



Università degli Studi di Cagliari

**SCUOLA DI DOTTORATO IN**  
**Tossicologia-Oncologia e patologia molecolare**  
XXIII Ciclo

**TITOLO TESI**

ANALISI DELLA STRUTTURA DEI GENI CODIFICANTI I RECETTORI  
DELL'ORMONE TIROIDEO IN UN MODELLO DI  
EPATOCANCEROGENESI SPERIMENTALE

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/04

Presentata da: Dott.ssa Silvia Pinna

Direttore: Prof. Gaetano Di Chiara

Relatore: Prof. Amedeo Columbano

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

## ***Indice***

## *Introduzione:*

- ✓ Carcinoma epatocellulare pag. 2
- ✓ Recettori per l'ormone tiroideo pag. 12
- ✓ Le basi Epigenetiche del cancro pag. 30

## *Scopo del lavoro* pag. 36

## *Materiali e metodi*

- ✓ Animali pag. 40
- ✓ Protocollo sperimentale pag. 40
- ✓ Istologia e Immunoistochimica pag. 42
- ✓ Estrazione DNA genomico da tessuto congelato pag. 43
- ✓ Estrazione di RNA totale da tessuto pag. 44
- ✓ Valutazione qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici pag. 44
- ✓ Reazione a catena di polimerasi (PCR) pag. 45
- ✓ Elettroforesi su gel di agarosio pag. 47
- ✓ Estrazione di DNA da gel di agarosio pag. 47
- ✓ Sequenziamento del DNA pag. 48
- ✓ RT-PCR (Reverse-Transcription-Polymerase-Chain-Reaction) pag. 49
- ✓ Real Time PCR pag. 49
- ✓ Trattamento col sodio bisolfito pag. 50

- ✓ Methylation Specific PCR (MSP) pag. 52
- ✓ Laser Capture Microdissection pag. 54
- ✓ Isolamento RNA pag. 54
- ✓ Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA pag. 55
- ✓ Statistica pag. 55

*Risultati e Discussione* pag. 56

*Bibliografia* pag. 76

# ***Introduzione***

## ***Carcinoma Epatocellulare***

Il Carcinoma Epatocellulare (HCC) costituisce l'85-90% dei tumori primitivi del fegato. Oltre 560 mila individui sviluppano tumore al fegato ogni anno e un numero quasi uguale muore a causa di tale malignità (Hussain K, 2009).

Esso è, su scala mondiale, il quinto tumore più comune negli uomini e l'ottavo nelle donne; i tassi di sopravvivenza a 5 anni sono molto bassi (6.5% in Europa; 8.3% negli Stati Uniti) (Bosch FX, 2004).

L' HCC si sviluppa normalmente in un fegato precedentemente danneggiato e le cause basilari del danno epatico differiscono in rapporto alla distribuzione geografica. I meccanismi di epatocarcinogenesi e le caratteristiche del tumore possono variare grandemente nelle diverse aree geografiche (Llovet JM, 2003).

In aree ad alto rischio come Africa e Asia del Sud il consumo di cibi contaminati da Aflatossina B1 e l'infezione cronica da virus dell'Epatite B (HBV) sono altamente predominanti. In questi pazienti l'HCC si sviluppa spesso in giovane età. In Giappone, Egitto e Europa del Sud l'esposizione al virus dell'Epatite C (HCV) è la maggiore causa di HCC. In queste popolazioni l'HCC normalmente insorge in età avanzata e in un fegato fibrotico o cirrotico. Nei paesi dell'Europa Centrale e del Nord l'infezione da HCV e l'alcool sono le maggiori cause di cirrosi, responsabile per il 60% dei casi di HCC sviluppati nell'ultima decade (Chevret S, 1999).

Gli studi epidemiologici fin qui condotti hanno evidenziato che gli individui di sesso maschile presentano più alti tassi di HCC rispetto alle femmine con un rapporto maschi:femmine mediamente tra 2:1 e 4:1 (Hussain K, 2009). In particolare, studi condotti a Taiwan su popolazioni residenti in diversi distretti dell'isola hanno riportato un'associazione positiva tra incremento dei livelli di testosterone circolante e HCC in maschi affetti da HBV (Yu MW, 1993) (Yu MW, 2001).

Oltre ai fattori di rischio ambientali, una predisposizione genetica individuale probabilmente contribuisce a determinare il rischio di sviluppare epatocarcinoma, come suggerito dal fatto che normalmente in una rilevante percentuale di casi di HCC, circa il 20% in uno studio condotto negli USA, nessun fattore di rischio predisponente conosciuto può essere identificato (Dragani T, 2010).

### Principali cause di HCC

#### *Virus dell'epatite B (HBV)*

Globalmente l'infezione da HBV rappresenta il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di HCC, data anche la sua ampia diffusione su scala mondiale, con circa 300 milioni di individui cronicamente infettati. L'HBV incrementa il rischio di sviluppare HCC dalle 5 alle 15 volte. Sebbene questo virus sia notoriamente in grado di determinare l'insorgenza di HCC in assenza di cirrosi, circa il 70-90% di HCC correlato a HBV sviluppa in un background di cirrosi (Hussain K, 2009).

#### *Virus dell'epatite C (HCV)*

L'infezione cronica da HCV è responsabile per la maggior parte dei casi di HCC sviluppati nei paesi Occidentali e in Giappone (Naugler WE and Schartz JM, 2008). L'HCV incrementa il rischio di sviluppare HCC attraverso la promozione di fibrosi epatica. È stato dimostrato che tale rischio, in pazienti affetti da HCV, dipende dal grado di fibrosi epatica: in pazienti con un basso grado di fibrosi l'incidenza di HCC è stata descritta essere dello 0.5% mentre tra i pazienti che presentavano una severa fibrosi epatica l'incidenza era dello 7.9% (Yoshida H, 1999). In diversi pazienti affetti da HCV è stato descritto sviluppo successivo di cirrosi epatica: una volta che la cirrosi correlata a HCV è stabilita, l'HCC si sviluppa in questi pazienti a un tasso annuale dall'1 al 4%. I fattori che sembrano accelerare la progressione a cirrosi e quindi a HCC includono: età avanzata al

momento dell'infezione, sesso maschile, forte apporto di alcool, diabete, obesità e coinfezione con HIV e HBV (Di Bisceglie AM, 1997).

#### *Alcool*

Una forte assunzione di alcool intesa come ingestione superiore a 50-70 g/giorno per periodi prolungati è un chiaro fattore di rischio per HCC (Hussain K, 2009). Il più probabile meccanismo favorente lo sviluppo di cancro al fegato correlato all'assunzione di alcool è lo sviluppo di cirrosi. Inoltre, l'infezione da HCV sembra accelerare il corso del danno alcolico al fegato e causare lo sviluppo di HCC a una più giovane età tra i bevitori rispetto ai non bevitori (Morgan TR, 2004). In uno studio in cui è stata esaminata l'associazione tra ingestione di alcool e HCC tra casi e controlli è stato mostrato che per ciascun livello di alcool ingerito il più alto rischio viene osservato tra i soggetti con infezione da HCV seguiti da quelli affetti da HBV e infine da quelli esenti da infezione di entrambi i virus dell'epatite (Donato F, 2002). La cirrosi alcolica è probabilmente il più importante fattore di rischio per HCC in popolazioni con bassa prevalenza di infezione HBV e HCV e bassa esposizione ad aflatossina, come il Nord America e il Nord Europa (La Vecchia C, 2007).

#### *Aflatossina B1 (AFB1)*

L'aflatossina B1 è una micotossina prodotta dal fungo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* che cresce rapidamente in cibi come cereali, noci e altri vegetali conservati in condizioni di umidità (Chuang SC, 2009). Le aree maggiormente interessate dalla contaminazione dei cibi con aflatossina sono l'Africa, il Sud-Est Asiatico e la Cina. Una volta ingerita, l'aflatossina B1 viene metabolizzata nel fegato dal citocromo P450 in un intermedio attivo detto AFB1-exo-8-9-epoxide che può legare il DNA per formare l'addotto pro-mutagenico AFB1-N7-guanina. Questo addotto è stato descritto essere responsabile



dell'insorgenza di mutazioni nel gene codificante la proteina p53 (l'AFB1 induce frequentemente la transversione da G:C a T:A alla terza base nel codone 249 della p53) (Garner RC, 1972), osservata nel 30-60% degli HCC nelle aree ad alta esposizione ad aflatossina (Bressac B,1991). In queste aree c'è un'alta prevalenza di infezione cronica da HBV.

### *Fattori di rischio mono- e poli-genici*

#### *Deficienza di Alfa1-antitripsina*

La deficienza di alfa1-antitripsina (AATD) è una malattia autosomica recessiva che risulta da diverse mutazioni nel gene SERPINA1 (conosciuto anche col nome PI) localizzato sul cromosoma 14q32.1. Questo gene codifica per la AAT, un inibitore delle serine proteasi che è sintetizzato ad alti livelli nel fegato e la cui funzione biochimica è l'inibizione dell'elastasi neutrofila (Fairbanks KD, 2008). I pazienti con deficienza di AAT possono sviluppare danno al fegato. La deficienza di AAT è correlata a incremento del rischio di sviluppare HCC, specialmente nei maschi (Elzouki AN, 1996).

#### *Sovraccarico di Ferro*

Livelli molto alti di ferro epatico come quelli riscontrati in pazienti affetti da emocromatosi ereditaria (comune disordine del metabolismo del ferro caratterizzato da eccessivo assorbimento gastrointestinale di quest'ultimo e da conseguente accumulo in tutti gli organi tranne che nel cervello e nel sistema nervoso) causano un incremento di 200 volte del rischio di HCC (Kowdley KV, 2004). L'effetto del sovraccarico di ferro sembra essere indipendente dallo sviluppo di cirrosi e può interagire con l'alcool e con l'infezione da HBV o HCV.

### *Tirosinemia del tipo I*

La tirosinemia ereditaria del tipo I è un disordine autosomico recessivo causato da una deficienza dell'ultimo enzima della via catabolica della tirosina chiamato fumarilacetoacetato idrolasi (FAH), il cui gene è localizzato sul cromosoma 15q23-q25. Questa malattia è un grave disordine dell'infanzia che causa insufficienza epatica, rachitismo e HCC. L'accumulo dei cataboliti intermedi dovuto a deficienza enzimatica è ritenuta essere la causa del danno che risulta in insufficienza epatica nell'infanzia o danno cronico al fegato associato con cirrosi e sviluppo di HCC (Scott CR, 2006).

### *Epatite autoimmune*

L'epatite autoimmune (AIH) è una patologia poco comune che risulta nella progressiva distruzione del parenchima epatico dovuta alla perdita della tolleranza immunitaria verso gli epatociti. Un rischio significativamente elevato di sviluppare malignità epatobiliare, soprattutto HCC, è stato in pazienti affetti da AIH (Werner M, 2009).

### *Obesità e Diabete*

In uno studio condotto negli USA i tassi di mortalità per tumore al fegato sono risultati essere 5 volte maggiori tra gli uomini con alto indice di massa corporea (BMI, Body Mass Index) (35-40 kg/m<sup>2</sup>) rispetto a quelli con BMI normale. Sebbene non sia evidente il collegamento tra obesità e HCC, un maggior rischio in persone obese è stato descritto (Calle EE, 2003).

Nel diabete di tipo 2, che è associato con la sindrome di insulino-resistenza, è stato ipotizzato che la stimolazione autocrina della via dell'IGF come risultato dell'alta concentrazione di insulina possa promuovere l'epatocarcinogenesi in questi pazienti (Nussbaum T, 2008).

Nel diabete di tipo 1 il rischio di sviluppo di HCC rimane controverso in quanto alcuni studi riportano un incremento del rischio in questi pazienti mentre altri studi non confermano questa associazione (Dragani T, 2010).

### Storia naturale dell'HCC

Il processo attraverso il quale si sviluppa l'epatocarcinoma è abbastanza lungo e può essere diviso in tre fasi distinte (Trevisani F, 2008):

1. Molecolare
2. Preclinica
3. Clinica o sintomatica

La fase molecolare include le alterazioni genomiche sequenziali che portano alla trasformazione cellulare. Le cellule trasformate possono essere sia epatociti che cellule epiteliali biliari o cellule staminali epatiche (D'Errico A, 1996). La fase preclinica corrisponde a un iniziale periodo in cui il tumore è ancora troppo piccolo per essere visualizzato e a una seconda fase in cui il tumore è rivelabile, ma è ancora asintomatico.

La fase clinica o sintomatica inizia con l'avvio di sintomi causati dalle dimensioni del tumore (4,5-8 cm) (Yuen MF, 2000) (Trevisani F, 2002). Studi retrospettivi focalizzati su pazienti affetti da HCV suggeriscono che lo sviluppo di HCC richiede circa 10 anni dalla diagnosi di cirrosi e circa 30 dall'esposizione ad HCV (Kiyosawa K, 1990).

