

**CARATTERIZZAZIONE DI UN MODELLO DI TOPO TRANSGENICO PER  
SERPINB3 UMANA**

**INDICE**

<b>INDICE</b>	pag. 01
<b>RIASSUNTO</b>	pag. 03
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 11
<b>Struttura e funzione delle serpinae</b>	pag. 11
<b>Le isoforme SERPINB3 e SERPINB4</b>	pag. 11
<b>Caratteristiche di SERPINB3</b>	pag. 13
<b>Modello animale sperimentale</b>	pag. 14
<b>METODOLOGIA E SPERIMENTAZIONI</b>	pag. 17
<b>1. CARATTERIZZAZIONE DEL TOPO TRANSGENICO</b>	pag. 18
<b>Analisi genomica di SERPINB3</b>	pag. 19
<i>PCR (Polymerase chain reaction)</i>	pag. 19
<b>Risultati</b>	pag. 19
<i>Real-time PCR quantitativa (saggio SYBR green)</i>	pag. 20
<b>Risultati</b>	pag. 21
<b>Valutazione dell'espressione di SERPINB3 in differenti organi</b>	pag. 23
<i>Real-time PCR (saggio SYBR green)</i>	pag. 23
<b>Risultati</b>	pag. 23
<b>2. EFFETTO DI SERPINB3 SULLA CARCINOGENESI EPATICA SPONTANEA ED INDOTTA DA AFLATOSSINA B1</b>	pag. 25
<b>Introduzione</b>	pag. 26
<b>Modello sperimentale</b>	pag. 26
<i>Studio osservazionale</i>	pag. 26
<i>Trattamento con aflatoossina B1</i>	pag. 27
<i>Parametri istologici</i>	pag. 27
<i>Analisi statistiche</i>	pag. 28
<b>Risultati</b>	pag. 28
<i>Studio osservazionale</i>	pag. 28
<i>Trattamento con aflatoossina B1</i>	pag. 30
<b>Discussione</b>	pag. 32

<b>3. INDUZIONE DI FIBROSI POLMONARE MEDIANTE BLEOMICINA</b>	pag. 33
<b>Introduzione</b>	pag. 34
<b>Modello sperimentale</b>	pag. 34
<i>Analisi statistiche</i>	pag. 35
<b>Risultati</b>	pag. 35
<b>Discussione</b>	pag. 38
<b>4. STUDIO DELLA RIGENERAZIONE EPATICA DOPO EPATECTOMIA PARZIALE</b>	pag. 39
<b>Introduzione</b>	pag. 40
<b>Modello sperimentale</b>	pag. 40
<b>Immunoistochimica</b>	pag. 42
<i>Espressione di SERPINB3</i>	pag. 42
<i>Quantificazione dell'attività proliferativa</i>	pag. 42
<b>Tecniche molecolari</b>	pag. 43
<i>Real-time PCR quantitativa (saggio SYBR green)</i>	pag. 43
<i>Western blot</i>	pag. 44
<b>Saggi Sierologici</b>	pag. 45
<i>Determinazione del profilo citochinico</i>	pag. 45
<i>Analisi statistiche</i>	pag. 46
<b>Risultati</b>	pag. 46
<i>Profilo citochinico</i>	pag. 50
<b>Discussione</b>	pag. 51
<b>5. STUDIO DEI MECCANISMI PATOGENETICI DELL'ENCEFALOPATIA CORRELATA A DANNO EPATICO ACUTO DA PARACETAMOLO</b>	pag. 53
<b>Introduzione</b>	pag. 54
<b>Modello sperimentale</b>	pag. 54
<b>Risultati</b>	pag. 56
<b>Discussione</b>	pag. 60
<b>CONCLUSIONI</b>	pag. 61
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 63

## RIASSUNTO

### **Caratterizzazione di un modello di topo transgenico per SERPINB3 umana**

**Presupposti dello studio:** Le serpine sono una famiglia di inibitori delle proteasi seriniche implicata in molte funzioni biologiche e nei processi di controllo dell'omeostasi cellulare. SERPINB3 (chiamata anche SCCA1), appartenente alle ov-serpine, è espressa normalmente negli epitelii squamosi, ma si trova iper-espressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale e nell'epatocarcinoma.

Il coinvolgimento di SERPINB3 nella regolazione dei processi proteolitici ha importanti implicazioni a livello dei processi neoplastici, dal momento che l'equilibrio tra le proteasi ed i loro inibitori, può influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione e la morte cellulare stessa.

Dato il potenziale ruolo di SERPINB3 ed il limite determinato dalla disponibilità di materiale biologico per la ricerca clinica sull'uomo, risulta importante poter utilizzare un modello animale che permetta di sperimentare in vivo il ruolo che la proteina può rivestire in molteplici processi cellulari.

**Scopo dello studio:** lo scopo del nostro studio è quello di sperimentare il coinvolgimento della serpina in diverse patologie utilizzando un modello animale, costituito da un topo transgenico per SERPINB3 umana, caratterizzato dall'espressione della serpina in diversi organi quali il cervello, i polmoni ed il fegato.

**Materiali e metodi:** è stata valutata l'espressione di SERPINB3 nel modello di topo transgenico con metodica PCR e Real-time PCR (SYBR Green) e successivamente sono state condotte sperimentazioni sugli effetti di SERPINB3 nei processi di sviluppo della carcinogenesi epatica, della fibrosi polmonare, della rigenerazione epatica e dell'encefalopatia, correlata a danno epatico acuto.

Studio dei processi di carcinogenesi epatica spontanea ed indotta da aflatossina B1: inizialmente una popolazione di 123 topi transgenici per SERPINB3 e una di 148 topi wild type dello stesso ceppo (C57BL/6J) sono state osservate nel tempo fino al decesso; in un sottogruppo, costituito da 38 topi transgenici e 35 wild type, è stato anche prelevato il fegato per essere sottoposto ad esami istologici ed istochimici.

Nella seconda parte dello studio sono stati somministrati, intraperitonealmente, 2 µg/gr di peso corporeo di Aflatossina B1 (1 volta/settimana per 3 settimane) a due

gruppi di 10 animali transgenici e 10 animali wild type, mantenendoli in osservazione per 1 anno assieme ai gruppi di controllo non trattati.

Al momento del sacrificio è stato prelevato il fegato di tutti gli animali sul quale sono stati effettuati esami istologici ed istochimici.

Studio del danno polmonare dopo induzione di fibrosi con bleomicina: 8 topi transgenici ed 8 topi wild type sono stati inoculati, a livello intratracheale, con bleomicina ad una concentrazione di 2,5U/kg di peso corporeo; i due gruppi di controllo sono stati inoculati con PBS 1X. Al termine dell'esperimento sono stati prelevati i polmoni per studi di tipo istologico, immunoistochimico e morfologico.

Studio della rigenerazione epatica dopo epatectomia parziale: 11 topi transgenici e 10 wild type sono stati sottoposti ad epatectomia parziale bassa e sacrificati dopo 7 giorni. Al sacrificio sono stati prelevati il fegato in rigenerazione e campioni di siero per valutare i livelli di SERPINB3 circolante, di albumina e di un pannello di citochine. L'entità della rigenerazione è stata espressa come peso epatico relativo, calcolata in base al peso del fegato espianato, rispetto al peso corporeo; le stesse misurazioni sono state ottenute in due gruppi di animali, uno transgenico e uno wild type, non sottoposti ad intervento per ottenere valori basali di controllo. I campioni sono stati sottoposti ad indagini istologiche e molecolari.

Studio dei meccanismi patogenetici dell'encefalopatia, correlata a danno epatico acuto da paracetamolo: 12 topi transgenici e 12 wild type sono stati inoculati, a livello intraperitoneale, con paracetamolo ad una concentrazione di 0.8 mg/gr di peso corporeo. Due gruppi di controllo sono stati inoculati con fisiologica e durante tutti gli esperimenti è stato monitorato l'andamento della temperatura corporea.

Dopo 20 ore sono stati prelevati il cervello, il fegato ed il siero. Cervello e fegato sono stati utilizzati per studi di tipo istologico, immunoistochimico e molecolare. Sono stati valutati i livelli di ammoniemia nel sangue e l'espressione di differenti citochine nel siero.

**Risultati:** il nostro modello animale ha presentato una differente espressione di SERPINB3-mRNA negli organi esaminati: cervello (media  $\pm$  SD, 22.25  $\pm$  10.96 pg/ $\mu$ g RNA), polmone (media  $\pm$  SD, 17.5  $\pm$  0.71 pg/ $\mu$ g RNA) e fegato (media  $\pm$  SD, 11.25  $\pm$  2.47 pg/ $\mu$ g RNA), mentre quantità irrilevanti sono state identificate nelle gonadi, nel rene e nel muscolo.

Carcinogenesi epatica: I topi transgenici hanno mostrato un tempo di sopravvivenza significativamente più elevato rispetto ai controlli wild type (media  $\pm$  SD, TG: 13.83  $\pm$

0.65 mesi vs WT:  $11.73 \pm 0.55$  mesi,  $p=0.0131$ ), la differenza è risultata più evidente confrontando i maschi (media  $\pm$  SD, TG:  $13.72 \pm 0.83$  mesi vs WT:  $11.19 \pm 0.71$  mesi,  $p=0.0213$ ), rispetto alle femmine (media  $\pm$  SD, TG:  $13.96 \pm 1.03$  mesi vs WT:  $12.33 \pm 0.84$  mesi,  $p=0.2167$ ).

Nel sottogruppo di animali in cui è stato analizzato il fegato, i topi transgenici non hanno presentato differenze significative rispetto ai controlli e non sono stati evidenziati focolai di trasformazione neoplastica. L'analisi multivariata ha mostrato come l'età influenzi in modo significativo lo sviluppo di steatosi ( $p=0.0012$ ) e la riduzione della carica glicogenica ( $p=0.0265$ ) nei due gruppi di animali.

Nella sperimentazione con aflatossina B1 entrambi i gruppi hanno mostrato incrementi significativi della flogosi e della displasia rispetto al corrispettivo gruppo non trattato, con decremento della componente glicogenica significativo solo per i wild type ( $p=0.0014$ ).

Fibrosi polmonare: i topi transgenici hanno presentato maggiore entità della fibrosi ( $p=0.0395$ ), maggiore proliferazione cellulare ( $p=0.0381$ ), associati ad una inferiore flogosi follicolare ( $p=0.0022$ ). Da segnalare la presenza di focolai di trasformazione neoplastica nel gruppo di topi transgenici, evento non riscontrato nei controlli.

Rigenerazione epatica: il peso relativo del fegato dopo una settimana dall'epatectomia, è risultato significativamente più elevato nei topi transgenici rispetto ai topi wild type (media  $\pm$  SD:  $5.38\% \pm 0.15$  vs  $4.84\% \pm 0.11$ ,  $p=0.0221$ ). Il maggior sviluppo della massa epatica, nel gruppo di topi transgenici, era associato ad una diminuzione significativa dell'attività apoptotica, valutata come espressione di caspasi-3 attivata ( $p=0.0047$ ). Gli indici di proliferazione sono risultati elevati in entrambi i gruppi, con significatività di Ki67 rispetto al basale solo nei topi transgenici ( $p=0.0317$ ).

Encefalopatia correlata a danno epatico acuto: dopo l'induzione di insufficienza epatica acuta i topi transgenici hanno mostrato una sopravvivenza significativamente più bassa rispetto ai controlli (media  $\pm$  SD,  $29.20 \pm 2.58$  h vs  $50.40 \pm 5.88$  h,  $p=0.0108$ ), a parità di diminuzione della temperatura corporea e di entità di danno epatico.

Nei preparati istologici di tessuto cerebrale i topi transgenici, che esprimevano SERPINB3 a livello endoteliale, hanno mostrato una ipercellularità con maggior attivazione della microglia, rispetto ai controlli.

**Conclusioni:** i risultati ottenuti sul modello animale supportano l'ipotesi che SERPINB3 sia innanzitutto una molecola che induce protezione cellulare, come dimostrato dalla maggior sopravvivenza dei topi transgenici, rispetto ai controlli. Le evidenze sperimentali prodotte dimostrano inoltre che questa serpina non è un fattore in grado di indurre direttamente processi di trasformazione neoplastica, ma può potenziare l'attività proliferativa conseguente a stimolo flogistico con aumento del rischio di degenerazione neoplastica, come osservato a livello polmonare, o con peggioramento del danno cerebrale, con attivazione della microglia, come in corso di encefalopatia epatica acuta.

Nel processo di rigenerazione epatica questa serpina sembra svolgere un ruolo rilevante, indipendente da IL-6, caratterizzato da resistenza nei confronti della morte cellulare per apoptosi e da ulteriore stimolo proliferativo epatocitario.

Le caratteristiche biologiche di SERPINB3 fanno ritenere che questa serpina possa essere considerata un fattore protettivo che aumenta i meccanismi di sopravvivenza in condizioni di danno acuto, mentre in situazioni di danno cronico, le caratteristiche di maggior resistenza e potenzialità proliferativa cellulare potrebbero essere responsabili di un aumento del rischio di trasformazione neoplastica.

## **Characterization of a mouse model transgenic for human SERPINB3**

**Background:** the serpins are a family of serine protease inhibitors involved in several biological functions and in the maintenance of cell homeostasis.

SERPINB3 (known as SCCA1), a member of the ovalbumin family, is normally expressed in squamous epithelium, and it is over-expressed in tumours of epithelial origin and in hepatocellular carcinoma.

The SERPINB3 involvement in the control of proteolytic processes has important implications in neoplastic transformation, whereas the balance between proteases and their inhibitors can affect cell motility, invasiveness, proliferation and apoptosis.

Considering the potential role of SERPINB3 and the lack of human biological tissues for clinical research, the possibility to use a transgenic animal model to explore in vivo the role of this serpin in several cell processes could be of great value.

**Aim of the study:** the aim of the present study was to assess the SERPINB3 involvement in several pathologies by a transgenic mouse model for human SERPINB3, expressed in different organs as brain, lung and liver.

**Materials and methods:** SERPINB3 expression has been evaluated in transgenic mice by PCR and Real-time PCR (SYBR Green). SERPINB3 homozygote animals have been examined in hepatocarcinogenesis, lung fibrosis, liver regeneration and acute hepatic encephalopathy.

Spontaneous and aflatoxin B1 induced hepatocarcinogenesis: 123 transgenic mice for SERPINB3 and 148 wild type mice (strain C57BL/6J) have been initially included and followed up till death. In a subgroup (38 transgenic and 35 wild type) the liver was analyzed by histology and immunohistochemistry.

In the second part of the study two groups of animals (10 transgenic and 10 wild type mice) have been inoculated intraperitoneally with 2 µg/gr of body weight with aflatoxin B1 (1 time/week for 3 weeks) and followed up for 1 year. At sacrifice the liver of all injected animals and of the controls was analyzed by histology and immunohistochemistry.

Induction of pulmonary fibrosis by bleomycin: 8 transgenic and 8 wild type mice have been inoculated intratracheally with 2,5U/kg of body weight of bleomycin; the corresponding control groups have been inoculated with PBS 1X. After 20 days mice were sacrificed and lungs were analyzed by morphology, histology and immuno histochemistry.

Liver regeneration after partial hepatectomy: 11 transgenic and 10 wild type mice underwent low partial hepatectomy and were sacrificed after 7 days. At sacrifice the remnant liver and the corresponding serum samples have been analyzed by histological and molecular techniques.

Pathogenetic mechanisms of acute hepatic encephalopathy induced by acetaminophen: 12 transgenic and 12 wild type mice have been inoculated intraperitoneally with 0.8 mg/gr of body weight of acetaminophen. Control groups have been inoculated with saline solution and body temperature was controlled throughout the experiment. 20 hours post injection brain, liver and serum were analyzed.

**Results:** Transgenic animals showed a different expression of SERPINB3-mRNA in the examined organs, higher in brain (mean  $\pm$  SD, 22.25  $\pm$  10.96 pg/ $\mu$ g RNA), lung (mean  $\pm$  SD, 17.5  $\pm$  0.71 pg/ $\mu$ g RNA) and liver (mean  $\pm$  SD, 11.25  $\pm$  2.47 pg/ $\mu$ g RNA), while trivial amounts were identified in gonads, kidney and muscle.

Hepatocarcinogenesis: transgenic mice have shown a significantly longer survival than controls (mean  $\pm$  SD, TG: 13.83  $\pm$  0.65 months vs WT: 11.73  $\pm$  0.55 months,  $p=0.0131$ ), being difference more relevant in males (mean  $\pm$  SD, TG: 13.72  $\pm$  0.83 months vs WT: 11.19  $\pm$  0.71 months,  $p=0.0213$ ), compared to females (mean  $\pm$  SD, TG: 13.96  $\pm$  1.03 months vs WT: 12.33  $\pm$  0.84 months,  $p=0.2167$ ).

The liver features of transgenic mice and controls did not show significant differences and none of the animals developed neoplastic transformation foci. The multivariate stepwise analysis identified age as significant factor associated to steatosis accumulation ( $p=0.0012$ ) and glycogen decrease ( $p=0.0265$ ) in both groups.

In animals treated with aflatoxin B1, a significant increase of inflammation and dysplasia was observed in both groups, while a significant decrease of glycogen was detected only in wild type ( $p=0.0014$ ). None of the mice developed neoplastic lesions in the liver.

Pulmonary fibrosis: transgenic mice showed larger degree of fibrosis ( $p=0.0395$ ), of cell proliferation ( $p=0.0381$ ), associated with lower follicular inflammation ( $p=0.0022$ ). The occurrence of neoplastic transformation foci was detected only in transgenic mice, but not in controls.

Liver regeneration: one week after hepatectomy the relative liver weight was higher in transgenic mice than in controls (mean  $\pm$  SD: 5.38%  $\pm$  0.15 vs 4.84%  $\pm$  0.11,  $p=0.0221$ ). The higher increase of the liver mass in transgenic mice, was associated

with a significant decrease of apoptotic activity, expressed as activated caspases-3 ( $p=0.0047$ ). Proliferation parameters were increased in both groups, being Ki67 index significantly higher in transgenic mice ( $p=0.0317$ ). This effect was independent of IL-6 levels.

Acute hepatic encephalopathy: after induction of acute liver failure, transgenic mice showed a significantly lower survival time than controls (mean  $\pm$  SD,  $29.20 \pm 2.58$  h vs  $50.40 \pm 5.88$  h,  $p=0.0108$ ), while comparable decrease of body temperature and degree of liver injury were detected. In brain tissue preparations transgenic mice, expressing SERPINB3 in brain vascular endothelial cells, showed a higher cell number with higher microglial activation, compared to wild type mice.

**Conclusions:** the obtained results indicate that SERPINB3 induces cell protection, as proved by the higher survival observed in transgenic mice. In addition, this serpin does not induce directly neoplastic transformation, but it can enhance proliferation activity after inflammatory stimulus, increasing the risk increase of neoplastic degeneration, as observed in the lung model, or worsening brain injury, with activation of microglia, as in the course of acute hepatic encephalopathy.

