olio rosso (Oil Red O) per 30 min. Dopo un ulteriore lavaggio in acqua deionizzata le cellule sono state montate su un vetrino porta oggetto ed analizzate con un microscopio Leica DC100 utilizzando obiettivi x63 e x40. Le immagini sono state ottenute mediante telecamera digitale collegata al microscopio ed elaborate con il programma Leica IM50 (Image Manager) a luce trasmessa.

La presenza e la disposizione dell' α -SMA è stata invece testata su HSC in coltura da almeno sette giorni, fissate mediante paraformaldeide al 4% p/v. Le cellule sono quindi state incubate per 30 minuti con BSA al 2% p/v e Triton X-100 allo 0,03% v/v per bloccare legami aspecifici e permeabilizzare la membrana cellulare, rispettivamente. Dopo lavaggio, sono state incubate con l'anticorpo diretto contro l' α -actina del muscolo liscio diluita 1:300 in PBS con 0,5% p/v di BSA (Sigma). Tale anticorpo viene fornito dalla ditta produttrice già coniugato a Cy3. Dopo incubazione di 1 ora a temperatura ambiente ed al buio, i vetrini sono stati lavati in PBS per tre volte e montati su vetrini porta oggetto. Le cellule sono state quindi analizzate e fotografate mediante microscopio confocale a fluorescenza (TCS-NT/SP2, Leica) utilizzando un obiettivo x63.

4.4 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit SV Total RNA Isolation System (Promega). I campioni (<30 mg di tessuto o 10⁶ cellule) sono stati omogeneizzati in 175 μ l di SV RNA Lysis Buffer (4 M guanidina isotiocianato, 0.01 M Tris pH 7.5, 0.97% v/v β -mercaptoetanol) utilizzando l'omogeneizzatore Mixer Mill MM300 (Qiagen) 5 min a 30 Hz. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 10 min, è stato raccolto il surnatante e l'estrazione proseguita secondo le indicazioni del produttore. Il protocollo di purificazione comprende una

fase di trattamento con DNase, utile per ridurre sostanzialmente eventuali contaminazioni di DNA genomico. L'RNA totale estratto è stato quindi conservato a -80°C. La quantità dell'RNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica (NanoDrop® ND-1000) alla lunghezza d'onda di 260 nm, mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti d'assorbanza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} .

4.5 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA impiegando la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina (MuLV) e utilizzando primers universali (random). Tutte le procedure sono state eseguite in cappa a flusso laminare al fine di evitare contaminazioni.

Per la retrotrascrizione (RT) si prepara una miscela costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 2,5 µM oligonucleotidi innesco universali (Random hexamers), 60 U inibitore dell' RNasi , 125 U di trascrittasi inversa MuLV, 2 µg di RNA estratto ed acqua MilliQ fino ad un volume finale di 100 µl. La miscela viene quindi posta in termociclatore (Mastercycler® Personal, Eppendorf®) per 10 minuti a 25°C seguiti da 60 minuti a 48°C e 5 minuti a 95°C.

Successivamente, 5 µl di cDNA così ottenuti sono stati amplificati utilizzando primers specifici per valutare la presenza dell'mRNA dei geni d'interesse utilizzando oligonucleotidi di sintesi disegnati in base alla sequenza genica codificante la proteina d'interesse ricavata dall'analisi della GenBank. La reazione d'amplificazione (polymerase chain reaction, PCR) è stata condotta in 25 µl di una miscela costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,2 µM primers senso ed antisense, 0,625 U Taq polimerasi (Applied Biosystems) ed acqua MilliQ. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 40 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 15 sec di denaturazione del cDNA a 95°C, ed 1 min di appaiamento/estensione alla temperatura indicata. La sequenza dei primers, le temperature di appaiamento e le dimensioni degli amplificati sono riportate in Tabella 1 per i geni murini ed in Tabella 2 per i geni umani. Gli amplificati così ottenuti sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% (p/v) (Seakem, FMC), addizionato di etidio bromuro (0,5 µg/ml) e visualizzati mediante transilluminatore a raggi UV.

4.6 Allestimento di curve standard per PCR quantitativa

4.6.1 Ligazione del prodotto di PCR nel vettore pGEM®-T (TA cloning)

Ciascuna curva standard utilizzata nella reazione di PCR quantitativa è stata preparata mediante clonaggio del rispettivo cDNA. In un primo momento sono state allestite normali reazioni di PCR utilizzando i primers riportati in Tabella 1 e 2 e cDNA di HSC come *template*. I prodotti di PCR sono stati quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% p/v e colorazione con etidio bromuro, al fine di evidenziare la presenza di un amplificato delle dimensioni attese. Il prodotto di amplificazione è stato quindi inserito nel vettore di clonaggio pGEM®-T (Promega) mediante reazione di ligazione condotta in una miscela formata da 3 Weiss unit di DNA ligasi del fago T4, 5 µl di buffer di ligazione 2x (60

Tabella 1: primers murini utilizzati. T_A = temperatura d'appaiamento, Pb = paia di basi

GENE	GENBANK ACCESSION NUMBER	SEQUENZA PRIMER	AMPLICON, PB	T _A
<i>a-sma</i>	NM_007392	FW 5'GCTGAAGTATCCGATAGAACACG3' RV 5'GGTCTCAAACATAATCTGGGTCA3'	181	63
<i>Col1a1</i>	NM_007742	FW 5'TCAGAGGCCGAAGGCAACAGT3' RV 5'CCCAAGTTCCGGTGTGA3'	76	60
<i>Dsp</i>	XM_896350	FW 5'GTGAAATATCTGGCAAACGAGAC3' RV 5'CTGAACCATGGTCTCTTGATAG3'	155	63
<i>Gapdh</i>	NM_008084	FW 5'CGGGAAGCCCATCACCA3' RV 5'CCGGCTCACCCATT3'	63	60
<i>Ilk</i>	NM_010562	FW 5'GAGAAGATGCAGGACAAGTAGGA3' RV 5'ACAAGTCCATAACTGGGGTAGT3'	152	56
<i>Mmp-9</i>	NM_013599	FW 5'ATCTTTCTAGAGACTGGGAAGGAG3' RV 5'AATAAAAGGTCAGAATCCACCCTAC3'	193	64
<i>Snail1</i>	NM_011427	FW 5'CAACTATAGCGAGCTGCAGGA3' RV 5'ACTGGGGTACCAGGAGAGAGT3'	156	63

Tabella 2: primers umani utilizzati. T_A = temperatura d'appaiamento, Pb = paia di basi

GENE	GENBANK ACCESSION NUMBER	SEQUENZA PRIMER	AMPLICON, PB	T _A
<i>Gapdh</i>	NM_002046	FW 5'TGAACGGGAAGCTCACTGG3' RV 5'GGTCCCACTGACACGTTG3'	63	60
<i>Snail1</i>	NM_005985	FW 5'ACCCCAATCGGAAGCCTAACT3' RV 5'GGTCGTAGGGCTGCTGGAA3'	75	60

mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 20 mM DTT, 10% PEG MW8000), 50 ng di vettore, dall'amplificato ed acqua fino ad un volume finale di 10 µl. La miscela, incubata a 16°C *overnight*, è stata poi utilizzata per trasformare cellule di *E.coli* DH5aF'.

4.6.2 Caratteristiche del vettore pGEM[®]-T

Il plasmide pGEM[®]-T [Figura 4.1] viene fornito nel kit "TA Cloning" (Promega) in forma linearizzata. Il plasmide lineare presenta, alle due estremità 3', delle code di dTTP a singolo filamento. I prodotti di PCR presentano, invece, alle estremità 3', dei prolungamenti costituiti da dATP. La complementarità delle basi permette la ligazione dei due frammenti di DNA, reazione catalizzata dalla DNA ligasi del fago T4. Il plasmide contiene anche il promotore lac, che controlla l'espressione batterica del gene lacZα codificante per i primi 146 aminoacidi della β-galattosidasi. La ligazione di un frammento di DNA, quale un prodotto di PCR, amplificato mediante Taq polimerasi, interrompe la continuità del gene lacZα; in questo modo il gene codificante la β-galattosidasi non viene più espresso da cellule batteriche di *E.coli* DH5a. La carenza di tale enzima dà origine a colonie batteriche di colore bianco

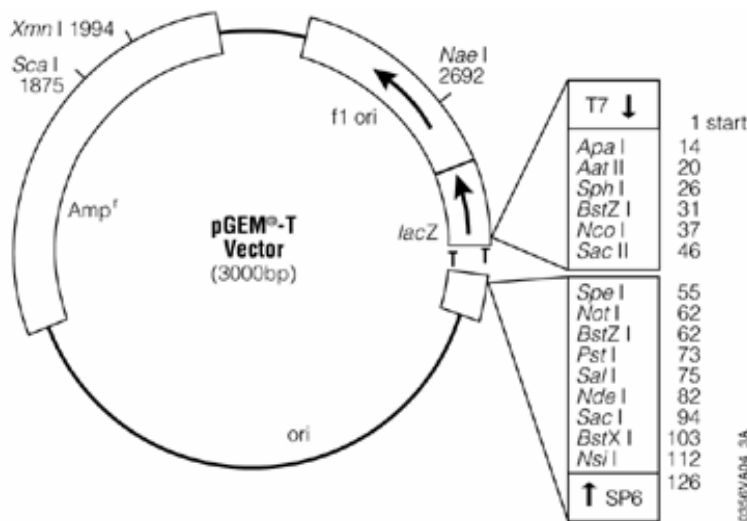


Figura 4.1

Rappresentazione schematica del vettore pGEM[®]-T (Promega): il sito di clonaggio si trova all'interno del gene lacZ; inoltre è presente il gene per la resistenza all'ampicillina.

anziché blu in un terreno di crescita arricchito con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside; 40 μl ad una concentrazione di 40 mg/ml). Nella sequenza del plasmide pGEM[®]-T è compreso anche il gene per conferire la resistenza all'ampicillina, l'origine di replicazione batterica ColE1, la sequenza di basi complementari ai primers M13 Forward e M13 Reverse.

4.6.3 Trasformazione in cellule batteriche

Per la trasformazione è stato impiegato il ceppo batterico *E.coli* DH5αF' (F'/endA1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)). I batteri sono stati coltivati in terreno LB (Luria Bertani) sia liquido (1% bactotriptone, 0,5% estratto di lievito, 1% NaCl) che solido (contenente 1,5% p/v bacto agar) a cui è stata aggiunta ampicillina alla concentrazione finale di 100 μg/ml.

Tale ceppo batterico è stato dapprima reso competente sottoponendo la coltura batterica in fase di crescita esponenziale precoce (O.D.₆₀₀=0,375) ad una serie di lavaggi con una soluzione di CaCl₂ 60 mM, glicerolo 15% v/v, PIPES 10 mM, pH 7.0 e successive centrifugazioni. Infine le cellule, risospese nella stessa soluzione, sono state suddivise in aliquote e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La trasformazione delle cellule batteriche è stata ottenuta con il metodo dello shock termico. Un volume corrispondente a 100 μl di cellule competenti è stato miscelato con l'intero volume della soluzione di ligazione (10 μl) ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente le cellule sono state sottoposte a shock termico incubando per 2 minuti a 37°C e subito dopo 5 minuti in ghiaccio. Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di terreno LB liquido e quindi sono state incubate per 1 h a 37°C in agitazione (70 rpm). Le cellule sono quindi state seminate su piastre LB-agar addizionate di ampicillina e substrato X-gal e lasciate crescere per 16 ore a 37°C. Le colonie di colore bianco (dove la continuità dalla β-galattosidasi è stata interrotta) sono state sottoposte a screening per individuare la presenza del plasmide/inserto d'interesse.

4.6.4 Verifica del clonaggio

La verifica del clonaggio del cDNA d'interesse nel plasmide pGEM[®]-T è stata eseguita mediante estrazione del DNA plasmidico da una coltura batterica di 2 ml di terreno. Dopo lisi alcalina dei batteri, il DNA plasmidico è stato purificato mediante estrazione in fenolo/cloroformio e quindi precipitato per aggiunta di isopropanolo. Il pellet, lavato con etanolo al 70%, è stato risospeso in tampone TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) contenente RNasi pancreatica alla concentrazione di 20 µg/ml. L'avvenuta inserzione del cDNA d'interesse è stata verificata mediante doppia restrizione enzimatica condotta a 37°C per due ore e successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio per visualizzare i frammenti di DNA delle dimensioni attese. I cloni che mostravano inserti di dimensioni compatibili sono stati, infine, sottoposti a sequenziamento genico (par. 4.6.5). Il clone così selezionato è stato fatto crescere in 100 ml di LB liquidi addizionato di ampicillina. Da tale coltura batterica è stato successivamente purificato il DNA plasmidico mediante plasmid Isolation Spin-Kit (AppliChem GmbH) secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

4.6.5 Sequenziamento genico

Per il sequenziamento dei frammenti genici clonati è stato utilizzato un sequenziatore automatico a 16 capillari (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems). Nella reazione di sequenziamento vengono utilizzati dideossinucleotidi terminatori (ddNTP) cui è legato un gruppo donatore di fluorescenza (fluoresceina) collegato, tramite un *linker*, ad un gruppo accettore di fluorescenza. Il *linker* assicura la massima efficienza di trasferimento di energia tra il gruppo donatore ed accettore di fluorescenza. Questi due gruppi sono associati ai ddNTP in modo tale da non interferire stericamente con la reazione di incorporazione nel filamento di DNA neosintetizzato. Ognuno dei quattro ddNTPs lega un diverso gruppo accettore, che è eccitato dalla stessa lunghezza d'onda (448 nm) ma emette il massimo di fluorescenza in un diverso intervallo di lunghezza d'onda, variabile tra 500 e 700 nm (dR110 per la guanosina nel blu, dR6G per l'adenosina nel verde, dTAMRA per la timidina nel giallo, dROX per la citidina nel rosso).

Il DNA da sequenziare è stato amplificato mediante una reazione di PCR, condotta in un volume di 10 µl contenente 500 ng di DNA plasmidico, 3,2 pmoli di primer specifico per l'inserto in esame, 1 µl di Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (contenente i quattro ddNTP terminatori marcati con i quattro fluorocromi e la polimerasi), 2 µl di buffer specifico 5x (5 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl pH 9), il tutto portato eventualmente a volume con acqua MilliQ. L'enzima che catalizza la reazione è l'AmpliTaq polimerasi che, a differenza della Taq polimerasi, è priva dell'attività nucleasica e discrimina con minor efficienza dNTP e ddNTP. La reazione di PCR di sequenza è stata condotta secondo il seguente schema ripetuto per 35 cicli: denaturazione a 96°C per 10 secondi, appaiamento a 50°C per 5 secondi, allungamento a 60°C per 4 minuti. Il DNA a singolo filamento così ottenuto viene purificato mediante precipitazione a freddo con sodio acetato 3 M e successivi lavaggi con etanolo al 95% ed al 70%. Tale purificazione permette di eliminare i terminatori di catena in eccesso che potrebbero interferire nell'analisi della sequenza. Una volta

liofilizzato, il DNA viene risospeso in 10 µl di formamide (Amresco®) e denaturato a 95°C per 2 minuti.

Il DNA così ottenuto viene quindi analizzato al sequenziatore automatico: il DNA lineare a singolo filamento viene separato per elettroforesi capillare ed illuminato con una luce a lunghezza d'onda di 448 nm. Le differenti lunghezze d'onda di emissione associate ai quattro ddNTP vengono rilevate e registrate dal software Sequencing Analysis. Analizzando quindi lo spettro di emissione di ciascun campione è possibile ricostruire la sequenza nucleotidica del DNA.

4.6.6 Preparazione della curva standard per PCR quantitativa

Dopo aver determinato mediante misura spettrofotometrica la concentrazione di DNA plasmidico, espressa in µg/µl, è stato calcolato il corrispondente numero di copie plasmidiche grazie ad un programma di foglio elettronico (MS-Excel) opportunamente impostato. Le concentrazioni espresse in µg/µl sono state computate in copie plasmidiche/µl.

Il plasmide purificato è stato quindi diluito in acqua in maniera da ottenere una diluizione iniziale pari a 10^{10} copie plasmidiche/µl. Tale soluzione è quindi stata sottoposta a diluizioni successive di un fattore 10 per ottenere concentrazioni plasmidiche decrescenti di un logaritmo fino al valore di 10^1 . La curva standard per la reazione di PCR Real Time è stata costruita amplificando 5 µl delle diluizioni comprese tra 10^6 e 10^1 contenenti quindi, all'inizio della reazione, 5×10^6 e 5×10^1 molecole di plasmide rispettivamente. Al termine della reazione d'amplificazione il software correla i valori di fluorescenza al numero di copie presenti inizialmente e, mediante una retta di regressione, è in grado di determinare il numero di copie di cDNA presenti in ogni campione analizzato.