L'epatocancerogenesi è un processo complesso associato ad accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche che avvengono durante le fasi di iniziazione, promozione e progressione di questa patologia. Gli eventi cellulari sono spesso accompagnati dall'incremento dell'espressione di fattori che influenzano la sopravvivenza di cellule tumorali attraverso la soppressione dell'apoptosi e della

regolazione del ciclo cellulare (Aravalli RN, 2008). Le alterazioni strutturali del gene che si sviluppano durante la fase precedente lo sviluppo del tumore possono risultare da meccanismi multipli (Fig. 1): l'HBV è direttamente mutagenico a causa dell'integrazione del genoma virale o dei suoi frammenti nel DNA cellulare; componenti molecolari dell'HBV (HBX) e dell'HCV (core, NS5A e NS3) possono danneggiare la funzione della p53 e dell'Rb e alterare l'efficienza di enzimi coinvolti nel riparo del danno al DNA; anche il danno ossidativo del DNA può avvenire in uno scenario di infiammazione cronica (Kremsdorf D, 2006) (Fig. 1). Le alterazioni genomiche nell'HCC sono molto eterogenee, tra le più ricorrenti troviamo: perdita di eterozigotità ai cromosomi 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 16q e 17p; amplificazione ai cromosomi 1p, 6p, 7q, 8q e 17q (Trevisani F, 2008). Le delezioni sono spesso a carico di regioni cromosomiche che contengono geni oncosoppressori quali p53 e Rb con conseguente perdita della loro funzione, mentre oncogeni come c-myc vengono spesso amplificati in HCC con conseguente attivazione (Trevisani F, 2008).

Diversi studi hanno dimostrato che le mutazioni di p53 e la sua inattivazione giocano un ruolo critico nell'HCC. In uno studio clinico che ha coinvolto 16 pazienti cinesi affetti da HCC, 8 presentavano una mutazione puntiforme alla terza base del codone 24; in 7 di questi campioni è stata descritta la transversione G → T (arginina → serina) e in 1 la transversione G → C (arginina → serina) (Hsu I, 1991). La presenza di mutazioni nel gene codificante la p53 nel plasma viene valutata come un potenziale biomarker per l'esposizione ad AFB1 e presenza di HCC.

Tra i meccanismi molecolari che dall'infezione da HBV o HCV e cirrosi portano allo sviluppo di HCC, è stata descritta la deregolazione della via del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina in cui sono stati osservati inattivazione dell'oncosoppressore APC o

mutazione del proto-oncogene  $\beta$ -catenina (Terris B, 1999, Herbst A, 2007, Aravalli, 2008). Oltre queste alterazioni, vengono riscontrate spesso anche mutazioni in Axin 1 e Axin 2, regolatori negativi della via di Wnt (Taniguchi K, 2002).

Le proteine dell'HBV e HCV e del virus dell'epatite E modulano la via del segnale delle MAPK agendo in diversi stadi di questa via (Zhao LJ, 2005). Nell'HCC umano i livelli di espressione della proteina Spred, un inibitore della via Ras/Raf-1/ERK, sono deregolati. Una espressione forzata di Spred causa inibizione dell'attivazione di ERK sia in vivo che in vitro, risultando in una ridotta proliferazione delle cellule tumorali e in una diminuzione delle metallo proteinasi di matrice 2 e 9.

Mutazioni puntiformi nel codone 13 di H-Ras, nel codone 12 di N-Ras e nel codone 61 di K-Ras sono stati osservati nell'HCC causato da diversi agenti come N-nitrosomorfoline, bleomicina e 1-nitropirene nei roditori (Baba M, 1997, Bai F, 2003).

Diversi studi suggeriscono che la via di Ras è importante nello sviluppo di HCC nei roditori ma non in quello umano, in quanto nell'uomo è stato riscontrato un basso tasso di mutazioni di Ras (Rawlings JS, 2004). In studi recenti viene comunque riportato che RASSF1A e NORE1A, membri della famiglia RASSF (inibitori di Ras) sono inattivati nell'HCC umano, dimostrando un ruolo della via di Ras nella tumorigenesi epatica nell'uomo (Liao Y, 1997).

Sono state inoltre identificate in HCC alterazioni a carico degli inibitori dei complessi ciclina-CDK, quali la proteina p16, la p21 e la p27. La perdita dell'espressione di uno o più di questi inibitori contribuisce alla cancerogenesi in circa il 90% dei casi di HCC nell'uomo. Il gene codificante la p16 viene inattivato soprattutto durante le prime fasi dell'epatocarcinogenesi (Aravalli RN, 2008).

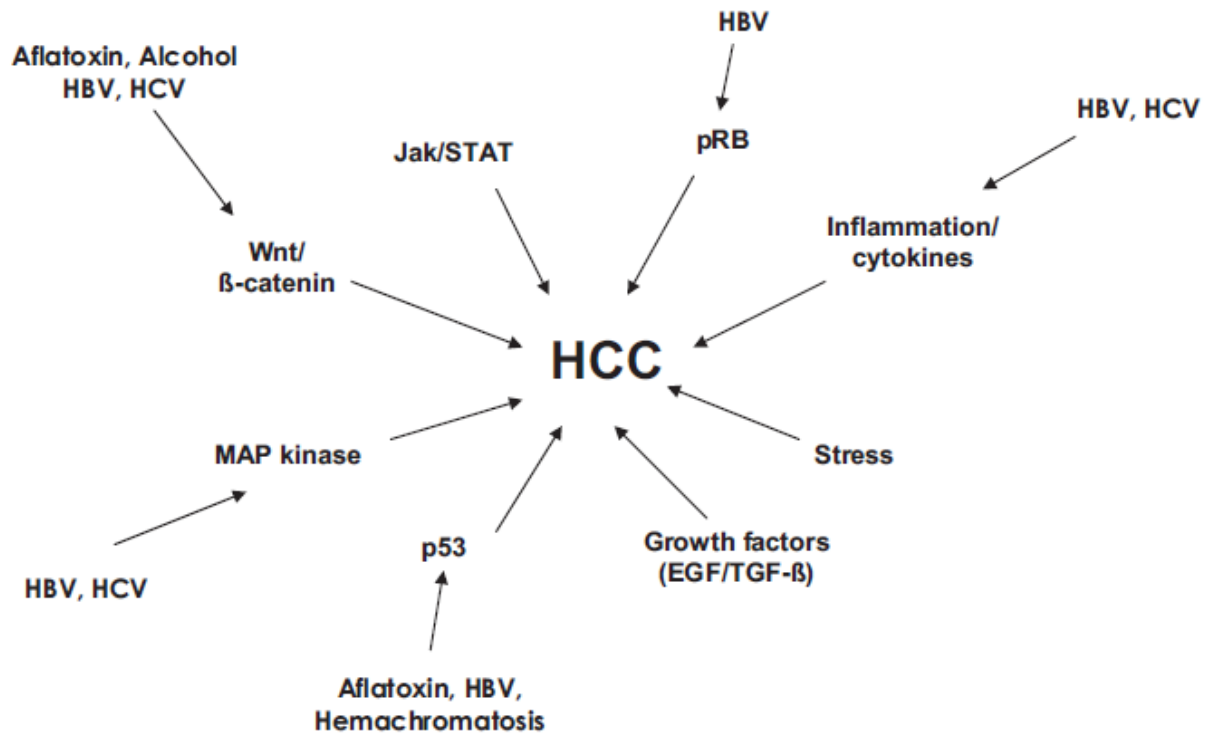


Fig. 1 Vie di segnale implicate nello sviluppo di HCC (Hepatology, 2008).

All'elenco dei geni mutati nel carcinoma epatocellulare umano si sono recentemente aggiunti i geni codificanti per i recettori dell'ormone tiroideo,  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  (Chan IH and Privalsky ML 2006).

### Modello di epatocancerogenesi di Solt-Farber

La necessità di identificare i meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza del carcinoma epatocellulare ha portato allo sviluppo di modelli animali di epatocancerogenesi. Tra di essi, uno dei più utilizzati è il modello dell'Epatocita Resistente o di Solt-Farber, il quale consente di studiare le diverse fasi della epatocancerogenesi nel ratto (Solt DF, 1976). Il modello dell'epatocita resistente prevede un protocollo sperimentale costituito dalla somministrazione di una singola dose dell'agente iniziante dietilnitrosamina (DEN, 150 mg/kg) seguita

dopo due settimane dal regime promovente costituito dall'esposizione a 2-acetilaminofluorene (2-AAF, 0.02%) nella dieta per due settimane piu' una epatectomia parziale dei 2/3 del fegato per selezionare gli epatociti resistenti che viene eseguita dopo la prima settimana di trattamento con 2-AAF. Il 2-AAF inibisce completamente la proliferazione degli epatociti normali, mentre e' inefficace verso la sottopopolazione di epatociti precedentemente iniziati dalla DENA. Le cellule iniziate vanno incontro rapidamente ad espansione clonale e formano lesioni preneoplastiche identificabili grazie alla loro positività alla colorazione immunohistochimica per la forma placentare dell'enzima glutatione-S-transferasi (GSTP). Nelle settimane successive i noduli assumono dimensioni apprezzabili macroscopicamente, sino ad occupare la maggior parte del fegato. Successivamente, in gran parte delle lesioni preneoplastiche gli epatociti perdono gradualmente la colorazione per il GSTP, riacquisendo un fenotipo differenziato. Queste lesioni preneoplastiche, attraverso un processo detto di rimodellamento, si reintegrano quindi nel parenchima circostante. Una minima frazione dei noduli preneoplastici progredisce col tempo a formare adenomi e dopo approssimativamente un anno, si ha la comparsa di carcinomi epatocellulari. Studi condotti in questo laboratorio hanno portato alla descrizione, tra i noduli preneoplastici persistenti positivi alla colorazione per il GSTP, di una sottopopolazione di noduli persistenti che esprimono la proteina dei filamenti intermedi citocheratina 19 (CK 19) (Andersen JB, 2010). Lo studio del profilo di espressione genica delle lesioni preneoplastiche positive per la CK19 ha dimostrato che esse posseggono il maggiore potenziale di progressione fino allo stadio di HCC, dando origine a quasi la totalita' degli HCC generabili nel modello dell'Epatocita Resistente (Andersen JB, 2010).

## **Recettori per l'ormone tiroideo**

Gli ormoni 3,5,3',5' tetraiodo-L-tironina (T4), e 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3) sono sintetizzati e rilasciati in circolo dalle cellule follicolari della tiroide. L'ormone T3 (Fig. 2) e' il principale mediatore degli effetti determinati dagli ormoni tiroidei, in quanto la maggior parte dell'ormone T4 viene trasformato in T3 attraverso un processo di deiodazione da parte dell'enzima 5'-deiodinasi, espresso soprattutto a livello epatico e renale, e perche' tra i due ormoni il T3 ha una affinità superiore per i recettori degli ormoni tiroidei. La sintesi degli ormoni tiroidei e la loro secrezione sono regolate a livello dell'asse ipotalamo-ipofisario (Shupnik MA, 1989).

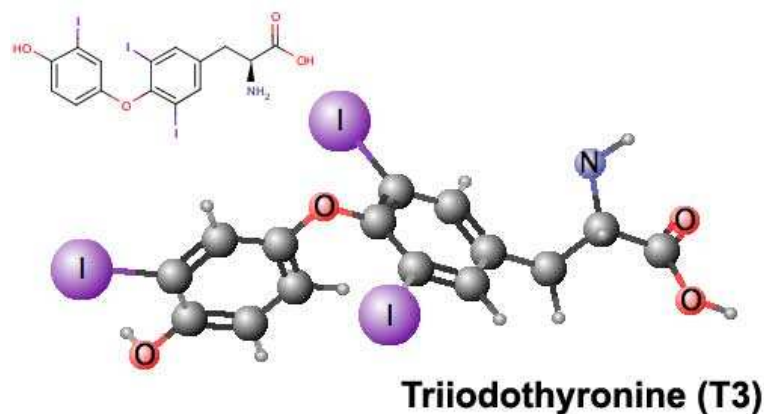


Fig. 2 Struttura geometrica (a) e tridimensionale (b) dell'ormone tiroideo 3,5,3'-triiodo-L-tironina

Gli effetti mediati dall'azione dell'ormone T3 possono essere ricondotti ad effetti sul metabolismo ed effetti sullo sviluppo somatico. Gli effetti sul metabolismo comprendono la regolazione del consumo di ossigeno e della termogenesi, le azioni sui metabolismi glucidico, proteico, lipidico, e idrico-salino. Gli effetti sullo sviluppo somatico sono volti alla regolazione della crescita corporea, insieme all'ormone somatotropo (Oppenheimer JH, 1996) (Greenspan FS, 1997).



Altre azioni dell'ormone tiroideo determinano effetti sul sistema cardiocircolatorio, sulla muscolatura scheletrica, e sul sistema nervoso. L'ormone tiroideo T3 e' inoltre un potente mitogeno per gli epatociti (Lee KL, 1968).

Le azioni fisiologiche dell'ormone T3 sono mediate dalla sua interazione con specifici recettori nucleari denominati *Thyroid Hormone Receptors* (THRs).

#### Struttura e funzione dei recettori per l'ormone tiroideo

I THRs appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari che include i recettori per gli ormoni steroidei, per la vitamina D (VDR) e per l'acido all-trans retinoico (RAR) e 9-cis-retinoico (RXR) (Fig. 3). Con essi il recettore tiroideo condivide una simile organizzazione in domini funzionali A/B, C, D, E e F (Evans RM, 1988; Mangelsdorf DJ, 1995; Aranda A, 2001). Analisi mutazionali delle diverse isoforme del THR e la comparazione con gli altri membri della superfamiglia dei recettori nucleari hanno contribuito a chiarire le caratteristiche strutturali e funzionali dei THRs. Tutti i THRs hanno una simile struttura organizzata in domini: un dominio N-terminale chiamato *A/B domain*, un dominio centrale dedicato al legame col DNA denominato *DNA-binding domain* (DBD), una *hinge region* contenente il segnale di localizzazione nucleare e un dominio per il legame col ligando detto *ligand-binding domain* (LBD) (Yen PM, 2001).