During liver regeneration this serpin seems to have an important role, characterized by resistance to apoptosis and by increased hepatocyte proliferative potential.

Biological characteristics of SERPINB3 suggest that this serpin can be considered a protective factor which enhances survival mechanisms during acute injury, while during chronic injury, the greater cell resistance and proliferative potential could be responsible for an increased risk of neoplastic transformation.



# INTRODUZIONE

## Struttura e funzione delle serpine

Le serpine sono una famiglia di inibitori delle proteasi seriniche implicate in molte funzioni biologiche e nei processi di controllo dell'omeostasi cellulare (1). Presentano caratteristiche comuni nella loro struttura, localizzazioni extra ed intra cellulari e meccanismi di inibizione che hanno come bersaglio proteasi specifiche (2, 3). Filogeneticamente le serpine si dividono in nove gruppi ed in particolare la famiglia delle ov-serpine, inclusa nel gruppo B, è caratterizzata da un'omologia di sequenza aminoacidica dei suoi membri (39-50%), da caratteristiche strutturali comuni (assenza di regioni N- e C-terminali comuni nelle altre serpine) e da una analoga organizzazione genica (4).

Dal punto di vista evolutivo le serpine sono considerate molecole antiche in quanto le si ritrova nei batteri, nei virus e negli invertebrati, mentre le ov-serpine sono state identificate nei vertebrati a partire dai pesci fino ai mammiferi (5), dove durante la loro evoluzione i geni ancestrali, localizzati su un singolo locus, si sarebbero suddivisi in due loci.

Le serpine sono caratterizzate da una struttura ternaria che alterna 9  $\alpha$  eliche e 3 foglietti  $\beta$  tra i quali, all'estremità più alta della molecola, è posizionata l'ansa del sito di reazione (RSL, reactive-site loop), costituito da una sequenza conservata di aminoacidi, caratteristica di ogni singola proteina (1, 3).

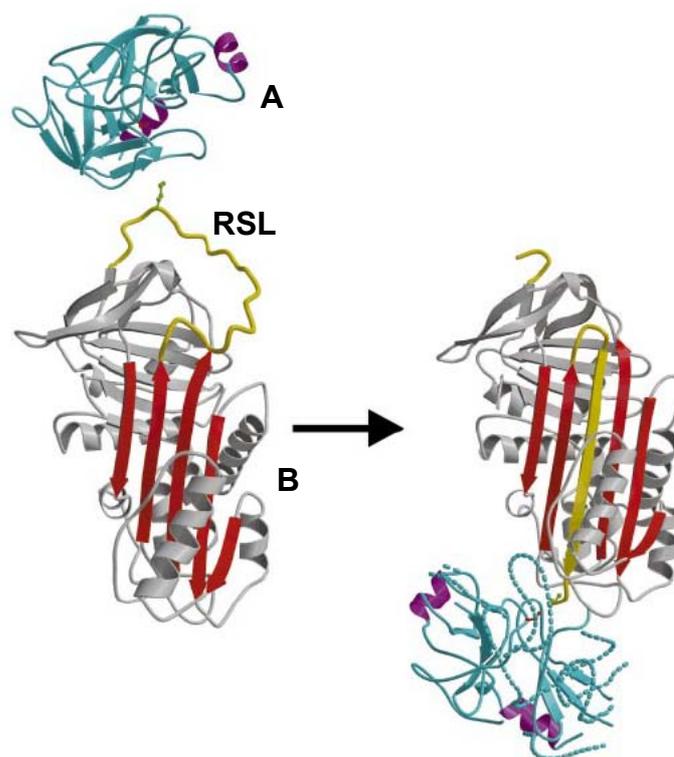
La specificità per le proteasi bersaglio, dimostrata dalle serpine, dipende principalmente dalle loro differenze nella sequenza del sito di reazione.

Quando il sito viene riconosciuto dalla proteasi, questa si lega (formando un complesso) e lo taglia in un punto specifico determinando come conseguenza un cambiamento nella conformazione della serpina (Figura 1, passaggio dalla forma "stressata" alla forma "distesa") che conduce all'inibizione della proteasi (6).

## Le isoforme SERPINB3 e SERPINB4

Anche se la maggior parte delle serpine ha come bersaglio le proteasi seriniche, alcune serpine si sono evolute acquisendo attività inibitorie contro altre proteasi, come ad esempio SERPINB3 (chiamata anche Squamous Cell Carcinoma Antigen 1, SCCA1) e SERPINB4 (chiamata anche Squamous Cell Carcinoma Antigen 2, SCCA2) che hanno come bersaglio le cistein-proteasi (7, 8). Nel loro caso le due

serpine non formano un complesso con le cistein-proteasi bersaglio, ma l'interazione con il loro substrato determina l'inibizione dell'attività catalitica della proteasi (9, 10). Le due isoforme (SERPINB3 e SERPINB4) sono state originariamente purificate da tessuto di carcinoma a cellule squamose della cervice uterina (11) ed il clonaggio del cDNA di SERPINB3 (1190 nucleotidi per una sequenza di 390 amminoacidi) da parte di Suminami nel 1990 ha permesso di evidenziare che la sequenza amminoacidica di SERPINB3 è omologa a quella delle altre serpine appartenenti alla sottofamiglia delle ov-serpine, così chiamate per la loro omologia con l'ovoalbumina (12).



**Figura 1. Cambiamento conformazionale della serpina (B) dopo il legame con la serin-proteasi (A). In giallo il sito di reazione (RSL) riconosciuto e tagliato dalla proteasi.**

I due geni codificanti le due isoforme di serpina sono localizzati sul cromosoma 18, nella regione q21.3 di 600 kb (13), assieme ad almeno altri quattro geni codificanti varianti serpiniche.

Questi due geni, quasi identici, sono distribuiti in tandem sul cromosoma (appaiamento testa-coda): il gene più vicino al centromero codifica SERPINB3, quello più vicino alla regione telomerica codifica SERPINB4; probabilmente essi derivano da eventi di duplicazione di un gene ancestrale comune (14). L'elevata omologia nella sequenza nucleotidica dei due geni (98%) si traduce in un'altrettanto

elevata omologia di sequenza aminoacidica delle due proteine, stimata intorno al 92% (12), ma mostrano proprietà e substrati distinti (6) in quanto SERPINB3 inibisce cistein-proteasi (papaina, catepsina S, K e L) (8), mentre SERPINB4 inibisce sia serin-proteasi (catepsina G) sia cistein-proteasi (Der p1 e Der f1) (15, 10).

La specificità di SERPINB3 e SERPINB4 è dovuta alle differenze nel loro sito di reazione (RSL) nel quale solo 7 residui aminoacidici su 13 (54%) sono identici (16).

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

### **Caratteristiche di SERPINB3**

SERPINB3 viene espressa normalmente negli epitelii squamosi (epidermide, cervice uterina, esofago, tonsille, vie aeree), ma si trova iper-espressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale (17, 18) ed è stata descritta nell'epatocarcinoma (19, 20).

SERPINB3 è una proteina nota dal 1977, anno in cui fu isolata per la prima volta da Kato e Torigoe (11) ed ha un peso molecolare di circa 45kDa (14).

Il coinvolgimento di SERPINB3 nella regolazione dei processi proteolitici può avere delle importanti implicazioni a livello dei processi neoplastici, dal momento che l'equilibrio tra le proteasi ed i loro inibitori è in grado di influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione, e la morte cellulare stessa (21).

SERPINB3 è di fatto aumentata nei tessuti tumorali, rispetto agli epitelii normali ed esistono alcune evidenze di un legame tra livello di espressione di proteina e il grado di sviluppo tumorale (22).

Un aspetto interessante è il coinvolgimento di questa serpina nell'apoptosi (morte cellulare programmata). E' noto come questo fenomeno risulti diminuito o addirittura soppresso durante la trasformazione tumorale ed il risultato è che le cellule neoplastiche non vengono eliminate, ma continuano a proliferare in maniera incontrollata.

Dati recenti indicano che SERPINB3 è in grado di proteggere le cellule neoplastiche dall'apoptosi cellulare indotta da diversi tipi di stimoli (23, 24) e, in cheratinociti sovraesposti a raggi ultravioletti, trasloca nel nucleo legandosi a JNK1 fosforilato inibendo il processo apoptotico indotto da UV (25). Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che SERPINB3 può promuovere la crescita tumorale anche bloccando

l'infiltrazione intratumorale delle cellule NK (Natural Killer) (26). Dati recenti indicano inoltre che questa serpina può indurre proliferazione cellulare (27).

Il meccanismo attraverso cui SERPINB3 risulta in grado di proteggere le cellule tumorali dall'apoptosi coinvolge l'inibizione dell'attività della caspasi-3, una proteasi coinvolta nella cascata dei segnali intracellulari che inducono apoptosi (23). E' stato infatti dimostrato che cellule epiteliali (293T) esprimenti SERPINB3 hanno livelli più bassi di espressione della caspasi-3, rispetto ai controlli (23, 24). Inoltre, ulteriori dati sperimentali hanno documentato come questa serpina inibisca il rilascio di citocromo c dal mitocondrio, suggerendo pertanto una sua influenza a monte, presumibilmente a livello dell'attivazione di bid o bcl2 (28).

SERPINB3 può avere quindi un ruolo nello sviluppo del fenotipo tumorale, in quanto favorisce la sopravvivenza delle cellule neoplastiche interferendo con i processi apoptotici cellulari.

In analogia con quanto osservato nelle cellule di origine epiteliale, anche nell'epatocarcinoma l'inibizione dell'attività apoptotica è alterata e significativamente diminuita (29), questo potrebbe dipendere, almeno in parte, da SERPINB3 che, essendo iper-espressa nei tumori epatici, potrebbe modulare in senso negativo la morte cellulare programmata, contribuendo così alla sopravvivenza delle cellule tumorali.

Oltre alla localizzazione citoplasmatica e nucleare, SERPINB3 è stata individuata a livelli elevati nel siero di pazienti affetti da tumori di origine squamocellulare e più di recente è stata dimostrata la sua presenza in immunocomplessi circolanti composti con immunoglobuline di isotipo IgM nel siero di pazienti affetti da epatocarcinoma. In questi ultimi le concentrazioni sono più elevate rispetto a quelle presenti nei pazienti affetti da epatite cronica e cirrosi epatica e, data la sua assenza nei controlli sani, suggerisce che possa essere utilizzata come nuovo marcatore diagnostico tumorale (30).

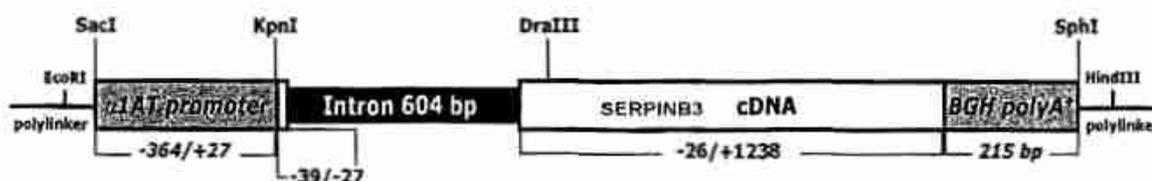
### **Modello animale sperimentale**

Dato il potenziale ruolo cruciale di SERPINB3, implicata in molte attività biologiche rilevanti per l'omeostasi cellulare, risulta importante poter utilizzare un modello animale che permetta di sperimentare in vivo il ruolo che la proteina può rivestire in molteplici processi cellulari.

La ricerca clinica sull'uomo è limitata dalla disponibilità di materiale biologico ed il semplice modello sperimentale animale, costituito dal topo (*mus musculus*), permette di acquisire utili informazioni per la comprensione di funzioni biologiche non del tutto definite di nuove componenti proteiche e di meccanismi patogenetici.

Il presente studio è stato quindi condotto su un modello animale originale e non disponibile in commercio (dono del Prof. Cassani, TecnoGen S.c.p.A, Caserta, Italia), costituito da un topo transgenico di ceppo C57BL/6J nel quale è stato inserito il gene della serpina umana SERPINB3 (Figura 2).

La sequenza di SERPINB3 umana (-26/+1238) è stata inserita nel vettore plasmidico pcDNA3 sotto controllo del promotore della  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1AT) e con un sito di terminazione della trascrizione (BGHpolyA+) (31).



**Figura 2. Modello animale sperimentale: topo transgenico (ceppo C57BL/6J) per SERPINB3 e rappresentazione della struttura del transgene inserito.**

Inizialmente sono stati condotti studi preliminari per meglio caratterizzare il nostro modello transgenico sia dal punto di vista qualitativo, per confermare l'espressione della serpina attraverso metodica PCR, sia dal punto di vista quantitativo per verificare la condizione di omozigosi del transgene, attraverso tecnica SYBR Green Real-time PCR (32), e quindi l'espressione di SERPINB3 nei differenti organi dell'animale.

La valutazione dell'espressione della serpina nei differenti organi è stata effettuata sempre attraverso la tecnica di SYBR Green Real-time PCR e gli animali, scelti in

uguale numero tra maschi e femmine, sono stati sacrificati per il prelievo di diversi organi che sono stati analizzati.

Dai tessuti conservati a -80°C è stato estratto l'RNA totale da cui è stato retrotrascritto il cDNA e successivamente amplificato con primers disegnati in base alla sequenza di SERPINB3-mRNA umano pubblicata su GenBank (GenBank accession number NM 006919).

L'espressione di SERPINB3-mRNA nella popolazione di topi transgenici si è dimostrata differente nei vari organi con una maggior espressione nel cervello, polmone e fegato, rispetto agli altri organi.

I risultati di localizzazione così ottenuti sono stati importanti per il disegno delle ricerche, condotte sul nostro modello animale, che hanno riguardato lo studio di SERPINB3 nei seguenti modelli sperimentali:

- Studio dei processi di carcinogenesi epatica spontanea ed indotta da aflatossina B1,
- Studio del danno polmonare dopo induzione di fibrosi con bleomicina,
- Studio della rigenerazione epatica dopo epatectomia parziale,
- Studio dei meccanismi patogenetici dell'encefalopatia, correlata a danno epatico acuto da paracetamolo.

Gli animali, nel corso di tutta la sperimentazione, sono stati stabulati presso il Centro di Chirurgia Sperimentale dell'Università degli Studi di Padova.

## **METODOLOGIA E SPERIMENTAZIONI**

## **1. CARATTERIZZAZIONE DEL TOPO TRANSGENICO**

## **Analisi genomica di SERPINB3**

### PCR (Polymerase chain reaction)

Per determinare la presenza del costrutto trasgenico nel topo il DNA genomico è stato estratto dalle code degli animali attraverso l'utilizzo del metodo con fenolo-cloroformio, modificato da quello di Blin e Stafford (33).

Una coppia di primer vettore-specifici è stata usata per l'analisi dei topi transgenici ( $\alpha$ 1AT: upstream primer: 5'-GCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGG-3' e downstream primer: 5'- ACATCCAACCAGCTGTTAAGATGCG-3'; BGHpolyA+: upstream primer: 5'- GCAGAAGCTG CAGCTGCCACC-3' e downstream primer: 5'-TGACACCTACTCAGACAATGCG ATGC-3').

Le condizioni di amplificazione, per l'analisi PCR, selezionate per il Termociclatore 480 (Perkin Elmer, Norwalk, CT) erano le seguenti: un primo ciclo costituito da una fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguita dalla fase di annealing a 62°C per 1 minuto e dalla fase di estensione a 72°C per 1 minuto; seguono quindi 40 cicli caratterizzati da denaturazione a 95°C per 1 minuto, *annealing* a 62°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto. Infine un ultimo ciclo caratterizzato da 95°C per 1 minuto, 62°C per 1 minuto e 72°C per 5 minuti.

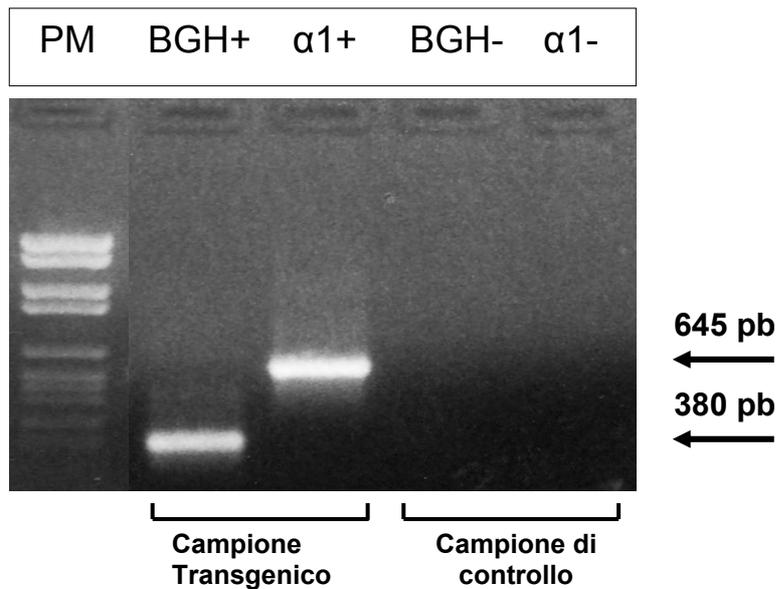
Le dimensioni dei prodotti di amplificazione così ottenuti erano di 645 paia di basi (pb) per  $\alpha$ 1AT e di 380 paia di basi (pb) per BGHpolyA+. Le dimensioni e la qualità dell'amplificato venivano verificate successivamente mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.5% in presenza di etidio bromuro.

La positività del campione per la presenza del costrutto trasgenico veniva attribuita in base alla positività dell'amplificazione delle sequenze di  $\alpha$ 1AT e BGHpolyA+.

## **Risultati**

Negli animali transgenici è stata ottenuta una banda di amplificazione per  $\alpha$ 1AT, di dimensioni corrispondenti a 645 pb, ed una banda di amplificazione per BGHpolyA+ di 380 pb (Figura 3).

Gli animali che non portavano il costrutto erano negativi per entrambe le bande di amplificazione.



**Figura 3. Immagine di corsa elettroforetica in gel di agarosio. Sono evidenti il peso molecolare (PM), le bande di amplificazione per l'animale transgenico (BGH+ e  $\alpha$ 1+) e l'assenza delle bande di amplificazione nell'animale di controllo (BGH- e  $\alpha$ 1-).**

Real-time PCR quantitativa (saggio SYBR green)

Al fine di determinare la presenza di SERPINB3 in forma omozigote o eterozigote nel nostro modello animale, è stata utilizzata una metodica di Real Time PCR quantitativa mediante saggio SYBR green su DNA genomico estratto dalle code degli animali.