4.7 Determinazione dei livelli di mRNA mediante RT-PCR Real-Time

Sull'RNA totale estratto e retrotrascritto in cDNA è stata eseguita la quantificazione dell'mRNA utilizzando il sistema ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer), un unico strumento risultante dalla combinazione di un termociclatore, di un rilevatore a fluorescenza laser e di software applicativi specifici. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando come sistema rilevatore il SYBR® Green I dye, un intercalante che presenta una minima fluorescenza nella miscela iniziale ed emette fluorescenza a 520 nm solo quando è legato a dsDNA. L'intensità di fluorescenza dipende quindi dalla quantità iniziale di campione. L'emissione di fluorescenza durante l'amplificazione di PCR viene analizzata da un software (SDS, Sequence Detection System software), che costruisce una curva d'amplificazione. Le misurazioni dal 3° al 15° ciclo vengono considerate rumore di fondo (livello di base) e su questi viene calcolata la deviazione standard. I valori di ciclo soglia vengono calcolati determinando il punto in cui la fluorescenza supera di 10 volte la deviazione standard del livello di base. Per determinare la concentrazione iniziale di campione, il software calcola il ciclo soglia di ogni campione e inserisce questo valore in una curva standard creata con concentrazioni note di uno standard. Il SYBR® Green è tuttavia un intercalante

estremamente aspecifico in quanto si lega a qualsiasi molecola di DNA a doppio filamento generato dalla Taq polimerasi. Al termine di ogni reazione di PCR quantitativa quindi è stata effettuata l'analisi delle curve di melting, al fine di escludere la presenza di dimeri di primers o amplificati aspecifici.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μ l in una miscela costituita da 12,5 μ l di 2x Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 μ M primers senso ed antisenso, 5 μ l di cDNA ed acqua MilliQ. La fase di denaturazione a 95°C per 10 minuti è seguita anche in queste reazioni da 40 cicli di denaturazione per 15 secondi e di appaiamento alla temperatura richiesta dai primers per 1 minuto. Ogni campione è stato analizzato in duplicato. Primers e condizioni delle reazioni di PCR sono riportati in Tabella 1 ed in Tabella 2. I trascritti mRNA specifici per ciascun gene sono stati sottoposti a quantificazione rapportandoli alle curve standard generate dall'amplificazione di diluizioni seriali in base 10 dei corrispondenti cDNAs clonati nel vettore pGEM[®]-T (Promega). In ogni esperimento lo *slope* della curva standard era costante e compreso tra i valori di -3,3 e -4,1 ed il coefficiente di correlazione 0.99. L'espressione di ciascun gene studiato è stata normalizzata utilizzando l'espressione del gene *house-keeping* GAPDH come controllo endogeno.

4.8 Immunofluorescenza (IF) ed immunoistochimica (IHC)

Al fine di valutare la presenza e la distribuzione delle proteine in esame sia a livello del fegato in animali controllo e con fibrosi sia nelle cellule stellate epatiche a diverso stadio d'attivazione, sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza. A tale scopo sezioni dello spessore di 4 μ m ottenute da campioni di fegato inclusi in OCT (DKK s.r.l.) sono state poste su vetrini portaoggetto, mentre cellule stellate epatiche appena estratte sono state seminate su vetrini coprioggetto e poste in coltura per 1-10 giorni. Le sezioni o le HSC sono state fissate per 10 minuti in PFA 4% p/v pH 7.3 e successivamente lavate per tre volte per 5 minuti con TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl). Al fine di ridurre l'autofluorescenza i campioni sono stati trattati per 10 minuti a temperatura ambiente con NH₄Cl 50 mM. In seguito è stata effettuata un'incubazione per 30 minuti con BSA (Sigma) al 2% p/v e Triton X-100 (BM Biomedicals) allo 0,03% v/v in TBS per bloccare legami aspecifici e permeabilizzare la membrana cellulare, rispettivamente. Successivamente i campioni sono stati trattati con anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse [Tabella 3] opportunamente diluito in TBS allo 0,5% p/v di BSA. Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati accuratamente lavati e quindi incubati per un'ora al buio con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con fluoroforo alla diluizione adeguata [Tabella 4]. I campioni sono stati poi lavati in TBS per tre volte. Quando richiesto, al fine di visualizzare i nuclei i campioni sono stati trattati con RNasi (Sigma) 100 μ g/ml per 20 minuti a 37°C e poi incubati 10 minuti a temperatura ambiente con ioduro di propidio 1 μ g/ml. Dopo lavaggio, le sezioni sono state coperte con vetrini coprioggetto e le cellule montate su vetrini portaoggetto. I vetrini sono quindi stati analizzati mediante microscopio confocale a fluorescenza (TCS-NT/SP2, Leica) utilizzando un obiettivo x40 o x63.

Tabella 3: Anticorpi primari utilizzati. IF = immunofluorescenza, WB = Western Blotting

ANTICORPO PRIMARIO	TIPO	AZIENDA PRODUTTRICE	WORKING DILUTION
<i>a-sma</i> (clone 1A4)	Ms mono-Cy3 TM	Sigma Aldrich	1:300 (IF)
<i>a-sma</i> (clone 1A4)	Ms mono	Sigma Aldrich	1:4000 (WB)
<i>β-actina</i> (clone AC-15)	Ms mono	Sigma Aldrich	1:5000 (WB)
<i>Snail1</i> (H130)	Rb poly	Santa Cruz Biotech	1:100 (IF)

Tabella 4: Anticorpi secondari utilizzati.

ANTICORPO SECONDARIO	AZIENDA PRODUTTRICE	WORKING DILUTION
Gt X Ms IgG-HRP	Sigma Aldrich	1:10000 (WB)
Gt x Rb IgG–Alexa Fluor 488	Invitrogen	1:200 (IF)

Le immagini sono state paragonate ad un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario.

4.9 Western Blotting (WB)

Le HSC murine appena isolate sono state seminate su piastre del diametro di 10 cm e lasciate in coltura per 1-10 g. Per estrarre le proteine totali, le cellule sono state poi lavate due volte con PBS freddo e quindi lisate in ghiaccio per 10 min mediante 100 µl di buffer di lisi [1% Triton X-100, 0.5% acido deossicolico, 10 mM EDTA, 1X Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem) in PBS]. I frammenti di fegato congelati in azoto liquido sono stati invece omogeneizzati in 250 µl di buffer di lisi [50 mM Tris HCl, pH 7.6, 0.25% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1 mM PMSF, 1X Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem)] utilizzando l'omogeneizzatore Mixer Mill MM300 (Qiagen) 5 min a 30 Hz (Quiagen) e lasciati in ghiaccio per 10 min.

I campioni sono stati quindi centrifugati a 15.000 x *g* per 30 min a 4°C. Il sovranatante è stato raccolto e la concentrazione delle proteine totali è stata determinata mediante saggio di Bradford utilizzando il Protein Assay Kit (Bio-Rad). Ad opportuna quantità di campione (60 µg di proteine totali estratte da HSC o 90 µg di proteine totali estratte da tessuto) è stato aggiunto loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% v/v glicerolo, 2% SDS 10%, 5% v/v β-mercaptoetanolo e 0.1% blu di bromofenolo). I campioni sono stati riscaldati a 100°C per 5 min prima di essere frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide e successivamente trasferiti su una membrana di PVDF (Bio-Rad). Il trasferimento è stato condotto per 1 ora a 100 mV a 4°C utilizzando buffer di trasferimento (Tris base 20 mM, glicina 150 mM, metanolo 20% v/v). Eventuali legami aspecifici alla membrana sono stati bloccati mediante incubazione a temperatura ambiente per un'ora con

blocking buffer (5% p/v latte non grasso (Oncogene), 0,05% v/v Tween-20 in PBS). La membrana è stata quindi incubata con anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse opportunamente diluito in blocking buffer (Tabella 3). L'incubazione è stata protratta per 16 ore a 4°C sotto costante agitazione. La membrana è stata quindi nuovamente lavata (tre volte per 15 minuti) in PBS-T e successivamente incubata per un'ora a temperatura ambiente con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) alla diluizione adeguata (Tabella 4) in blocking buffer. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-T, la membrana è stata sviluppata al buio per 4 minuti mediante "ChemiLucent™ detection system" (Chemicon). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante reazione con l'anticorpo coniugato HRP, fotografati con il sistema VersaDoc (BioRad) ed analizzati con il software Quantity One (Bio-Rad).

Allo scopo di verificare il frazionamento su gel di quantità uguali di proteine per ciascun campione, gli immunocomplessi sono stati staccati dalla membrana di nitrocellulosa mediante riscaldamento a 50°C per 15 min con strip buffer (Tri-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% p/v e β -mercaptoetanolo 100 mM). Dopo numerosi lavaggi con PBS, la membrana è stata nuovamente bloccata e si è proceduto al rilevamento della proteina β -actina come sopra descritto. La membrana è stata quindi nuovamente sviluppata ed analizzata.

4.10 Produzione di vettori adenovirali per silenziamento genico

Per la produzione dei vettori adenovirali è stato utilizzato il "BLOCK-iT™ Adenoviral RNAi Expression System" (Invitrogen). In tale sistema l'oligonucleotide codificante lo shRNA d'interesse viene clonato in un vettore di trasferimento (pENTR™/U6). Il plasmide risultante viene poi sottoposto a ricombinazione LR con pAd/BLOCK-iT™-DEST, il plasmide costituito dal DNA virale privo delle regioni E1 ed E3. I costrutti adenovirali ricombinanti vengono poi tagliati con Pac I per far esporre le regioni ITR e transfettati in cellule 293A (cellule di packaging), in grado di supplire le funzioni della regione E1 e quindi di far produrre particelle virali. I vettori adenovirali, successivamente amplificati e titolati mediante infezione di cellule 293A, sono pronti per la transfezione delle cellule d'interesse.

4.10.1 Caratteristiche del plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST e del plasmide di trasferimento pENTR™/U6

pAd/BLOCK-iT™-DEST [Figura 4.2A] è un plasmide di 34864 pb contenente il genoma del sierotipo 5 dell'Adenovirus umano (Ad5), delecto delle regioni E1 ed E3. Esso possiede una copia del gene per la resistenza all'ampicillina ed una per la resistenza al cloramfenicolo, utilizzati per la selezione dei costrutti ricombinanti, ed un'origine di replicazione pUC che ne permette la replicazione in *E.coli*. I siti *attR1* ed *attR2* sono sequenze derivanti dal Batteriofago λ che consentono la ricombinazione LR *in vitro* con il vettore di trasferimento.

pENTR™/U6 [Figura 4.2B] è un plasmide di 2854 pb contenente la cassetta d'espressione U6 RNAi, che comprende gli elementi necessari per l'espressione dello shRNA

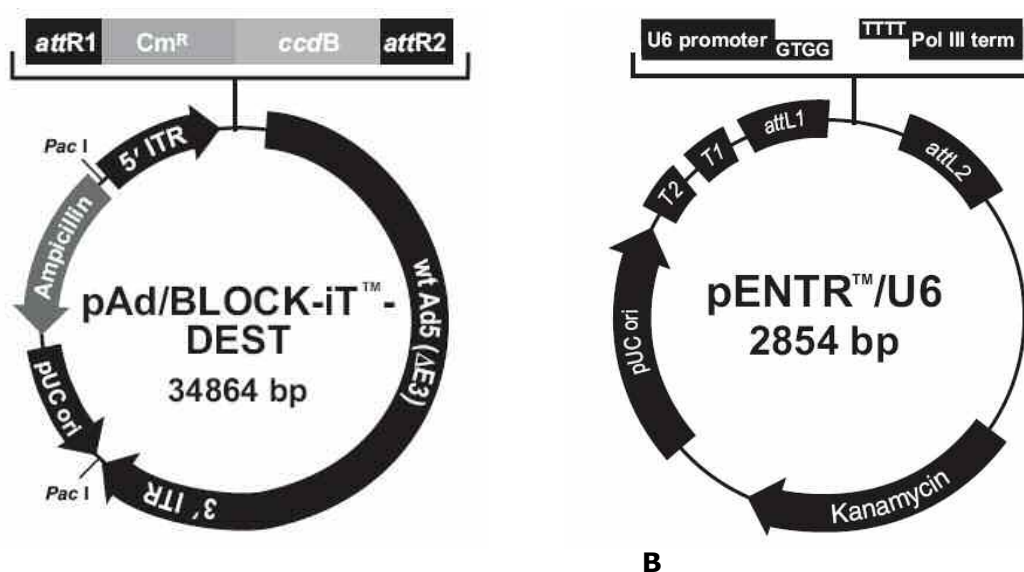


Figura 4.2 Rappresentazione schematica dei plasmidi **(A)** pAd/BLOCK-iT™-DEST e **(B)** pENTR™/U6. Nei plasmidi sono presenti i siti *attR* ed *attL*, sequenze derivanti dal Batteriofago λ , che permettono il clonaggio dello shRNA nel plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST mediante ricombinazione LR.

d'interesse: il promotore umano U6, riconosciuto dall'RNA polimerasi III, che consente l'espressione costitutiva dello shRNA, ed una sequenza di terminazione della trascrizione RNA polimerasi III-dipendente costituita da un *cluster* di 6 timidine. Tale cassetta d'espressione è fiancheggiata dai siti *attL1* ed *attL2*, sequenze derivanti dal Batteriofago λ , che permettono il clonaggio dello shRNA nel plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST mediante ricombinazione LR. pENTR™/U6 presenta inoltre la sequenza dell'origine di replicazione pUC ed il gene di resistenza alla kanamicina quale gene di selezione. Il vettore viene fornito linearizzato con *overhangs* di 4 nucleotidi alle estremità 5' per facilitare il clonaggio dell'oligonucleotide codificante lo shRNA.

4.10.2 Progettazione degli oligonucleotidi codificanti per i shRNA

Le sequenze *target* per il silenziamento post-trascrizionale del gene murino *Snail* ed i relativi oligonucleotidi a singolo filamento (ss oligo) necessari per il clonaggio nel vettore di trasferimento pENTR™/U6 sono stati individuati e disegnati utilizzando il BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/index.jsp>) oppure in base a costrutti già utilizzati in letteratura [139] [Figura 4.3].

4.10.3 Generazione degli oligonucleotidi a doppio filamento (ds oligo)

Per ogni inserto codificante lo shRNA sono stati ordinati alla ditta Invitrogen due ss oligo, uno con la sequenza senso e l'altro con la sequenza antisenso dell'inserto. Gli oligonucleotidi, forniti liofilizzati, sono stati risospesi in acqua *nuclease-free* ad una concentrazione finale di 200 μ M. Per generare gli oligonucleotidi a doppio filamento necessari per il clonaggio in pENTR™/U6 è stata quindi allestita una reazione d'appaiamento. In un tubo è stata preparata una miscela costituita da 5 μ l di ss oligo senso, 5 μ l di ss oligo

Linker	Sequenza target senso	Loop	Sequenza target antisenso	Nome inserto
5'-	CACCGGAAGATCTTCAACTGCAAATCGAA	ATTTG	CAGTTGAAGATCTTCC -3'	shSnail515
3'-	CCTTCTAGAAGTTGACGTTTAGCTT	TAAAC	GTCAACTTCTAGAAGGAAAA -5'	
5'-	CACCGATGCACATCCGAAGCCACTTCAAGAGA	GTGG	CTTCGGATGTGCATC-3'	shSnail573
3'-	CTACGTGTAGGCTTCGGTGAAGTTCTCT	CACCG	AAGCCTACACGTAGAAAA-5'	
5'-	CACCGCATGTCCTTGCTCCACAAGCCGAA	GCTT	GTGGAGCAAGGACATGC -3'	shSnail803
3'-	CGTACAGGAACGAGGTGTTTCGGCTT	CGAAC	CACCTCGTTCCTGTACGAAAA -5'	
5'-	CACCGCTACACAAATCAGCGATTT	CGAA	AAATCGCTGATTTGTGTAG-3'	shLacZ
3'-	CGATGTGTTTAGTCGCTAAAGCTT	TTT	AGCGACTAAACACATCAAAA-5'	

Figura 4.3 Oligonucleotidi codificanti shRNA utilizzati.

antisenso, 2 µl di Oligo Annealing Buffer 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1 M NaCl) e 8 µl di acqua *nuclease-free*. La soluzione è stata quindi incubata a 95°C per 5 minuti (denaturazione), e successivamente lasciata raffreddare a temperatura ambiente per 15 minuti (appaiamento). I ds oligo così ottenuti (stock 50 µM) sono stati poi diluiti ad una concentrazione finale di 5 nM in Oligo Annealing Buffer 1X per il successivo clonaggio in pENTR™/U6.