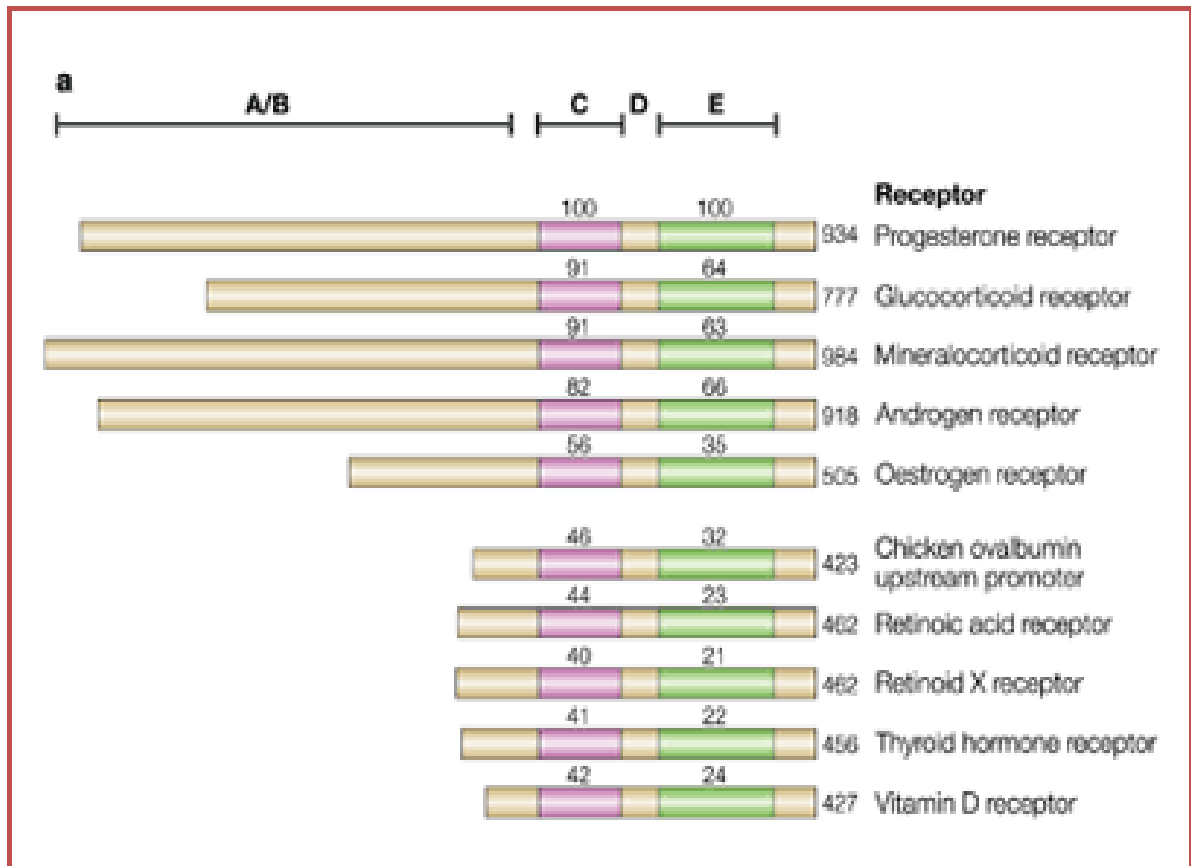


Fig. 3 Struttura dei recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari steroidei/tiroidei.

### *DNA-binding domain*

Localizzato nella regione centrale della proteina, questo dominio è costituito da due zinc fingers che si estendono per circa 60-70 amminoacidi, ciascuno composto da quattro cisteine coordinate con uno ione zinco e una estensione C-terminale (CTE) che contiene il T-box e il A-box, critici per il legame al DNA del recettore monomero. All'interno del primo zinc finger c'è una regione denominata *P-box*, necessario per il riconoscimento della sequenza specifica degli elementi responsivi insieme al D-box: l'elica 1 in cui c'è il P-box e l'elica 2 in cui è sita il D-box si ripiegano per formare il sito di riconoscimento per la sequenza degli elementi responsivi del recettore tiroideo (TREs) (Aranda A, 2001).

### *Ligand-binding domain*

Questa regione C-terminale (denominata dominio AF-2) non è necessaria solo per il legame con la triiodotironina ma gioca un ruolo critico anche per la dimerizzazione, la transattivazione e la repressione basale dovuta alla mancanza di legame con la T3 o l'attivazione trascrizionale ligando-dipendente (Yen PM, 2001) (Gonzalez-Sancho JM, 2003).

Il LBD consiste di 12  $\alpha$ -eliche che sono disposte in modo da formare una tasca per il legame col ligando. L'elica 12 gioca un ruolo cruciale poiché è essenziale per il cambio del recettore da silenziatore ad attivatore (Apriletti JW, 1998). Nella conformazione non legata l'elica 12 sporge fuori dal centro della struttura del LBD e permette il legame del corepressore. Il legame dell'ormone porta al contatto tra l'elica 12 e il centro della tasca che risulta nel rilascio del corepressore e nell'associazione col coattivatore. La delezione dell'elica 12 porta al costitutivo silenziamento anche in presenza del ligando indicando appunto che questa elica è coinvolta nella coordinazione della repressione/attivazione (Eckey M 2003).

### *Hinge region*

È la regione localizzata tra il DBD e il LBD; contiene una sequenza amminoacidica associata con la localizzazione nucleare (Evans RM, 1988). È una sequenza ricca di lisina, altamente conservata tra i recettori nucleari. I THR sono condotti all'interno del nucleo subito dopo la sintesi e possono legare il DNA anche in assenza dell'ormone.

### *Dominio amino-terminale (A/B)*

Questa regione presenta lunghezza variabile e diversa sequenza tra le isoforme del recettore tiroideo. Tra le diverse specie è la regione meno conservata (Koenig RJ, 1988). Essa gioca un ruolo importante nell'attivazione trascrizionale e

nell'interazione con il fattore di trascrizione TFIIB (Baniahmad A, 1993) (Hadzic E, 1995).

Struttura genica dei recettori per l'ormone tiroideo

Le diverse isoforme del THR vengono codificate da due geni distinti, denominati  $THR\alpha$  (NR1A1) e  $THR\beta$  (NR1A2), localizzati nelle regioni cromosomiali 17q11.2 e 3p24.3 nell'uomo e 10q31 e 15p16 nel ratto, rispettivamente. Il trascritto primario di entrambi i geni viene sottoposto a diversi eventi di splicing alternativo dando luogo a multiple isoforme proteiche dei recettori che differiscono nella composizione amminoacidica e nelle proprietà biologiche (Fig. 4).

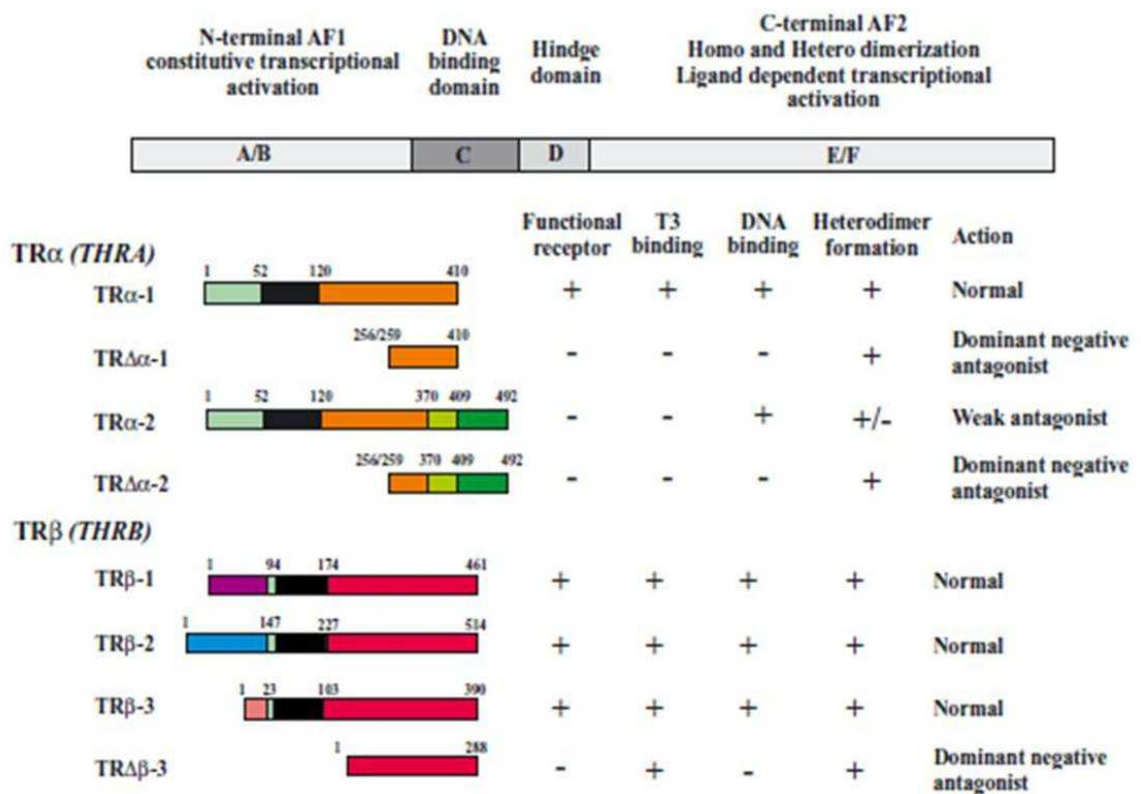


Fig. 4 Rappresentazione schematica dei quattro domini funzionali nelle differenti isoforme dei recettori THR

(Mol Cell Endocr 2003).

Il gene  $THR\alpha$  codifica per una isoforma che lega la T3 denominata  $THR\alpha_1$ , e due varianti di splicing dette  $THR\alpha_2$  e  $THR\alpha_3$ . Queste proteine sono identiche dal residuo amminoacidico 1 al 370, mentre differiscono per la restante porzione di proteina ovvero per la regione C-terminale. A causa di ciò il  $THR\alpha_2$  e il  $THR\alpha_3$  non possono legare la T3 poiché contengono un dominio C-terminale di 122 amminoacidi che sostituisce la regione di legame con l'ormone tiroideo, presente nel  $THR\alpha_1$ . Essi sono deboli dominanti negativi *in vitro*, mentre il loro ruolo *in vivo* e' ancora sconosciuto (Lazar M A 1988, Mitsuhashi T 1998, Sap J 1986, Weinberger C 1986). Forme tronche trascritte a partire da un promotore interno localizzato nell'introne 7, danno origine al  $THR\Delta\alpha_1$  e al  $THR\Delta\alpha_2$  che mancano del dominio A/B e del DBD, ma che conservano la maggior parte del LBD (Chassande O, 1997).

Il gene  $THR\beta$  contiene due regioni promotrici, ciascuna delle quali è capace di trascrivere un mRNA codificante per distinte proteine (Koenig RJ, 1988). Le isoforme risultanti vengono denominate  $THR\beta_1$  e  $THR\beta_2$ . La sequenza amminoacidica del dominio che lega il DNA, della *hinge region* e del dominio che lega il ligando sono identiche nelle due isoforme del  $THR\beta$  mentre non c'è omologia tra regioni N-terminali (Lazar MA, 1993). Entrambe le isoforme sono autentici recettori che legano con alta affinità e specificità la T3 e gli elementi responsivi presenti sul DNA e possono mediare la trascrizione regolata da T3. Inoltre sono state recentemente descritte nel ratto due nuove isoforme,  $THR\beta_3$  e  $THR\Delta\beta_3$  (Williams GR 2000). Il  $THR\beta_3$  e' un recettore funzionale per il T3, la sua funzione fisiologica e' sconosciuta e non e' stato descritto nell'uomo (Harvey CB, 2007). Il recettore  $THR\Delta\beta_3$  e' in grado di legare il T3 ma non lega il DNA. Ciascuna delle isoforme descritte nell'uomo, nel ratto e nel topo presentano alta

omologia rispetto alla sequenza amminoacidica (PM Yen, 2001) (Cheng SY, 2010).

Tra le diverse isoforme del recettore per gli ormoni tiroidei fin qui descritte, le  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  sono le uniche in grado di legare l'ormone. L'isoforma  $\alpha_2$  pur non essendo capace di legame con l'ormone triiodotironina, è espresso nell'uomo ed è stata descritta essere rilevante nella tumorigenesi epatica.

Per quanto riguarda il  $THR\alpha$ , l'isoforma  $\alpha_1$  è costituita da 8 esoni codificanti mentre l'isoforma  $\alpha_2$  è composta da 9 esoni codificanti.