Il DNA è stato diluito in acqua distillata per ottenere una concentrazione finale di 40 ng ed è stata utilizzata una coppia di primers SERPINB3-specifici (senso: 5'-GCAAATGCTC CAGAAGAAAG-3' ed antisenso: 5'-CGAGGCAAATGAAAAGATG-3') ed una coppia di primers actina di topo-specifici (senso: 5'-AGCC ATGTACGTAGCCATCC-3' ed antisenso: 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3').

I campioni incogniti sono stati amplificati inserendo in ogni amplificazione un campione omozigote ed uno eterozigote come controlli positivi.

Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: dopo una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguivano 40 cicli di amplificazione con le seguenti condizioni: denaturazione a 94°C per 1 secondo, annealing a 61°C per 10 secondi ed estensione a 72°C per 10 secondi.

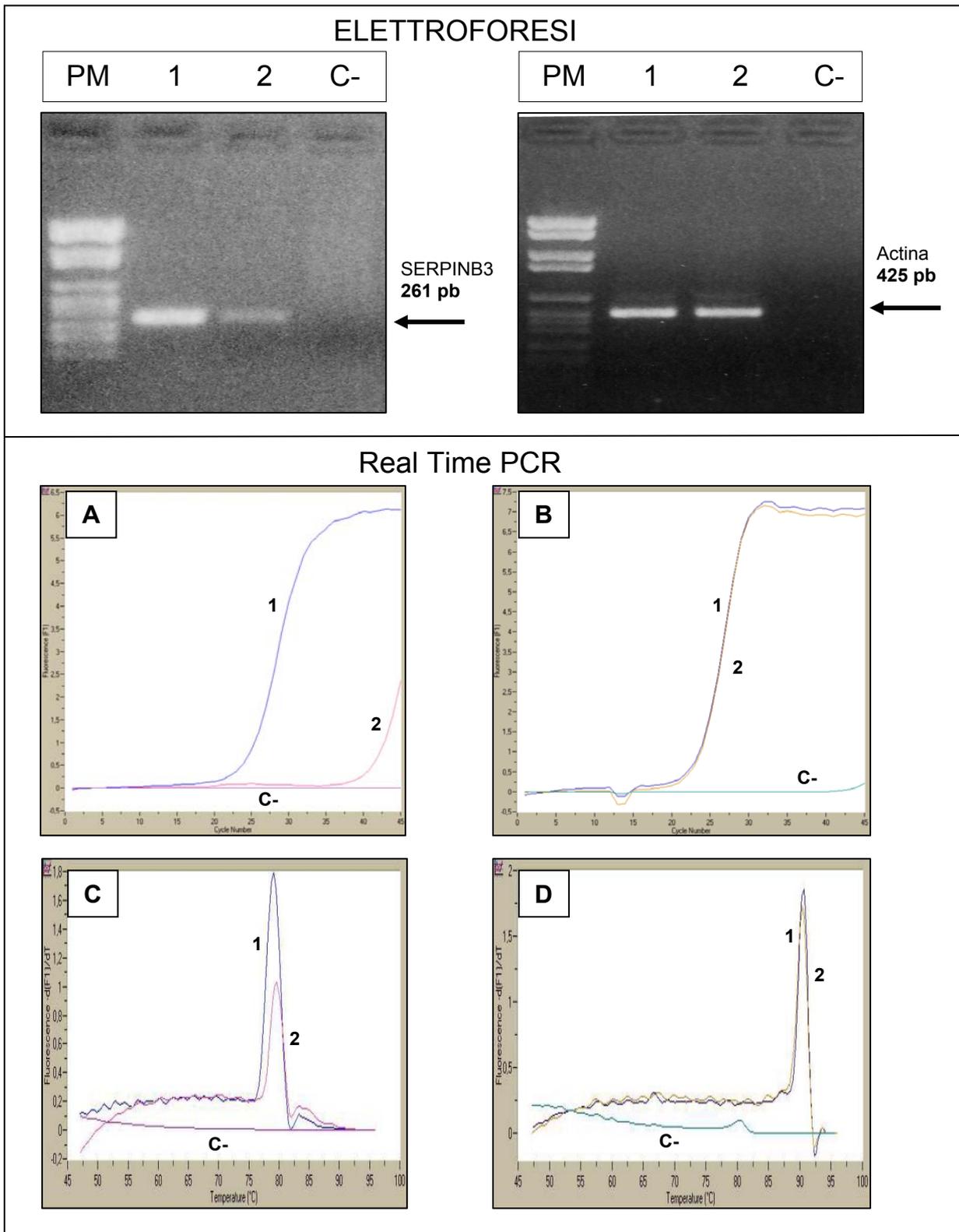
L'amplificazione dei prodotti di trascrizione specifici era confermata dai profili della curva di melting alla fine del processo di amplificazione.

La quantificazione dell'espressione di SERPINB3 è stata ottenuta valutando il rapporto dei cicli soglia tra SERPINB3 ed actina e mediante confronto con i controlli eterozigoti ed omozigoti inseriti nel ciclo di amplificazione. Come ulteriore controllo i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio, con successiva misurazione della intensità della banda di amplificato che risultava più intensa nei campioni omozigoti rispetto a quelli eterozigoti.

## **Risultati**

La metodica di amplificazione mediante Real time PCR ha permesso di quantificare gli amplificati ottenuti, con ottima capacità discriminatoria tra forme omozigoti ed eterozigoti (Figura 4). I rapporti dei cicli soglia tra SERPINB3 ed actina confermavano la differenza tra i due gruppi (media  $\pm$  SD,  $1.03 \pm 0.04$  vs  $1.73 \pm 0.05$ ,  $p < 0.0001$ ).

Le sperimentazioni sono state quindi condotte su animali con omozigosi per il gene umano SERPINB3.



**Figura 4. Pannello superiore:** immagini di corse elettroforetiche in gel di agarosio. A sinistra si vedono le bande di amplificazione per SERPINB3 con il peso molecolare (PM), il campione omozigote per SERPINB3 (1), il campione eterozigote per SERPINB3

(2) ed il controllo negativo (C-). A destra sono rappresentate le corrispondenti bande di amplificazione per l'actina di topo.

**Pannello inferiore:** rappresentazione delle curve di amplificazione di SERPINB3 (A) ed actina (B) e delle curve di melting di SERPINB3 (C) ed actina (D) in Real time PCR. Il campione omozigote (1) inizia l'amplificazione prima di quello eterozigote (2).

## **Valutazione dell'espressione di SERPINB3 in differenti organi**

### Real-time PCR (saggio SYBR green)

La valutazione dell'espressione di SERPINB3 nei differenti organi del modello transgenico è stata effettuata attraverso la tecnica di SYBR Green Real-time PCR e gli animali, scelti in uguale numero tra maschi e femmine, sono stati sacrificati per il prelievo degli organi da analizzare: cervello, polmone, fegato, gonadi, rene e muscolo.

I tessuti sono stati conservati in freezer (-80°C) e successivamente è stato estratto l'RNA totale con TRIzol/alcool isopropilico; l'RNA estratto quindi è stato retrotrascritto in cDNA ed analizzato con la tecnica quantitativa SYBR Green Real-time PCR.

Per questa tecnica sono stati usati primers disegnati sulla sequenza di SERPINB3-mRNA umana pubblicata su GenBank (senso: 5'-GCAAATGCTCCAGAAGAAAG-3' ed antisense: 5'-CGAGGCAAA ATGAAAAGATG -3'), utilizzando lo strumento Light Cycler (Roche).

La quantificazione del contenuto in SERPINB3 dei vari organi, espressa come pg/μg di RNA totale, è stata calcolata in base al confronto dei risultati con quelli ottenuti in una curva standard di riferimento costituita da diluizioni note di un costrutto plasmidico contenente SERPINB3 umana.

## **Risultati**

L'espressione di SERPINB3-mRNA, nella popolazione di topi transgenici analizzata, è risultata differente nei vari organi con una maggior espressione nel cervello (media  $\pm$  SD, 22.25  $\pm$  10.96 pg/μg RNA), nel polmone (media  $\pm$  SD, 17.5  $\pm$  0.71 pg/μg RNA) e nel fegato (media  $\pm$  SD, 11.25  $\pm$  2.47 pg/μg RNA). Negli altri organi analizzati sono state identificate quantità irrilevanti di espressione serpinica (media  $\pm$  SD pg/μg RNA: testicolo 6  $\pm$  1.06, ovaio 4.5  $\pm$  1.06, rene e muscolo <0.6) (Figura 5).

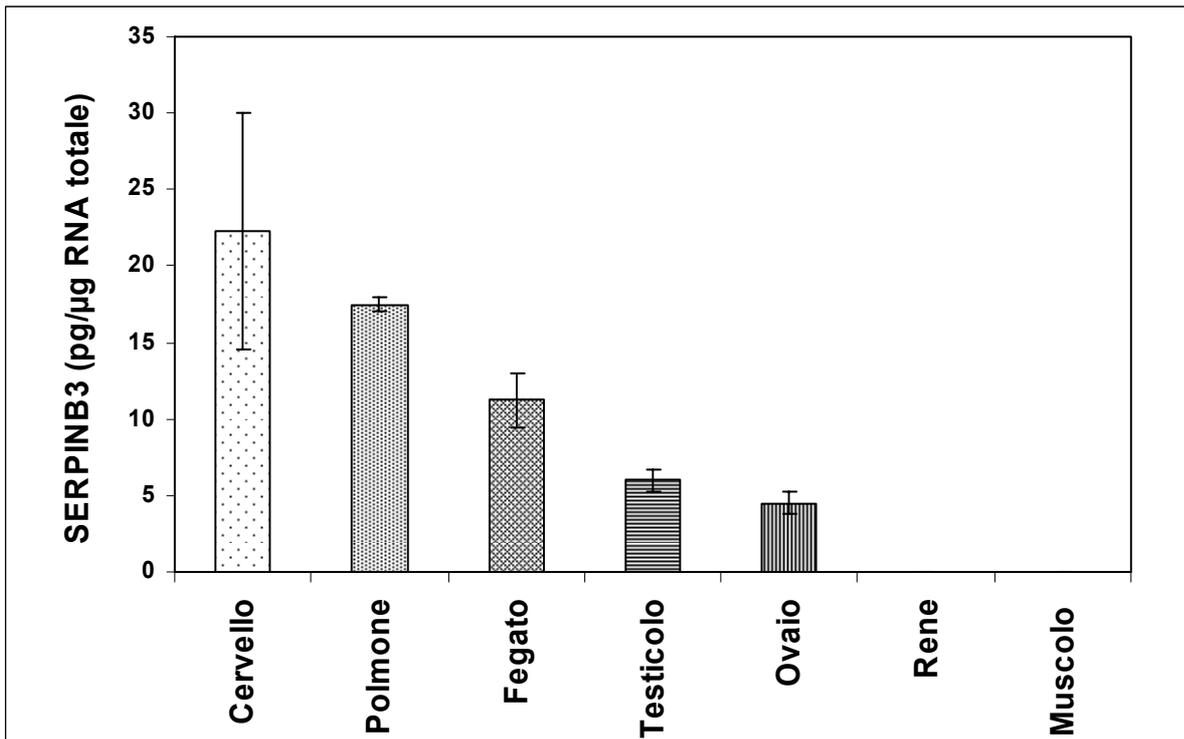


Figura 5. Espressione di SERPINB3-mRNA, valutata mediante Real-time PCR, in differenti organi di topo transgenico. I risultati sono espressi come valori medi, le barre verticali rappresentano l'errore standard nei diversi organi.

**2. EFFETTO DI SERPINB3 SULLA CARCINOGENESI EPATICA  
SPONTANEA ED INDOTTA DA AFLATOSSINA B1**

## Introduzione

Una volta caratterizzato il modello transgenico, obiettivo della nostra ricerca è stato lo studio del potenziale ruolo biologico della serpina umana SERPINB3, con particolare riguardo al possibile suo coinvolgimento nei processi di carcinogenesi epatica sia spontanea che chimicamente indotta. L'epatocarcinogenesi è un processo multifasico che comporta profonde alterazioni a carico del genoma cellulare (34) ed è riconducibile a tre momenti principali (35): **l'induzione, la promozione e la progressione**. Nella prima fase (induzione), la trasformazione maligna dell'epatocita è causata da mutazioni genetiche indotte o da un agente virale (HBV, HCV) o da un agente iniziante chimico (aflatossine, farmaci), oppure secondarie ad un aumentato turnover cellulare.

Tali mutazioni determinano un'alterata espressione di alcuni proto-oncogeni (ras, myc, fos) e conseguentemente una disregolazione del ciclo cellulare (36). Queste modificazioni cellulari sono irreversibili, ma le cellule interessate possono essere rimosse dal fegato attraverso il processo apoptotico (37). La seconda fase (promozione) consiste nella proliferazione delle cellule trasformate, che richiede la presenza di uno stimolo continuo o ripetuto, come ad esempio la persistenza del danno necro-infiammatorio cronico (epatite cronica) associato alla rigenerazione (cirrosi) (38). La promozione della neoplasia è contrastata da un lato dall'interferenza di ormoni sessuali, citochine, enzimi o cicline coinvolte nella proliferazione cellulare (39), dall'altro è favorita da fattori di crescita (IGF-2, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) e da ulteriori mutazioni genetiche coinvolgenti geni oncosoppressori come la p53 (40) che portano all'espansione clonale delle cellule neoplastiche e quindi alla progressione del tumore.

SERPINB3, iperespressa nell'epatocarcinoma umano (19), induce resistenza all'apoptosi e, in sistemi di coltura cellulare in vitro, risulta in grado di stimolare la proliferazione cellulare.

## Modello sperimentale

### Studio osservazionale

Nella prima parte del nostro studio una popolazione di 123 topi transgenici (TG) per SERPINB3 e una di 148 topi wild type (WT) dello stesso ceppo, in eguali condizioni

di stabulazione, sono state osservate nel tempo fino al decesso. Su un sottogruppo di queste popolazioni, costituito da 38 topi transgenici e 35 wild type è stato anche immediatamente prelevato il fegato per essere sottoposto ad esami istologici ed istochimici.

### Trattamento con aflatossina B1

Nella seconda parte dello studio abbiamo voluto verificare la combinazione tra la presenza di SERPINB3 e la somministrazione di aflatossina B1, potente epatocarcinogeno, nell'induzione della carcinogenesi epatica. Come sostanza mutagenica è stata scelta l'aflatossina B1, in quanto questo composto, che normalmente da solo non induce tumore nel topo (41), in precedenti studi è risultato in grado di indurre tumore epatico in presenza di un altro stimolo cancerogenico. Dagli studi svolti da Chisari e Sell (42, 43), su modelli di topo transgenico, risulta infatti evidente come l'azione sinergica tra l'epatocarcinogeno (aflatossina B1) ed il danno a livello cellulare causato dal virus HBV siano in grado di indurre lo sviluppo di tumore epatico.

Il modello sperimentale ha incluso topi transgenici per SERPINB3, ed i rispettivi controlli wild-type, che sono stati sottoposti a somministrazione intraperitoneale di aflatossina B1 e valutazione dell'entità della degenerazione epatica dopo un intervallo di 12 mesi.

I gruppi di animali, sia transgenici che wild type, sono stati inoculati con 200 µl di soluzione contenente 2 µg/gr di peso corporeo di Aflatossina B1 (1 volta/settimana per 3 settimane), mentre i rispettivi gruppi di controllo sono stati mantenuti senza trattamento.

Ogni gruppo sperimentale era costituito da 10 animali, omogenei per età (4-5 mesi) e sesso, tenuti in osservazione per 1 anno (gli animali deceduti prima della conclusione del periodo di osservazione venivano sostituiti) al termine del quale sono stati soppressi per il prelievo del fegato su cui sono state condotte analisi istologiche ed istochimiche.

### Parametri istologici

Tutti i campioni di fegato sono stati valutati per una serie di parametri indicativi dello stato di salute epatica, quali: flogosi (stato infiammatorio), steatosi (accumulo

intracellulare di trigliceridi), carica glicogenica (contenuto intracellulare di glucidi, indice di benessere dell'epatocita), displasia (anormale cambiamento morfologico cellulare) e presenza di focolai di trasformazione neoplastica o noduli epatici.

Per questi parametri, in ogni campione, veniva assegnato un punteggio da 0 a 3, con il valore 0 che indicava assenza, mentre per gli altri valori il significato variava a seconda del parametro.

Per la flogosi il valore 1 equivaleva a lieve, il valore 2 a moderata ed il valore 3 a diffusa; per la steatosi il valore 1 ad una positività nell'1-30% degli epatociti, il 2 ad una positività nel 31-50% e il 3 ad una positività superiore al 50%; per la carica glicogenica il valore 1 corrispondeva ad una positività < 30%, il 2 ad una positività tra il 31-50% ed il 3 ad una positività superiore al 50% degli epatociti; infine per la displasia il valore 1 equivaleva a lieve, il 2 a moderata e il 3 a grave.

L'attività proliferativa è stata analizzata mediante colorazione immunohistochimica per Ki67 (MIB1, GeneTex Inc., TX, USA).

### Analisi statistiche

I dati demografici e le caratteristiche istologiche degli animali, arruolati nello studio, sono oggetto di analisi descrittiva tramite media, deviazione standard, errore standard, valore minimo e massimo nel caso di variabili di tipo continuo, e tramite frequenze e percentuali quando di tipo qualitativo. I risultati sono stati presentati per gruppo e per confronto tra gruppi.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il Sas System (SAS Institute Inc, North Carolina, USA) for Windows 9.01 ed in particolare le procedure Freq, T-test, Mann-Whitney e Logistic. Il livello di significatività dei dati è stato fissato per un valore di  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

### Studio osservazionale

Le due popolazioni di topi, dal punto di vista della distribuzione dei sessi, si sono dimostrate omogenee (TG: 56.1% maschi e 43.9% femmine vs WT: 52.7% maschi e 47.3% femmine,  $p = 0.7003$ ). Complessivamente la popolazione di topi transgenici (TG) ha evidenziato un tempo di sopravvivenza significativamente più elevato

rispetto ai controlli wild type (WT) (media  $\pm$  SD, TG: 13.83  $\pm$  0.65 mesi vs WT: 11.73  $\pm$  0.55 mesi, p=0.0131), questo aspetto risulta più evidente quando si confrontano i maschi (media  $\pm$  SD, TG: 13.72  $\pm$  0.83 mesi vs WT: 11.19  $\pm$  0.71 mesi, p=0.0213) rispetto alle femmine (media  $\pm$  SD, TG: 13.96  $\pm$  1.03 mesi vs WT: 12.33  $\pm$  0.84 mesi, p=0.2167). Nel sottogruppo di animali in cui è stato prelevato il fegato i topi transgenici hanno evidenziato sempre un tempo di sopravvivenza significativamente più elevato rispetto ai controlli wild type (media  $\pm$  SD, TG: 11.49  $\pm$  3.43 mesi vs WT: 8.36  $\pm$  4.66 mesi, p=0.002), ma in questo caso la numerosità dei maschi è risultata superiore nel gruppo dei transgenici (TG: 76.32% maschi, 23.68% femmine vs WT: 51.43% maschi, 48.57% femmine, p=0.031).