4.10.4 Ligazione dei ds oligo nel vettore di trasferimento pENTR™/U6

La reazione di ligazione è stata condotta in un volume totale di 20 µl. Tale volume è costituito da 4 µl di tampone di ligazione 5X (250 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (w/v) polyethylene glycol-8000), 2 µl (1 ng) di vettore pENTR™/U6, 1 µl di ds oligo 5nM ed 1 µl (1 unità) della DNA ligasi del fago T4, il tutto in acqua *nuclease-free*. La reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 2 ore e 5 µl del prodotto utilizzati per trasformare ceppi competenti di *E.coli* One Shot® TOP10.

4.10.5 Trasformazione di cellule batteriche competenti *E.coli* One Shot® TOP10

È stato impiegato il ceppo di *E.coli* One Shot® TOP10 (F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*) fornito dal kit, caratterizzato da un'efficienza di trasformazione di 1x10⁹ cfu/µg di DNA.

Un volume corrispondente a 20 µl di cellule competenti è stato miscelato con 5 µl della soluzione di ligazione ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente le cellule sono state sottoposte a shock termico incubando per 1 minuto a 42°C e subito dopo 5 minuti in ghiaccio. Alle cellule sono stati aggiunti 250 µl di terreno S.O.C. (2% Tryptone, 0.5%

Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosio) e quindi sono state incubate per 1 h a 37°C in agitazione (200 rpm). Infine le cellule batteriche sono state seminate su piastre di LB-agar addizionato di kanamicina (50 µg/ml).

Dopo incubazione *overnight* a 37°C le colonie cresciute sono state sottoposte a screening per individuare la presenza del plasmide/inserto d'interesse.

4.10.6 Verifica del clonaggio di ds oligo nel vettore di trasferimento pENTRTM/U6

Per verificare l'avvenuto clonaggio dell'inserto codificante lo shRNA d'interesse nel vettore di trasferimento pENTRTM/U6, le colonie kanamicina-resistenti sono state inoculate in 5 ml di terreno SOB (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) addizionato di kanamicina (50 µg/ml) e lasciate crescere *overnight* a 37°C. Il DNA plasmidico è stato poi isolato mediante miniprep e sottoposto a sequenziamento genico (par. 4.6.5). Il DNA da sequenziare è stato amplificato mediante una reazione di PCR, condotta in un volume di 15 µl contenente 500 ng di DNA plasmidico, 6 µl di primer 1 µM, 1 µl di BigDye Terminator Ready Reaction Mix, 3 µl di buffer 5x (5 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl pH 9), 5% v/v di dimetilsolfossido (DMSO), il tutto portato eventualmente a volume con acqua MilliQ. I primers utilizzati per il sequenziamento sono l'U6 Forward 5'-GGACTATCATATGCTTACCG-3' e l'M13 Reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' forniti dal kit.

Una volta accertata la correttezza del clonaggio e della sequenza dell'inserto, il DNA plasmidico è stato amplificato e purificato mediante maxiprep per la successiva analisi d'efficacia di silenziamento.

4.10.7 Verifica dell'efficacia di silenziamento

Per verificare l'efficacia dei shRNA clonati in pENTRTM/U6 sono stati effettuati dei saggi di iRNA transiente mediante transfezione dei costrutti nella linea cellulare umana 293A (Invitrogen).

In particolare, 3 µg di ogni plasmide codificante lo shRNA per Snail o per LacZ quale controllo negativo sono stati co-transfettati insieme ad 1 µg di plasmide pLPCX-Snail (codificante per il gene murino Snail, fornito dal prof. M. Tripodi, Università degli Studi di Roma "La Sapienza") in cellule 293A confluenti al 90%, precedentemente seminate in una piastra da 6 pozzetti (Cellstar[®]), utilizzando 6 µl di LipofectamineTM2000 (Invitrogen) (par. 4.10.9). Dopo 48 ore le cellule sono state raccolte e l'RNA totale estratto e retrotrascritto (par. 4.4-5) per la successiva analisi quantitativa mediante Real Time RT-PCR dell'espressione del gene murino Snail (par. 4.7). I due costrutti maggiormente efficaci nel silenziamento del gene murino Snail sono stati scelti per il successivo trasferimento mediante ricombinazione LR nel plasmide pAd/BLOCK-iTTM-DEST.

4.10.8 Ricombinazione LR per la produzione di costrutti adenovirali ricombinanti

La ricombinazione LR catalizza *in vitro* la ricombinazione tra i siti *attL* del vettore di trasferimento pENTRTM/U6 ed i siti *attR* del vettore pAd/BLOCK-iTTM-DEST sfruttando le proprietà della ricombinazione sito-specifica del batteriofago λ . Il kit fornisce la LR ClonaseTM II enzyme mix, che contiene le proteine del Batteriofago λ Integrasi (Int), Excisionasi (Xis) e la proteina codificata da *E.coli* Integration Host Factor (IHF) nel tampone di reazione.

La reazione di ricombinazione è stata condotta in un volume totale di 10 μ l. Tale volume è costituito da 150 ng di pENTRTM/U6 contenente lo shRNA, 150 ng di plasmide pAd/BLOCK-iTTM-DEST e 2 μ l di LR ClonaseTM II enzyme mix, il tutto in tampone TE, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). La reazione è stata incubata a 25°C per 3 ore; successivamente è stata bloccata mediante aggiunta di 1 μ l di soluzione di proteinasi K (2 μ g/ μ l in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM CaCl₂, 50% glicerolo) ed incubazione a 37°C per 10 minuti. L'intero prodotto è stato poi utilizzato per trasformare ceppi competenti di *E.coli* One Shot[®] TOP10 (par. 4.10.5). Le cellule batteriche sono state seminate su piastre di LB-agar addizionato di ampicillina (100 μ g/ml). Dopo incubazione *overnight* a 37°C le colonie cresciute sono state inoculate in 5 ml di terreno SOB addizionato di ampicillina (100 μ g/ml) e lasciate crescere *overnight* a 37°C. L'avvenuta ricombinazione è stata verificata mediante semina su piastre di LB-agar addizionato di cloramfenicolo (30 μ g/ml): i costrutti ricombinanti risultano sensibili al cloramfenicolo, poiché la ricombinazione fa perdere il gene di resistenza per tale antibiotico. Il DNA plasmidico è stato poi isolato mediante miniprep e sottoposto a sequenziamento genico (par. 4.6.5) per confermare la presenza dello shRNA. I primers utilizzati per il sequenziamento sono il pAd forward priming site 5'-GACTTTGACCGTTTACGTGGAGAC-3' ed il pAd reverse priming site 5'-CCTTAAGCCACGCCACACATTTTC-3' forniti dal kit.

Una volta accertata la presenza dell'inserto e la stabilità della ricombinazione, il DNA plasmidico è stato amplificato e purificato mediante maxiprep per la successiva transfezione in cellule di packaging.

4.10.9 Transfezione del genoma adenovirale ricombinante in cellule di packaging

In preparazione alla transfezione, 8 μ g di genoma adenovirale ricombinante sono stati digeriti con l'enzima Pac I, estratti con il metodo fenolo/cloroformio e precipitati con etanolo. Il plasmide linearizzato è stato risospeso in 20 μ l di acqua sterile.

Ventiquattro ore prima della transfezione 5x10⁵ cellule della linea cellulare umana 293A (Invitrogen) sono state seminate in un pozzetto di una piastra da 6 pozzetti (Cellstar[®]) in 2 ml di terreno DMEM completo, così da ottenere circa l'80-90% di confluenza al momento della transfezione. Il giorno della transfezione il terreno è stato sostituito con 1,5 ml di terreno DMEM 10% privo di antibiotico.

Per introdurre il genoma adenovirale ricombinante nelle cellule 293A è stato utilizzata LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), una soluzione di lipidi cationici in grado di complessare il

DNA, formando così dei lipoplessi che poi si fondono con la membrana citoplasmatica delle cellule.

Al momento della transfezione, si sono preparate due soluzioni in terreno DMEM privo di siero ed antibiotici, per un volume finale di 250 µl ognuna: nella prima si sono posti 1 µg di DNA adenovirale ricombinante linearizzato con Pac I mentre nella seconda si sono aggiunti 3 µl di lipofectamina. Entro 5 minuti dalla loro preparazione, le due soluzioni sono state mescolate e lasciate a temperatura ambiente per 20 minuti. Al termine dell'incubazione, la miscela ottenuta è stata aggiunta al pozzetto contenente le cellule 293A. La piastra è stata poi posta in incubatore a 37°C, 5% CO₂ *overnight*, dopodiché il terreno è stato sostituito con DMEM 10% completo. 48 ore dopo la transfezione le cellule sono state tripsinizzate e seminate in una piastra da 10 cm di diametro in 10 ml di DMEM 10% completo. Successivamente metà del terreno è stato cambiato ogni 3 giorni.

Circa 8-10 giorni dopo la transfezione, si è iniziato ad osservare effetto citopatico (CPE). Si è lasciata procedere l'infezione finché non si è osservato CPE in circa l'80% delle cellule (circa 12-15 giorni); le cellule sono state quindi raccolte e sono stati effettuati tre cicli di congelamento/scongelo (alternando immersione in azoto liquido e incubazione a 37°C) per favorire il rilascio dei virioni presenti all'interno delle cellule. Al termine della procedura i detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a 4000 rpm per 15 min ed il surnatante contenente il virus ricombinante (*crude viral lysate stock*) è stato raccolto e conservato a -80°C per la successiva amplificazione.

4.10.10 Amplificazione dell'adenovirus ricombinante

Allo scopo di generare un'adeguata quantità di virus, sono stati compiuti più cicli d'amplificazione utilizzando il seguente schema: sono state seminate 5x10⁶ cellule 293A in una fiasca da 75 cm² (Cellstar®); il giorno successivo le cellule sono state infettate con 100 µl del *crude viral stock* ottenuto dalla transfezione, diluito in 10 ml di terreno DMEM 5%. Quando si è osservato l'80% di CPE (48-72 ore circa dopo l'infezione), il terreno è stato raccolto e le cellule, risospese in 1 ml di terreno DMEM e 10% v/v di glicerolo, sono state sottoposte a tre cicli di congelamento/scongelo, centrifugate ed il surnatante ottenuto è stato titolato, aliquotato e conservato a -80°C.

4.10.11 Titolazione dell'adenovirus ricombinante mediante metodo Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀)

Per stimare il titolo di adenovirus ricombinante ottenuto in seguito ad amplificazione è stato utilizzato il metodo TCID₅₀, che si basa sull'osservazione dello sviluppo d'effetto citopatico in cellule 293A in seguito ad infezione con diluizioni seriali del virus.

Ventiquattro ore prima dell'infezione una piastra da 96 pozzetti è stata seminata con 2,5 x 10³ cellule 293A/100 µl DMEM 2%/pozzetto. Il giorno successivo 100 µl di adenovirus ricombinante da titolare sono stati diluiti in 900 µl di DMEM 2% (diluizione 10⁻¹). Tale soluzione è quindi stata sottoposta a diluizioni successive di un fattore 10 per ottenere concentrazioni virali decrescenti di un logaritmo fino alla diluizione 10⁻¹¹. In ogni fila di

pozzetti della piastra da 96 sono stati aggiunti 100 µl/pozzetto per 10 pozzetti delle otto diluizioni virali più alte (dalla 10⁻⁴ alla 10⁻¹¹); gli ultimi due pozzetti d'ogni fila sono stati invece utilizzati come controllo negativo. La piastra è stata poi incubata a 37°C, 5% CO₂ per 10 giorni. Dopo tale periodo è stato osservato l'effetto citopatico (CPE) al microscopio ottico e si sono contati i pozzetti positivi per fila. Un pozzetto è stato considerato positivo per l'effetto citopatico anche se solo poche cellule presentavano CPE. Il test è da ritenersi valido solamente se i controlli negativi non presentano CPE e la diluizione più bassa (10⁻⁴) mostra il 100% d'infezione mentre la diluizione più alta (10⁻¹¹) non presenta alcun CPE. Il titolo virale viene quindi stimato mediante il metodo statistico di Kärber:

$$T=10^{1+d(S-0,5)+1} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

d=Log₁₀ della diluizione (=1 per diluizioni di fattore 10)

S=somma dei rapporti di pozzetti CPE+/fila per ogni diluizione (dalla 10⁻¹ alla 10⁻¹⁰)

In seguito si converte il titolo virale in PFU/ml sottraendo 0,7 Log al titolo calcolato come TCID₅₀/ml.

4.11 Saggio d'infettività su HSC

Al fine di determinare la minima quantità di particelle adenovirali necessarie per assicurare un'efficienza di trasduzione delle HSC pari o superiore al 95%, un ugual numero di HSC è stato trasdotto con 25, 50, 100, 200 o 500 MOI d'adenovirus ricombinante AdLacZ, generato precedentemente nel nostro laboratorio.

L'adenovirus ricombinante AdLacZ codifica per l'enzima β-galattosidasi, che idrolizza i β-galattosidi. L'X-gal è un suo substrato cromogeno, utilizzato per individuare le cellule che esprimono l'enzima: la β-galattosidasi infatti idrolizza l'X-gal determinando la formazione di galattosio e di un precipitato insolubile di colore blu.

Quarantotto ore dopo la trasduzione, le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione, centrifugate e lavate con PBS. Sono state in seguito fissate con una soluzione di glutaraldeide 0,2% v/v per 10 min a 4°C, lavate con PBS ed incubate per 2 ore a 37°C con una soluzione di X-gal (1 mg/ml). Al termine di queste operazioni il numero di HSC trasdotte (risultanti di colore blu) è stato determinato al microscopio ottico, contando le cellule per mezzo di un emocromocitometro.

4.12 Silenziamento di Snail1 in HSC mediante AdshRNA

Le HSC purificate da 5 fegati sani e raccolte in 25 ml di DMEM addizionato di 20% v/v FBS (Gibco®), 2 mM L-glutamina, 0,1 mM di amminoacidi non essenziali, 1 mM di sodio piruvato, 100 U penicillina/100 µg streptomicina/0,25 µg amfotericina B/ml (Gibco®) sono state poste in coltura in piastre da sei pozzetti, 1 ml per ciascun pozzetto. Il giorno successivo il terreno è stato sostituito ed il secondo giorno di coltura un pozzetto di cellule è stato utilizzato per contare le cellule presenti. A ciascun pozzetto è stato quindi aggiunto l'adenovirus ricombinante codificante lo shRNA d'interesse ad una MOI=100 in 1 ml di DMEM 20%. Dopo 90 minuti d'incubazione a 37°C, 5% CO₂ ogni pozzetto è stato portato ad un volume finale di 2 ml con terreno DMEM 20% e la piastra è stata riposta in incubatore.

L'ottavo giorno di coltura le HSC sono state raccolte ed immediatamente congelate in azoto liquido, quindi conservate a -80°C fino ad estrazione dell'RNA totale (par. 4.4) o delle proteine totali (par. 4.9).

4.13 Campioni di tessuto epatico umano

I campioni di fegato umano sano sono stati ottenuti in corso di epatectomia eseguita in pazienti con metastasi epatiche di carcinoma del colon ($N = 2$, 1 M/ 1 F, età media 66 ± 5 anni). I pazienti avevano dei livelli sierici normali di aminotransferasi. Il campione epatico è stato prelevato da una zona macroscopicamente normale del parenchima epatico ed il successivo esame istologico di un frammento ha confermato una normale architettura epatica ed assenza di lesioni neoplastiche. I campioni di fegato fibrotico sono stati ottenuti da biopsie di pazienti affetti da epatite cronica da HCV ($N = 6$, 4 M/ 2 F, età media 39 ± 12 anni) con diverso grado di fibrosi (2 II/3 III/1 IV). I campioni appena raccolti sono stati conservati a -80°C sino al momento dell'estrazione dell'RNA totale (par. 4.4).