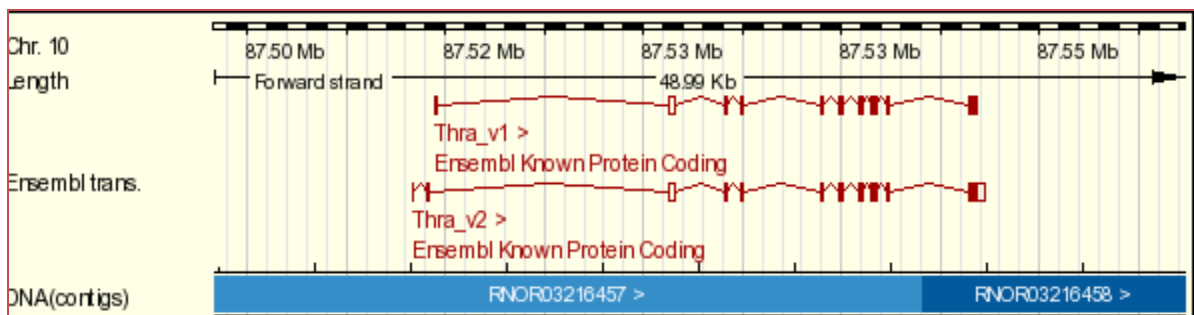


Fig. 5 Struttura del gene  $THR\alpha$  nel ratto.

In particolare, gli esoni costituenti le due isoforme sono:

l'esone 1  $\alpha_{1-2}$ , composto da 53 bp, l'esone 2  $\alpha_{1-2}$ , composto da 68 bp e l'esone 3, composto da 101 bp i quali codificano per il dominio N-terminale delle due varianti;

l'esone 4  $\alpha_{1-2}$ , composto da 148 bp e l'esone 5  $\alpha_{1-2}$ , composto da 206 bp che codificano per il DNA binding domain sia della variante  $\alpha_1$  che  $\alpha_2$ ;

l'esone 6  $\alpha_{1-2}$ , composto da 147 bp che codifica per la Hinge Region in entrambe le varianti;

l'esone 7  $\alpha_{1-2}$ , composto da 259 bp e l'esone 8  $\alpha_1$ , composto da 249 bp che fanno parte del Ligand binding domain.

l'esone 8  $\alpha_2$ , composto da 128 bp e l'esone 9  $\alpha_2$ , composto da 369 bp che fanno parte del Ligand binding domain della variante  $\alpha_2$  (Fig. 6).

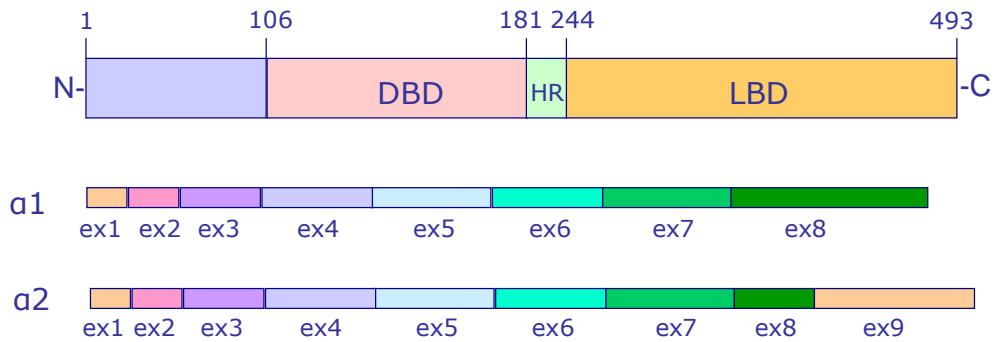


Fig. 6 Schema illustrante la struttura degli esoni codificanti delle isoforme  $THR\alpha_1$  e  $THR\alpha_2$ .

Le isoforme  $\beta_1$  e  $\beta_2$  del retto per gli ormoni tiroidei vengono invece codificate da 8 e 7 esoni, rispettivamente.

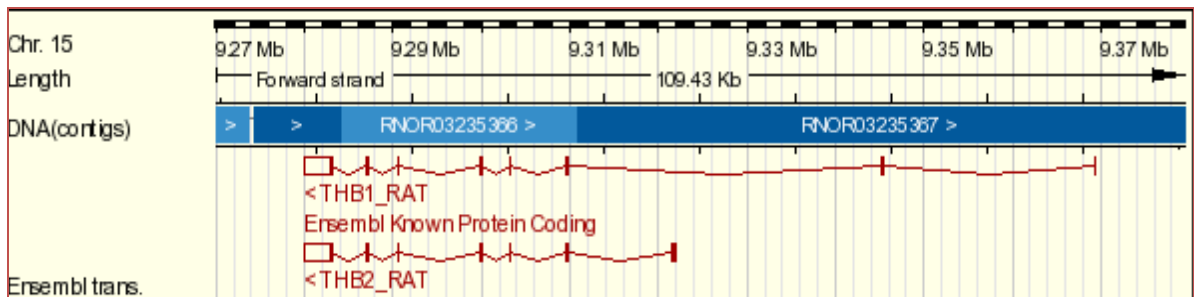


Fig. 7 Struttura del gene  $THR\beta$  nel ratto.

Gli esoni codificanti le due isoforme  $THR\beta$  sono:

l'esone 1  $\beta_1$ , composto da 66 bp e l'esone 2  $\beta_1$ , composto da 261 bp i quali codificano per il dominio N-terminale dell'isoforma  $\beta_1$ ;

l'esone 3  $\beta_{1-2}$ , composto da 101 bp, l'esone 4  $\beta_{1-2}$ , composto da 148 bp e l'esone 5  $\beta_{1-2}$ , composto da 206 bp i quali codificano per il DNA binding domain per entrambe le varianti;

l'esone 6  $\beta_{1-2}$ , composto da 147 bp, posto a cavallo tra la Hinge Region e il Ligand binding domain delle due varianti;

l'esone 7  $\beta_{1-2}$ , composto da 259 bp e l'esone 8  $\beta_{1-2}$ , composto da 242 bp, che fanno parte del Ligand binding domain di entrambe le varianti;

l'esone 1  $\beta_2$ , composto da 442 bp, il quale costituisce il dominio N-terminale dell'isoforma  $\beta_2$  (Fig. 8).

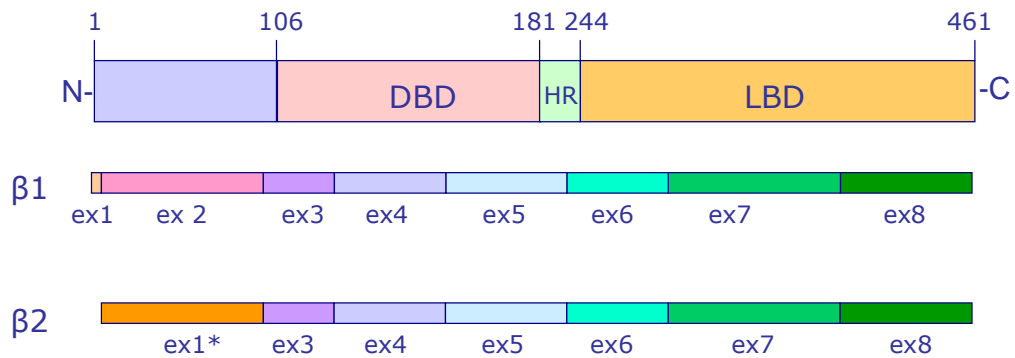


Fig. 8 Schema illustrante la struttura degli esoni codificanti delle isoforme  $\text{THR}\beta_1$  e  $\text{THR}\beta_2$ .

### Espressione tissutale dei recettori per l'ormone tiroideo

Nonostante i geni  $\text{THR}\alpha$  e  $\text{THR}\beta$  siano ubiquitariamente espressi nei tessuti, le diverse isoforme mostrano un profilo di espressione regolato sia temporalmente che spazialmente durante lo sviluppo (Forrest D, 1990) (Forrest D, 1991). Nell'adulto i livelli di espressione delle varie forme recettoriali sono differenzialmente regolate nei diversi tessuti. L'isoforma  $\alpha$  media l'azione del T3 durante lo sviluppo nel cuore, nello scheletro e nell'intestino, e controlla la temperatura corporea e l'attività cardiaca (Gauthier K, 2001) (Mai W, 2004) (Plateroti M, 2001) (O'Shea PJ, 2003) (O'Shea PJ, 2005). L'isoforma  $\text{THR}\beta_1$  è prevalentemente espressa nel fegato (Gullberg H 2000), mentre l'espressione della isoforma  $\beta_2$  è limitata all'ipotalamo, ghiandola pituitaria, coclea e retina (Sjoberg M, 1992) (Hodin RA, 1990). Sia  $\text{THR}\beta_1$  che  $\text{THR}\beta_2$  sono necessari per la regolazione dell'asse ipotalamico-pituitario-tiroideo (Gauthier K, 1999) (Forrest D, 1996).



Meccanismi molecolari dell'azione dei recettori per gli ormoni tiroidei e regolazione dell'espressione genica

Il recettore per gli ormoni tiroidei è localizzato nel nucleo della cellula anche in assenza del legame con la triiodotironina ed è in grado di legare gli elementi responsivi presenti sul promotore dei geni target. Questa è una caratteristica del THR che lo distingue da altri membri della superfamiglia dei recettori nucleari (Yen PM, 2001).

In generale la trascrizione basale dei geni che sono attivati dalla T3 è repressa dal recettore non legato. È stato tuttavia descritto che il THR $\beta$  funziona da attivatore trascrizionale costitutivo nei lieviti (Ohashi H, 1991).

La regione del THR responsabile della repressione della trascrizione in assenza del legame con la T3 (apoTHR) è localizzata nel dominio C-terminale (Lazar MA, 1993).

Il recettore per gli ormoni tiroidei media i suoi effetti genomici sulla trascrizione attraverso il legame a specifici elementi del DNA localizzati nelle regioni promotrici, enhancer e silencer dei geni target. Questi elementi del DNA sono conosciuti col nome di elementi responsivi (TREs) (Fig. 9) (Cheng SY, 2010).

Il recettore tiroideo lega il DNA attraverso i TREs prevalentemente come eterodimero con il recettore dell'acido 9-cis retinoico (RXR) ma può anche formare omodimeri. L'eterodimerizzazione incrementa notevolmente il legame del recettore tiroideo agli elementi responsivi, la capacità del THR di rispondere alla T3 e quindi l'attivazione trascrizionale (Zhang XK, 1993).

La maggior parte dei geni regolati positivamente contengono almeno due sequenze esameriche dette half-site che consistono della sequenza consenso G/AGGTC/GA. La sequenza si ripete con polarità diretta oppure invertita: quelli organizzati come direttamente ripetuti presentano uno spazio tra le due sequenze

esameriche di quattro nucleotidi (DR4); quelli con sequenza invertita hanno uno spazio di sei nucleotidi (IP6). Vi sono inoltre le sequenze palindromiche (PAL0) nelle quali non c'è spazio tra le sequenze esameriche (Williams GR, 1991).

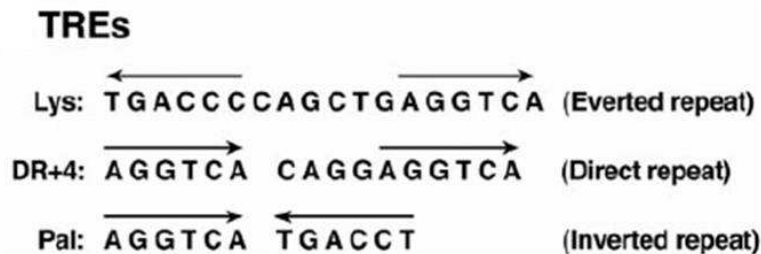


Fig. 9 Elementi responsivi per il recettore tiroideo (Ebdocrine Reviews, 2010).

Sulla base degli effetti del ligando sulla trascrizione, gli elementi responsivi possono essere classificati come positivi (pTRE) o negativi (nTRE) (Fig. 10). Il legame dell'ormone al recettore quando questo lega pTREs porta alla dissociazione del corepressore e al reclutamento dei coattivatori e quindi all'attivazione dell'espressione genica. Quando invece si ha il legame con nTREs, il recettore per gli ormoni tiroidei attiva l'espressione genica in assenza del ligando e il legame dell'ormone porta alla repressione della trascrizione (Eckey M, 2003). Quindi il THR può reclutare i corepressori sia in presenza di ligando che in sua assenza e inoltre i cambi allosterici che risultano dal legame del THR ai differenti tipi di TREs possono determinare se un cofattore agisce come coattivatore o corepressore.

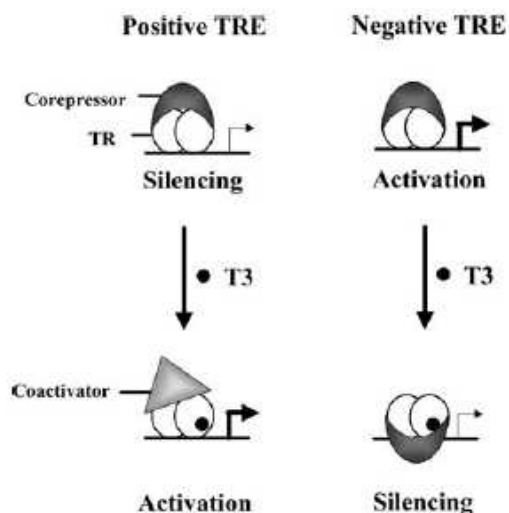


Fig. 10 Comparazione tra elementi responsivi per il recettore tiroideo positivi e negativi (Mol Cell Endocr, 2003).

È stato osservato per i nTREs che la loro posizione all'interno del gene sembra essere un fattore importante: la maggior parte sono localizzati in vicinanza del sito di inizio della trascrizione dei geni target o downstream della TATA box (Belandia B, 1998) (Aranda and Pascual, 2001).