Nessun animale, sia nel gruppo di topi transgenici che nel gruppo di controllo, ha presentato focolai di trasformazione neoplastica o noduli epatici.

Alla luce delle differenze sia di sesso che di sopravvivenza nei due gruppi, i parametri epatici quali flogosi, steatosi, displasia e carica glicogenica, sono stati valutati sia globalmente che dopo stratificazione in gruppi omogenei per età e sesso. Nell'analisi globale il gruppo di topi transgenici ha presentato una differenza statisticamente significativa, rispetto al gruppo di topi wild type, con evidenza di una maggior steatosi e una minor carica glicogenica (in dettaglio nella tabella 1).

Statistiche								
Gruppo	Variabile	N	Media	Dev. Std	Err. Std	Minimo	Massimo	P (T-test)
TG	Flogosi	38	0.6579	0.7807	0.1267	0	3	0.4242
WT	Flogosi	35	0.5143	0.7425	0.1255	0	3	
TG	Steatosi	38	<b>0.6053</b>	0.8865	0.1438	0	2	<b>0.0270</b>
WT	Steatosi	35	<b>0.2</b>	0.6325	0.1069	0	3	
TG	Carica Glicogenica	37	<b>1.973</b>	0.9276	0.1525	0	3	<b>0.0195</b>
WT	Carica Glicogenica	31	<b>2.4839</b>	0.8112	0.1457	0	3	
TG	Displasia	38	0.4211	0.5517	0.0895	0	2	0.5424
WT	Displasia	35	0.5143	0.7425	0.1255	0	3	

**Tabella 1. Dati riassuntivi dei parametri epatici valutati globalmente nel gruppo di topi transgenici per SERPINB3 (TG) e nel gruppo wild type di controllo (WT).**

Nell'analisi effettuata in gruppi omogenei per età e sesso, solo la carica glicogenica risultava significativamente più bassa nei transgenici, indipendentemente dai due parametri di stratificazione considerati (stratificazione per età  $p=0.037$ , stratificazione per sesso  $p=0.013$ ).

E' stata quindi effettuata un'analisi multivariata che ha documentato come l'età sia un fattore significativamente importante per lo sviluppo di steatosi ( $p=0.0012$ ) e per la riduzione della carica glicogenica epatica ( $p=0.0265$ ) nei due gruppi di animali (tabella 2).

Variabile	Fattore	Odds Ratio	Intervallo di Confidenza		P (Wald Chi-Square)
FLOGOSI	Sesso (F vs M)	2.036	0.716	5.792	0.1825
	Gruppo (TG vs WT)	1.400	0.486	4.034	0.5331
	Età (mesi)	1.095	0.971	1.234	0.1407
STEATOSI	Sesso (F vs M)	0.269	0.053	1.358	0.1120
	Gruppo (TG vs WT)	2.044	0.431	9.683	0.3678
	Età (mesi)	<b>1.535</b>	1.183	1.992	<b>0.0012</b>
CARICA GLICOGENICA	Sesso (F vs M)	0.778	0.209	2.895	0.7080
	Gruppo (TG vs WT)	0.336	0.084	1.340	0.1224
	Età (mesi)	<b>0.826</b>	0.698	0.978	<b>0.0265</b>
DISPLASIA	Sesso (F vs M)	0.700	0.250	1.964	0.4985
	Gruppo (TG vs WT)	0.985	0.345	2.815	0.9773
	Età (mesi)	0.971	0.863	1.092	0.6204

**Tabella 2. Dati riassuntivi per l'analisi multivariata della probabilità di sviluppare flogosi, steatosi, accumulo di glucidi e displasia in due gruppi sperimentali di topi: transgenici per SERPINB3 (TG) e wild type (WT).**

### Trattamento con aflatoxina B1

I gruppi di topi analizzati dopo 12 mesi dall'inoculo di Aflatossina B1 hanno mostrato un profilo sostanzialmente sovrapponibile dei parametri epatici, con evidenza di incremento dell'entità della flogosi e della displasia, rispetto al corrispettivo gruppo di controllo non trattato. Non sono state evidenziate modificazioni significative dell'attività proliferativa, valutata come espressione di Ki67. Le differenze osservate in presenza e in assenza di trattamento sono risultate simili nei due gruppi.

Da segnalare solo un decremento significativo della componente glicogenica nel gruppo wild type trattato con aflatossina ( $p=0.0014$ ), mentre nei topi transgenici la differenza risultava meno rilevante (Figura 6).

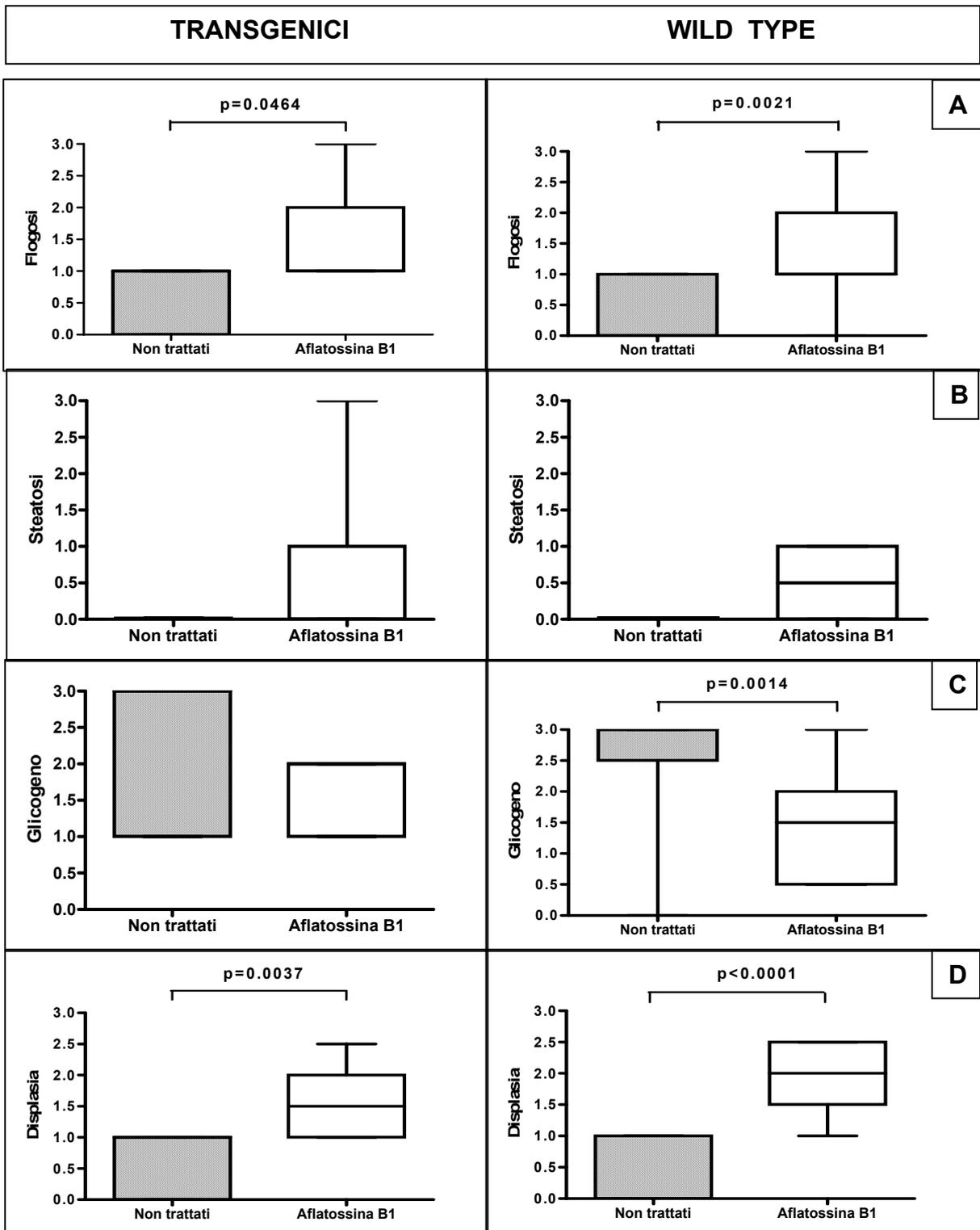


Figura 6. Box-plot dei parametri epatici valutati nei gruppi di topi transgenici e wild type non trattati (controlli) e inoculati con Aflatossina B1. Sono rappresentati i valori ottenuti per la flogosi (A), la steatosi (B), la carica glicogenica (C) e la displasia (D).

**Gli estremi di ciascun rettangolo indicano il 25° ed il 75° percentile, mentre la linea all'interno qualora non coincida con uno dei due estremi, indica la mediana. Le barre individuano l'intervallo di distribuzione dei valori.**

## **Discussione**

Lo studio osservazionale ha documentato un'aumento globale di sopravvivenza del 15% nei topi transgenici, rispetto ai controlli wild type, effetto più evidente nei maschi, dove è stato documentato un incremento della sopravvivenza del 18.5%, mentre nelle femmine l'incremento è risultato del 12.7%. Nessuno degli animali ha sviluppato neoplasia epatica. Questi dati dimostrano come la serpina SERPINB3 sia in grado di svolgere un effetto di tipo "protettivo" a livello cellulare, incrementando la durata di vita, senza peraltro, di per sé, portare allo sviluppo di tumore. L'età più avanzata era caratterizzata dal riscontro di una steatosi più marcata e dalla riduzione della riserva glicogenica epatica, fenomeni tipici dell'invecchiamento.

La somministrazione di Aflatossina B1 è risultata in grado di indurre danno epatico, confermato dall'aumento degli indici di flogosi e displasia negli animali trattati rispetto a quelli non trattati. Tuttavia, la presenza di SERPINB3 non si è dimostrata un fattore aggiuntivo di rischio di sviluppo di epatocarcinoma in questo modello di carcinogenesi, non presentando i topi transgenici differenze significative nell'entità dei parametri istologici considerati, rispetto a quelle osservate nel gruppo trattato di controllo.

A differenza di altri modelli sperimentali, è verosimile che l'azione mutagena di Aflatossina B1 (44) non sia in grado di indurre un effetto sinergico con SERPINB3 per la carcinogenesi epatica. Come riportato nel prossimo modello sperimentale a livello polmonare, l'azione SERPINB3 risulta piuttosto potenziare l'evoluzione neoplastica in seguito a stimoli di tipo flogistico. Questi risultati costituiscono pertanto la base per ulteriori studi di carcinogenesi epatica, impiegando modelli basati su meccanismi di flogosi cronica e induzione di rigenerazione a partenza dalla componente staminale epatica.

### **3. INDUZIONE DI FIBROSI POLMONARE MEDIANTE BLEOMICINA**

## **Introduzione**

La fibrosi polmonare è una patologia cronica polmonare che interessa l'albero respiratorio ad ogni livello e che è caratterizzata dalla distruzione del parenchima polmonare, dalla sovversione dell'architettura alveolare, dal deposito di matrice extracellulare a livello interstiziale e da apoptosi delle cellule endoteliali e produzione di un pattern citochinico chemiochinico di tipo pro-fibrotico in grado di perpetuare il danno alveolare (45). Dal punto di vista patogenetico, il processo di fibrogenesi è sovrapponibile a quello che avviene a livello epatico, con un aumento del rischio di degenerazione neoplastica nelle fasi di fibrosi avanzata, che nel fegato corrispondono alla fase di cirrosi.

Come già sottolineato, la ricerca clinica sull'uomo è limitata dalla disponibilità di materiale biologico e di modelli sperimentali adeguati che permettano di studiare lo sviluppo nel tempo dei processi patologici. Di conseguenza, il nostro modello di topo transgenico, esprimente SERPINB3 anche a livello polmonare, è risultato adatto per valutare l'effetto della serpina nel processo di fibrosi polmonare indotto da bleomicina.

Elevati livelli di SERPINB3 sono stati descritti a livello dell'albero bronchiale nell'uomo, specie in patologie polmonari di tipo asmatiforme, ipotizzandone un ruolo protettivo, sulla base della sua attività antiproteasica (46).

## **Modello sperimentale**

Il modello animale utilizzato ha comportato l'induzione di fibrosi polmonare mediante l'inoculo intratracheale di bleomicina in topi transgenici per SERPINB3 ed in topi wild-type, utilizzati come controllo. Questo modello, che non necessita dell'acquisizione di approfondite tecniche chirurgiche, permette di riprodurre un danno dell'epitelio alveolare con rapida induzione di processi fibrotici a carico del polmone (47).

La procedura utilizzata è consistita nell'esecuzione di una piccola incisione a livello tracheale, svolta sotto anestesia generale, con successivo inoculo in trachea di una soluzione di bleomicina (50 µl, concentrazione 2,5 U/kg di peso corporeo). Gli animali sono stati quindi posti in osservazione per 20 giorni e poi sono stati sacrificati.

Sono stati impiegati globalmente 32 animali (età: 4 mesi), suddivisi nei seguenti gruppi sperimentali, ciascuno composto da 8 animali:

Gruppo 1. Topi transgenici inoculati con 2,5 U/kg di bleomicina,

Gruppo 2. Topi wild type inoculati con 2,5 U/kg di bleomicina,

Gruppo 3. Topi transgenici inoculati con PBS 1X,

Gruppo 4. Topi wild type inoculati con PBS 1X.

Al termine dell'esperimento, agli animali sacrificati sono stati prelevati i polmoni che sono stati conservati in paraformaldeide al 4%, quindi in paraffina per studi di tipo morfologico, istologico e immunohistochimico, con particolare riguardo ai marcatori di flogosi, fibrosi ed attività proliferativa (Ki67).

### Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il test parametrico t Student, il test non parametrico Mann-Whitney ed il Fisher's exact test. Il livello di significatività dei dati è stato fissato per un valore di  $p < 0.05$ . Tutte le analisi sono state svolte con il software GraphPad InStat (San Diego, CA, USA).

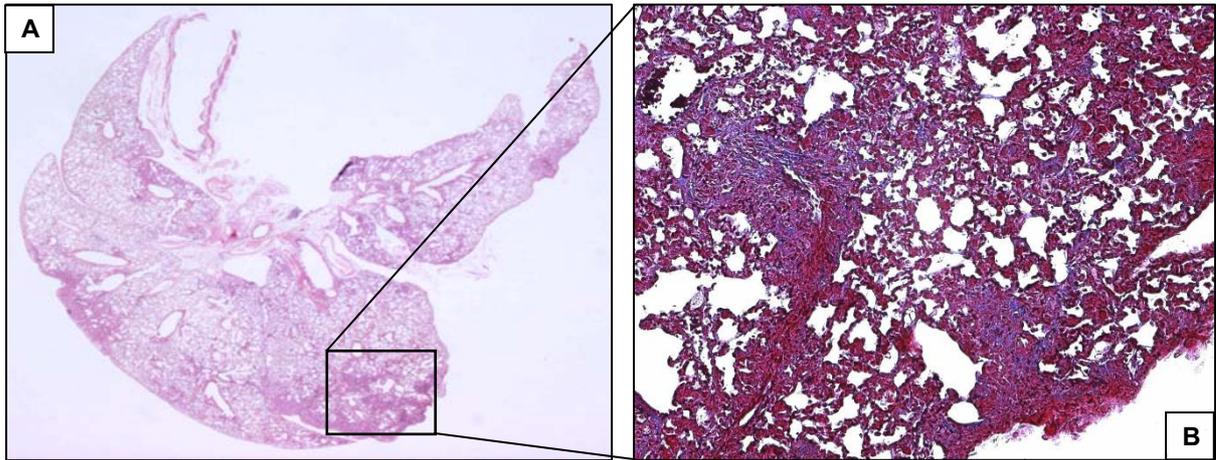
### **Risultati**

Nei due gruppi di animali trattati con bleomicina (8 topi transgenici e 8 topi wild type) sono stati riscontrati 1 decesso nel gruppo transgenico e 3 decessi nel gruppo wild type di controllo. Degli animali analizzati al termine dello studio, i topi transgenici, hanno evidenziato, rispetto ai wild type, maggiore fibrosi ( $p=0.0395$ ), maggiore proliferazione cellulare ( $p=0.0381$ ) e minor flogosi follicolare ( $p=0.0022$ ). E' stata inoltre documentata una maggiore entità di trasformazione neoplastica nel gruppo dei transgenici trattati, anche se la differenza rispetto ai controlli non è risultata statisticamente significativa, come si può osservare nella tabella che descrive i risultati complessivi del trattamento (tabella 3). Nei casi di controllo, trattati con iniezione intratracheale di PBS, non sono state osservate modificazioni significative dei parametri considerati in entrambe i gruppi.

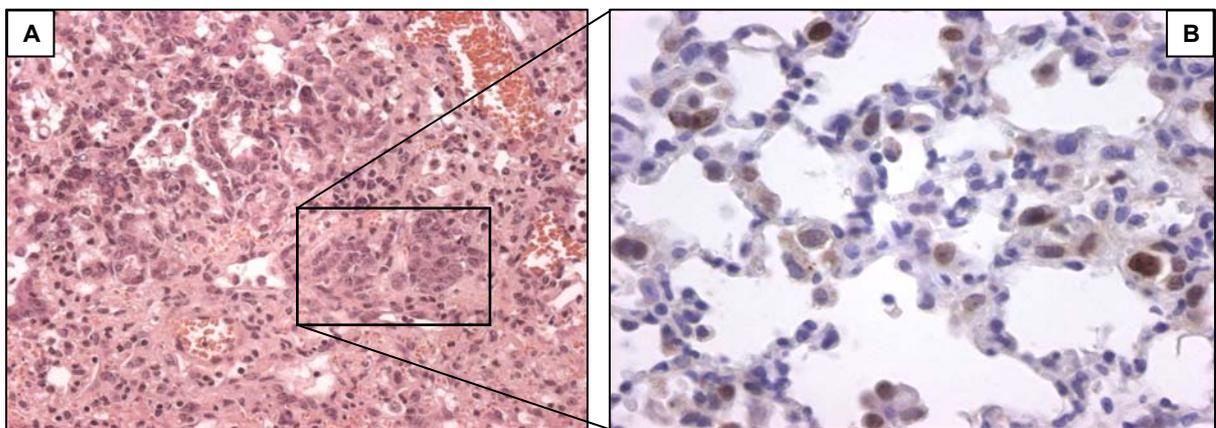
Trattamento con bleomicina					
Gruppo	Variabile	Media	Dev. Std	Err. Std	P
TG	Fibrosi (%)	2.324	0.971	0.376	<b>0.0395</b>
WT	Fibrosi (%)	1.000	0.959	0.392	
TG	Ki67 (%)	6.150	1.455	0.727	<b>0.0381</b>
WT	Ki67 (%)	2.850	1.684	0.687	
Gruppo	Variabile	Casi positivi (%)	Casi negativi (%)	P	
TG	Flogosi follicolare	0	100	<b>0.0022</b>	
WT	Flogosi follicolare	100	0		
TG	Trasformazione neoplastica	71.4	28.6	0.242	
WT	Trasformazione neoplastica	20	80		

**Tabella 3. Dati istologici riassuntivi della sperimentazione con bleomicina in due gruppi di topi: transgenici per SERPINB3 (TG) e wild type (WT).**

Questi risultati documentano come il trattamento profibrogenico con bleomicina sia stato in grado di indurre, soprattutto nel gruppo di animali transgenici, un importante rimodellamento tessutale con aumento della componente fibrotica, associato a incremento della proliferazione cellulare e, conseguentemente della trasformazione neoplastica (Figura 7 e Figura 8).