4.14 Analisi statistica

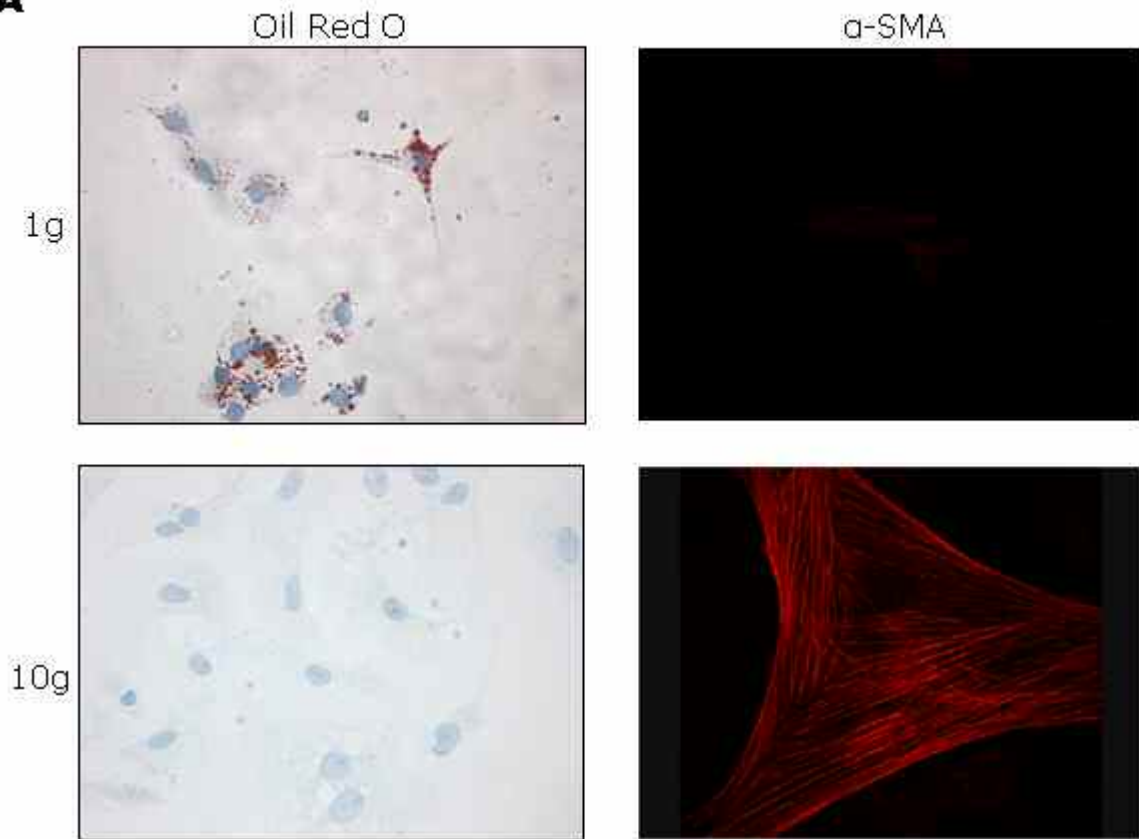
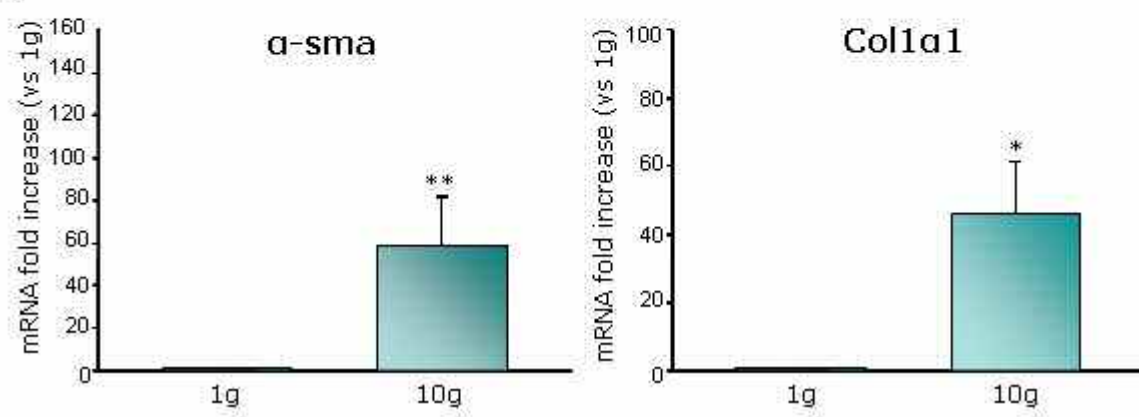
I dati ottenuti dall'analisi di RT-PCR quantitativa vengono riportati come incremento del numero di copie di mRNA rispetto al controllo. Tutti i dati vengono espressi come media \pm errore standard. L'analisi statistica è stata condotta mediante *t* test di Student. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

5. RISULTATI

5.1 Caratterizzazione di HSC murine in coltura: il modello d'attivazione *in vitro*

Le HSC utilizzate negli esperimenti descritti in questo lavoro sono state isolate da fegato di topi secondo un protocollo ottimizzato nel nostro laboratorio. La caratterizzazione delle cellule poste in coltura è stata eseguita mediante analisi morfologica al microscopio a contrasto di fase e mediante valutazione della presenza di marcatori specifici delle HSC quali i granuli lipidici ed i filamenti di α -actina muscolare liscia. Al microscopio a contrasto di fase le HSC murine evidenziano nei primi 2-3 giorni di coltura un corpo centrale da cui si dipartono numerose estroflessioni citoplasmatiche più o meno allungate che conferiscono alle HSC una forma stellata, morfologia paragonabile a quella descritta in letteratura.

Per studiarne il processo di transdifferenziazione dallo stato quiescente a quello attivato è stato inizialmente utilizzato come modello l'attivazione *in vitro*. Le HSC i primi giorni di coltura presentano il cosiddetto fenotipo "quiescente", caratterizzato dalla presenza di granuli intracitoplasmatici di vitamina A. Questa peculiarità è stata evidenziata mediante colorazione con olio rosso, l'Oil Red O, comunemente utilizzato in istologia per evidenziare depositi lipidici intratessutali. Le HSC murine in coltura da un giorno trattate con tale colorante hanno evidenziato la presenza più o meno intensa di granuli lipidici distribuiti uniformemente nel compartimento citoplasmatico [figura 5.1A]. Man mano che la coltura procede, a partire dal terzo-quarto giorno, le HSC vanno incontro ad un processo di attivazione spontanea, contraddistinto dalla progressiva perdita dei depositi di vitamina A e dall'acquisizione di marcatori fibrogenici quali l' α -actina muscolare liscia (α -SMA) ed il Collagene di tipo I. Come riportato in figura 5.1A, HSC murine in coltura da dieci giorni incubate con l'anticorpo diretto contro α -SMA ed analizzate al microscopio confocale, hanno mostrato filamenti di actina intensamente colorati e disposti in maniera regolare, mentre le goccioline lipidiche sono completamente scomparse. Inoltre, l'analisi quantitativa dei trascritti specifici per i geni associati allo stato attivato, α -SMA e procollagene1(α 1) (Col1 α 1), ha confermato un significativo aumento della loro espressione in HSC in coltura da dieci giorni rispetto ad HSC in coltura da un solo giorno [figura 5.1B].

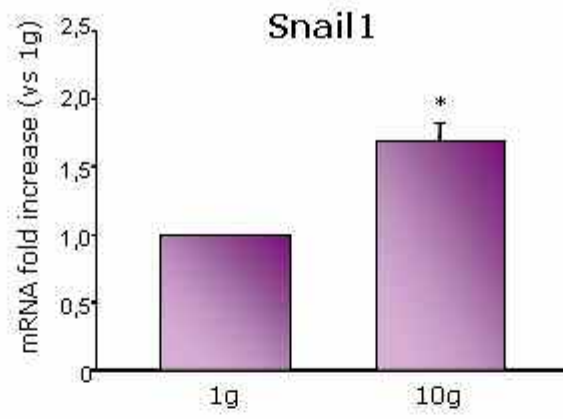
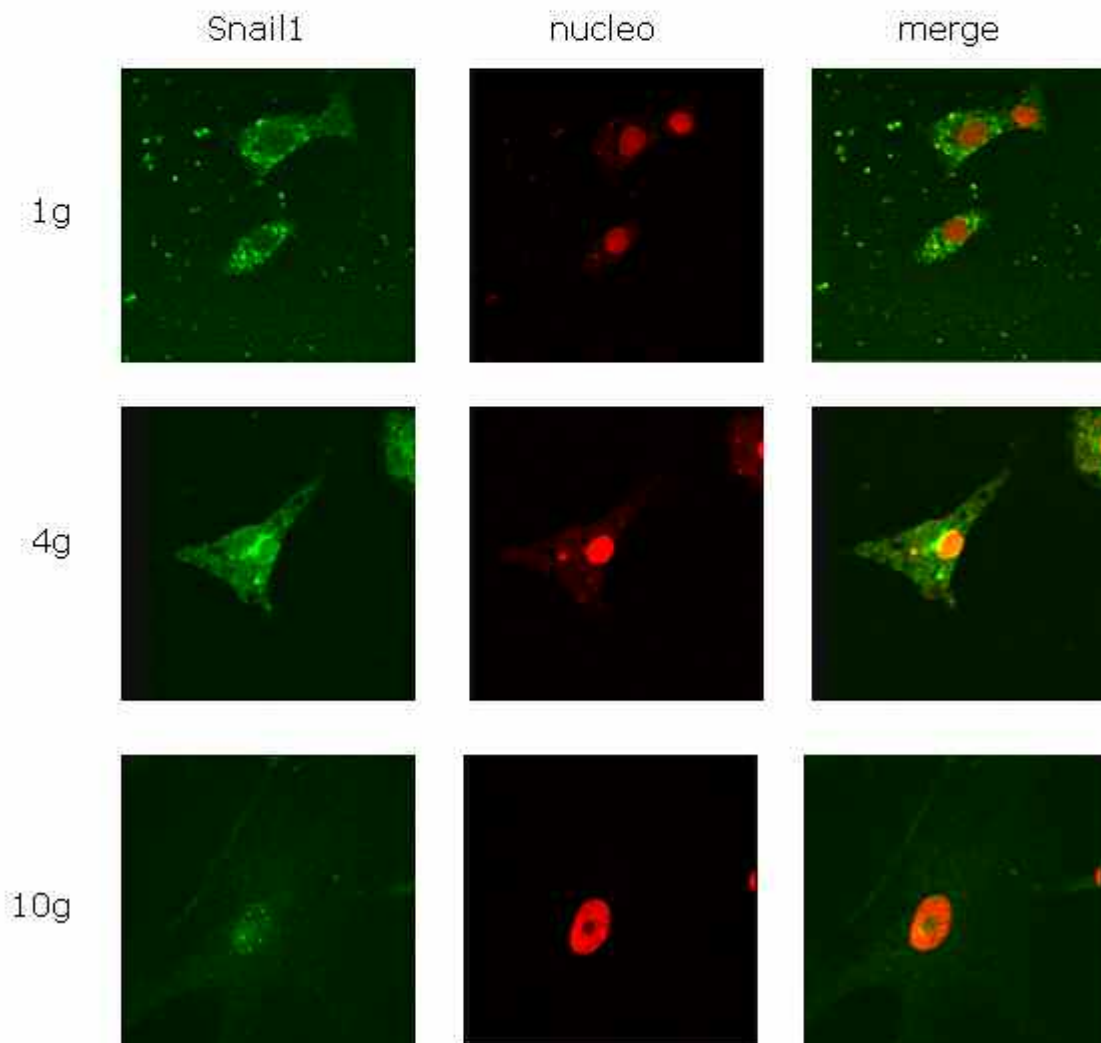
A**B**

5.2 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 in HSC attivate *in vitro*

Per verificare se l'attivazione *in vitro* delle HSC fosse associata ad un aumento dell'espressione di Snail1, è stata analizzata l'espressione dell'mRNA specifico mediante Real-Time RT-PCR quantitativa in HSC coltivate per un giorno (quiescenti) e dieci giorni (attivate). Come riportato in figura 5.2A, tale analisi ha evidenziato un aumento dei trascritti per Snail1 in HSC attivate rispetto ad HSC quiescenti ($1,68 \pm 0,13$ volte, $p < 0,01$).

Essendo Snail1 un fattore di trascrizione, la sua collocazione all'interno della cellula è determinante affinché esso possa svolgere la propria funzione. Constatata la sua *up-regulation* in seguito alla transdifferenziazione delle HSC, se ne è quindi verificata la localizzazione tramite immunofluorescenza effettuata su cellule in coltura fino a dieci giorni. Mediante quest'esperimento si è potuto osservare come in HSC in coltura da un giorno Snail1 sia localizzato a livello citoplasmatico e solamente dopo il terzo-quarto giorno di coltura si sono osservate cellule in cui era avvenuta la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione. Il decimo giorno di coltura, quando ormai le cellule hanno un fenotipo completamente attivato, Snail1 si trova nel nucleo in punti ben definiti, con un *pattern* d'espressione non omogeneo simile a quello precedentemente descritto in alcune linee cellulari tumorali umane [148] [figura 5.2B].

Figura 5.1 Caratterizzazione delle HSC murine e del loro stato d'attivazione *in vitro*. **(A)** Le HSC isolate da fegato di topi sono state poste in coltura su vetrini per microscopia per 1-10 giorni e caratterizzate mediante marcatori specifici per lo stato di quiescenza (Oil Red O) e di attivazione (α -SMA). I vetrini sono stati quindi analizzati al microscopio a contrasto di fase (obiettivo 40x) o confocale (obiettivo 63x). Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti condotti separatamente. **(B)** Le HSC sono state coltivate per 1 giorno (1g) o 10 giorni (10g). L'RNA totale è stato quindi estratto ed i trascritti specifici per *asma* e *Col1a1* sono stati quantificati mediante Real Time RT-PCR quantitativa. I dati sono rappresentativi di cinque diversi esperimenti e sono espressi come media \pm SE; ogni campione è stato saggiato in duplicato per ogni reazione di PCR (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ vs 1g).

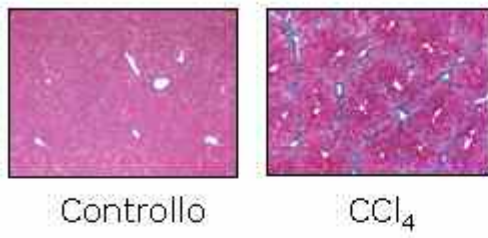
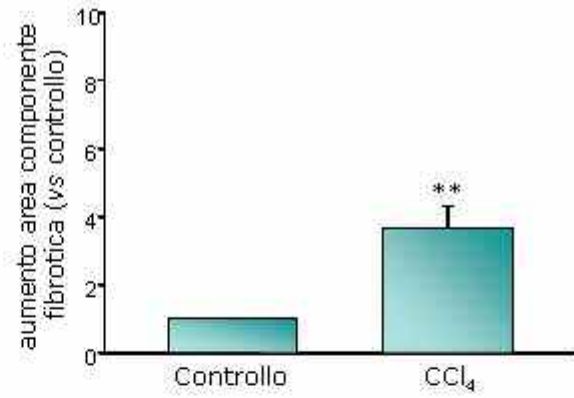
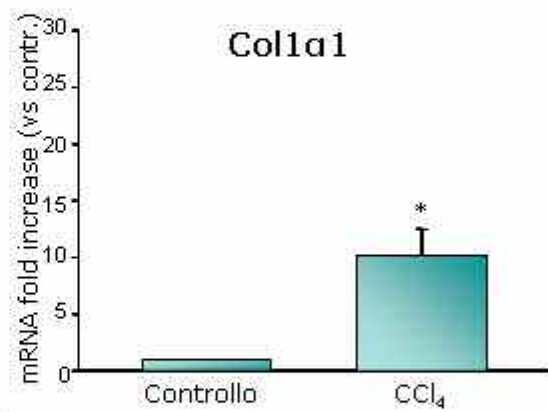
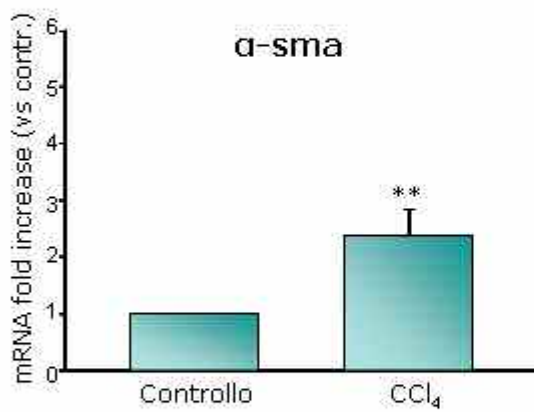
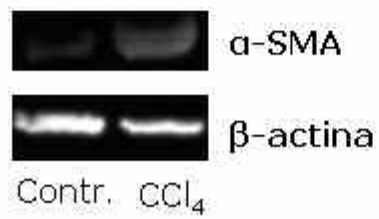
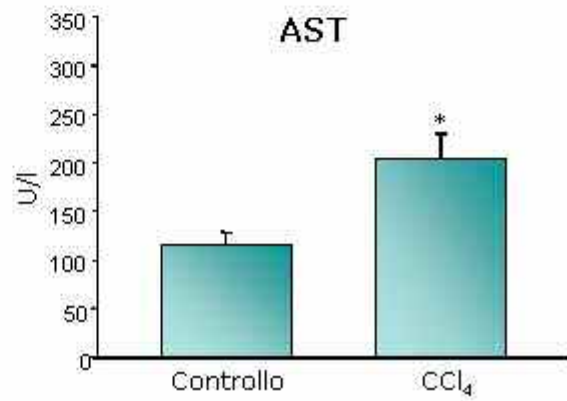
A**B**

5.3 Valutazione dell'espressione di Snail1 nella fibrosi epatica sperimentale

Per determinare se la sovraespressione di Snail1 osservata *in vitro* potesse avere un riscontro anche nel processo di fibrogenesi epatica *in vivo*, è stata indotta la fibrosi in topi per mezzo d'intossicazione da tetracloruro di carbonio (CCl₄). La progressione della fibrosi epatica è stata monitorata mediante analisi istologica con colorazione ematossilina/eosina ed Azan-Mallory, che ha evidenziato un'estesa deposizione di fibre di collagene nei topi trattati per otto settimane con CCl₄ [figura 5.3A]. L'analisi morfometrica ha rivelato che l'area della componente fibrotica dei fegati di topi trattati è aumentata di $3,68 \pm 0,63$ volte rispetto ai fegati degli animali controllo ($p < 0,05$) [figura 5.3B]. Inoltre, anche l'espressione dei geni marcatori di fibrosi Col1 α 1 e α -SMA risulta significativamente aumentata [figura 5.3C], dato confermato qualitativamente anche a livello proteico per α -SMA mediante Western Blotting [figura 5.3D]. Come riportato in figura 5.3E, il dosaggio delle aspartato aminotransferasi (AST) sieriche ne ha rivelato un aumento significativo nel sangue di animali trattati con CCl₄, indicando quindi la presenza di danno epatico.