La maggior parte dei corepressori finora caratterizzati legano il recettore solo in assenza del ligando. Il legame dell'ormone induce un cambio conformazionale nel recettore che risulta nella dissociazione del corepressore e nell'abolizione della repressione. Il primo corepressore caratterizzato per THR è stato SMRT (silencing mediator for RAR and THR), insieme con la proteina omologa NCoR (nuclear receptor corepressor). Queste due molecole mostrano una elevata similarità nella struttura e nella funzione. Sebbene entrambi i corepressori interagiscano col THR, NCoR è preferenzialmente reclutato dal recettore per gli ormoni tiroidei (Hu X and Lazar MA, 1999). I domini di interazione (ID) NHR di questi corepressori sono localizzati nella regione C-terminale e sono definiti dalla presenza di un co-repressor nuclear receptor box. SMRT e NCoR condividono due IDs ma è stato

recentemente mostrato che NCoR possiede un terzo ID localizzato nella porzione N-terminale che sembra essere responsabile del legame preferenziale al THR. NCoR sembra stabilizzare l'omodimero THR quando legato al DNA prevenendo la sua dissociazione dagli elementi responsivi. L'eterodimerizzazione con RXR sembra diminuire la forza di legame tra THR e NCoR o SMRT, facilitandone il distacco e di conseguenza riducendo l'azione di silenziamento genico (Makowski A, 2003).

Analisi di competizione tra SMRT e SRC-1 (un coattivatore per THR), dimostrano che SMRT è capace di inibire l'interazione tra SRC-1 e il recettore e che tale competizione è vigente anche in presenza di ligando. Questo significa che "l'interruttore trascrizionale" tra attivazione e repressione non è un interruttore statico on off, ma è piuttosto un dinamico equilibrio che viene spostato in una o nell'altra direzione sulla base del legame del ligando, dal tipo di elementi responsivi e dal rapporto tra i cofattori (Sohn YC, 2003).

Sono stati descritti altri corepressori come Alien e TRUP1. Alien interagisce con THR ma non con RAR o RXR; interagisce con Sin3 ma non con NCoR e SMRT. TRUP1 interagisce con THR e RAR ma non con RXR o il recettore per gli estrogeni e interferisce con il legame recettore/DNA (Harvey CB and Williams GR, 2002).

Il recettore per gli ormoni tiroidei può mediare il silenziamento genico attraverso una diretta interazione con il complesso basale di trascrizione. È stato dimostrato che il THR $\beta$  interagisce con il fattore TFIIB attraverso il suo dominio di silenziamento. Il legame dell'ormone tiroideo porta a un indebolimento di questa interazione. L'interazione può avvenire anche tra NCoR o SMRT e TFIIB e le TBP associated factors (TAFs) (Baniahmad A, 1993).

Per reprimere la trascrizione genica il recettore tiroideo influenza l'organizzazione della cromatina. Una delle modificazioni che viene più spesso descritta è l'acetilazione delle code istoniche. L'acetilazione istonica effettuata dalle istone acetilasi (HAT) e l'effetto contrario mediato dalle deacetilasi istoniche (HDAC) sono state correlate con la presenza di regioni del genoma trascrizionalmente attive o represses, rispettivamente. La deacetilazione della coda istonica conduce a una struttura della cromatina più compatta che è meno accessibile al complesso trascrizionale e quindi trascrizionalmente silente (Eckey M, 2003).

In alcuni casi la HDAC interagisce direttamente con il corepressore (NCoR o SMRT) (Shi Y, 2001); un'altra possibilità è una associazione indiretta attraverso il complesso di reclutamento che ospita i membri della famiglia della classe HDAC I come quello denominato Sin3-SAP costituito da Sin-associated protein (SAP), RbAp46 e 48 (Retinoblastoma associated protein), HDAC 1 e 2 e la proteina SIN3 che serve come base per l'assemblaggio degli altri componenti.

Alcuni complessi di HDAC contengono inoltre i fattori di rimodellamento cromatinico. Queste proteine sono capaci di alterare attivamente il raggruppamento dei nucleosomi sul DNA. Questi complessi idrolizzano l'ATP in modo da cambiare la struttura del nucleosoma e la posizione del nucleosoma relativa al DNA (Becker PB and Horz W, 2002). Un altro complesso è il NURD (nucleosome remodelling and histone deacetylation) che condivide alcune subunità con Sin3 e possiede attività rimodellante (Xue Y, 1998). Esso contiene la proteina MBD 2 e 3, MTA2 e l'ATPase Mi-2 al posto della proteina SAP.

Probabilmente questi complessi contribuiscono alla repressione mediata da THR attraverso la creazione e il mantenimento di una globale deacetilazione istonica mentre i corepressori associati alle HDAC giocano probabilmente un ruolo nella repressione gene specifica (Li J, 2002).

SRC-1 (steroid hormone receptor CoA-1) è stato il primo coattivatore che lega il THR/ligando ad essere clonato (McKenna NJ, 1999). Sono stati poi identificati SRC-2/TIF2/GRIP1 (transcription intermediary factor 2 e GR-interacting protein 1) e SRC-3/TRAM-1/RAC3/ACTR/pCIP (thyroid hormone receptor activator molecule 1, receptor-associated CoA3, activator of thyroid receptor e p300/CBP cointegrator-associated protein). Questi coattivatori presentano una relativa omologia di sequenza, con proprietà funzionali simili a SRC-1 e vengono ora descritti come membri della famiglia SRC/p160 (McKenna NJ, 2002). I coattivatori p160/SRC1 posseggono attività istone acetil transferasica (HAT) intrinseca e reclutano proteine associate che posseggono anche attività istone metiltransferasica. Così i coattivatori mediano il rimodellamento cromatinico per generare una struttura cromatinica trascrizionalmente permissiva. Inoltre la proteina associata a SRC1 p300/CBP lega direttamente la RNA polimerasi II agendo come proteina adattatrice per il complesso THR/RXR/ligando e il complesso di trascrizione basale. Un secondo gruppo di coattivatori include le TRAPs (TR associated protein) o le DRIPs (vitamin D receptor interacting protein) le quali non posseggono attività HAT (Rosenfeld MG and Glass CK, 2001). L'esistenza di due gruppi apparentemente distinti di proteine co-attivatrici suggerisce che il complesso THR/RXR/ligando può mediare la trascrizione attraverso un processo a due fasi in cui prima la p160/SRC1 recluta HAT portando al rimodellamento cromatinico; il processo prosegue con il reclutamento di TRAP220 e del complesso TRAP/DRIP che promuovono la trascrizione genica in modo ormone-dipendente (Bassett JH, 2003).

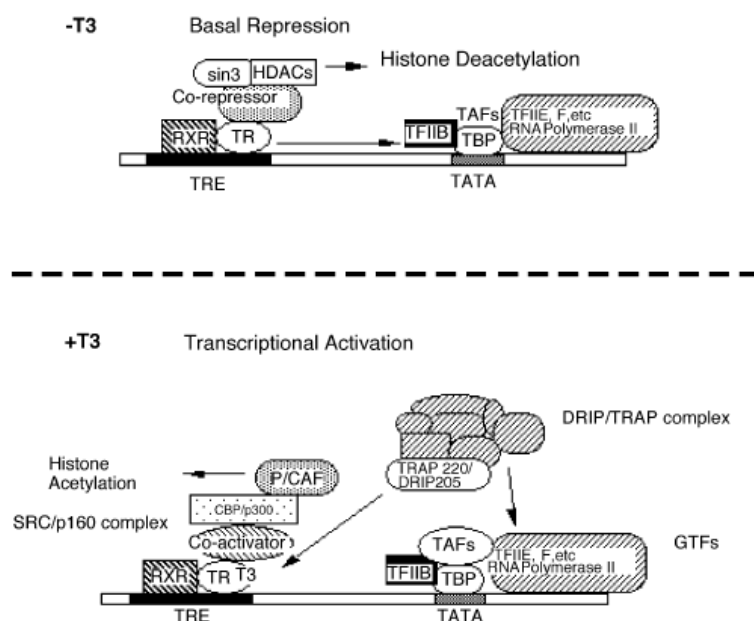


Fig. 11 Modello molecolare della repressione basale dipendente dal legame con i corepressori in assenza di T3 e della attivazione trascrizionale mediata dai coattivatori in presenza di T3 (Mol Cel Endocr, 2006).

In generale i geni la cui trascrizione viene stimolata dalla T3 sono coinvolti nella gluconeogenesi (ad esempio la glucosio-6-fosfatasi), glicogenolisi, lipogenesi (ad esempio Spot14), proliferazione cellulare e apoptosi mentre tra i geni repressi sono compresi geni coinvolti nell'immunità cellulare, nella struttura della matrice extracellulare, nella architettura cellulare, nella glicosilazione proteica e nelle funzioni mitocondriali (Harvey CB and Williams GR, 2002).

L'attività aberrante dei recettori per gli ormoni tiroidei determina patologie di natura endocrina e neoplastica (Tenbaum S 1997, Apriletti JW 1998, Ando S 2001, Winter WE 2001). Difetti ereditari nella funzione dei THR determinano nell'uomo una patologia nota come Sindrome da Resistenza all'Ormone Tiroideo (Refetoff S 1993).

Le prime osservazioni che hanno suggerito un coinvolgimento dei recettori per gli ormoni tiroidei aberranti nel processo tumorale deriva dall'osservazione che il

recettore  $\text{THR}\alpha_1$  e' la controparte cellulare dell'oncogene virale v-erbA, che e' implicato nel processo di trasformazione neoplastica che porta a leucemia eritroide acuta e sarcoma (Sap J 1986, Thormeyer D 1999).

Mutazioni somatiche dei THR sono state riscontrate con alta frequenza in carcinomi epatocellulari umani, carcinomi renali a cellule chiare e alcune neoplasie tiroidee e gastriche (Kamiya Y 2002, Puzianowska-Kuznicka M 2002). Nei carcinomi epatocellulari e renali umani sono state identificate mutazioni sia nelle isoforme  $\alpha$  che  $\beta$  (Lin KH 1997, Lin KH 1999, Lin KH 2001). Il contributo di queste forme mutanti dei THR al processo tumorale nell'uomo e' ancora incerto, ma l'alta frequenza di mutazioni in queste neoplasie (il 65% degli HCC mostra mutazioni di  $\text{THR}\alpha_1$ , mentre nel 76% degli HCC e' stata evidenziata la presenza di mutazioni del gene  $\text{THR}\beta$ , con entrambi i loci mutati in alcuni tumori) suggerirebbe un ruolo causale o comunque rilevante nella progressione neoplastica. Questa considerazione e' supportata dal fatto che le mutazioni dei THR descritte determinano un fenotipo dominante-negativo. Inoltre, una forma mutante del gene  $\text{THR}\alpha$  (Gag-v-erbA), quando espressa in topi transgenici, e' in grado di determinare lo sviluppo di carcinomi epatocellulari (Barlow C, 1994).

In generale le regioni dei geni codificanti per i THR più frequentemente mutate corrispondono agli esoni codificanti 5-7 per  $\text{THR}\alpha$  e 6-8 per  $\text{THR}\beta$ , che corrispondono al dominio di legame con la T3 (Cheng SY 2003, Gonzalez-Sancho JM 2003).

Ad ulteriore supporto di un ruolo protettivo dell'ormone tiroideo nei confronti dello sviluppo tumorale, in questo laboratorio e' stato dimostrato che il trattamento con l'ormone tiroideo T3 determina la regressione di lesioni preneoplastiche e una riduzione della incidenza di carcinomi epatocellulari generati attraverso almeno



due protocolli di epatocancerogenesi (Ledda-Columbano GM 1999, Ledda-Columbano GM 2000) (Perra et al, 2009).

#### *Azioni non-genomiche dell'ormone tiroideo*

Le azioni dell'ormone tiroideo che non dipendono dal legame con il THR vengono definite non-genomiche. Questi effetti sono causati dall'interazione con proteine che non sono direttamente coinvolte nella regolazione dell'espressione genica. Tali effetti si caratterizzano per la rapidità d'insorgenza (secondi o minuti), per il fatto di non necessitare di nuova sintesi proteica, e per l'utilizzo di vie di segnalazione che originano nella membrana cellulare e che coinvolgono, in genere, l'attivazione di protein chinasi.

Il risultato è normalmente un aumento dell'attività di alcune proteine importanti per il metabolismo cellulare, come alcuni trasportatori ionici (specialmente della pompa sodio-potassio) e della calmodulina (Cheng SY, 2010).

## ***Le basi epigenetiche del Cancro***

L'Epigenetica può essere definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili nella funzione genica che non sono spiegabili attraverso modificazioni della sequenza del DNA (Riggs AD et al, 1996). Il meccanismo epigenetico maggiormente caratterizzato, normalmente associato con la repressione genica, è la metilazione del DNA.

La metilazione del DNA è presente in tutti gli eucarioti, ad eccezione dei lieviti.

Lo stabilirsi di un pattern di metilazione procede attraverso fasi definite durante lo sviluppo di un organismo. In generale le cellule germinali femminili sono meno metilate di quelle maschili e i pattern di metilazione dei gameti sono cancellati da una demetilazione dell'intero genoma vicino all'ottavo stadio cellulare di formazione della blastocisti (Monk M, 1987). Nell'adulto, la quantità e i pattern di metilazione sono tessuto e tipo cellulare specifici.