**Figura 7. Polmone di topo transgenico per SERPINB3 trattato con bleomicina. A) Colorazione ematossilina-eosina: si nota il rimodellamento parenchimale indotto dal trattamento con bleomicina, ingrandimento 12.5X. B) Colorazione Azan-Mallory, in blu è evidenziata la componente fibrotica, ingrandimento 100X.**



**Figura 8. Selezione di un'area di trasformazione neoplastica in topo transgenico per SERPINB3. A) Colorazione ematossilina-eosina in polmone trattato con bleomicina, ingrandimento 200X. B) Immunoistochimica per Ki67 (MIB1): sono individuabili aree solide o adenoidee con spiccate distorsioni citonucleari e con nuclei spesso nucleolati, ingrandimento 400X.**

## Discussione

I risultati indicano che i topi transgenici presentano da un lato maggiore resistenza al trattamento con bleomicina (1 animale deceduto rispetto a 3 wild type) e dall'altro sviluppano maggiore fibrosi, proliferazione cellulare e una maggiore tendenza alla trasformazione neoplastica rispetto ai controlli. Questo comportamento, com'era stato evidenziato nello studio sull'epatocarcinogenesi, sembra indicare come la presenza di SERPINB3 determini una maggiore resistenza cellulare, determinando da un lato un aumento della sopravvivenza, ma anche un incremento della fibrosi e della proliferazione cellulare che conseguentemente possono portare più facilmente alla trasformazione neoplastica, come è stato documentato in questo modello di carcinogenesi.

L'associazione tra l'aumento di fibrosi e la presenza di SERPINB3 trova conferma nello studio condotto da Calabrese et al. (48) nel quale in pazienti con fibrosi polmonare idiopatica è stata osservata una correlazione diretta tra l'espressione di SERPINB3, l'estensione di foci fibroblastici e l'incremento di espressione di TGF- $\beta$ .

La maggior resistenza agli stimoli infiammatori è evidenziata dalla completa assenza di flogosi follicolare negli animali transgenici, a differenza dei wild type. Questo riscontro è verosimilmente conseguente all'attività antiproteasica della serpina, che è in grado di interferire con i patterns citochinici/chemochinici impegnati nei processi flogistici a livello polmonare (26).

#### **4. STUDIO DELLA RIGENERAZIONE EPATICA DOPO EPATECTOMIA PARZIALE**

## **Introduzione**

La rigenerazione epatica, elemento distintivo di tutti i vertebrati, è caratterizzata principalmente da una crescita compensativa degli epatociti con l'obiettivo di ripristinare la massa funzionale epatica dopo perdita delle cellule parenchimali indotta da traumi, infezioni virali, agenti farmacologici e chimici o interventi chirurgici (49). Questo processo comporta cambiamenti nell'espressione genica di molteplici vie di segnale nelle differenti componenti cellulari presenti a livello epatico. Lo studio sulle potenzialità riparative del fegato richiede necessariamente una sperimentazione in vivo, in quanto è impossibile ricreare in sistemi di coltura in vitro le condizioni esistenti in vivo che possono favorire questo processo.

Nelle fasi iniziali avvengono contemporaneamente nuove interazioni, indotte dalla produzione di fattori di crescita, citochine e fattori neuroendocrini (50). Nonostante il grande numero di vie del segnale già individuate, la quantità di molecole riconosciute che intervengono nella rigenerazione epatica è in continua crescita.

La presente sperimentazione è stata condotta al fine di verificare l'effetto di SERPINB3 sulla rigenerazione epatica. E' noto infatti che questa serpina, implicata in molteplici attività biologiche importanti per l'omeostasi cellulare (51), è in grado di indurre resistenza all'apoptosi (23) e dati recenti indicano che aumenta la capacità proliferativa cellulare (27).

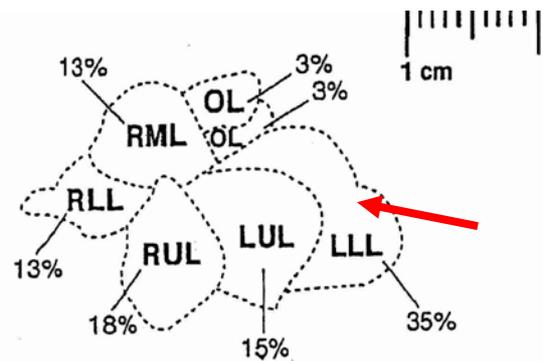
E' stato pertanto utilizzato il nostro modello transgenico al fine di studiare gli effetti di questa serpina dopo epatectomia parziale.

## **Modello sperimentale**

Il modello sperimentale prevedeva l'utilizzo di topi wild-type e transgenici che sono stati sottoposti ad epatectomia parziale bassa (35%), nei quali è stata valutata l'entità della rigenerazione epatica a livello morfologico e molecolare.

Globalmente sono stati utilizzati 21 topi C57BL/6J, 11 transgenici per SERPINB3 umana e 10 controlli wild type (età: 3 - 4 mesi). Gli animali sono stati sottoposti ad epatectomia parziale del 35% (resezione del lobo sinistro inferiore che corrisponde al 35% della massa epatica murina) (Figura 9) secondo le indicazioni riportate nello studio di Greene and Puder (52), finalizzate a garantire la minima mortalità tra gli animali.

**RUL:** right upper lobe  
**LUL:** left upper lobe  
**RML:** right middle lobe  
**LLL:** left lower lobe  
**RLL:** right lower lobe  
**OL:** omental lobe



**Figura 9. Fegato normale di topo C57BL/6J dopo 8 settimane dalla nascita, composto da 7 lobi. E' indicato il contributo percentuale al peso totale dei lobi che lo formano.**

Dopo l'intervento chirurgico gli animali sono stati idratati con 1 ml di soluzione salina sterile per via sottocutanea, monitorati quotidianamente e sacrificati dopo 7 giorni, in quanto questo intervallo è stato riconosciuto adeguato per la rigenerazione epatica (53). Sia i campioni di fegato rimossi chirurgicamente, durante l'epatectomia, sia quelli espantati al sacrificio dell'animale sono stati suddivisi in due parti: una conservata in paraformaldeide al 4% e successivamente fissata in paraffina per le indagini istologiche, l'altra invece veniva immediatamente congelata in azoto liquido e conservata a -80°C per ulteriori analisi molecolari.

In tutti gli animali sono stati prelevati campioni di siero all'inizio dello studio e al momento del sacrificio. I campioni sono stati analizzati per SERPINB3 circolante ed albumina, inoltre è stato analizzato il seguente profilo citochinico: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Nel fegato prelevato è stata valutata, in entrambi i gruppi, l'entità della rigenerazione dal punto di vista morfologico, sia macroscopico che microscopico.

A tal fine, tre ore prima dell'eutanasia, gli animali sono stati inoculati per via intraperitoneale con bromodeossiuridina, che ha permesso la definizione del grado di proliferazione cellulare, in quanto si fissa selettivamente a livello nucleare.

Gli animali sono stati pesati all'inizio e alla fine della sperimentazione, così come il fegato in rigenerazione espantato alla fine dell'esperimento. Il peso del fegato rigenerante è stato espresso come rapporto con il peso finale dell'animale, ottenendo il peso epatico relativo, quale indice della percentuale di rigenerazione epatica. Lo stesso rapporto è stato anche calcolato in gruppi di topi transgenici e wild type, non sottoposti ad intervento, per definire il valore normale basale.

## **Immunoistochimica**

### *Espressione di SERPINB3*

In tutti i campioni di fegato è stata determinata l'espressione di SERPINB3 mediante l'utilizzo di un anticorpo oligoclonale specifico (Hepa-Ab, Xeptagen, Italia) come precedentemente descritto (19). I campioni sono stati sviluppati con una metodica che utilizza avidin-streptavidinperossidasi e successiva colorazione con una miscela di 3,3-diamino-benzidina tetraidrocloreuro e perossido di idrogeno.

Come controlli sono stati utilizzati in parallelo preparati senza anticorpo primario e/o secondario, inoltre, è stata eseguita la stessa colorazione su campioni normali di controllo per verificare la reattività del fondo. La reattività della reazione è stata espressa mediante un punteggio assegnato da 0 a 3: il valore 0 indicava assenza di positività cellulare, il valore 1 una positività nell'1-30% degli epatociti, il valore 2 una positività nel 31-50% e il valore 3 una positività in più del 50% degli epatociti.

### *Quantificazione dell'attività proliferativa*

L'attività proliferativa è stata valutata sia attraverso il conteggio dei nuclei mitotici, evidenziati dopo colorazione con ematossilina-eosina (H&E) sia attraverso metodiche di immunoistochimica, utilizzando bromodeossiuridina (BrdU) ed il marcatore di proliferazione Ki67. Le mitosi sono state contate in sezioni H&E a 400 ingrandimenti, utilizzando un microscopio Olympus B x 40. I risultati sono stati espressi come indice mitotico, riferito al numero di mitosi osservato in 10 campi (HPF, high power fields).

Dopo l'eliminazione della paraffina e l'idratazione, le sezioni di fegato (4 µm) sono state incubate a temperatura ambiente con un anticorpo monoclonale anti-BrdU (Amersham, UK) per un'ora, successivamente sono stati utilizzati un anticorpo secondario biotinilato ed il complesso avidin-perossidasi secondo le istruzioni contenute nel kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Infine la reazione colorimetrica per evidenziare le cellule immunoreagenti è stata sviluppata con l'aggiunta di Diaminobenzidina in presenza di ioni cobalto e nickel. I risultati sono espressi come numero di nuclei epatocitari marcati con BrdU per campo mitotico (HPF, high power field).

Per la rilevazione dell'antigene di proliferazione Ki67 è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale MIB-1 (GeneTex Inc., TX, USA) ed i risultati sono stati espressi come percentuale dei nuclei positivi, contando almeno 1000 nuclei (indice di marcatura per Ki67).

## **Tecniche molecolari**

### *Real-time PCR quantitativa (saggio SYBR green)*

L'espressione di SERPINB3 umana nel fegato è stata valutata attraverso la metodica di Real-time PCR. L'RNA totale è stato estratto da campioni di tessuto congelato utilizzando TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni del protocollo di estrazione.

Per ogni campione di tessuto, 2µg di RNA, sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando il First Strand cDNA Synthesis kit, 200U di SuperScript II Reverse Transcriptase e 0,5 µg of oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA). L'amplificazione mediante Real-time (SYBR Green PCR) è stata eseguita mediante l'apparecchio Light Cycler Apparatus (Roche, Monza, Italy), utilizzando capillari in vetro nei quali il campione è stato miscelato con una mix fornita dal FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Kit (Roche, Monza, Italy).

I primer sono stati disegnati a partire dalla sequenza di SERPINB3 mRNA umana (Accession number GenBank™ U19556), producendo i seguenti primers:

senso: 5'-GCAAATGCTCCAGAAGAAAG-3'; antisenso: 5'-CGAGGCCAAAATGAAAA GATG-3'.

Dopo una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguivano 45 cicli di amplificazione con le seguenti condizioni: denaturazione a 94°C per 1 secondo, annealing a 58°C per 10 secondi ed estensione a 72°C per 10 secondi. L'amplificazione dei prodotti di trascrizione specifici era confermata dai profili della curva di melting alla fine del processo di amplificazione.

Il prodotto di amplificazione generato consisteva in un frammento di 261 paia di basi. Le dimensioni e la qualità dell'amplificato sono state verificate mediante una corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.5% in presenza di etidio bromuro.

La quantità di amplificato SERPINB3, espressa come pg/µg RNA totale (54), è stata stabilita attraverso una curva standard di riferimento, ottenuta utilizzando diluizioni seriali di un vettore plasmidico (pUC18) contenete il gene di SERPINB3 umana (31).

Per evidenziare il comportamento della serpina murina omologa durante il processo di rigenerazione epatica, l'espressione di SERPINB mRNA murino è stata valutata sia nei topi transgenici sia in quelli wild type, utilizzando la seguente coppia di primers (senso: 5'-TTTGGCTGAACAAGAACAACA-3', antisenso: 5'-AAGTCAGCCTTCTGTGGATCA-3') (55, 56).

### Western blot

Gli estratti di tessuto epatico sono stati utilizzati per valutare l'espressione di SERPINB3 umana, l'attività apoptotica mediante l'analisi dell'enzima caspasi 3 clivato e la  $\beta$ -actina, quale proteina endogena di controllo mediante Western blot.

L'omogenato di fegato è stato ottenuto attraverso il trattamento prima con un ml di soluzione a pH 7.4 contenente: mannitolo 210 mM, sucrosio 70 mM, hepes 10 mM e EGTA 1 mM; successivamente con l'aggiunta di un ml di buffer di lisi a pH 7.4 (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 2%) e 150  $\mu$ l di protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germania). Il lisato è stato centrifugato a 100.000 g per 30 minuti a 4 °C mediante ultracentrifuga MLS-50 Beckman Coulter. Per ogni campione 100  $\mu$ g di proteine totali, quantificate con il BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), sono state quindi separate attraverso corsa elettroforetica su gel al 10% di poliacrilammide e trasferite successivamente su membrana di nitrocellulosa.

Tutti gli anticorpi, utilizzati nella metodica, sono stati diluiti in una soluzione di PBS 1X contenente latte in polvere purificato al 2%. La rilevazione degli antigeni specifici (SERPINB3 umana e caspasi 3 clivata) è stata effettuata mediante chemiluminescenza (Amersham, Arlington Height, IL, USA) e successiva analisi densitometrica (VersaDoc Imaging System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

La quantificazione densitometrica delle proteine di interesse è stata quindi normalizzata per il contenuto in  $\beta$ -actina. Per l'analisi sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-SERPINB3 umano policlonale (diluizione 1:462, Xeptagen, Venezia, Italia), anti-caspasi 3 clivata policlonale (diluizione 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti- $\beta$  actina monoclonale (diluizione 1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anticorpi secondari coniugati con perossidasi

anti-IgG murina (diluizione 1:1000, Amersham Bioscience, Arlington Height, IL, USA) e anti-IgG di coniglio (diluizione 1:2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **Saggi sierologici**

La funzione epatica è stata monitorata attraverso l'analisi della concentrazione di albumina presente nel siero degli animali per mezzo di un saggio colorimetrico (Eurokit S.r.l., Gorizia, Italia) secondo le istruzioni del protocollo di analisi.

La concentrazione di albumina, in ogni campione, espressa in g/dL è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione ottenuta con diluizioni seriali dello standard, compreso nell'intervallo tra 4-0.5 g/dL.

### *Determinazione del profilo citochinico*

Il profilo di citochine murine (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) è stato dosato nei campioni di siero di topi transgenici e wild type, utilizzando il sistema Bio-Plex protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Bio-Plex è un sistema multiplex che permette di analizzare campioni seminati in una micropiastra e per ogni campione è in grado di quantificare contemporaneamente fino a 100 analiti.

Questa tecnologia è basata sull'utilizzo di distinti set di microsfere in polistirene (diametro di 5,6  $\mu$ ) impregnate con proporzioni univoche di 2 coloranti fluorescenti e rivestite covalentemente con anticorpi specifici per l'antigene bersaglio.

Durante l'incubazione gli anticorpi legano l'analita in proporzione alla sua concentrazione. Il complesso microsfera-anticorpo-analita è stato poi incubato con un altro anticorpo, specifico per un secondo epitopo sul medesimo antigene. Infine, al secondo anticorpo è stata legata una molecola fluorescente di ficoeritrina, con emissione di un segnale proporzionale alla quantità di analita.

Ciascuna microsfera viene incanalata verso due raggi fluorescenti in sequenza (uno verde e uno rosso) e il segnale generato passa attraverso un fotodiode per il segnale verde e due fotodiodi per i segnali nel rosso. I due coloranti della microsfera hanno medesima lunghezza d'onda di assorbimento, ma due lunghezze d'onda distinte di emissione e per questa ragione viene utilizzato un singolo raggio per l'eccitazione ma due diodi.

In ogni pozzetto vengono analizzate almeno 100 microsfere per ciascun analita di interesse e viene poi calcolata la mediana delle fluorescenze misurate.

L'identificazione dell'analita, ossia la catalogazione delle microsfere e la sua quantificazione, ossia l'analisi della fluorescenza emessa dalla ficoeritrina è stata effettuata mediante il software Bio-Plex Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), che è in grado di estrapolare i dati da una curva standard a 8 punti, mediante un algoritmo di regressione lineare a 5 parametri.

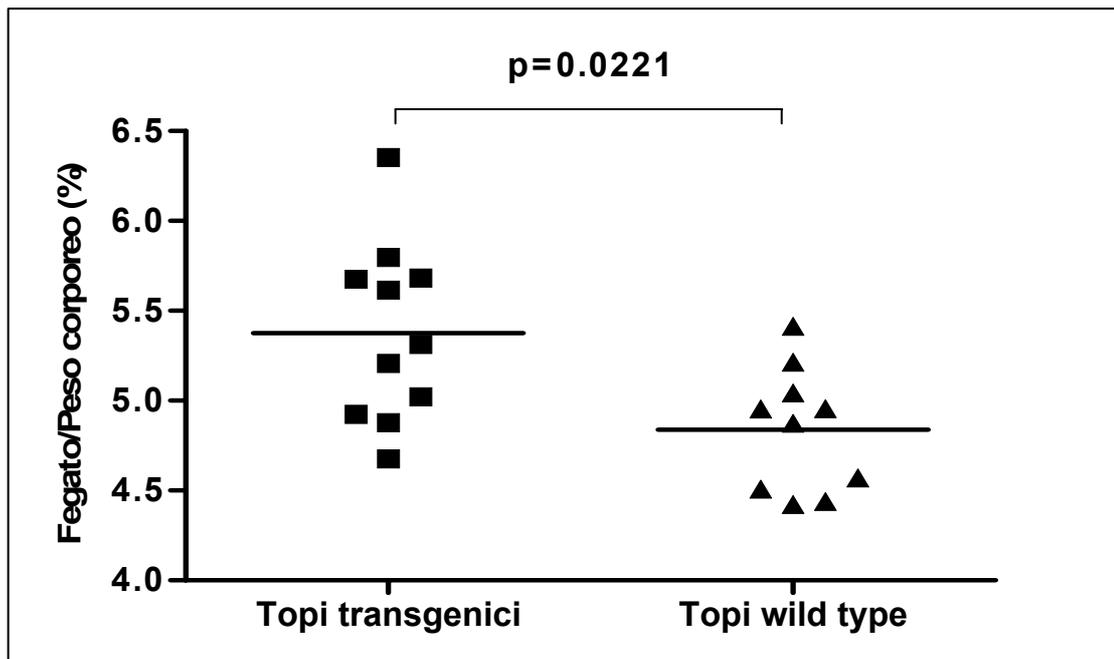
Per aumentare ulteriormente il range dinamico della misurazione del sistema Bio-Plex sono state analizzate due curve standard, una a bassa sensibilità per le concentrazioni più alte e una ad alta sensibilità per le concentrazioni più basse.

### Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il test parametrico t Student, il test non parametrico Mann-Whitney ed il test di Wilcoxon (matched pairs). Il livello di significatività dei dati è stato fissato per un valore di  $p < 0.05$ . Tutte le analisi sono state svolte con il software GraphPad InStat (San Diego, CA, USA).

### **Risultati**

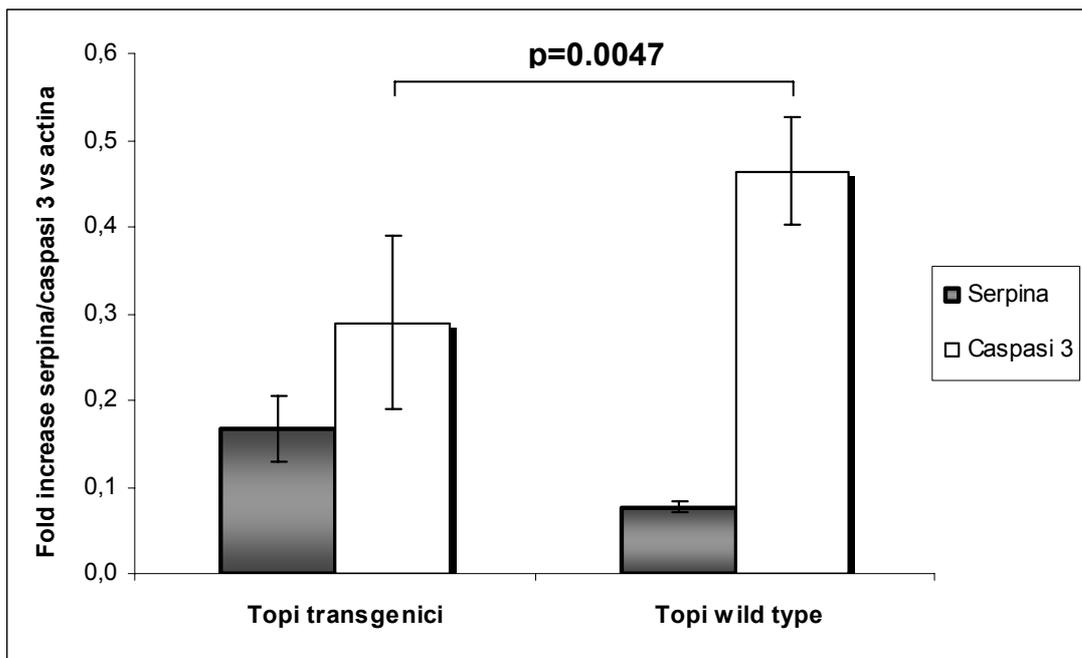
L'attività di rigenerazione del fegato è stata espressa come peso relativo del fegato (rapporto tra il peso del fegato e il peso corporeo dell'animale al sacrificio). Come mostrato in Figura 10, il peso relativo del fegato dopo una settimana dall'epatectomia era significativamente più alto nei topi transgenici rispetto ai topi wild type (media  $\pm$  SD: 5.38%  $\pm$  0.15 vs 4.84%  $\pm$  0.11,  $p=0.0221$ ), mentre nei due corrispettivi gruppi di animali non operati non sono state evidenziate differenze significative (media  $\pm$  SD: 5.41%  $\pm$  0.17 vs 5.03%  $\pm$  0.21,  $p=0.2403$ ).



**Figura 10.** Distribuzione del peso relativo del fegato (%) nei topi transgenici e nei topi wild type 7 giorni dopo epatectomia parziale. Le barre orizzontali rappresentano i valori medi.

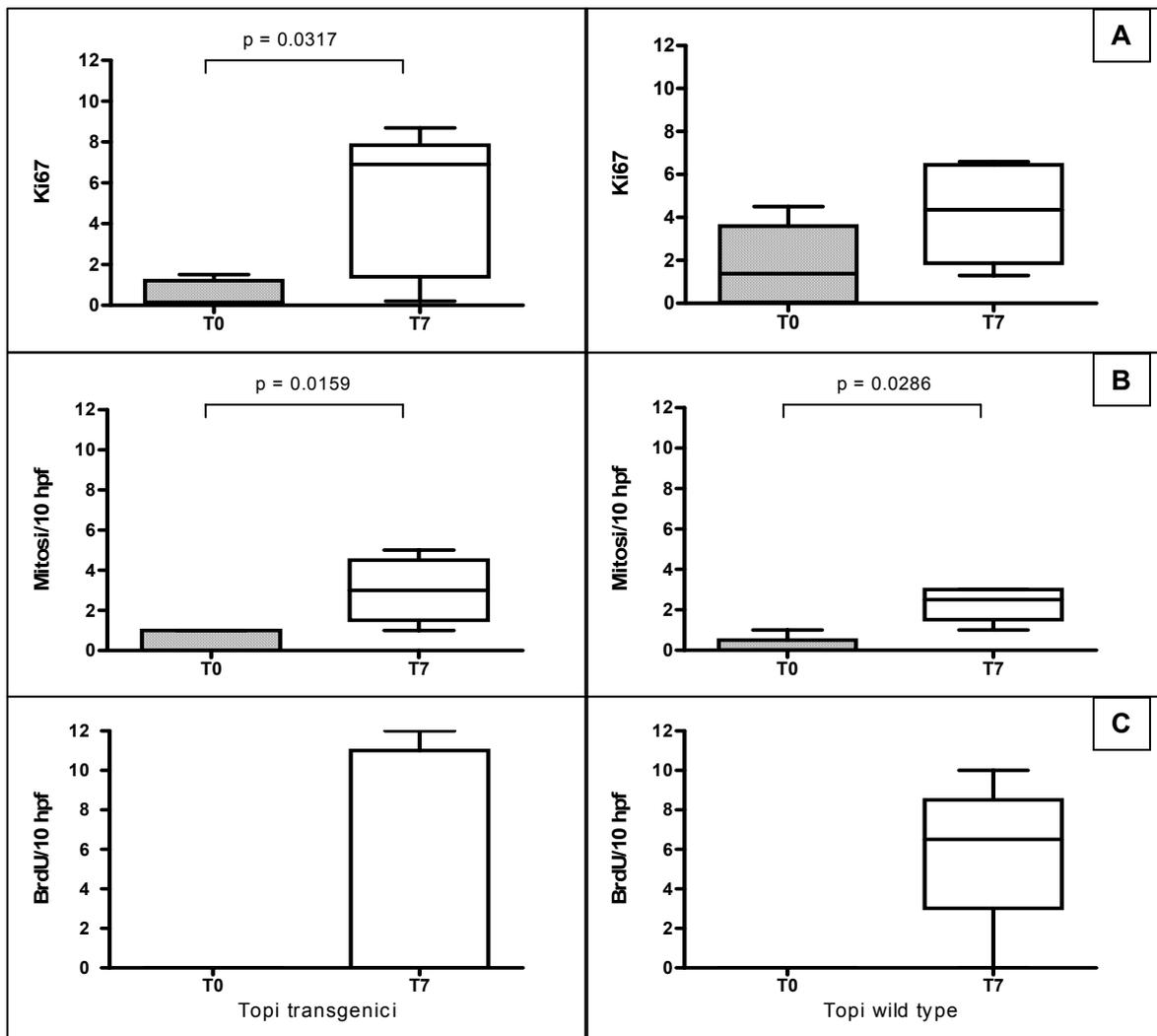
Il maggior sviluppo della massa epatica, osservata per il gruppo di topi transgenici, era associato a una diminuzione significativa dell'attività apoptotica, come documentato dai più bassi livelli di caspasi-3 clivata (attivata).

La [Figura 11](#) dimostra l'espressione, al momento del sacrificio, dei livelli di caspasi-3 nei transgenici confrontata con quella espressa dal gruppo di topi wild type (media  $\pm$  SD:  $0.3 \pm 0.04$  vs  $0.46 \pm 0.02$ ,  $p=0.0047$ ). Da segnalare inoltre la correlazione inversa tra l'espressione della serpina e la diminuzione dell'attività apoptotica nei due gruppi di animali.



**Figura 11. Valori medi di espressione di serpina e di caspasi 3 clivata nei due gruppi di topi transgenici e wild type, analizzati mediante Western Blot. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.**

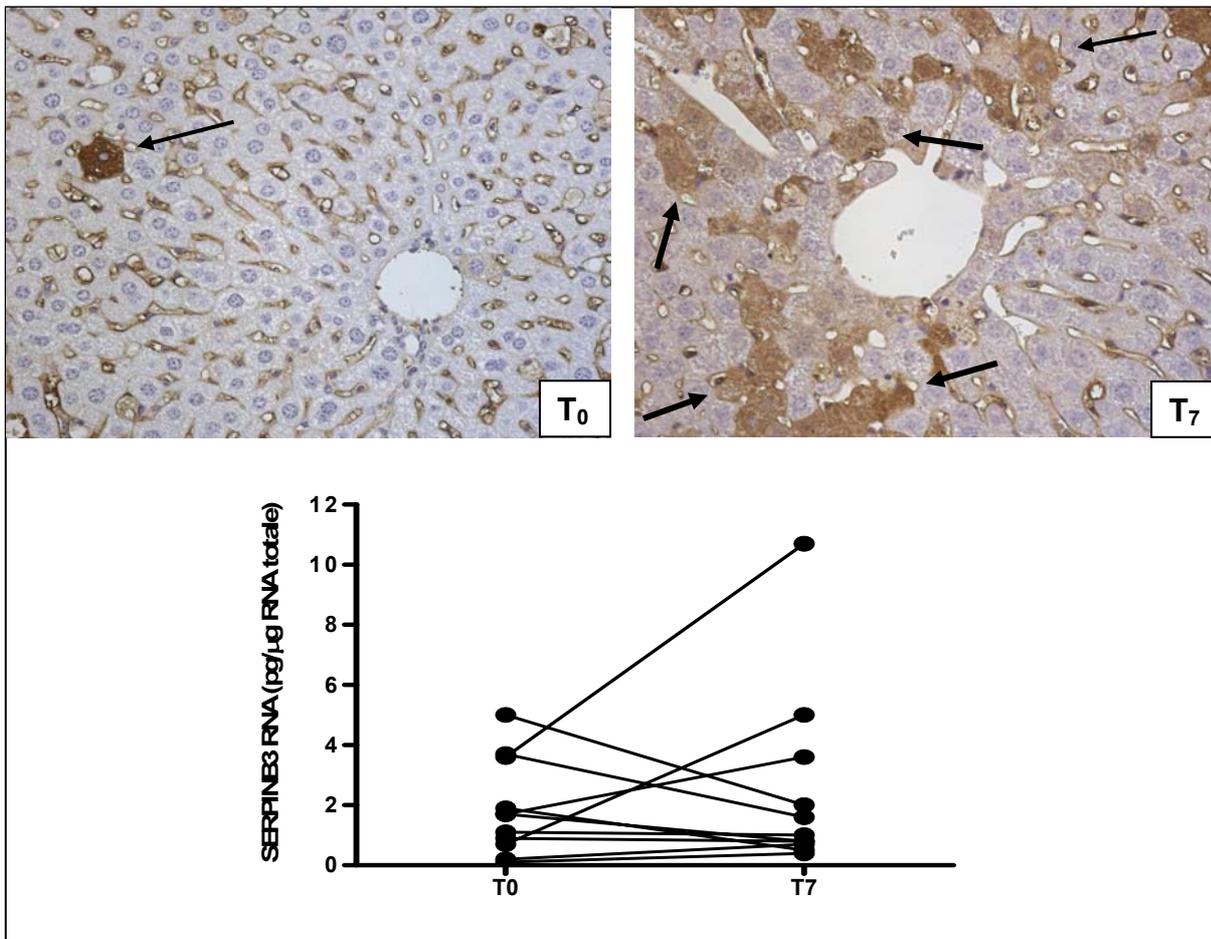
Il gruppo di topi transgenici ha documentato complessivamente, al momento del sacrificio, una maggiore attività proliferativa, in rapporto ai topi wild type, sebbene la differenza non sia risultata statisticamente significativa. In [Figura 12](#) è rappresentato l'andamento di parametri di proliferazione nei topi transgenici e nei controlli, misurati sul fegato rimosso al momento dell'epatectomia (T0) e dopo 7 giorni, al momento del sacrificio (T7). Rispetto al prelievo basale, l'espressione di Ki67 è risultata significativamente più elevata nei topi transgenici a differenza dei topi wild type, il numero di mitosi è risultato significativamente elevato in entrambe i gruppi, mentre la marcatura con bromodeossiuridina, pur risultando più elevata in entrambe i gruppi, non ha raggiunto un livello di significatività statistica.



**Figura 12.** Indici di attività proliferativa, nel gruppo di topi transgenici e nei wild type, valutati al momento dell'epatectomia (T<sub>0</sub>) e dopo 7 giorni (T<sub>7</sub>). Sono rappresentati il box-plot di Ki67 ( riquadro A), numero di mitosi ( riquadro B) e marcatura con bromodeossiridina ( riquadro C). Gli estremi del rettangolo indicano il 25° ed il 75° percentile, mentre la linea all'interno qualora non coincida con uno dei due estremi, indica la mediana. Le barre individuano l'intervallo di distribuzione dei valori.

L'espressione di SERPINB3 a livello trascrizionale dopo epatectomia nei topi transgenici ha documentato un comportamento eterogeneo, con aumento dei livelli in circa un terzo dei casi. Questi risultati erano supportati da un più alto punteggio in immunostochimica per SERPINB3 (Figura 13).

Da segnalare che SERPINB3 umana non è risultata positiva nel gruppo di topi wild type.



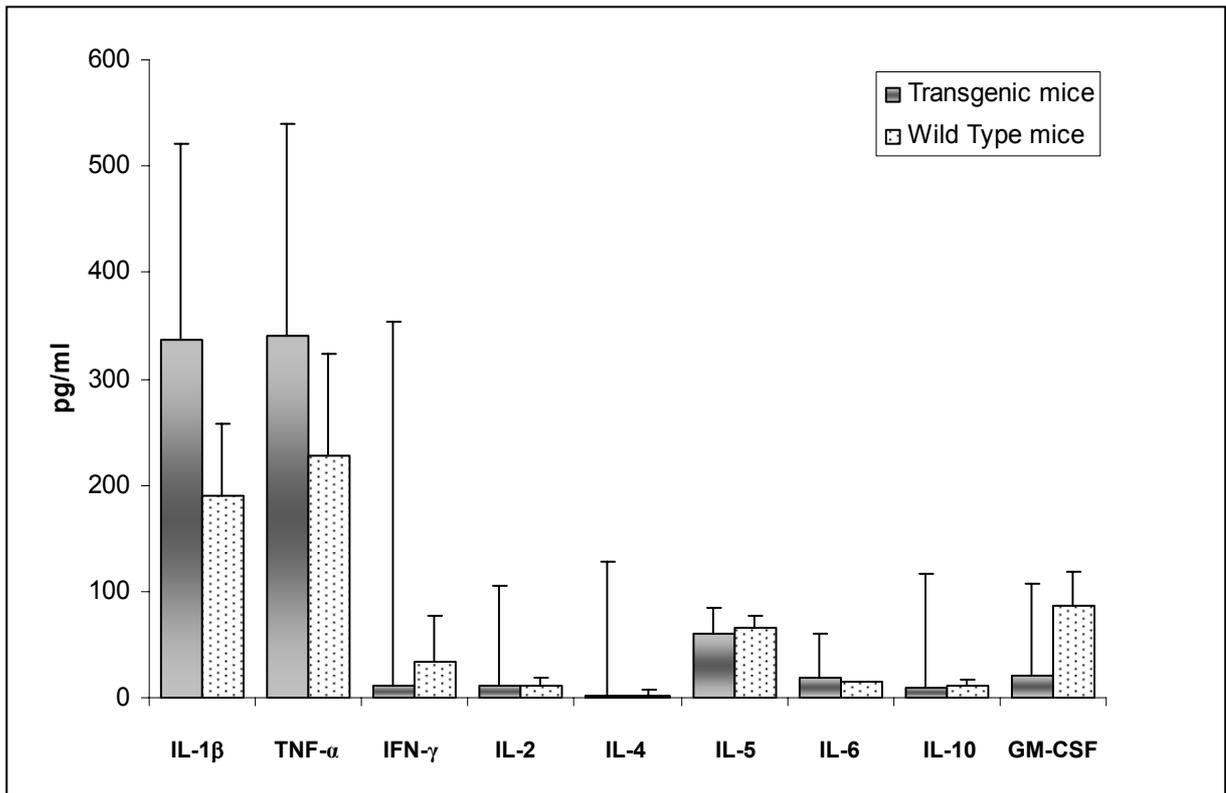
**Figura 13. Pannello superiore:** T<sub>0</sub>) Immunoistochimica per SERPINB3 nel fegato di un topo transgenico al momento dell'epatectomia; solo un epatocita (indicato dalla freccia) mostra un'intensa colorazione bruna citoplasmatica. Ingrandimento 100X. T<sub>7</sub>) Immunoistochimica per SERPINB3 nel fegato dello stesso animale al momento del sacrificio (7 giorni dopo epatectomia parziale); diversi epatociti (frecce) mostrano un'intensa colorazione bruna citoplasmatica. Ingrandimento 100X.

**Pannello inferiore:** Livelli di RNA di SERPINB3, valutata mediante Real-time PCR, al momento dell'operazione (T<sub>0</sub>) e 7 giorni dopo epatectomia (T<sub>7</sub>) nel gruppo di topi transgenici.

### Profilo citochinico

In Figura 14 sono riportati i risultati riguardanti le concentrazioni delle citochine circolanti nei due gruppi di topi al momento del sacrificio. Sebbene la differenza non sia statisticamente significativa, nel gruppo dei topi transgenici si può osservare una tendenza verso un più alto profilo Th1 (TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$ ), mentre è risultato più basso il profilo Th2 (GM-CSF).