Successivamente è stata quantificata l'espressione dei trascritti Snail1 specifici: nei fegati fibrotici l'mRNA del fattore di trascrizione risulta aumentato di $1,40 \pm 0,13$ volte ($p = 0,02$) rispetto ai fegati controllo [figura 5.4A]. Mediante immunistochemica è stata esaminata la distribuzione di Snail1 e la contemporanea marcatura con anticorpo anti- α -SMA è stata utilizzata per l'identificazione di HSC attivate nel tessuto. Come riportato in figura 5.4B, il tessuto epatico di animali controllo è risultato negativo per la marcatura anti-Snail1. Snail1 è invece presente nei fegati fibrotici e l'immuno-reattività si localizza prevalentemente lungo i setti fibrotici porto-portali caratterizzati dalla presenza di cellule α -SMA⁺. La sovrapposizione delle due marcature evidenzia la presenza di cellule Snail1⁺ α -SMA⁺, ma anche di cellule Snail1⁺ α -SMA⁻ e Snail1⁻ α -SMA⁺.

Figura 5.2 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 in HSC quiescenti ed attivate *in vitro*. **(A)** L'RNA totale è stato estratto da HSC quiescenti (coltivate per 1 giorno) o attivate *in vitro* (coltivate per 10 giorni) e l'mRNA specifico per Snail1 è stato quantificato mediante qReal Time RT-PCR. I dati sono espressi come media \pm SE e provengono da cinque esperimenti differenti (* $p < 0,01$ vs 1g). Ogni campione è stato saggiato in duplicato. **(B)** La localizzazione di Snail1 è stata determinata mediante immunofluorescenza. HSC seminate su vetrini per microscopia sono state incubate con l'anticorpo anti-Snail1 e con ioduro di propidio per evidenziare il nucleo; sono state quindi analizzate al microscopio confocale utilizzando un obiettivo 63x. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti condotti separatamente.

A**B****C****D****E**

5.4 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 in HSC attivate *in vivo*

L'attivazione *in vitro* delle HSC rappresenta il modello d'attivazione di tali cellule più utilizzato, tuttavia non riproduce completamente i cambiamenti nel *pattern* d'espressione genica che si verificano invece *in vivo* [161], dal momento che il microambiente delle HSC nel fegato fibrotico è complesso ed espone le cellule a numerose interazioni cellulari ed umorali che in coltura non sono presenti. Si è ritenuto perciò opportuno accertare che l'*up-regulation* di Snail1 si verificasse anche in HSC attivate *in vivo*. Le HSC sono state quindi purificate da fegati di topi trattati con CCl₄ per otto settimane (HSC attivate *in vivo*) e da fegati di topi controllo (HSC quiescenti) e lasciate in coltura per 20 ore. Il metodo utilizzato per isolare le cellule dal tessuto epatico si basa su di un gradiente di Percoll a diversa densità che permette di separare le cellule contenenti granuli intracitoplasmatici di vitamina A (più leggere) dal resto della popolazione cellulare epatica. La popolazione di HSC isolata da fegati fibrotici potrebbe perciò contenere potenzialmente HSC ancora quiescenti; tuttavia, come verificato mediante analisi dell'espressione dei geni marcatori d'attivazione α -SMA e Col1 α 1, i trascritti attivazione specifici risultano significativamente sovraespressi nella popolazione di HSC estratta da fegati fibrotici rispetto alle HSC purificate da fegati sani [figura 5.5A]. Probabilmente queste cellule contengono ancora i depositi di vitamina A, ma sono *committed* verso un fenotipo attivato, rappresentano in altre parole cellule in uno stadio intermedio del processo d'attivazione. Confrontando i livelli di mRNA di Snail1, è risultato un aumento di $2,71 \pm 0,63$ volte ($p=0,02$) dell'espressione del gene in HSC attivate *in vivo* rispetto ad HSC quiescenti [figura 5.5B]. Inoltre, come riportato in figura 5.5C, l'immunofluorescenza rivela come Snail1 sia prevalentemente localizzato nel nucleo in HSC attivate *in vivo*, mentre nelle HSC quiescenti si trova solamente a livello citoplasmatico.

Complessivamente questi dati confermano la sovraespressione e la localizzazione nucleare di Snail1 nel corso d'attivazione delle HSC sia *in vivo* che *in vitro*.

Figura 5.3 Caratterizzazione della fibrosi epatica sperimentale. Per indurre la fibrosi epatica a gruppi di topi ($n=7$) è stato somministrato CCl₄ i.p. due volte a settimana per otto settimane. Come controllo sono stati utilizzati animali ($n=7$) a cui è stato somministrato solo olio d'oliva. **(A)** Sezioni di fegato sano (controllo) e fibrotico (CCl₄) sono state sottoposte ad analisi istologica mediante colorazione con ematossilina-eosina ed Azan-Mallory. **(B)** La componente fibrotica è stata quantificata mediante analisi morfometrica delle sezioni colorate con Azan-Mallory mediante software ImageJ ($n=4$ campi/fegato, 7 fegati per gruppo, $** p<0,05$ vs controllo). **(C)** L'RNA totale è stato estratto da fegati di topi controllo e trattati con il CCl₄ ed i trascritti specifici per α SMA e Col1 α 1 sono stati quantificati mediante Real Time RT-PCR quantitativa ($n=7$ fegati per gruppo). I dati sono espressi come media \pm SE; ogni campione è stato saggiato in duplicato per ogni reazione di PCR ($* p<0,01$, $**p<0,05$ vs controllo). **(D)** Le proteine totali estratte da fegati di topi controllo e trattati con il CCl₄ sono state saggiate mediante Western blotting per l'espressione di α -SMA. L'espressione di β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento di egual quantità di campione. I dati riportati sono rappresentativi di tre diversi esperimenti. **(E)** Il danno epatico è stato valutato mediante dosaggio delle AST nel siero prelevato da topi controllo o trattati con CCl₄ ($* p<0,01$ vs controllo, $n=7$ per ogni gruppo di animali).

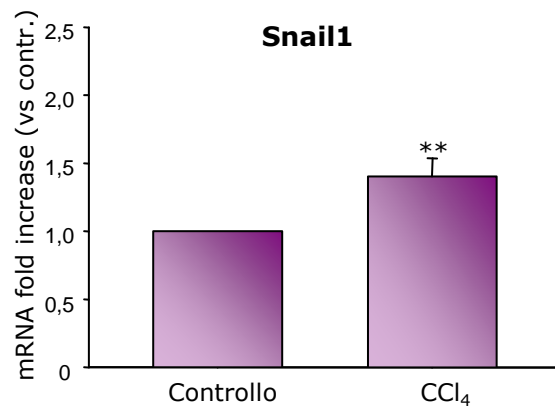
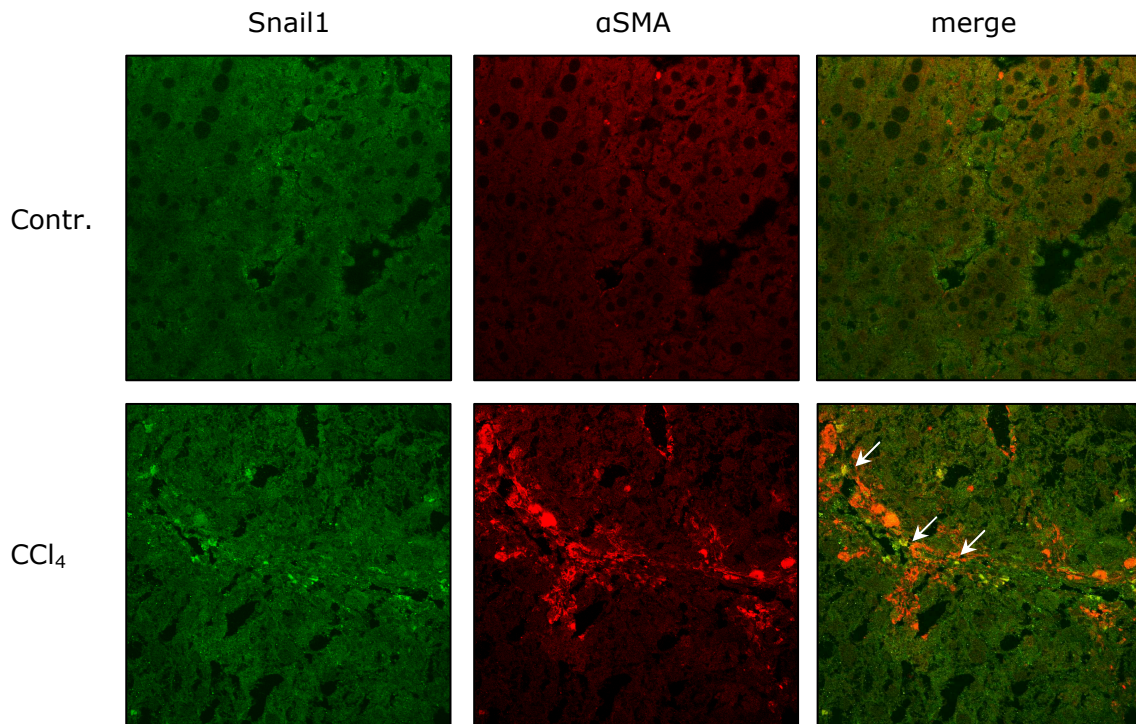
A**B**

Figura 5.4 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 nella fibrosi epatica sperimentale. **(A)** L'RNA totale è stato estratto da fegati di topi controllo e trattati con il CCl₄ e l'mRNA specifico per Snail1 è stato quantificato mediante Real Time RT-PCR quantitativa (n=7 fegati per gruppo). I dati sono espressi come media \pm SE; ogni campione è stato saggiato in duplicato per ogni reazione di PCR (** $p < 0,05$ vs controllo). **(B)** Sezioni di fegato sano (controllo) e fibrotico (CCl₄) sono state marcate con anticorpi anti-Snail1 ed anti- α SMA; sono state quindi analizzate al microscopio confocale utilizzando un obiettivo 40x. Le immagini sono rappresentative di quattro esperimenti condotti separatamente.

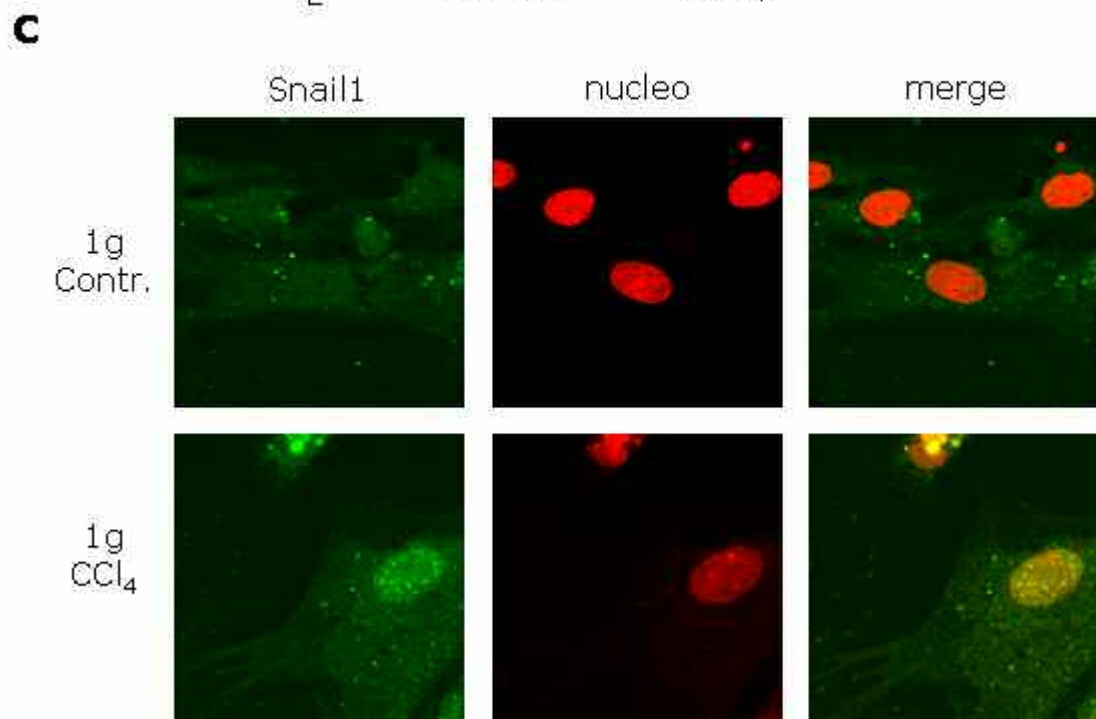
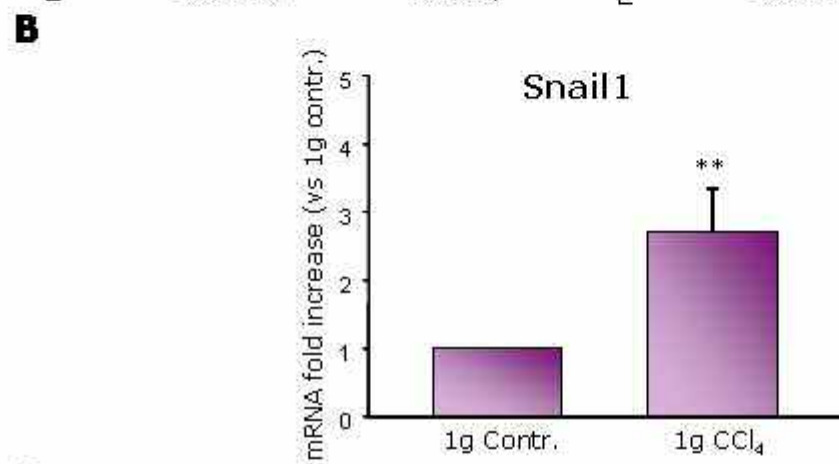
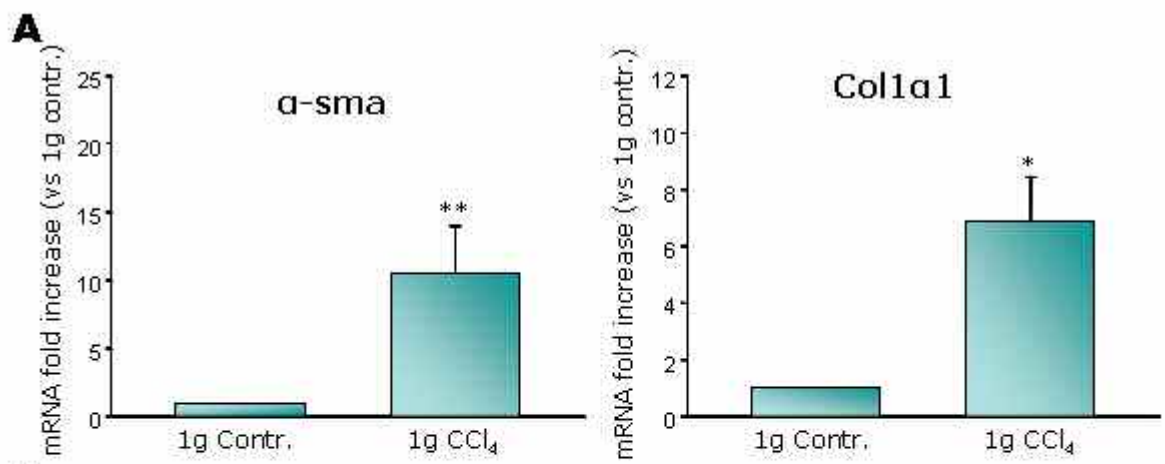


Figura 5.5 Espressione di Snail1 in HSC attivate *in vivo*. **(A)** L'RNA totale è stato estratto da HSC coltivate per un giorno dopo la purificazione da fegati sani (controllo) e fibrotici (CCl₄) e l'mRNA specifico per asma, Col1α1 e Snail1 **(B)** è stato quantificato mediante qReal Time RT-PCR. I dati sono espressi come media ± SE e provengono da cinque esperimenti differenti (* $p < 0,01$ vs 1g). Ogni campione è stato saggiato in duplicato. **(C)** La localizzazione di Snail1 è stata valutata mediante immunofluorescenza. HSC estratte da fegati sani (controllo) e fibrotici (CCl₄) e seminate per un giorno su vetrini per microscopia sono state incubate con l'anticorpo anti-Snail1 e con ioduro di propidio per evidenziare il nucleo; sono state quindi analizzate al microscopio confocale utilizzando un obiettivo 63x (zoom 2x). Le immagini sono rappresentative di cinque esperimenti condotti separatamente.