La metilazione di sequenze genomiche ripetute (trasposoni) probabilmente previene l'instabilità cromosomica, la traslocazione e la rottura del gene causata da riattivazione di sequenze trasponibili del DNA (Bestor TH, 2005).

Oltre alla metilazione del DNA, un altro importante meccanismo epigenetico è costituito dalla modificazione della struttura istonica.

Gli istoni, oltre a costituire i nucleosomi, i quali rappresentano le unità fondamentali di cui è costituita la cromatina, sono strutture molecolari che partecipano alla regolazione dell'espressione genica. Gli istoni conservano l'informazione epigenetica attraverso modificazioni post-traduzionali come l'acetilazione di lisine, metilazione di arginine e lisine e fosforilazione di serine (Esteller M, 2008). L'acetilazione delle lisine presenti negli istoni è generalmente

associata ad attivazione trascrizionale. Le conseguenze funzionali della metilazione degli istoni dipende dal tipo di residuo, lisina o arginina, e dal sito specifico che la metilazione modifica (Mack GS, 2006). La metilazione dell'istone H3 in corrispondenza del residuo di lisina in posizione 4 (K4) è strettamente collegata ad attivazione trascrizionale, mentre la metilazione dell'istone H3 al residuo K9 o K27 e dell'istone H4 al residuo K20 è associata con repressione della trascrizione (Karpf AR, 2005).

Il profilo epigenetico presente nelle cellule normali subisce una profonda distorsione nel cancro. Alterazioni dei meccanismi epigenetici giocano un ruolo importante nello sviluppo tumorale. Ad esempio la metilazione delle citosine nel dinucleotide CpG può contribuire al fenotipo trasformato attraverso diversi meccanismi, quali la ipometilazione globale del genoma nel cancro, la ipermetilazione focale dei promotori dei geni oncosoppressori, e la mutagenesi diretta, attraverso spontanea deaminazione idrolitica delle citosine metilate e conseguenti transizioni C → T ( Jones and Laird, 1999; Jones and Baylin, 2002; Herman and Baylin, 2003).

La progressione sequenziale di eventi che porta alla formazione di un carcinoma è stata correlata a cambiamenti che avvengono a livello genetico ed epigenetico. Nell'HCC sono state osservate mutazioni somatiche in diversi geni oncosoppressori come p16 e RB, in oncogeni come c-myc o  $\beta$ -catenina e in altri geni associati al cancro come la ciclina D1 (Aravalli RN, 2008). La alterata metilazione del DNA è il principale meccanismo epigenetico di silenziamento genico che è stato osservato in diversi tumori umani (Herat NI 2006, Hernandez-Vargas 2010).

Si ritiene che il profilo di metilazione del DNA sia dettato dalle modificazioni post-traduzionali della struttura istonica, le quali sono comunemente alterate nei tumori (Seligson DB, 2005). La metilazione del DNA ha un ruolo critico nel controllo dell'attività genica e dell'architettura della cromatina nucleare. Normalmente per metilazione del DNA si intende la metilazione del carbonio in posizione 5 delle citosine che precedono le guanine, cioè localizzate all'interno dei di nucleotidi CpG (Herman JG, 2003) (Fig. 12). I dinucleotidi CpG sono particolarmente frequenti in corrispondenza dei promotori di determinati geni, dove costituiscono delle regioni chiamate "isole CpG".

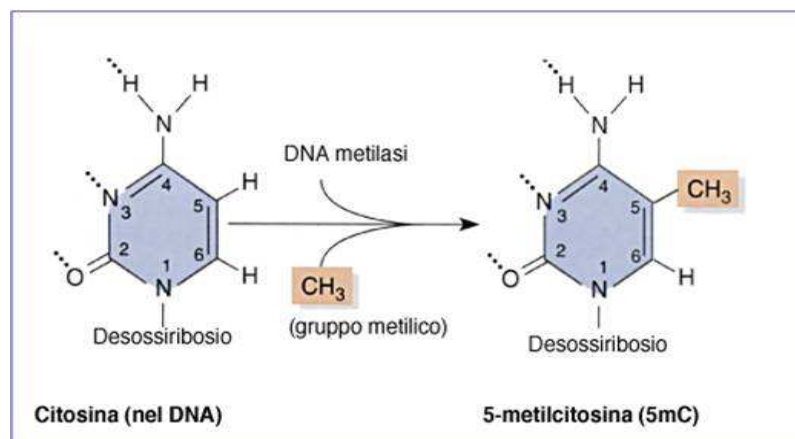


Fig. 12 Meccanismo di metilazione delle citosine del dinucleotide CG

La maggior parte delle 5-metilcitosine nel DNA dei mammiferi è presente nel dinucleotide 5'-CpG-3'. Altre sequenze come 5'-CpNpGp-3' o 5'-CpA-3' possono esibire metilazione, ma generalmente a una frequenza più bassa. Negli organismi superiori circa il 50-60% dei geni contengono isole CpG, le quali sono normalmente localizzate all'interno delle regioni promotrici (Costello JF, 2001).

In uno studio del 2007 diretto da Joseph Biju è stato esaminato lo stato di metilazione dei geni che codificano per i recettori degli ormoni tiroidei in tumori alla tiroide. In questo studio è stata riscontrata una frequente ipermetilazione della

regione promotrice del gene  $THR\beta$  con conseguente perdita di espressione in pazienti affetti da diversi tipi di tumore alla tiroide.

La scoperta della perdita dell'espressione del THR in un contesto tumorale e l'osservazione di alterazioni quali mutazioni e delezioni descritte precedentemente nei geni per il recettore degli ormoni tiroidei umano, accrescono la possibilità che i geni THR possano essere proposti come oncosoppressori.

### Meccanismo

Sono state identificate tre DNA Metiltransferase: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (Fig. 13). L'iniziale metilazione del DNA richiede un'attività metiltransferasica *de novo* che è principalmente presente durante il primo sviluppo embrionale. Tutte e tre le metiltransferase possiedono l'attività *de novo*, ma riconoscono distinte sequenze target per la metilazione (Okano M, 1999). L'attività di DNMT1 si svolge preferenzialmente sul DNA emimetilato ed è quindi rivolta al mantenimento della metilazione durante la replicazione del DNA.

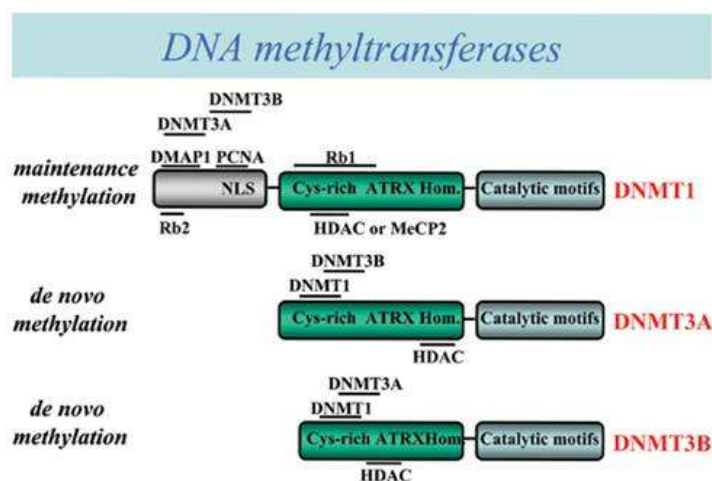


Fig. 13 Struttura schematica delle differenti DNA Metiltransferasi.

La DNMT1 è ubiquitariamente espressa nei tessuti somatici e interagisce con PCNA (proliferating cell nuclear antigen) alla forcina di replicazione (Chuang LS, 1997). DNMT1 interagisce inoltre in un complesso con HDAC2 e DMAP1 (DNMT1 associated protein) per mediare la repressione trascrizionale (Rountree MR, 2000). La metilazione delle citosine può inibire il legame di alcuni fattori di trascrizione ai loro siti di riconoscimento CpG che contengono di nucleotidi CpG oppure può determinare il reclutamento di complessi proteici come MeCP1 e MeCP2 (Methyl-CpG binding proteins) che legano specificamente le CpG metilate e possono inibire indirettamente il legame dei fattori di trascrizione limitando il loro accesso agli elementi regolatori (Nan X, 1998).

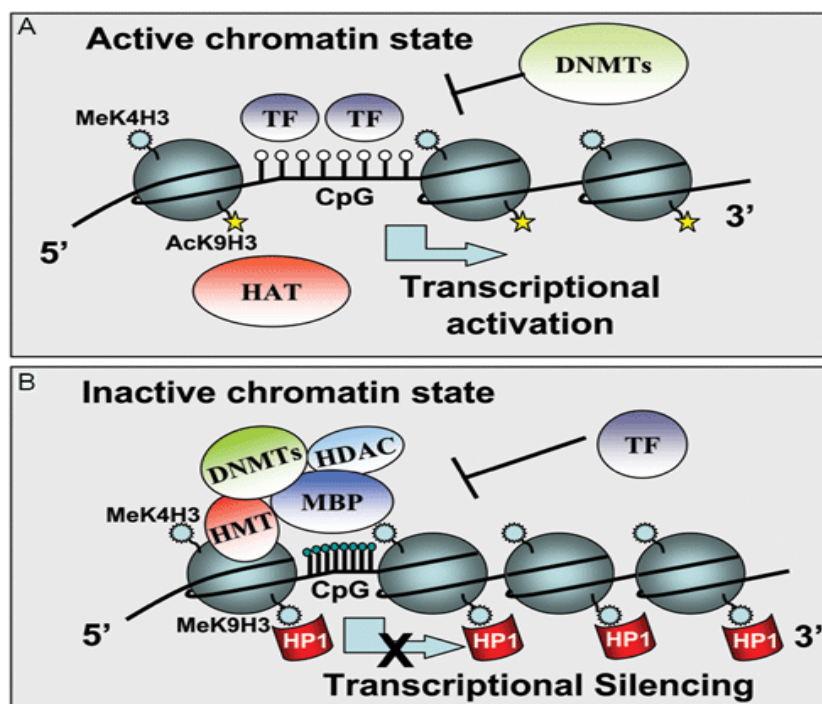


Fig. 14 Meccanismo d'azione delle metiltransferase

È stata identificata una famiglia composta da 5 proteine, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 e MBD4, importante nell'interpretazione del segnale che la metilazione del DNA rappresenta. Ciascun membro di questa famiglia include un tratto di 60-80

residui che presenta un alto livello di omologia (50-70%) tra tutte e cinque le proteine. In MeCP2 questa regione è stata descritta come necessaria per il legame diretto al gruppo metil-CpG ed è stata denominata mCpG-binding domain (MDB). È stato osservato che MBD2 possiede attività demetilasiica mentre MBD4 è un insolito enzima di riparazione. MBD3 apparentemente manca della specifica attività volta a legare il DNA metilato sebbene possieda alta omologia di sequenza con MBD2. MBD1 e MeCP2 legano specificamente il DNA metilato e inibiscono la trascrizione (Wakefield R, 1999).

MeCP2 consta di un singolo polipeptide che contiene un dominio che lega le CpG metilate denominato MBD composto da 85 amminoacidi, e un dominio di repressione trascrizionale detto TRD (transcriptional repression domain) composto da 104 amminoacidi. È capace di legare una singola CpG metilata sia sul DNA privo di cromatina che in presenza di quest'ultima. Attraverso il dominio TRD, la MeCP2 può interagire con Sin3A, un corepressore che fa parte del complesso multimolecolare che comprende anche HDAC (Bird AP and Wolffe AP, 1999). TRD è capace di reclutare l'istone deacetilasi e spostare l'istone H1 dalla cromatina preassemblata che contiene il DNA metilato (Wakefield R, 1999).

## ***Scopo del lavoro***



I meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo tumorale nell'HCC rimangono poco conosciuti. Diversi geni sono stati descritti essere alterati in carcinomi epatocellulari umani. Tra di essi, mutazioni puntiformi, delezioni e perdita dell'espressione dei geni  $THR\alpha$  (NR1A1) e  $THR\beta$  (NR1A2) codificanti rispettivamente le isoforme  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  dei recettori per l'ormone tiroideo triiodotironina (T3), sono state rilevate in diversi tumori umani. In particolare, in carcinomi epatocellulari (HCC) umani, entrambi i geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  sono stati descritti essere frequentemente mutati, mentre in diversi tipi di tumore alla tiroide è stata riscontrata ipermetilazione del promotore del gene  $THR\beta$ .

Non è chiaro se la comparsa di queste alterazioni sia un evento precoce o sia invece un epifenomeno conseguente alla instabilità genomica frequentemente riscontrata nei carcinomi e pertanto di limitata rilevanza per lo sviluppo e la progressione tumorali.

Studi condotti nel nostro laboratorio su modelli animali di epatocancerogenesi hanno dimostrato che la somministrazione di T3 ha un effetto antagonista sullo sviluppo tumorale.

Nel complesso, queste evidenze hanno portato a ipotizzare un ruolo di oncosoppressore per i geni codificanti i recettori dell'ormone tiroideo.