Il dosaggio dell'albumina, quale indice di sintesi proteica epatica, ha evidenziato una differenza nei livelli sierici tra i due gruppi: nei topi wild type non si è osservata nessuna variazione tra il prelievo basale e quello finale (g/dL T0:  $3.4 \pm 0.42$  vs T7:  $2.78 \pm 0.46$ ,  $p= 0.275$ ), mentre nel gruppo dei topi transgenici si è osservato un decremento significativo dopo epatectomia (g/dL T0:  $3.29 \pm 0.13$  vs T7:  $2.82 \pm 0.30$ ,  $p= 0.001$ ).



**Figura 14. Confronto dei valori medi delle concentrazioni di citochine circolanti nel gruppo di topi transgenici e wild type, 7 giorni dopo epatectomia parziale. Le barre verticali rappresentano l'errore standard.**

## Discussione

La risposta rigenerativa del fegato coinvolge un vasto numero di fattori di crescita, citochine e fattori di trascrizione, molti dei quali, negli ultimi anni, sono stati identificati come importanti regolatori del processo (49, 50). La complessità di questa risposta, comunque, coinvolge con molta probabilità attori supplementari che non sono ancora stati identificati.

I risultati ottenuti indicano che la presenza di SERPINB3 nei topi transgenici funziona come un forte stimolo addizionale per la crescita del fegato, verosimilmente attraverso l'inibizione dell'apoptosi da un lato e l'aumento della proliferazione cellulare dall'altro. Dato che il picco di attività proliferativa è massimo dopo circa 48 ore dall'epatectomia, a cui fa seguito un'onda apoptotica di rimodellamento epatico, la tempistica di rilevamento nel nostro modello sperimentale ha favorito la valorizzazione dell'evento rigenerativo "in toto" ed ha permesso di documentare le differenze di attività apoptotica, ridotte in presenza di SERPINB3.

Gli indici di proliferazione invece, benché più elevati nei topi transgenici, non hanno mostrato differenze significative rispetto ai controlli, verosimilmente in quanto misurati nella fase discendente del picco. L'andamento più elevato del profilo citochinico Th1 nei topi transgenici merita ulteriori approfondimenti, anche se l'associazione di questa serpina con TNF- $\alpha$  è stata già precedentemente osservata (57). L'andamento di IL-6, citochina riconosciuta svolgere un ruolo predominante nel processo rigenerativo (58), non è risultato diverso nei due gruppi di topi, suggerendo che le differenze osservate non coinvolgono questa citochina. Per quanto riguarda i livelli di albumina nel siero, mentre sono risultati invariati nei topi wild type, hanno documentato una diminuzione significativa nei topi transgenici dopo epatectomia. Una possibile spiegazione potrebbe essere il fatto che nei topi transgenici l'attività dell'epatocita sia più orientata verso la rigenerazione, penalizzando la via dell'omeostasi cellulare, come sembrano indicare i diminuiti livelli di albumina nel siero.

In conclusione, i risultati ottenuti supportano l'ipotesi che SERPINB3 eserciti un ruolo importante nel complesso processo della rigenerazione epatica, conferendo resistenza nei confronti della morte cellulare per apoptosi ed agendo come uno stimolo supplementare per la proliferazione degli epatociti.

**5. STUDIO DEI MECCANISMI PATOGENETICI DELLA  
ENCEFALOPATIA CORRELATA A DANNO EPATICO ACUTO DA  
PARACETAMOLO**

## **Introduzione**

L'obiettivo di questo progetto è stato lo studio dei meccanismi d'azione di SERPINB3 con particolare riguardo agli effetti sullo sviluppo dell'encefalopatia correlata a danno epatico acuto indotto chimicamente da un sovradosaggio di paracetamolo.

Da dati presenti in letteratura è stato osservato che nei casi di overdose da paracetamolo si induce un'epatite fulminante, caratterizzata da insufficienza epatica acuta ed encefalopatia grave. I meccanismi responsabili della compromissione cerebrale, se da un lato coinvolgono gli elevati livelli di ammonio ematico, quale espressione del danno epatico, dall'altro sembrano affiancati, almeno in parte, da una componente infiammatoria a livello cerebrale caratterizzata da un processo di attivazione della microglia (59).

In alcuni studi è stato evidenziato come SERPINB3 sia implicata nei meccanismi infiammatori e di attivazione della microglia (60).

Il modello di topo transgenico per SERPINB3 umana, con la sua elevata espressione a livello cerebrale, oltre che epatico, è stato ritenuto un modello utile per approfondire questi aspetti patogenetici.

## **Modello sperimentale**

Il modello sperimentale ha previsto la somministrazione, in topi transgenici per SERPINB3 umana ed in topi wild type dello stesso ceppo, di paracetamolo (0.8 mg/gr di peso corporeo) mediante iniezione intraperitoneale, al fine di verificare il rapporto tra la presenza di SERPINB3 e la diversa induzione del danno a livello epatico e cerebrale nei due gruppi di animali.

In parallelo agli animali trattati (tutti di 4 mesi di età), sono stati seguiti anche due gruppi di controllo (topi transgenici e wild type), inoculati con fisiologica. Durante tutti gli esperimenti è stato monitorato l'andamento della temperatura corporea degli animali, in modo che le condizioni sperimentali rimanessero identiche nei gruppi.

In un primo esperimento sono stati valutati gli intervalli di sopravvivenza in due gruppi di animali (5 topi transgenici e 5 topi wild type) dal momento dell'inoculo di paracetamolo, ottenendo in questo modo indicazioni importanti sui tempi di sopravvivenza dei due gruppi trattati.

Nei successivi esperimenti, dopo 20 ore dall'inoculo, è stata effettuata l'eutanasia nei seguenti gruppi di animali:

- 12 topi transgenici inoculati con paracetamolo,
- 12 topi transgenici inoculati con soluzione fisiologica,
- 12 topi wild type inoculati con paracetamolo,
- 12 topi wild type inoculati con soluzione fisiologica.

Sono stati quindi prelevati il cervello, il fegato, oltre al siero, utilizzati per studi di tipo morfologico, immunoistochimico (SERPINB3, microglia), molecolare (Real-time PCR) ed istologico con particolare riguardo agli indicatori della flogosi, agli indici di danno epatico e cerebrale. Le tecniche di rilevazione istologiche utilizzate in questa sperimentazione sono le stesse descritte per lo studio della rigenerazione epatica con l'aggiunta della metodica per la caratterizzazione, su tessuto cerebrale, della microglia per cui è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-F4/80 (AbD Serotec, Oxford, UK).

Per quanto concerne il dosaggio delle citochine a livello cerebrale, questo è stato effettuato mediante Real time PCR su cDNA ottenuto da RNA estratto dal tessuto cerebrale.

La metodica seguita è la stessa impiegata nello studio della rigenerazione epatica ed i primers utilizzati per l'amplificazione di TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 ed IL-10 sono stati i seguenti:

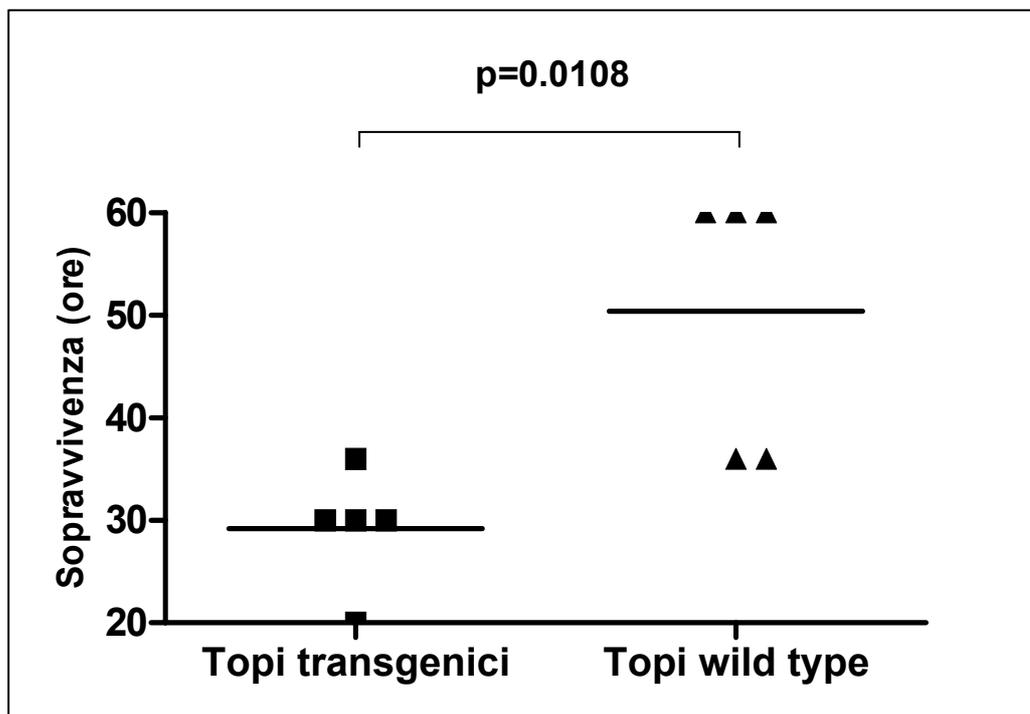
TGF- $\beta$  senso: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3'; TGF- $\beta$  antisenso: 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'; TNF- $\alpha$  senso: 5'-AGCCCCCAGTCTGTATCCTT-3'; TNF- $\alpha$  antisenso: 5'-CTCCCTTTGCAGAACTCAGG-3'; IL-6 senso: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA -3'; IL-6 antisenso: 5'- CAGAATTGCCATTGCACAAC -3'; IL-10 senso: 5'-CCAAGCCTTATCGGAAATGA-3'; IL-10 antisenso: 5'-TTTTACAGGGGAGAAATCG -3'.

Dopo una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguivano 45 cicli di amplificazione con le seguenti condizioni: denaturazione a 94°C per 1 secondo, annealing a 60°C per 10 secondi ed estensione a 72°C per 10 secondi. L'amplificazione dei prodotti di trascrizione specifici era confermata dai profili della curva di melting alla fine del processo di amplificazione. Successivamente, per ottenere una misura della variazione di espressione citochinica dopo il trattamento, i valori espressi dagli animali trattati sono stati normalizzati rispetto ai valori espressi da quelli non trattati.

Nel siero sono stati dosati i livelli di ammoniemia ( $\text{NH}_4$ ) e l'espressione del profilo di differenti citochine ( $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL2}$ ,  $\text{IL4}$ ,  $\text{IL5}$ ,  $\text{IL10}$ ,  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ ) è stata valutata nei topi trattati e di controllo attraverso la tecnologia Bioplex protein assay, precedentemente descritta.

## Risultati

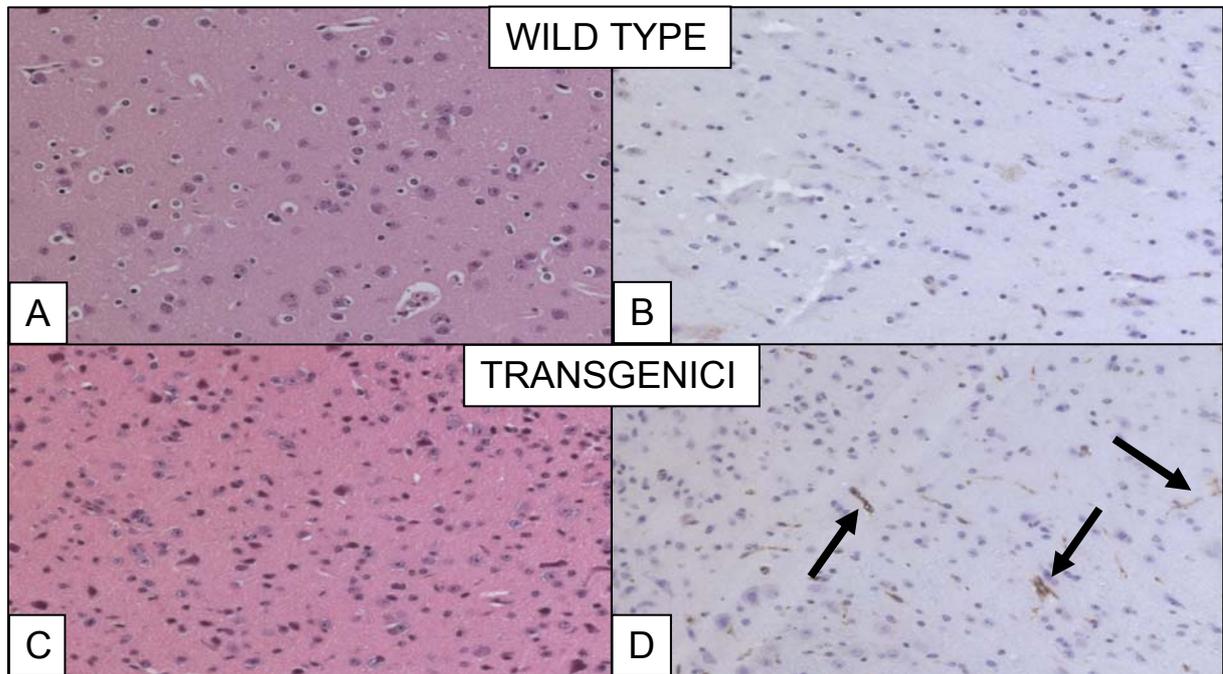
Dopo iniezione di paracetamolo i topi transgenici mostravano tempi significativamente più bassi di sopravvivenza rispetto ai controlli (media  $\pm$  SD,  $29.20 \pm 2.58$  h vs  $50.40 \pm 5.88$  h,  $p = 0.0108$ ), mentre la diminuzione della temperatura corporea (TG: media  $\pm$  SD,  $38 \pm 0.45$  °C vs  $27.42 \pm 1.39$ °C con  $p = 0.0022$ ; WT: media  $\pm$  SD,  $37.92 \pm 0.49$  °C vs  $30 \pm 1.55$ °C con  $p = 0.0022$ ) era simile in entrambi i gruppi, escludendo così questo fattore come influente nelle differenze osservate tra i topi transgenici ed i controlli (Figura 15).



**Figura 15.** Tempi di sopravvivenza (calcolati in ore), tra topi transgenici e wild type, dopo iniezione di paracetamolo.

Nei preparati istologici di tessuto cerebrale i topi transgenici, che presentavano elevata espressione di  $\text{SERPINB3}$  a livello endoteliale, mostravano una ipercellularità con maggior attivazione della microglia rispetto ai controlli (Figura 16).

Nei preparati istologici di fegato, invece, l'entità del danno epatico si è dimostrata sovrapponibile nei due gruppi.

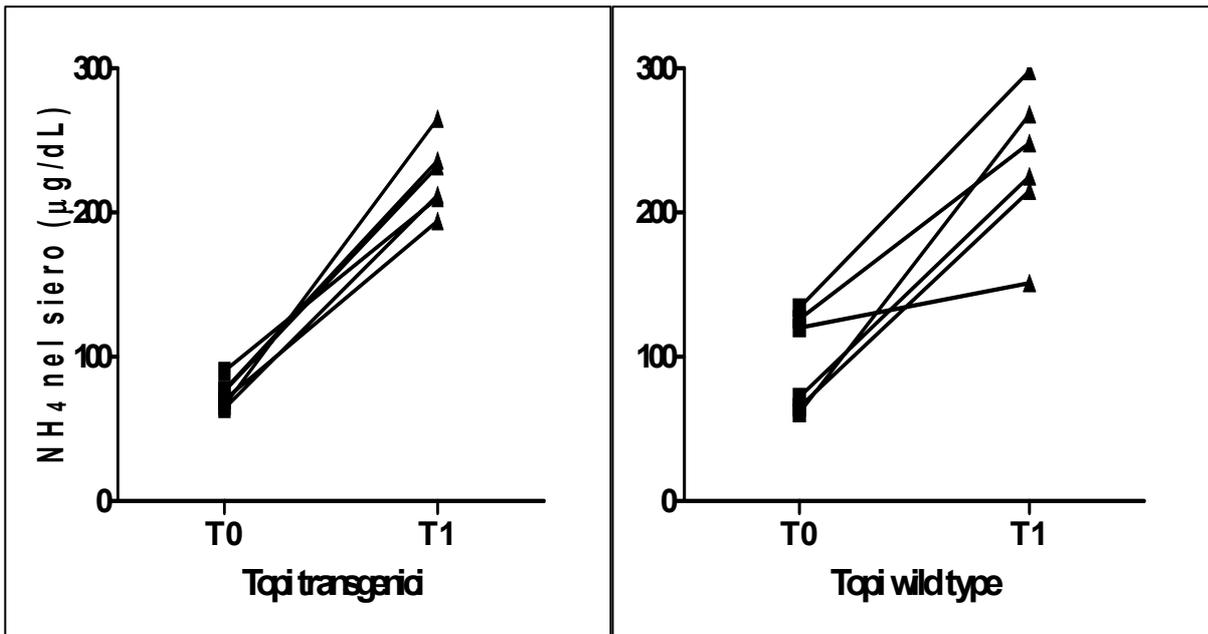


**Figura 16. Colorazione con ematossilina-eosina (H&E) ed immunoistochimica per SERPINB3 (IHC) in tessuto cerebrale di topo.**

**A) Cervello di topo wild type (H&E); B) Cervello di topo wild type negativo per la serpina (IHC); C) Cervello di topo transgenico (H&E); D) Cervello di topo transgenico con espressione della serpina (indicata dalle frecce) a livello delle cellule endoteliali vascolari (IHC).**

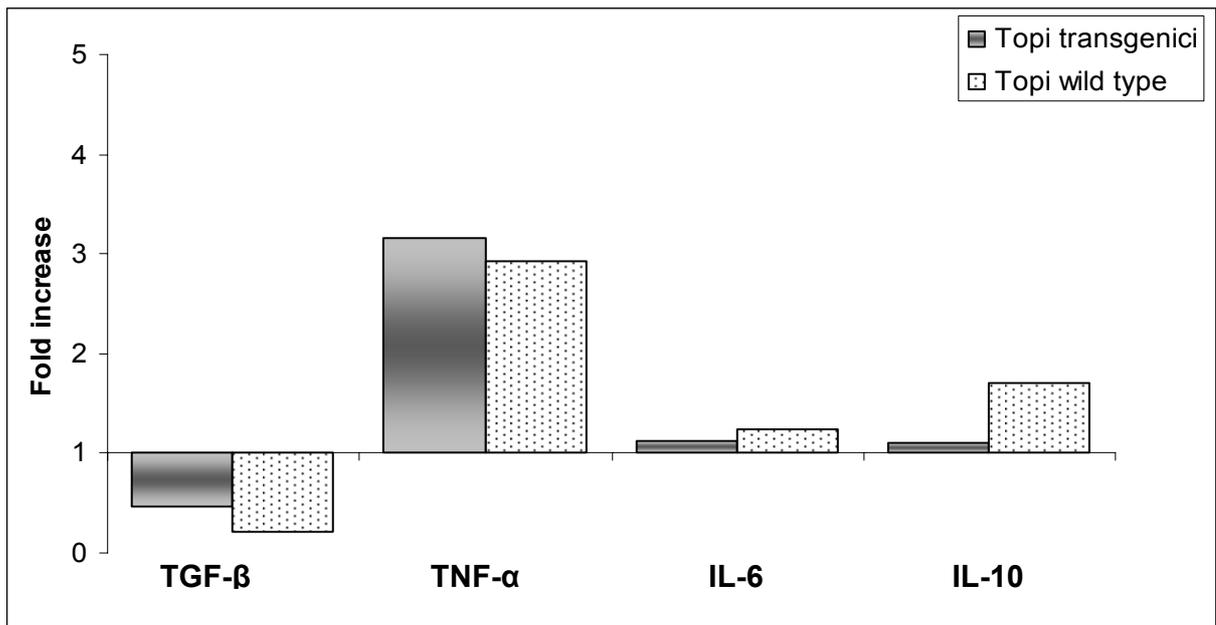
**Ingrandimento 200X.**

La misurazione dell'ammoniemia ( $\text{NH}_4$ ) nel sangue basale e post trattamento mostrava, nei transgenici e wild type, lo stesso aumento significativo, senza differenze sostanziali tra i due gruppi (Figura 17).