5.5 Costruzione di vettori adenovirali per il silenziamento di Snail1 mediante shRNA

Per chiarire il ruolo di Snail1 nel processo d'attivazione delle HSC sono stati creati dei costrutti con i quali ridurre selettivamente l'espressione di Snail1. A tale scopo, tre diversi oligonucleotidi codificanti gli shRNA aventi come *target* tre diverse porzioni dell'mRNA di Snail1 sono stati clonati nel vettore pENTRTM/U6. Per verificarne il clonaggio, la presenza degli inserti e la correttezza delle sequenze *target* sono state confermate mediante sequenziamento genico. Successivamente l'efficacia di silenziamento mediato dai shRNA clonati in pENTRTM/U6 è stata valutata per mezzo di saggi di iRNA transiente mediante transfezione dei costrutti nella linea cellulare umana 293A codificante il gene murino Snail1. I due costrutti shRNA1 e shRNA2 sono risultati maggiormente efficaci nel silenziamento di Snail1, come valutato con analisi Real Time RT-PCR quantitativa [figura 5.6], e sono stati perciò scelti per il successivo trasferimento mediante ricombinazione LR nel plasmide pAd/BLOCK-iTTM-DEST. Una volta accertata la presenza dell'inserto mediante sequenziamento e la stabilità della ricombinazione, i genomi adenovirali ricombinanti sono stati transfettati in cellule di packaging per la successiva produzione ed amplificazione di adenovirus ricombinanti.

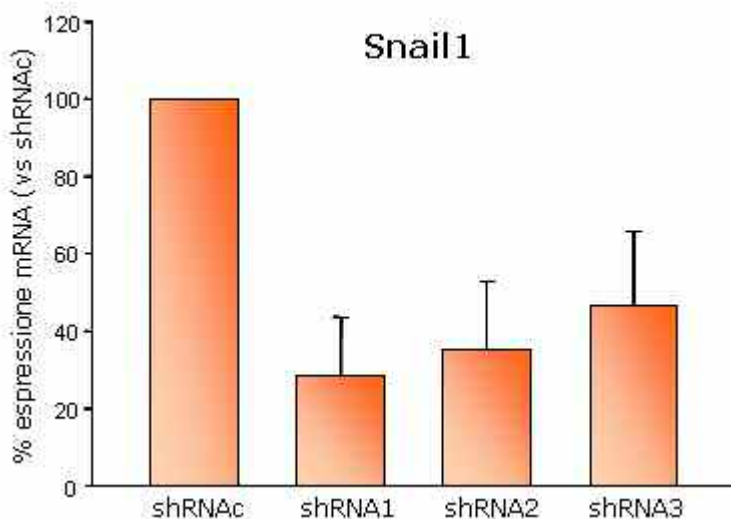


Figura 5.6 Costruzione di vettori adenovirali per il silenziamento di Snail1. L'RNA totale è stato estratto da cellule 293A codificanti il gene murino Snail1 transfettate con i plasmidi codificanti per i diversi shRNA. L'efficacia del silenziamento di Snail1 è stata testata mediante qReal Time RT-PCR. I dati sono espressi come percentuale media d'espressione ± SE vs shRNAc e provengono da tre esperimenti differenti.

5.6 Effetto del silenziamento di Snail1 in HSC

Poiché numerosi studi suggeriscono un ruolo per Snail1 nel controllo della differenziazione cellulare in favore di un fenotipo mesenchimale ed invasivo, è stato sperimentato se questo fattore di trascrizione fosse implicato nel processo di transdifferenziazione delle HSC. A tal fine, HSC murine isolate da fegati sani in coltura da 36 ore sono state trasdotte con i vettori adenovirali AdshSnail1-1 e AdshSnail1-2 per silenziare Snail1 o con AdshLacZ come controllo con MOI pari a 100 (che assicura un'efficienza di trasduzione pari al 95%, come precedentemente testato). Le HSC sono state raccolte per le successive analisi all'ottavo giorno di coltura, quando normalmente mostrano un fenotipo completamente attivato.

Al momento della raccolta l'mRNA specifico per Snail1 in HSC trasdotte con AdshSnail1-1 e AdshSnail1-2 è risultato espresso $0,22 \pm 0,08$ ($p < 0,01$) e $0,28 \pm 0,08$ volte ($p = 0,02$), rispettivamente, in confronto ad HSC controllo trasdotte con AdshLacZ, confermando quindi l'efficacia del silenziamento mediato dai costrutti costruiti anche a sei giorni dalla trasduzione [figura 5.7A]. È stata quindi effettuata l'analisi quantitativa dei trascritti specifici per i geni associati allo stato attivato α -SMA e Col1 α 1. L'espressione di entrambi i geni è risultata significativamente ridotta nelle HSC trasdotte con i due vettori AdshSnail1 rispetto alle HSC controllo trasdotte con AdshLacZ [figura 5.7B e C], avvalorando così l'ipotesi iniziale sul possibile ruolo di Snail1 nel processo d'attivazione delle HSC. Per quanto riguarda l'espressione di α -SMA, inoltre, il dato è stato confermato anche a livello proteico mediante Western Blotting [figura 5.7D].

In seguito si è proseguito con l'analisi dell'espressione di geni associati con il processo di transdifferenziazione delle HSC e/o possibili geni target di Snail1. In particolare, è stata determinata una significativa diminuzione dell'espressione di geni quali Integrin-Linked Kinase (Ilk), Metalloproteinasi-9 (Mmp9) e Snail2 ed un significativo aumento di desmoplakina (Dsp) in HSC in cui Snail1 è stato silenziato rispetto ad HSC controllo [figura 5.8 A-D].

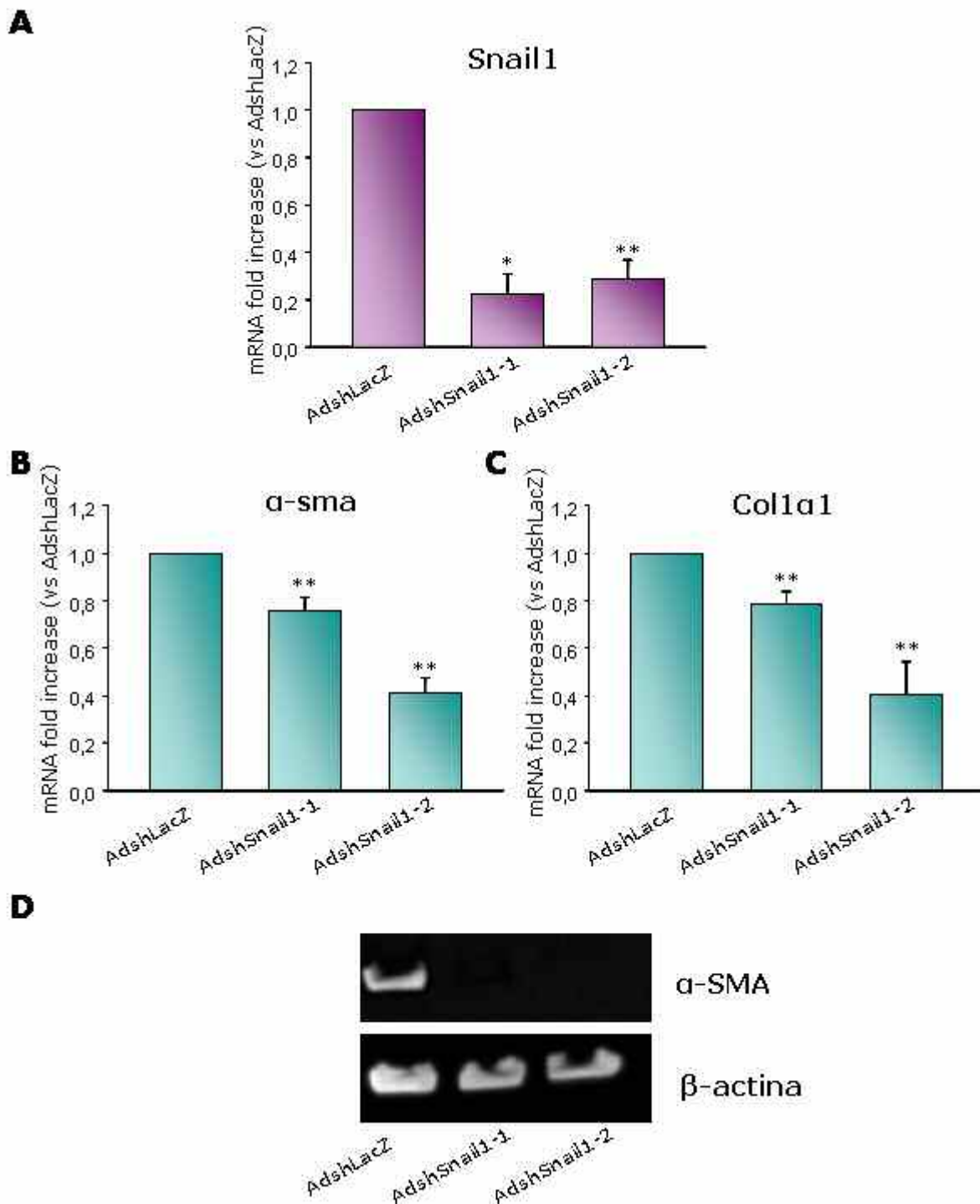


Figura 5.7 Effetto del silenziamento di Snail1 sul processo di attivazione delle HSC. Le HSC sono state infettate con AdshLacZ, AdshSnail1-1 o AdshSnail1-2 con MOI=100 il secondo giorno di coltura. All'ottavo giorno di coltura le cellule sono state raccolte e l'RNA totale è stato estratto ed i trascritti specifici per **(A)** Snail1 **(B)** asma e **(C)** Col1a1 sono stati quantificati mediante Real Time RT-PCR quantitativa. I dati sono espressi come media \pm SE e provengono da cinque esperimenti differenti (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ vs AdshLacZ). Ogni campione è stato saggiato in duplicato. **(D)** All'ottavo giorno di coltura le cellule sono state raccolte e le proteine totali sono state saggiate mediante Western blotting per l'espressione di α -SMA. L'espressione di β -actina è stata utilizzata come controllo di caricamento di egual quantità di campione. I dati riportati sono rappresentativi di tre diversi esperimenti.

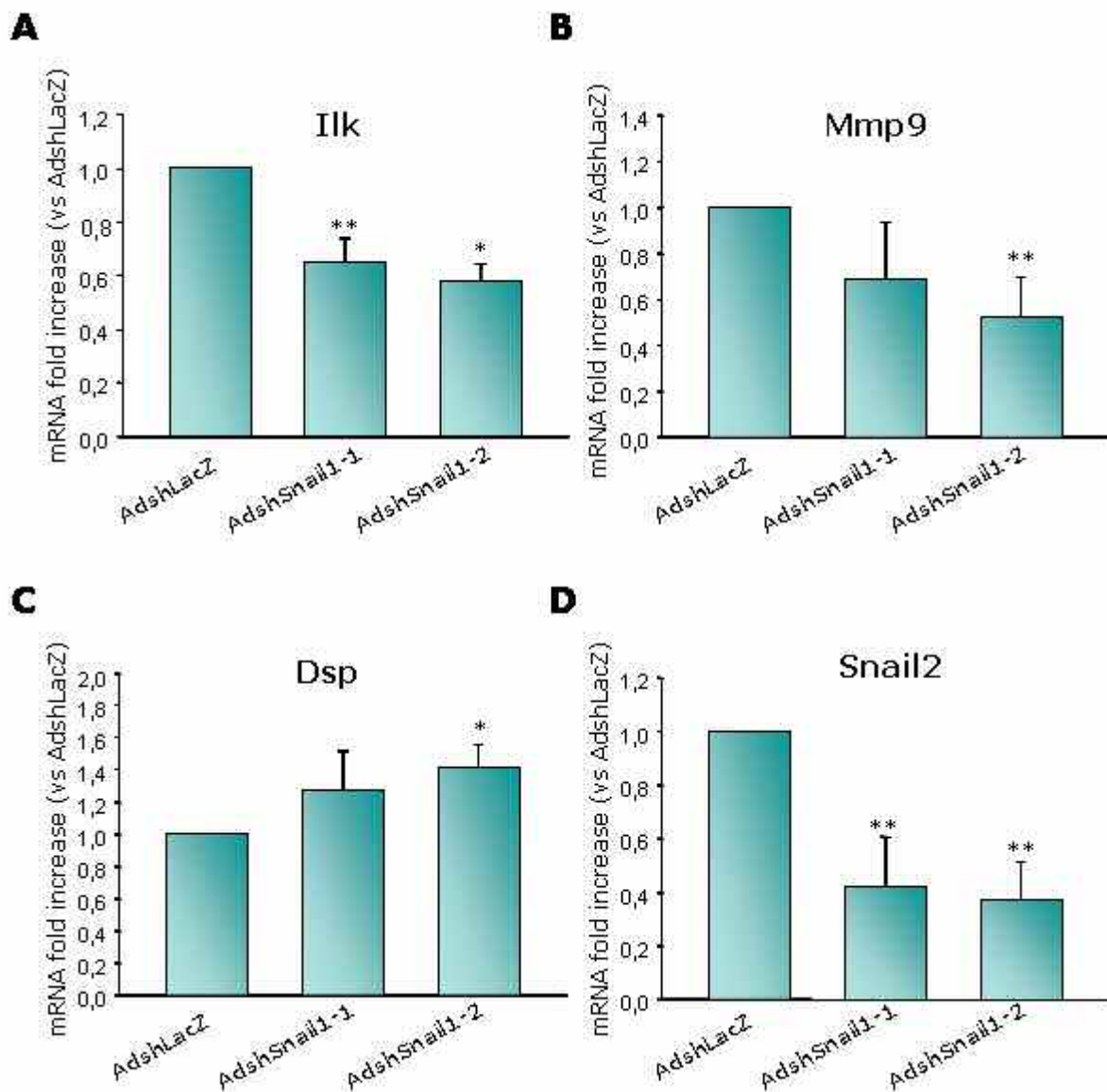


Figura 5.8 Effetto del silenziamento di Snail1 sul processo di attivazione delle HSC. Le HSC sono state infettate con AdshLacZ, AdshSnail1-1 o AdshSnail1-2 con MOI=100 il secondo giorno di coltura. All'ottavo giorno di coltura le cellule sono state raccolte e l'RNA totale è stato estratto ed i trascritti specifici per **(A)** Ilk **(B)** Mmp9 **(C)** Dsp e **(D)** Snail2 sono stati quantificati mediante Real Time RT-PCR quantitativa. I dati sono espressi come media \pm SE e provengono da cinque esperimenti differenti (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ vs AdshLacZ). Ogni campione è stato saggiato in duplicato.

5.7 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 nella fibrosi epatica umana

Per verificare il coinvolgimento di Snail1 anche nella fibrosi epatica umana, è stata iniziata l'analisi dell'espressione di Snail1 in campioni di fegato umano. I livelli di Snail1 sono stati determinati in fegato sano ottenuto in corso di epatectomia eseguita in pazienti con metastasi epatiche (controlli) (n=2) ed in campioni biotici di pazienti affetti da epatite cronica da HCV (n=6) con grado di fibrosi 2-4 [figura 5.9]. Dato il numero esiguo di campioni in esame non è stato possibile eseguire l'analisi statistica dei dati ottenuti, tuttavia nelle misurazioni finora effettuate il numero di copie di mRNA di Snail1 risulta aumentato nei campioni di fegato fibrotico rispetto ai controlli sani.