Nel presente studio ci siamo proposti di analizzare la struttura dei geni  $THR\alpha$  (NR1A1) e  $THR\beta$  (NR1A2) in tumori generati attraverso il modello di epatocancerogenesi sperimentale dell'Epatocita Resistente nel ratto allo scopo di valutare la presenza di alterazioni quali mutazioni puntiformi, delezioni o ipermetilazione di isole CpG localizzate nei promotori dei due geni. Questo modello, nel caso in cui venga rilevata la presenza di alterazioni geniche nei

carcinomi, consente di determinare, procedendo a ritroso nella analisi delle lesioni preneoplastiche a diversi tempi, se la comparsa delle stesse nei geni di interesse sia un evento precoce o invece insorga tardivamente.

## ***Materiali e Metodi***

### Animali

Sono stati utilizzati ratti Fisher maschi F-344 (Charles River, Milano) del peso di 100-125 g, alimentati con una dieta standard (Mucedola).

Prima di iniziare le procedure sperimentali i ratti sono stati sottoposti ad una settimana di adattamento in condizioni di stabulazione standard: temperatura di 25°C, luce per 12 ore al giorno, acqua e cibo *ad libitum*. Le linee guida dell'Università degli Studi di Cagliari sul trattamento degli animali sono state rispettate durante lo studio.

### Protocollo Sperimentale

I ratti, 12 per ogni gruppo sperimentale, (Fig. 15) sono stati trattati con una singola dose dell'agente iniziante dietilnitrosamina (DNA) (Sigma) pari a 150 mg/kg di peso corporeo, disciolta in soluzione salina ed iniettata in cavità peritoneale. Dopo due settimane dal trattamento iniziante gli animali sono stati sottoposti al regime di promozione di Solt-Farber: per due settimane è stata somministrata una dieta contenente lo 0,02% di 2-acetilamminofluorene (2-AAF) (Sigma). Tra la prima e la seconda settimana di questa dieta, è stata praticata una epatectomia dei 2/3 del fegato sotto anestesia generale indotta da dietiletere, secondo la metodica descritta da Higgins (Higgins GM 1931). I ratti sono stati successivamente ricondotti alla dieta basale. Tre gruppi addizionali sono stati utilizzati come controllo: un gruppo è stato trattato esclusivamente con la DNA, un altro gruppo è stato esposto al trattamento promotore (2-AAF + PH) in assenza del cancerogeno, e in un ulteriore gruppo di controllo sono stati omessi il trattamento iniziante e quello promotore. Ciascun gruppo sperimentale è stato suddiviso in tre sottogruppi, di cui il primo è stato sacrificato dopo 10 settimane dalla

somministrazione della DENA, per valutare la presenza dei noduli GSTP-positivi; il secondo sottogruppo e' stato sacrificato dopo 9 mesi per la valutazione della presenza di adenomi ed eventuali carcinomi epatocellulari; il terzo sottogruppo e' stato sacrificato dopo 14 mesi, un tempo al quale sono presenti epatocarcinomi in stadio avanzato, spesso in presenza di metastasi polmonari. Nel presente studio sono stati analizzati i campioni di fegato provenienti dai ratti sacrificati dopo 10 settimane e dopo 14 mesi dalla somministrazione della DENA. I carcinomi epatocellulari sono stati selezionati per l'analisi sulla base dei criteri proposti in *"Histologic Typing of Liver Tumors of the Rat"* (Stewart HLW, 1980).

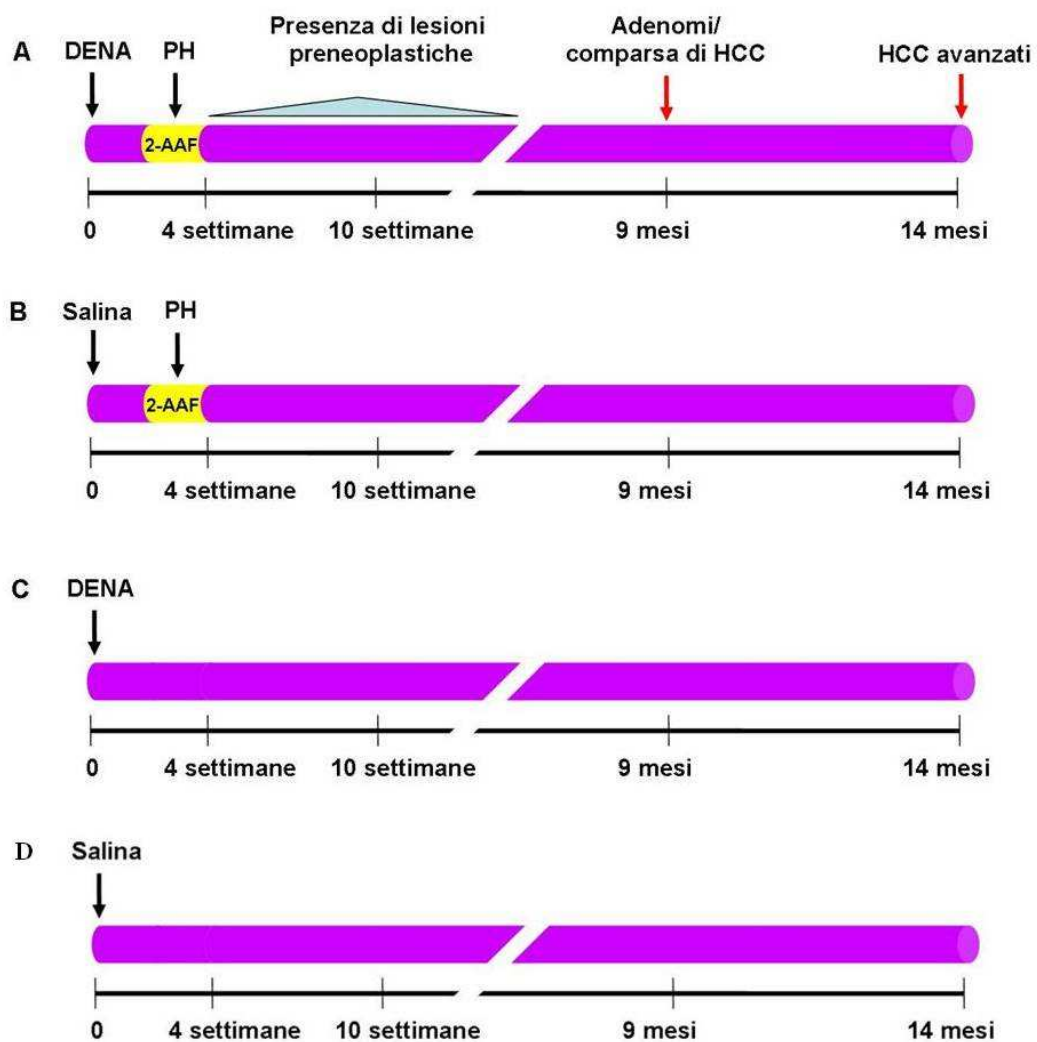


Fig. 15 Protocollo sperimentale

### Istologia e Immunoistochimica

Sezioni di fegato sono state fissate in formalina al 10% ed incluse in paraffina. Altre sezioni di fegato sono state rapidamente congelate mediante immersione in isopentano freddo e conservate a -80 °C.

Per la colorazione con ematossilina ed eosina, sezioni di fegato dello spessore di 5 µm sono state deparaffinate e reidratate tramite una serie discendente di alcoli. Le sezioni sono state poi incubate per 1 minuto con ematossilina di Harris e successivamente con eosina alcoolica acidificata all'1% per 30 secondi. Le sezioni sono state poi disidratate attraverso una serie ascendente di alcoli e montate con vetrino coprioggetto.

La colorazione immunoistochimica per la proteina GSTP e' stata eseguita su sezioni criostatate dello spessore di 6µm. Le sezioni sono state fissate mediante incubazione con acetone a -20°C per 10 minuti. Le perossidasi endogene sono state bloccate mediante incubazione col reagente Peroxidase Block (DAKO) per 10 minuti. I siti aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione delle sezioni per 1 ora a temperatura ambiente con tampone PBS (phosphate buffered saline) supplementato con il 5% di siero caprino normale, sieralbumina bovina allo 0.5%, e Triton X-100 allo 0.5%. Le sezioni sono state poi incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo anti-GSTP (MBL), sviluppato nel coniglio, ad una diluizione 1:1000 in tampone PBS contenente lo 0.5% di sieralbumina bovina (BSA) e lo 0.5% di Triton X-100. In seguito le sezioni sono state incubate con anticorpo secondario anti-coniglio (DAKO) per 30 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi controcolorate con ematossilina di Harris. La colorazione immunoistochimica per la proteina CK-19 è stata eseguita anch'essa su sezioni criostatate dello spessore di 6 µm che sono state fissate con acetone

mediante incubazione a -20°C per 20 minuti. Le perossidasi endogene e i siti specifici sono stati bloccati eseguendo gli stessi procedimenti utilizzati nella colorazione immunohistochimica per l'enzima GSTP. Successivamente le sezioni sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo anti-CK19 (Novocastra), sviluppato nel topo e diluito 1:200 con tampone PBS. In seguito le sezioni sono state incubate per la durata di 45 minuti con anticorpo secondario anti-topo diluito 1:200 in PBS e trattate con una soluzione di 3,3'-diaminobenzidina (DAB) per evidenziare la colorazione. Le sezioni sono state poi controcolorate con ematossilina di Harris.

#### Estrazione DNA genomico da tessuto congelato

Il DNA genomico è stato estratto dai carcinomi isolati da fegato dei ratti trattati secondo il modello dell'Epatocita Resistente e da fegato normale, come controllo. Il tessuto è stato sottoposto a lisi chimica e digestione proteica mediante l'aggiunta di 180ul di buffer ATL e 20ul di Proteinasi K (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN). Il campione è stato poi incubato a 56°C per minimo 3 ore e max overnight in un bagnetto termostato. Successivamente sono stati aggiunti 200ul di buffer AL e il campione è stato posto per 10 minuti in bagnetto termostato a 70°C. In seguito sono stati aggiunti 200ul di etanolo (96%) e il campione è stato trasferito in apposite colonnine. Queste ultime sono state sottoposte a centrifugazione a 8000g per 1 minuto e il DNA, che resta adsorbito sulla resina della colonna, è stato lavato con il buffer AW1 e successivamente con il buffer AW2. La risospensione del DNA è stata effettuata con acqua sterile, mediante incubazione per 5 minuti e successiva eluizione per centrifugazione (8000g per 1 minuto). Il

campione di DNA così ottenuto è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino alle successive applicazioni.

#### *Estrazione di RNA totale da tessuto*

L'RNA totale è stato estratto da porzioni di circa 25 mg di tessuto proveniente da carcinomi isolati dal fegato dei ratti trattati secondo il modello dell'Epatocita Resistente e da fegato normale, utilizzato come controllo, conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mediante l'utilizzo del kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). I campioni sono stati omogenati in 600  $\mu\text{l}$  di buffer RLT Plus e il lisato è stato centrifugato a massima velocità per 3 minuti. Il surnatante è stato poi trasferito nella gDNA Eliminator spin column per la separazione degli acidi nucleici mediante centrifugazione a 10000 rpm per 30 secondi. Il DNA viene trattenuto nella membrana della colonnina mentre l'RNA viene eluito. A quest'ultimo sono stati aggiunti 600  $\mu\text{l}$  di etanolo al 50% e il campione è stato caricato nella RNeasy spin column e centrifugato per 15 secondi a 10000 rpm. L'RNA viene trattenuto nella colonna e sottoposto ai lavaggi successivi con i buffer RW1 e RPE e infine eluito con 30  $\mu\text{l}$  di acqua RNase-free. Il campione di RNA così ottenuto è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino alla successiva applicazione e.

#### *Valutazione qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici*

La quantità degli acidi nucleici estratti è stata determinata spettrofotometricamente mediante l'utilizzo dello strumento NanoDrop. Per entrambi gli acidi nucleici è stato valutato il rapporto A260/A280: per il DNA questo rapporto è sempre stato compreso tra 1,7 e 2,0; per l'RNA il rapporto è sempre stato compreso tra 1,8 e 2,0.



### Reazione a catena di polimerasi (PCR)

Le sequenze di DNA genomico corrispondenti agli esoni codificanti i trascritti  $THR\alpha_1$  e  $THR\alpha_2$ ,  $THR\beta_1$  e  $THR\beta_2$  e le sequenze introniche adiacenti sono state amplificate mediante la tecnica di Reazione a Catena della Polimerasi (PCR). La struttura dei geni  $TR\alpha$  (NR1A1) e  $TR\beta$  (NR1A2) e' stata ricostruita sulla base delle informazioni contenute nei database Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ciascun esone delle isoforme  $THR\alpha_1$  e  $THR\alpha_2$ ,  $THR\beta_1$  e  $THR\beta_2$ , comprendente una porzione della sequenza intronica adiacente che comprende i siti di *splicing*, e' stato indipendentemente amplificato e sequenziato. Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione sono stati disegnati con l'ausilio del programma "Primer 3" (Tabella 1 e Tabella 2) prendendo come riferimento la sequenza presente sul database Ensembl.