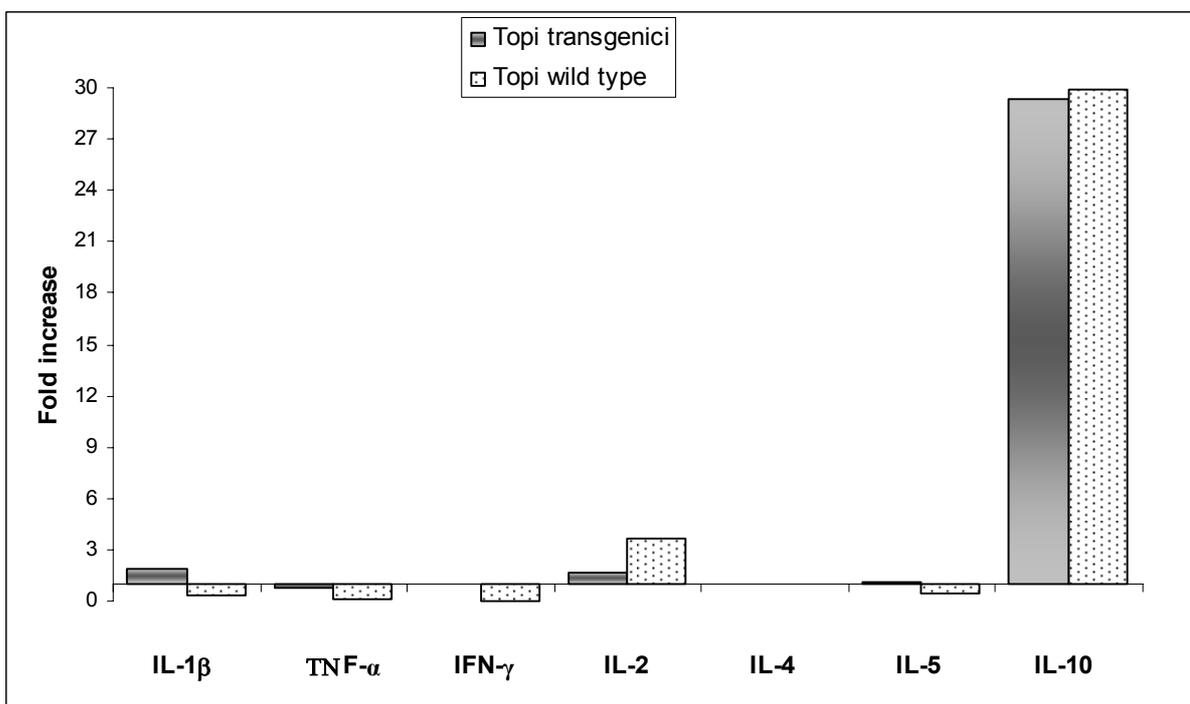


**Figura 17.** Andamento dei livelli di ammoniemia (NH<sub>4</sub>) nel siero di topi transgenici e wild type prima (T<sub>0</sub>) e 20 ore dopo iniezione di paracetamolo (T<sub>1</sub>).

Infine anche per quanto riguarda il profilo citochinico non si sono osservate differenze sostanziali tra i topi transgenici ed i wild type, in quanto è stato evidenziato in entrambi i gruppi un aumento dell'espressione di TNF $\alpha$ -RNA nel tessuto cerebrale ([Figura 18](#)) ed un aumento dei livelli di IL-10 nel siero ([Figura 19](#)).



**Figura 18.** Espressione citochinica nel tessuto cerebrale di topi transgenici e wild type dopo iniezione di paracetamolo. I risultati, ottenuti mediante Real-time PCR, esprimono la variazione di ogni citochina rispetto agli animali non trattati.



**Figura 19.** Espressione citochinica nel siero di topi transgenici e wild type dopo iniezione di paracetamolo. I risultati, ottenuti mediante tecnologia Bioplex protein assay, esprimono l'incremento di ogni citochina rispetto agli animali non trattati.

## **Discussione**

L'attivazione della microglia ed i processi infiammatori, assieme all'aumento dell'ammoniemia, sembrano giocare un ruolo importante nello sviluppo dell'encefalopatia correlata a danno epatico acuto. La minor sopravvivenza dei topi transgenici, associata ad aumentata attivazione della microglia, sembra suggerire che SERPINB3 favorisca il danno cerebrale mediante incremento della componente flogistica cerebrale.

Poichè questa serpina è coinvolta nei processi infiammatori e nei meccanismi di attivazione della microglia, il suo ruolo nell'encefalopatia epatica acuta dovrebbe essere tenuto in considerazione e approfondito in successivi studi.

## CONCLUSIONI

La ov-serpina SERPINB3 è espressa normalmente negli epiteli squamosi, mentre si trova iper-espressa nelle cellule neoplastiche di origine epiteliale (17, 18) e nel tumore primitivo del fegato (19, 20, 61), ma non nel fegato normale. Livelli più bassi di espressione sono stati riscontrati anche nella cirrosi epatica e nell'epatite cronica, in relazione all'attività infiammatoria (30).

Non si conosce ancora completamente il ruolo biologico di questa serpina ma Suminami ed il suo gruppo hanno evidenziato che regola la crescita tumorale non solo proteggendo le cellule dall'apoptosi attraverso la riduzione del processo di attivazione della caspasi-3 (62), ma anche inibendo l'infiltrazione intratumorale delle cellule NK (26). Indubbiamente nella regolazione dei processi proteolitici l'equilibrio che si instaura tra le proteasi ed i loro inibitori si dimostra fondamentale nell'influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione e la morte cellulare stessa (21).

Nel nostro studio abbiamo quindi approfondito il ruolo che può assumere SERPINB3 in differenti situazioni sperimentali utilizzando come modello animale un topo transgenico per la serpina umana.

I risultati ottenuti sul modello animale supportano l'ipotesi che SERPINB3 sia innanzitutto una molecola che induce protezione cellulare, come dimostrato dalla maggior sopravvivenza dei topi transgenici, rispetto ai controlli. Le evidenze sperimentali prodotte dimostrano inoltre che questa serpina non è un fattore in grado di indurre direttamente processi di trasformazione neoplastica, ma può potenziare l'attività proliferativa conseguente a stimolo flogistico con aumento del rischio di degenerazione neoplastica, come osservato a livello polmonare, o con peggioramento del danno cerebrale, con attivazione della microglia, come in corso di encefalopatia epatica acuta.

Nel complesso processo della rigenerazione epatica sembra svolgere un ruolo rilevante, indipendente da IL-6, che esercita conferendo resistenza nei confronti della morte cellulare per apoptosi ed agendo come uno stimolo supplementare per la proliferazione degli epatociti.

E' proprio questa capacità di inibire l'apoptosi cellulare che sembra attribuire a SERPINB3 un ruolo importante nello sviluppo del fenotipo tumorale (29). Questo aspetto è supportato dall'evidenza di elevati livelli di espressione di SERPINB3 nei

tessuti neoplastici, rispetto agli epitelii normali, e con alcune evidenze di un legame tra livello di espressione della proteina e il grado di sviluppo tumorale (20).

Le caratteristiche biologiche di SERPINB3 fanno ritenere che questa serpin possa essere considerata un fattore protettivo che aumenta i meccanismi di sopravvivenza in condizioni di danno acuto, mentre in situazioni di danno cronico, le caratteristiche di maggior resistenza e potenzialità proliferativa cellulare potrebbero essere responsabili di un aumento del rischio di trasformazione neoplastica.

Alla luce dei dati così riportati sarà importante affrontare studi mirati con una più ampia casistica di animali per poter consolidare i risultati ottenuti ed approfondire i meccanismi molecolari e le vie di segnale coinvolte.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; 276 (36): 33293-33296.
- 2) Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002; 102 (12): 4751-804.
- 3) Silverman GA, Whisstock JC, Askew DJ, Pak SC, Luke CJ, Cataltepe S, Irving JA, Bird PI. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 (3): 301-325.
- 4) Remold-O'Donnell E. The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett* 1993; 315 (2): 105-108.
- 5) Benarafa C, Remold-O'Donnell E. The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (32): 11367-11372.
- 6) Izuhara K, Ohta S, Kanaji S, Shiraishi H, Arima K. Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65 (16): 2541-2553.
- 7) Takeda A, Yamamoto T, Nakamura Y, Takahashi T, Hibino T. Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. *FEBS Lett* 1995; 359 (1): 78-80.
- 8) Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Bromme D, Chapman HA, Silverman GA. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 1998; 37 (15): 5258-5266.
- 9) Masumoto K, Sakata Y, Arima K, Nakao I, Izuhara K. Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1. *J Biol Chem* 2003; 278 (46): 45296-45304.
- 10) Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K.

The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p1. *J Biol Chem* 2004; 279 (5): 5081-5087.

11) Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977; 40 (4): 1621-1628.

12) Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181 (1): 51-58.

13) Kuwano A, Kondo I, Kishi F, Suminami Y, Kato H. Assignment of the squamous cell carcinoma antigen locus (SCC) to 18q21.3 by in situ hybridization. *Genomics* 1995; 30 (3): 626.

14) Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA. A serine protease inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 (8): 3147-51.

15) Schick C, Kamachi Y, Bartuski AJ, Cataltepe S, Schechter NM, Pemberton PA, Silverman GA. Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol Chem* 1997; 272 (3): 1849-1855.

16) Luke C, Schick C, Tsu C, Whisstock JC, Irving JA, Bromme D, Juliano L, Shi GP, Chapman HA, Silverman GA. Simple modifications of the serpin reactive site loop convert SCCA2 into a cysteine proteinase inhibitor: a critical role for the P3' proline in facilitating RSL cleavage. *Biochemistry* 2000; 39 (24): 7081-7091.

17) Takeshima N, Suminami Y, Takeda O, Abe H, Okuno N, Kato H. Expression of mRNA of SCC antigen in squamous cells. *Tumour Biol* 1992; 13 (5-6): 338-342.

18) Cataltepe S, Gornstein ER, Schick C, Kamachi Y, Chatson K, Fries J, Silverman GA, Upton MP. Co-expression of squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 in normal adult tissues and squamous cell carcinomas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48 (1):113-22.

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

- 20) Giannelli G, Marinosci F, Sgarra C, Lupo L, Dentico P, Antonaci S. Clinical role of tissue and serum levels of SCCA antigen in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 116 (4): 579-83.
- 21) Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, Hashimoto K, Hirose S, Kyo S, Ito M. Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518 (1-2): 124-31.
- 22) Silverman GA, Bartuski AJ, Cataltepe S, Gornstein ER, Kamachi Y, Schick C, Uemura Y. SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumor Biol* 1998; 19 (6): 480-7.
- 23) Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, Kato H, Whiteside TL. Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000; 82 (4): 981-989.
- 24) Murakami A, Suminami Y, Hirakawa H, Nawata S, Numa F, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer* 2001; 84 (6): 851-858.
- 25) Katagiri C, Nakanishi J, Kadoya K, Hibino T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV- induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase. *J Cell Biol* 2006; 172 (7) 983-990.
- 26) Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, Nawata S, Gondo T, Hirakawa H, Numa F, Silverman GA, Kato H. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res* 2001; 61 (5): 1776-1780.
- 27) Quarta S, Vidalino L, Ruvoletto MG, Della Barbera M, Calabrese F, Valente M, Gatta A, Pontisso P. SCCA over-expression induces cell proliferation and down-regulation of the adhesion system [abstract]. *J Clin Virol* 2006; 36: S193.
- 28) Hashimoto K, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, Sakai H. Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF- $\alpha$ -induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Tumor Biol* 2005; 26 (4): 165-172.
- 29) Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 (49): 242-9.
- 30) Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegnù L, Calabrese F, Gatta A, Pontisso P, Fassina G. Squamous cell carcinoma antigen-

immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103 (12): 2558-2565.

31) De Falco S, Ruvoletto MG, Verdoliva A, Ruvo M, Raucci A, Marino M, Senatore S, Cassani G, Alberti A, Pontisso P, Fassina G. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem* 2001; 276 (39): 36613-36623.

32) Shitara H, Sato A, Hayashi J, Mizushima N, Yonekawa H, Taya C. Simple method of zygosity identification in transgenic mice by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res* 2004; 13 (2): 191-194.

33) Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976; 3 (9): 2303-2308.

34) Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 1993; 72 (3 Suppl): 962-970.

35) Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9 (4): 138-141.

36) Hanson KD, Shichiri M, Follansbee MR, Sedivy JM. Effects of c-myc expression on cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1994; 14 (9): 5748-5755.

37) Grasl-Kraupp B, Bursch W, Ruttkay-Nedecky B, Wagner A, Lauer B, Schulte-Hermann R. Food restriction eliminates preneoplastic cell through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (21): 9995-9999.

38) Fausto N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog Growth Factor Res* 1991; 3 (3): 219-234.

39) Villa E, Dugani A, Moles A, Camellini L, Grottola A, Buttafoco P, Merighi A, Ferretti I, Esposito P, Miglioli L, Bagni A, Troisi R, De Hemptinne B, Praet M, Callea F, Manenti F. Variant liver estrogen receptor transcripts already occur at an early stage of chronic liver disease. *Hepatology* 1998; 27 (4): 983-988.

40) Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 (5): 1973-1977.

41) Ghebranious N, Sell S. Hepatitis B injury, male gender, aflatoxin and p53 expression. Each contribute to hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1998; 27 (2): 383-391.

- 42) Dunsford HA, Sell S, Chisari FV. Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Research* 1990; 50 (11): 3400-3407.
- 43) Sell S, Hunt JM, Dunsford HA, Chisari FV. Synergy between hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice. *Cancer Research* 1991; 51 (4): 1278-1285.
- 44) Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res* 1999; 424 (1-2):167-181.
- 45) Chapman HA. Disorders of lung matrix remodeling. *J Clin Invest* 2004; 113 (2): 148-157.
- 46) Nishi N, Miyazaki M, Tsuji K, Hitomi T, Muro E, Zaito M, Yamamoto S, Inada S, Kobayashi I, Ichimaru T, Izuhara K, Nagumo F, Yuyama N, Hamasaki Y. Squamous cell carcinoma-related antigen in children with acute asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94 (3): 391-397.
- 47) Izbicki G, Or R, Christensen TG, Segel MJ, Fine A, Goldstein RH, Breuer R. Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4-overexpressing and knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283 (5): L1110-L1116.
- 48) Calabrese F, Lunardi F, Giacometti C, Marulli G, Gnoato M, Pontisso P, Saetta M, Valente M, Rea F, Perissinotto E, Agostini C. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen in idiopathic pulmonary fibrosis: clinicopathological correlations. *Thorax* 2008; 63 (9): 795-802
- 49) Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43 (2 Suppl 1): S45-S53.
- 50) Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213 (2): 286-300.
- 51) Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *J Biol Chem* 1994; 269 (23): 15957-15960.
- 52) Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003; 16 (2): 99-102.
- 53) Bucher NL. Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 1963; 15: 245-300.
- 54) Plumet S, Gerlier D. Optimized SYBR green real-time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers. *J Vir Methods* 2005; 128 (1-2): 79-87.
- 55) Askew DJ, Askew YS, Kato Y, Turner RF, Dewar K, Lehoczky J, Silverman GA. Comparative genomic analysis of the clade B serpin cluster at human chromosome

18q21: amplification within the mouse squamous cell carcinoma antigen gene locus. *Genomics* 2004; 84 (1): 176-184.

56) Sakata Y, Arima K, Takeshita K, Takai T, Aoki S, Ogawa H, Sugihara H, Fujimoto K, Izuhara K. Characterization of novel squamous cell carcinoma antigen-related molecules in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324 (4): 1340-1345.

57) Kato H. Expression and function of squamous cell carcinoma antigen. *Anticancer Res* 1996; 16 (4B): 2149-2153.

58) Peters M, Blinn G, Jostock T, Schirmacher P, Meyer zum Büschenfelde KH, Galle PR, Rose-John S. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 2000; 119 (6): 1663-1671.

59) Vaquero J, Butterworth RF. Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions. *Neurol Res* 2007; 29 (7): 683-690.

60) Thakker-Varia S, Elkabes S, Schick C, Silverman GA, Peng L, Sherwood AC and Black IB. Gene expression in activated brain microglia: identification of a proteinase inhibitor that increases microglial cell number. *Mol Brain Res* 1998; 56 (1-2): 99–107.

61) Guido M, Roskams T, Pontisso P, Fassan M, Thung SN, Giacomelli L, Sergio A, Farinati F, Cillo U, Ruggie M. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2008; 61 (4): 445-447.

62) Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, Kato H, Whiteside TL. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by the tumor-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000; 82 (4): 981-989.

## **RINGRAZIAMENTI**

Al Prof. Angelo Gatta, Prof.ssa Patrizia Pontisso, Prof.ssa Fiorella Calabrese  
ed al suo gruppo di lavoro, Prof. Carlo Agostini, Prof. Piero Amodio,  
Prof. Emanuele Cozzi, Dott. Luigi Dall’Olmo, Dott. Arben Dedja  
ed a tutti i miei compagni del gruppo in cui lavoro

Per avere reso possibile con il loro contributo la realizzazione di questa ricerca

Al Dott. Mauro Zucchetto, per la preziosa amicizia e per l’insostituibile aiuto nelle  
analisi statistiche