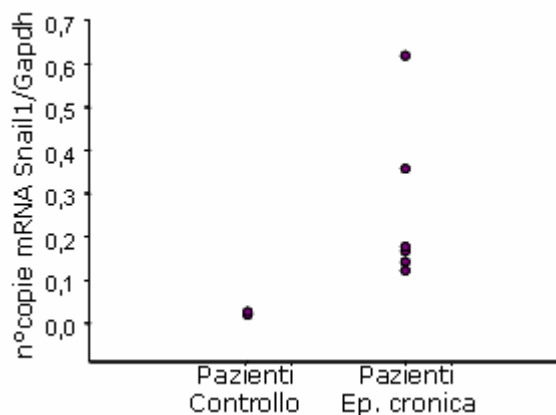


Figura 5.9 Caratterizzazione dell'espressione di Snail1 nella fibrosi epatica umana. L'RNA totale è stato estratto da campioni di fegato prelevati da pazienti affetti da metastasi epatiche (controllo) (n=2) o affetti da epatite cronica da HCV (fibrosi) (n=6) e l'mRNA specifico per Snail1 è stato quantificato mediante Real Time RT-PCR quantitativa. Ogni campione è stato saggiato in duplicato per ogni reazione di PCR.

6. DISCUSSIONE

La transdifferenziazione delle HSC in seguito a danno epatico costituisce una componente della normale risposta riparativa omeostatica del fegato. Tuttavia, nelle epatopatie croniche i meccanismi di riparazione tissutale risultano persistentemente attivati: producendo e depositando elevate quantità di ECM, possono sfociare nella disorganizzazione epatica e nell'instaurarsi della cirrosi. Perciò la comprensione dei meccanismi che governano la transdifferenziazione delle HSC rappresenta un pre-requisito per l'eventuale identificazione di anomale vie di segnale attivate e lo sviluppo di specifiche modalità terapeutiche.

In questo lavoro è stato per la prima volta caratterizzato il fattore di trascrizione Snail1 nella fibrogenesi epatica e ne è stato valutato il ruolo nel processo d'attivazione delle HSC. In particolare è stato dimostrato che: 1) nella fibrosi epatica sperimentale indotta mediante somministrazione di CCl₄ si verifica un aumento significativo dei livelli di trascritto per Snail1 e la doppia marcatura per α -SMA e Snail1 nel fegato fibrotico ne ha rivelato la colocalizzazione a livello dei setti fibrotici; 2) Snail1 è sovraespresso durante la transdifferenziazione di cellule stellate sia nel modello d'attivazione *in vitro* che *in vivo*; 3) il silenziamento specifico di Snail1 in cellule stellate ne attenua il fenotipo attivato *in vitro*; 4) dati preliminari evidenziano un'*up-regulation* dell'mRNA di Snail1 anche nella fibrosi epatica umana.

La maggior parte degli studi riguardanti Snail1 si sono focalizzati sul suo ruolo nella transizione epitelio-mesenchima (EMT) che avviene durante lo sviluppo embrionale e nella progressione tumorale. Una conclusione che si può trarre da tali studi è che questo fattore di trascrizione agisce principalmente nella regolazione del movimento cellulare e per fornire alle cellule capacità di sopravvivenza. Mentre queste proprietà sono cruciali per lo sviluppo embrionale, possono diventare fatali in situazioni patologiche nell'adulto. L'induzione del movimento cellulare mediato da Snail1 viene tradotta nell'embrione nella capacità di generare diversi tessuti ed organi distanti dalla posizione d'origine dei loro precursori. Nel cancro, d'altra parte, facilitano la delaminazione delle cellule dal tumore primario e la formazione di metastasi [132].

Nel contesto della riparazione tissutale Snail1 potrebbe contribuire all'attivazione e migrazione di miofibroblasti al sito di danno, fondamentale per la ricostituzione ed il rimodellamento della matrice extracellulare. A supporto di tale ipotesi, uno studio recente ha mostrato che Snail1 è presente in cellule mesenchimali e che la sua espressione non è costitutiva, ma dipendente dall'attivazione della via di segnale ERK [145, 158]; un saggio di *wound-healing in vivo* ha dimostrato che Snail1 è espresso solo da fibroblasti migranti; inoltre, nella fibromatosi, una condizione patologica caratterizzata dalla proliferazione di fibroblasti attivati e con un alto potenziale d'invasività, tali cellule risultano Snail1⁺ [158].

In questo studio è stato per prima cosa dimostrato che anche le cellule stellate epatiche, a tutt'oggi considerate la principale fonte di miofibroblasti nel fegato, sono Snail1⁺.

L'espressione di tale fattore risulta aumentata significativamente a livello di mRNA in HSC attivate *in vitro* ed *in vivo* [figura 5.2A e 5.5B], mentre a livello proteico risulta localizzato nel nucleo solo in cellule attivate o in corso d'attivazione [figura 5.2B e 5.5C]. Nel nucleo Snail1 si presenta con un *pattern* d'espressione non omogeneo, in punti ben precisi non colorati dallo ioduro di propidio, corrispondenti ad ICG (*interchromatin granule clusters*); si tratta di una distribuzione osservata anche in linee cellulari tumorali umane, specialmente quando l'esportazione nucleare viene inibita, e s'ipotizza che la presenza del fattore di trascrizione in tali strutture ne preceda l'uscita dal nucleo [148]. Ciò sottolinea l'importanza della regolazione post-traduzionale di Snail1, che influenza la localizzazione cellulare del fattore di trascrizione tramite fosforilazione ad opera di GSK-3 β , PAK-1 e LIV-1, enzimi di cui non è stata ancora caratterizzata la funzione nelle HSC. Uno studio recente ha inoltre dimostrato che le proteine *lysyl oxidase-like2* e 3 (LOXL2/3), coinvolte nella biogenesi del tessuto connettivo in quanto catalizzano il *crosslinkage* di collagene ed elastina [162], contribuiscono alla stabilizzazione di Snail1 nel nucleo mediante modificazione delle lisine K98 e K137 [163]. È interessante notare che sia LOXL2 che LOXL3 sono state rilevate nei setti fibrotici di campioni di fegato di pazienti con epatite cronica HBV ed HCV-associata [164], suggerendone quindi un potenziale coinvolgimento nella regolazione di Snail1 nella fibrogenesi epatica.

Esperimenti di RNAi mediante shRNA per Snail1 in HSC ne hanno confermato il coinvolgimento nella promozione del processo d'attivazione: difatti cellule in cui Snail1 è stato silenziato hanno mostrato una ridotta espressione di due tipici geni marcatori d'attivazione, α -SMA e procollagene I(α 1) [figura 5.7B-D]. Inoltre, è risultata modificata l'espressione di geni potenzialmente coinvolti nella migrazione e sopravvivenza delle HSC attivate [figura 5.8]. Integrin-linked Kinase (ILK) è down-regolata in HSC silenziate per Snail1; questa proteina adattatrice intracellulare, dotata di attività chinasi, è stata recentemente implicata nel processo di fibrogenesi epatica e nell'attivazione delle cellule stellate, favorendone la sopravvivenza, la migrazione ed il fenotipo fibrogenico [165, 166]. Anche l'espressione della metalloproteinasi-9 (MMP-9) risulta ridotta; si tratta di una collagenasi che degrada collagene interstiziali ed il collagene di tipo IV, un importante componente delle membrane basali [15], spesso associata all'invasività di cellule tumorali [167] ed implicata nella transdifferenziazione delle HSC [168]. Si è dimostrata inoltre l'alterazione dell'espressione di altri due geni, finora mai descritti nelle HSC, in cellule stellate in cui Snail1 è stato silenziato: si tratta della desmoplakina (Dsp), che risulta up-regolata, e di Snail2 (noto anche come Slug), la cui espressione risulta ridotta. La Dsp è una proteina componente dei desmosomi, strutture che fungono da siti d'ancoraggio per i filamenti intermedi, e spesso descritta come *target* di Snail1 [133]. Snail2 invece è un altro fattore di trascrizione facente parte della famiglia Snail, implicato anch'esso nel processo di EMT e nel promuovere la sopravvivenza cellulare [169]. Sebbene Snail1 sia noto prevalentemente come repressore trascrizionale, ciò non esclude una sua possibile funzione nell'induzione della trascrizione [154]. I dati ottenuti tuttavia non provano la regolazione diretta dei geni presi in esame da parte di Snail1, che invece potrebbe agire mediante repressione di altri geni che normalmente inibiscono la trascrizione di α -SMA, procollagene I(α 1), ILK, MMP-9 e

Snail2. Dato che negli esperimenti di silenziamento sono state utilizzate HSC nella prima settimana di coltura, quando cioè avviene il processo di transdifferenziazione, è possibile che Snail1 sia necessario per l'induzione di tali geni, ma non per il mantenimento della loro trascrizione. Nel complesso si può comunque affermare che il silenziamento specifico di Snail1 inibisce la progressione delle HSC verso il fenotipo attivato *in vitro*.

Anche *in vivo*, nel fegato fibrotico di animali sottoposti a somministrazione cronica di CCl₄, l'mRNA specifico per Snail1 è risultato significativamente aumentato [figura 5.4A]. L'induzione trascrizionale potrebbe essere dovuta a numerosi fattori noti per essere coinvolti nella progressione della fibrogenesi epatica, quali il TGF- β , i ROS ed NF- κ B [154]. I dati finora ottenuti dall'analisi di campioni epatici umani sembrano indicare un *trend* simile [figura 5.9], che tuttavia necessita di essere validato dall'esame di una più ampia casistica.

La contemporanea marcatura per Snail1 ed α -SMA in fegati fibrotici di animali trattati con CCl₄ ha evidenziato la presenza di cellule Snail1⁺ α -SMA⁺, ma anche di cellule Snail1⁺ α -SMA⁻ e Snail1⁻ α -SMA⁺ [figura 5.4B]. Questo tipo di marcatura potrebbe essere spiegato dall'eterogeneità delle HSC, dimostrata in uno studio condotto su fegati di topi doppio transgenici α -SMA-RFP/COLL-EGFP, in cui sono state osservate sottopopolazioni di cellule stellate α -SMA⁺ che non trascrivono attivamente collagene, cellule Coll⁺ prive di α -SMA e cellule che esprimono sia α -SMA che collagene [170]. Queste sottopopolazioni d'HSC sono caratterizzate da diversi livelli di marcatori neurali ed MMP [170]. D'altra parte, non è possibile escludere che cellule Snail1⁺ α -SMA⁻ non siano cellule stellate ma cellule parenchimali, epatociti e colangiociti, in corso di EMT. Difatti Snail1 viene riconosciuta come marcatore di EMT, e studi molto recenti hanno dimostrato che tale processo può contribuire allo sviluppo della fibrogenesi epatica. Diversi lavori hanno dimostrato in precedenza la transdifferenziazione *in vitro* di epatociti neonatali di ratto [171] e di epatociti murini Met [172] in cellule mesenchimali. Recentemente questo processo è stato osservato *in vivo* in topi transgenici AlbCre.R26RstoplacZ trattati con CCl₄, in cui il gene reporter LacZ risulta attivato negli epatociti ed in tutte le cellule con una precedente origine epatocitaria [173]. L'EMT di cellule dell'albero biliare invece è stata dimostrata per la prima volta da Xia *et al* [174], che mostrò che le cellule epiteliali biliari nel fegato murino dopo 12 settimane di BDL esprimono HSP47 e sintetizzano collagene di tipo I. Nel fegato umano prove di EMT nei colangiociti sono state osservate in un caso di PBC [175] e nella fibrosi associata ad atresia biliare, in cui Snail1 risulta colocalizzato con marcatori biliari [176].

In realtà non è da escludere che le HSC stesse vadano incontro ad un processo di EMT. Lim *et al* [177] hanno dimostrato precedentemente l'espressione delle citocheratine 18 e 19 (CK18 e CK19) in HSC umane in coltura, e la loro progressiva diminuzione in seguito a coltura prolungata. CK18 e CK19 vengono normalmente considerate marcatori cellulari d'origine epiteliale. Perciò conclusero che le HSC potessero avere un'origine epiteliale e che acquisissero un fenotipo mesenchimale durante l'attivazione. In un lavoro successivo hanno dimostrato che HSC quiescenti esprimono la E-caderina e la β -catenina sia *in vitro* che *in vivo*, e che la E-caderina viene sostituita dalla N-caderina durante l'attivazione delle HSC [178]. Inoltre, un altro studio recente [179] ha dimostrato che HSC e cellule progenitrici epiteliali presenti nel fegato fibrotico in un modello murino esprimono contemporaneamente

marcatori epiteliali e mesenchimali, dando prova che la EMT avviene in cellule del fegato adulto. Questo studio ha inoltre dimostrato che la E-caderina è espressa in una linea cellulare di HSC di ratto e che HSC isolate da fegato murino esprimono alti livelli di Mpk, un classico marcatore di cellule ovali. D'altra parte è recentemente emerso che una sottopopolazione di HSC CD133⁺ esprime marcatori di cellule staminali pluripotenti quali OCT4, nanog e c-kit ed è in grado di differenziarsi in cellule endoteliali ed epatociti [64]. In entrambi questi scenari, l'EMT e cellule pluripotenti, Snail1 potrebbe avere un ruolo nel *commitment* delle cellule verso un fenotipo mesenchimale.

In conclusione, in questo lavoro di dottorato è stato caratterizzato un nuovo fattore di trascrizione, Snail1, nel processo di fibrogenesi epatica e ne è stato dimostrato il coinvolgimento nella transdifferenziazione delle HSC. Si ritiene che tale studio possa costituire un presupposto per l'ulteriore delucidazione dei complessi e molteplici meccanismi che sottendono lo sviluppo della fibrosi epatica.

7. ABBREVIAZIONI

Ad, adenovirus; **AST**, aspartato aminotransferasi; **BDL**, *bile duct ligation*; **BSA**, albumina di siero bovino; **Col1 α 1**, procollagene1(α 1); **CPE**, *cytophatic effect*; **Cy3**, cyanine3; **DMEM**, Dulbecco's modified Eagle Medium; **dNTP**, deossiribonucleoside trifosfato; **ds**, *double stranded*; **ECM**, *extracellular matrix*; **EDTA**, acido etilendiamminotetraacetico; **EGF**, *epidermal growth factor*; **EMT**, *epithelial-mesenchymal transition*; **ET-1**, endotelina-1; **FBS**, siero fetale bovino; **FSP**, *fibroblast specific protein*; **GAPDH**, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi; **GFP**, *green fluorescent protein*; **HBSS**, Hanks' balanced salt solution; **HCV**, virus dell'epatite C; **HSC**, *hepatic stellate cells*; **IGF**, *insulin-like growth factor*; **IL**, interleuchina; **ITR**, *inverted terminal repeats*; **MCP-1**, *monocyte chemotactic protein*; **MMP**, metalloproteinasi; **MOI**, *multiplicity of infection*; **mRNA**, RNA messaggero; **pb**, paia di basi; **PBS**, *phosphate buffered saline*; **PCR**, *polymerase chain reaction*; **PDGF**, *platelets-derived growth factor*; **PF**, fibroblasti portalici; **PFA**, paraformaldeide; **PFU**, *plaque forming unit*, **p/v**, peso su volume; **RNAi**, *RNA interference*; **ROS**, *reactive oxygen species*; **SDS**, sodio dodecil solfato; **shRNA**, *short hairpin RNA*; **α -SMA**, *α -smooth muscle actin*; **ss**, *single stranded*; **TGF- β** , *transforming growth factor- β* ; **TIMP**, *tissue inhibitor of metalloproteinase*; **TNF- α** , *tumor necrosis factor- α* ; **TBS**, *Tris-buffered saline*.

8. BIBLIOGRAFIA

1. **Battaller R, Brenner DA.** Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2):209-218
2. **Pinzani M, Rombouts K.** Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36(4):231-42
3. **Poynard T, Bedossa P, Opolon P.** Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349(9055):825-32
4. **Pinzani M, Romanelli RG, Magli S.** Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *J Hepatol* 2001; 34(5):764-7
5. **Battaller R, North KE, Brenner DA.** Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37:493-503
6. **Friedman SL.** Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1:S38-53
7. **Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM.** Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 2007; 381(2):107-13
8. **Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R.** Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12):1705-13
9. **Friedman SL.** The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 328:1828-1835
10. **Bissell DM, Friedman SL, Maher JJ, Roll FJ.** Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology* 1990; 11:488-498
11. **Burgenson RE.** New collagens, new concepts. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4:551-577
12. **Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L.** Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979; 76:710-719
13. **Bissell DM.** Cell-matrix interaction and hepatic fibrosis. *Prog Liver Dis* 1990; 9:143-155
14. **McGuire RF, Bissell DM, Boyles J, Roll FJ.** Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology* 1992; 15:989-997
15. **Benyon RC, Arthur MJ.** Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:373-384
16. **Arthur MJ.** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(2): G245-G249
17. **Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, Arthur MJ.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-I and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Lond)* 1995; 89:75-81

18. **Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G.** Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:443–453
19. **Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G.** Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- α and TGF- β 1. *J Hepatol* 1999; 30:48–60
20. **Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, Clark N, Murphy G.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996; 24:176–184
21. **Iredale JP, Murphy FR, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJ.** Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992; 90:282–287
22. **Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP.** Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277:11069–11076
23. **Arthur MJ.** Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122:1525–1528
24. **Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, Sands E, Suliman I, Trim N, Knorr A, Arthur MJ, Benyon RC, Iredale JP.** Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004; 126:1795–1808
25. **Desmet VJ, Roskams T.** Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004; 40:840–867
26. **Desmoulière A.** Hepatic stellate cells: the only cells involved in liver fibrogenesis? A dogma challenged. *Gastroenterology* 2007; 132(5):2059–62
27. **Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmoulière A.** Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(2):135–51
28. **Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabbiani G.** Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1996; 74:265–278
29. **Desmoulière A, Darby I, Costa AMA, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G.** Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1997; 76:765–778
30. **Milani S, Herbst H, Schuppan D, Kim KY, Riecken EO, Stein H.** Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology* 1990; 98:175–184
31. **Gao Zh, McAlister VC, Williams GM.** Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *The Lancet* 2001; 357:932–33

32. **Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y.** Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002; 36:653-59
33. **Baba S, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Hoppo T, Naito M, Machimoto T, Ikai I.** Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 2004; 40:255-60
34. **Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ.** The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130:1807-21
35. **Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Ruge M, Wright NA, Alison MR.** A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126:955-63
36. **Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I.** Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 45:213-22
37. **Quan TE, Cowper SE, Bucala R.** The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2006, 8:145-50
38. **Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R.** Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36:598-606
39. **Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN.** Peripheral blood fibrocytes: Differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001, 166:7556-62
40. **Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA.** Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006; 45:429-38
41. **Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW.** The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172:973-81
42. **Kalluri R, Neilson EG.** Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112:1776-84
43. **Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R.** Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007; 282(32):23337-47
44. **Kaimori A, Potter J, Kaimori J, Wang C, Mezey E, Koteish A.** TGF-beta 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in-vitro. *J Biol Chem* 2007; 282(30):22089-22101
45. **Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Shi J, Li F, Song J.** Regulation of transforming growth factor- β 1-induced apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition by protein kinase A and signal transducers and activators of transcription 3. *Cancer Res* 2006; 66:8617-24
46. **Del Castillo G, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, Bertran E, Fernandez M, Sanchez A, Fabregat I.** Autocrine production of TGF- β confers resistance to

apoptosis after an epithelial-mesenchymal transition process in hepatocytes: Role of EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2006; 312:2860-71

47. **Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DEJ, Burt AD.** Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45:977-81
48. **Rygiel KA, Robertson H, Burt AD, Jones DEJ, Kirby JA.** Demonstration of the transition of intrahepatic biliary epithelial cells to fibroblasts during chronic inflammatory liver diseases. *J Hepatol* 2006; 44:S241
49. **Cassiman D, Roskams T.** Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 2002; 37:527-35
50. **Bhunchet E, Wake K.** Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology* 1992; 16:1452-1473
51. **Andrade ZA, Guerret S, Fernandes AL.** Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94:87-93
52. **Geerts A.** History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 311-335
53. **Geerts A.** On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *J Hepatol* 2004; 40: 331-334
54. **Pinzani M.** Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmac Ther* 1995; 66: 387-412
55. **Wake K, Sato T.** Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res* 1993; 273:227-237
56. **Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJP.** Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110:821-31
57. **Benyon RC, Arthur MJP.** Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:373-84
58. **Helyar L, Bundschuh DS, Laskin JD, Laskin DL.** Induction of hepatic Ito cell nitric oxide production after acute endotoxemia. *Hepatology* 1994; 20:1509-1515
59. **Marra F, Valente AJ, Pinzani M, Abboud HE.** Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1993; 92:1674-80
60. **Rockey D.** Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21:337-49
61. **Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A.** Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50:571-81
62. **Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodes J.** Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003; 38:919-29

63. **Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, Kaufmann SHE.** Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 2007; 26:117-29
64. **Kordes C, Sawitza I, Muller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Haussinger D.** CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352:410-17
65. **Zhan S-S, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ.** Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis *in vivo*. *Hepatology* 2006; 43:435-43
66. **Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K.** Regulation of Hepatic Stellate Cell Differentiation by the Neurotrophin Receptor p75NTR. *Science* 2007; 315:1853-56
67. **Lee JS, Semela D, Iredale JP, Shah VH.** Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericytes? *Hepatology* 2007; 45:817-25
68. **Gressner AM.** Transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int* 1996; 49:S39-45
69. **Friedman SL.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2247-2250
70. **Nieto N.** Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells in stellate cells. *Hepatology* 2006, 44:1487-1501
71. **Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S.** NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41:1272-81
72. **Baroni GS, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A.** Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27:720-26
73. **Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C.** Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25:361-67
74. **Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P.** Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde- induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001; 33:1130-40
75. **Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O.** Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35:1010-21
76. **Inagaki Y, Okazaki I.** Emerging insights into Transforming growth factor {beta} Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56:284-92
77. **Pinzani M, Marra F.** Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:397-416
78. **Ross R.** Platelet-derived growth factor. *Annu Rev Med* 1987; 38:71-9

79. **Marra F, Choudhury GG, Pinzani M, Abboud HE.** Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. *Gastroenterology* 1994; 107: 1110–7
80. **Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P.** Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 1999; 30(4):951-8
81. **Pinzani M, Marra F, Carloni V.** Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998; 18(1):2-13
82. **Gong W, Roth S, Michel K, Gressner AM.** Isoforms and splice variant of transforming growth factor beta-binding protein in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1998; 114: 352–63
83. **Wells RG.** Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G845-G850
84. **Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E.** Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor- β -induced gene expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 27161–27167
85. **Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ.** Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver - Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96:447-55
86. **Marra F, Bonewald LF, Parksnyder S, Park IS, Woodruff KA, Abboud HE.** Characterization and regulation of the latent transforming growth factor-beta complex secreted by vascular pericytes. *J Cell Physiol* 1996; 166:537-46
87. **Gressner AM, Polzar B, Lahme B, Mannherz HG.** Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor-beta. *Hepatology* 1996; 23:571-81
88. **Gressner AM, Lahme B, Mannherz HG, Polzar B.** TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol* 1997; 26:1079-92
89. **Kiso S, Kawata S, Tamura S, Ito N, Takaishi K, Shirai Y, Tsushima H, Matsuzawa Y.** Alteration in growth regulation of hepatocytes in primary culture obtained from cirrhotic rat: Poor response to transforming growth factor-beta 1 and interferons. *Hepatology* 1994; 20:1303-8
90. **Bissell DM, Roulot D, George J.** Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology* 2001; 34:859-67
91. **Koli K, Saharinen J, Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J.** Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Technique* 2001; 52:354-62
92. **Williams EJ, Gaca MD, Brigstock DR, Arthur MJ, Benyon RC.** Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 32: 754-761

93. **A.W. Rachfal and D.R. Brigstock.** Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2003; 26: 1–9
94. **Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P.** Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110(2):534-48
95. **Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolás JM, Jiménez W, Weich N, Gutiérrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodés J.** Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117–25
96. **Hegyí K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A.** Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004; 28: 159–169
97. **Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA.** Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35: 762–771
98. **Lang T, Ikejima K, Yoshikawa M, Enomoto N, Iijima K, Kitamura T, Takei Y, Sato N.** Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 1091–1095
99. **Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA.** Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004; 18: 1612–1614
100. **Marra F, Valente AJ, Pinzani M, Abboud HE.** Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemoattractant protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1993; 92: 1674-1680
101. **Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pastacaldi S, Pinzani M, Romanelli RG, Laffi G, Gentilini P.** Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 during active hepatic fibrogenesis: correlation with monocyte infiltration. *Am J Pathol* 1998; 152: 423-430
102. **Greenwel P, Rubin J, Schwartz M, Hertzberg EL, Rojkind M.** Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest* 1993; 69: 210-216
103. **Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, Chamuleau RA.** Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha. *J Hepatol* 1995; 23: 295-306
104. **Pinzani M.** Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmac Ther* 1995; 66: 387-412
105. **Sohara N, Znoyko I, Levy MT, Trojanowska M, Reuben A.** Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *J Hepatol.* 2002; 37:214-221

106. **Gaca MD, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale JP, Benyon RC.** Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol.* 2003; 22:229-239
107. **Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H.** Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273(1): 302-8
108. **Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ.** Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis-hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
109. **Baldwin AS.** The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-81
110. **Karin M, Ben-Neriah Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63
111. **Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, Sartor RB, Brenner DA.** Cytokines induce NF- κ B in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1998; 275: G269-78
112. **Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA.** Persistent activation of nuclear factor-kappa B in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of I κ B family proteins. *Hepatology* 1999; 30: 761-9
113. **Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA.** Nuclear factor KappaB in proliferation, activation and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58
114. **Vogt PK.** Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20:2365-77
115. **Bahr MJ, Vincent KJ, Arthur MJ, Fowler AV, Smart DE, Wright MC, Clark IM, Benyon RC, Iredale JP, Mann DA.** Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter in culture-activated rat hepatic stellate cells: regulation by activator protein-1 DNA binding proteins. *Hepatology* 1999; 29: 839-48
116. **Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazzi M, Mann J, Mann DA.** JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 24414-21
117. **Poulos JE, Weber JD, Bellezzo JM, Di Bisceglie AM, Britton RS, Bacon BR, Baldassare JJ.** Fibronectin and cytokines increase JNK, ERK, AP-1 activity and transin gene expression in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1997; 273: G804-11
118. **Solís-Herruzo JA, Rippe RA, Schrum LW, de La Torre P, García I, Jeffrey JJ, Muñoz-Yagüe T, Brenner DA.** Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1999; 274: 30919-26
119. **Ratzu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL.** Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9500-5

120. **Kim Y, Ratzu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL.** Transcriptional activation of transforming growth factor β 1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. *J Biol Chem* 1998; 273: 33750-8
121. **García-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Domínguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rojkind M.** Transforming growth factor β 1 induces the expression of α 1 (I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP β -dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 960-970
122. **Greenwel P, Domínguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M.** Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited α 1 (I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; 31: 109-16
123. **Iraburu MJ, Domínguez-Rosales JA, Fontana L, Auster A, García-Trevijano ER, Covarrubias-Pinedo A, Rivas-Estilla AM, Greenwel P, Rojkind M.** Tumor necrosis factor α down-regulates expression of the α 1 (I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBP β - and C/EBP δ -dependent mechanism. *Hepatology* 2000; 31: 1086-93
124. **Blackwell TK, Weintraub H.** Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 1990; 250: 1104-10
125. **Yun K, Wold B.** Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 877-89
126. **Vincent KJ, Jones E, Arthur MJ, Smart DE, Trim J, Wright MC, Mann DA.** Regulation of E-box DNA binding during in vivo and in vitro activation of rat and human hepatic stellate cells. *Gut* 2001; 49: 713-19
127. **Weiner JA, Chen A, Davis BH.** E-box repressor is down-regulated in hepatic stellate cells during up-regulation of mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor expression in early hepatic fibrogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 15913-19
128. **Buck M, Kim DJ, Houglum K, Hassanein T, Chojkier M.** c-Myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 2000; 278: G321-8
129. **Wilson TM, Lambert MH, Kliewer SA.** Peroxisome proliferators-activated receptor γ and metabolic disease. *Ann Rev Biochem* 2001; 70: 341-67
130. **Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H.** Peroxisome proliferators-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 35715-22
131. **Galli A, Crabb D, Price D, Ceni E, Salzano R, Surrenti C, Casini A.** Peroxisome proliferators-activated receptor γ transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; 31: 101-8
132. **Barrallo-Gimeno A, Nieto MA.** The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005; 132(14): 3151-61

133. **Nieto MA.** The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3): 155-66
134. **Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T.** The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 2001; 21(23): 8184-8
135. **Thisse C, Thisse B, Schilling TF, Postlethwait JH.** Structure of the zebrafish snail1 gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* 1993; 119(4): 1203-15
136. **Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA.** The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 76-83
137. **Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J.** Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1. *J Biol Chem* 2002 18; 277(42): 39209-16
138. **Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S.** Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 2003; 116(10): 1959-67
139. **Olmeda D, Jordá M, Peinado H, Fabra A, Cano A.** Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* 2007; 26(13): 1862-74
140. **Batlle E, Sancho E, Franci C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A.** The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 84-9
141. **Kajita M, McClinic KN, Wade PA.** Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 2004; 24(17): 7559-66
142. **Martínez-Alvarez C, Blanco MJ, Pérez R, Rabadán MA, Aparicio M, Resel E, Martínez T, Nieto MA.** Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev Biol.* 2004; 265(1): 207-18
143. **Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA.** Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004; 18(10): 1131-43
144. **Peinado H, Quintanilla M, Cano A.** Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003; 278: 21113–2123
145. **Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L, Garcia de Herreros A.** Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 2004; 23: 7345–7354
146. **Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, Garcia de Herreros A, Mercurio AM.** Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2005; 168: 29–33
147. **Peiró S, Escrivà M, Puig I, Barberà MJ, Dave N, Herranz N, Larriba MJ, Takkunen M, Franci C, Muñoz A, Virtanen I, Baulida J, García de Herreros A.** Snail1

- transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(7): 2077-84
148. **Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Francí C, García de Herreros A.** Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 2003; 23(14): 5078-89
 149. **Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC.** Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(10): 931-40
 150. **Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ.** Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* 2005; 280(12): 11740-8
 151. **Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R.** Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res* 2005; 65(8): 3179-84
 152. **Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T.** Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 2004; 429(6989): 298-302
 153. **Huber MA, Kraut N, Beug H.** Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 548-58
 154. **De Craene B, van Roy F, Berx G.** Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* 2005; 17(5): 535-47
 155. **Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M.** Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med.* 2003; 348(5): 403-13
 156. **Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A.** Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 2003; 112(10): 1486-94
 157. **Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA.** Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* 2006; 25(23): 5603-13
 158. **Francí C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gómez S, Rodríguez R, Escrivà M, Montserrat-Sentís B, Baró T, Garrido M, Bonilla F, Virtanen I, García de Herreros A.** Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 2006; 25(37): 5134-44
 159. **Constandinou C, Henderson N, Iredale JP.** Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005;117:237-50
 160. **Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palù G, Martines D.** Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289(3): G571-8

161. **De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF.** Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132(5): 1937-46
162. **Kagan HM, Li W.** Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 2003; 88: 660-672
163. **Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F.** A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J* 2005; 24(19): 3446-58
164. **Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, Gengrinovitch S, Kagan HM, Baruch Y, Izhak OB, Neufeld G.** Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J Hepatol* 2005; 43(3): 499-507
165. **Shafiei MS, Rockey DC.** The role of integrin-linked kinase in liver wound healing. *J Biol Chem* 2006; 281(34): 24863-72
166. **Zhang Y, Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Bouscarel B, Rojkind M, Hyodo I, Matsuzaki Y.** Involvement of integrin-linked kinase in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 2006; 44(3): 612-22
167. **Jordà M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A, Fabra A.** Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 2005; 118(15): 3371-85
168. **Han YP, Yan C, Zhou L, Qin L, Tsukamoto H.** A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *J Biol Chem* 2007; 282(17): 12928-39
169. **Leroy P, Mostov KE.** Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. *Mol Biol Cell* 2007; 18(5): 1943-52
170. **Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA.** A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 2004; 40(5): 1151-9
171. **Pagan R, Martín I, Llobera M, Vilaró S.** Epithelial-mesenchymal transition of cultured rat neonatal hepatocytes is differentially regulated in response to epidermal growth factor and dimethyl sulfoxide. *Hepatology* 1997; 25(3): 598-606
172. **Spagnoli FM, Cicchini C, Tripodi M, Weiss MC.** Inhibition of MMH (Met murine hepatocyte) cell differentiation by TGF(beta) is abrogated by pre-treatment with the heritable differentiation effector FGF1. *J Cell Sci* 2000; 113(20): 3639-47
173. **Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R.** Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282(32): 23337-47
174. **Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y.** Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006;168:1500-12

175. **Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DE, Burt AD.** Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45: 977-81
176. **Díaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG.** Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol* 2008; 39(1): 102-15
177. **Lim, Y.S., K.A. Kim, J.O. Jung, J.H. Yoon, K.S.Suh, C.Y. Kim, H.S. Lee.** Modulation of cytokeratin expression during in vitro cultivation of human hepatic stellate cells:evidence of transdifferentiation from epithelial to mesenchymal phenotype. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 127-136
178. **Lim YS, Lee HC, Lee HS.** Switch of cadherin expression from E- to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells. *Histochem Cell Biol* 2007; 127(2): 149-60
179. **Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM.** Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291(4): G575-83

9. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Giorgio Palù, direttore della sezione di Microbiologia e Virologia del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, per avermi dato l'opportunità di svolgere questo lavoro di tesi presso i laboratori del dipartimento.

Esprimo la mia gratitudine al responsabile di questo lavoro, il dott. Diego Martines, per l'entusiasmo con cui ha seguito questo studio ed i continui incoraggiamenti.

Grazie al prof. Ignazio Castagliuolo per la disponibilità, il supporto e la fiducia sempre riservatemi nel corso degli anni.