PRIMER	PRIMER SEQUENCE	PROD. SIZE	SEQ. LENGHT
alpha 1-2 ex. 1 F	ccagtctctggcgtgct	198	53
alpha 1-2 ex. 1 R	gaccagctctctttaccaga		
alpha 1-2 ex. 2 F	gggggtggaagtctcttagg	246	68
alpha 1-2 ex. 2 R	ctggaggaggccaagtatg		
alpha 1-2 ex. 3 F	aaggtagagtgggtgggtaca	295	101
alpha 1-2 ex. 3 R	aaggggaatcaggcaacag		
alpha 1-2 ex. 4 F	agctggggacggaacc	361	148
alpha 1-2 ex. 4 R	ttgcaattgggaccaagac		
alpha 1-2 ex. 5 F	atcagggcgagtgtattctg	393	206
alpha 1-2 ex. 5 R	ttggctggactaaaccaag		
alpha 1-2 ex. 6 F	tgagcggtaaagggtct	289	147
alpha 1-2 ex. 6 R	accagtgaggctctgtgac		
alpha 1-2 ex. 7 F	ctcggggaggatgtactgac	403	259
alpha 1-2 ex. 7 R	agagagaggcaagcaagagc		
alpha 1 ex 8 F	tcctctggctgtcctagacc	500	249
alpha 1 ex 8 R	tgtccctctctccaagctc		
alpha 2 ex 9 F	ccagaggctcatcttggaat	638	369
alpha 2 ex 9 R	ccctggagaaggagtagcat		

Tabella 1 Elenco dei *primers* utilizzati nel sequenziamento del gene *THRa*.

PRIMER	PRIMER SEQUENCE	PROD. SIZE	SEQ. LENGHT
beta 1 ex. 1 F	ctgcccacatcacacggt	249	66
beta 1 ex. 1 R	tcaggctgaagaccccagt		
beta 1 ex. 2 F	aacgaccggccttctaaat	414	261
beta 1 ex. 2 R	tggtagcgggagagagagac		
beta 1-2 ex. 3 F	tcctgtctggatgagaacctt	248	101
beta 1-2 ex. 3 R	ctgagtccgatggctgtct		
beta 1-2 ex. 4 F	aggctaaggccagaacaat	360	148
beta 1-2 ex. 4 R	ccacagaggttctgcttct		
beta 1-2 ex. 5 F	catgtgactccaggctcaga	395	206
beta 1-2 ex. 5 R	actgcccatcacaataatgg		
beta 1-2 ex. 6 F	cacgggttcttccagctt	301	147
beta 1-2 ex. 6 R	tcatttgcattggactctgc		
beta 1-2 ex. 7 F	cagtgggtgctttccaaca	380	259
beta 1-2 ex. 7 R	acccacgaagctctcttct		
beta 2 ex. 1 F	tgaagtgaggcgaactaggc	344	242
beta 2 ex. 1 R int	gtccaggcctgtccagata		
beta 2 ex. 1 F int	ggaagacagtccggcttaca	319	442
beta 2 ex. 1 R	gtgctccgatgcaaagattc		

Tabella 2 Elenco dei *primers* utilizzati nel sequenziamento del gene *THR $\beta$*

Il DNA e' stato amplificato utilizzando HF Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Dopo un iniziale ciclo di denaturazione di 5 minuti a 94°C, sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione secondo il seguente schema: denaturazione a 94°C per 30 secondi, appaiamento (*annealing*) a 61°C per 30 secondi, estensione a 68°C per 1 minuto.

La reazione si e' conclusa con un ultimo *step* a 68°C per 7 min. La reazione di PCR e' stata eseguita su un termociclatore GENEAMP PCR system 9700 v. 3.08 (Applied Biosystems).

### Elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. La presenza del DNA e' stata evidenziata mediante bromuro di etidio (Fig. 16). Le corrette dimensioni dei prodotti di PCR sono state verificate mediante raffronto con due diversi marcatori di peso molecolare (100 bp e 1Kb, Promega). Le bande corrispondenti al DNA amplificato, corrispondenti ciascuna ad un esone piu' la adiacente porzione intronica, sono state escisse dal gel per consentire la successiva estrazione del DNA.

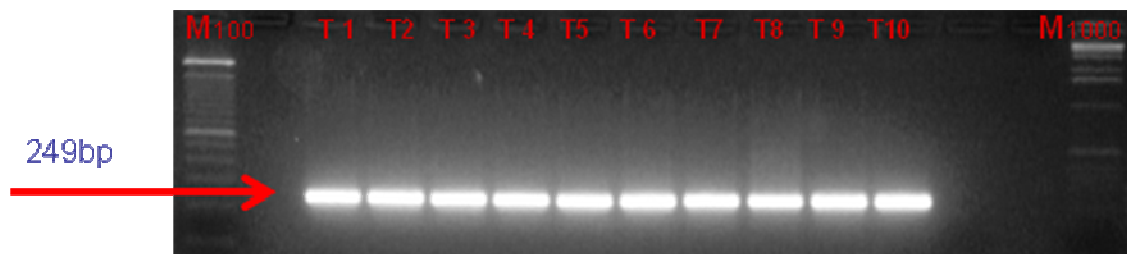


Fig. 16 Elettroforesi di DNA su gel di agarosio. Le bande evidenziate mediante etidio bromuro sono relative all'esone 1 della variante  $\beta$ 1.

### Estrazione di DNA da gel di agarosio

Il DNA amplificato mediante PCR e sottoposto a elettroforesi e' stato purificato dalle bande del gel di agarosio al 2% evidenziate mediante etidio bromuro. Per dissolvere il gel di agarosio è stato addizionato ai campioni un volume pari al terzo

del peso delle bande di buffer QG (MinElute Gel Extraction Kit, QIAGEN). I campioni sono stati poi incubati a 50°C per 10 minuti. Successivamente è stato aggiunto un volume di isopropanolo pari al peso delle bande, il campione è stato miscelato per inversione e trasferito in apposite colonnine. Queste ultime sono state sottoposte a centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto e il DNA, che resta adsorbito sulla resina della colonna, è stato lavato dapprima con 500 µl di buffer QG per eliminare i residui di agarosio e successivamente con 750 µl di buffer PE. La risospensione del DNA è stata effettuata in acqua sterile, mediante incubazione per 5 minuti e successiva eluizione per centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto.

#### Sequenziamento del DNA

La concentrazione del DNA estratto da ciascuna banda del gel di agarosio è stata misurata mediante determinazione spettrofotometrica. Sono stati successivamente prelevati 2 ng di DNA per ogni 100 basi del prodotto di PCR relativo all'esone in studio e aggiunte 6,4 pmol dell'oligonucleotide necessario per la reazione di sequenziamento. La reazione di sequenziamento si è svolta secondo il metodo del *Dye Terminator*. La elettroforesi verticale ad alta risoluzione in condizioni denaturanti è stata eseguita presso la BMR Genomics (Padova). Le sequenze sono state analizzate mediante il programma "Chromas Pro".

Le sequenze relative ad ogni campione sono state confrontate con le corrispondenti sequenze *wild-type* presenti sul *database* GeneBank.

### RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

L'RNA è stato retrotrascritto in cDNA mediante l'utilizzo del Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem).

1 µg di RNA è stato diluito in 10 µL di acqua RNase free. Ad ogni campione sono successivamente stati aggiunti 2 µL di RT Buffer (10X), 2µL di Random primers (10X), 0,8µL di dNTPs (100mM), 1µL dell'enzima Multiscribe Reverse Transcriptase, 1µL di RNase Inhibitor e l'appropriata quantità d'acqua fino al volume di 20 µL. Il campione è stato successivamente incubato a 25°C per 10 minuti, a 55°C per 120 minuti e la reazione di sintesi del filamento di cDNA è stata interrotta mediante incubazione per 5 secondi a 85°C. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al successivo utilizzo.

### REAL TIME PCR

L'RNA estratto da 20 campioni di HCC in stadio avanzato e da 15 campioni di noduli preneoplastici GSTP-positivi, CK-19 positivi, è stato utilizzato per l'analisi dei livelli di espressione per i recettori tiroidei.

La reazione di amplificazione (in un volume di 10ul) è stata effettuata utilizzando 4ul di cDNA (2,5 ng/µL ottenuto dai singoli campioni di tessuto epatico tumorale e normale), 5ul di TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) e sonde TaqMan specifiche a una concentrazione 0,3 uM. Nelle analisi di espressione genica sono state utilizzate le seguenti sonde TaqMan: Rn 01464143\_m1 per l'analisi dell'isoforma  $\alpha_2$ , la sonda Rn 01464144\_m1 per lo studio dell'isoforma  $\alpha_1$ , la sonda Rn 01537799\_m1 per l'analisi della variante  $\beta_1$  e la sonda Rn 00562044\_m1 per lo studio di entrambe le varianti dell'isoforma  $\beta$ .

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite su un termociclatore ABI PRISM 7300HT (Applied Biosystems). I parametri utilizzati hanno compreso uno step iniziale di attivazione a 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di amplificazione condotti ciascuno a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. La specificità della reazione di amplificazione è stata valutata mediante analisi della curva di melting. I campioni sono stati analizzati in triplicato ed è stato amplificato, oltre al gene target, anche un gene *housekeeping* ( $\beta$ -actina) per valutare eventuali variazioni nella quantità di cDNA utilizzato. I livelli di espressione delle diverse isoforme sono stati valutati con il metodo del  $\Delta\Delta C_t$  e rappresentati come espressione relativa rispetto a un calibratore scelto tra i controlli, avente un valore di espressione intermedio tra di essi nelle analisi delle diverse isoforme.

#### Trattamento con Sodio Bisolfito

Diversi metodi sono stati messi a punto per rivelare e quantificare la metilazione del DNA. Essi normalmente si avvalgono di un trattamento del DNA con sodio bisolfito, attraverso il quale le citosine non metilate vengono deamminate e solfonate per essere convertite in uracile, mentre le 5'-metil-citosine rimangono inalterate (Fig. 17). Il trattamento consente quindi di discriminare le citosine non metilate da quelle metilate, le quali vengono rivelate da successive analisi.

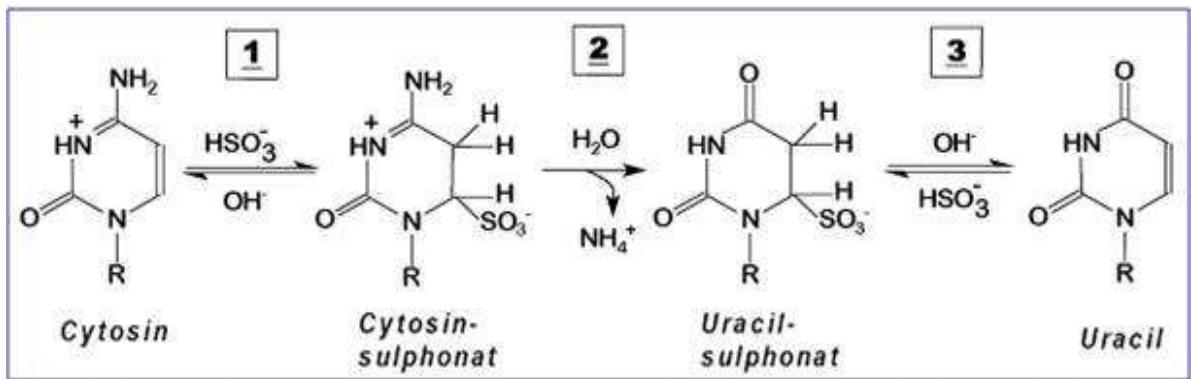


Fig. 17 Schema illustrante la conversione in uracile delle citosine non metilate.

Abbiamo sottoposto all'analisi dello stato di metilazione delle isole CpG dei geni  $\text{THR}\alpha$  e  $\text{THR}\beta$  campioni di DNA estratto dai 20 HCC precedentemente sottoposti all'analisi dell'espressione genica e dei rispettivi controlli, mediante l'utilizzo dell' EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH). A 1  $\mu\text{g}$  di DNA sono stati addizionati 5  $\mu\text{l}$  di M-Dilution buffer e il volume finale è stato portato a 50  $\mu\text{l}$  con acqua RNase-free. I campioni sono stati incubati per 15 minuti a 37°C. Sono stati successivamente aggiunti 100  $\mu\text{l}$  del CT Conversion Reagent ai campioni incubati al buio a 50°C per 16 ore. Il giorno seguente i campioni sono stati inizialmente incubati in ghiaccio per 10 minuti, poi caricato nelle apposite colonnine contenenti il M-Binding buffer e centrifugato a massima velocità per 30 secondi. È seguito un lavaggio con M-Wash buffer e la successiva desolfonazione attraverso incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti in M-Desulphonation buffer. I campioni sono stati infine lavati mediante due passaggi successivi in M-Wash buffer per essere poi eluito con 20  $\mu\text{l}$  di M-Elution buffer pre-riscaldato per 10 minuti a 37°C. I campioni così ottenuti vengono successivamente analizzati mediante il saggio denominato Methylation Specific PCR.

### Methylation Specific PCR (MSP)

La Methylation Specific PCR (MSP) è una tecnica ampiamente utilizzata per lo studio della metilazione delle isole CpG. Le differenze generate dopo il trattamento con Na-bisolfito tra citosine metilate e non sono alla base del funzionamento dell'MSP. I primers per la MSP sono stati disegnati con l'ausilio del programma MethPrimer, sulla base della sequenza delle isole CpG da noi identificate attraverso il *Genome Browser UCSC* corrispondenti alle regioni: per THR $\alpha$  chr 10:87514093-87516190 2098bp; per THR $\beta$  chr 15:9685416-9686269 654bp. In particolare, due set di primers sono stati disegnati: un set di primers che riconosce il DNA modificato dal trattamento con sodio bisolfito e non metilato, e un set di primers che riconosce il DNA modificato e metilato. Inoltre, con il programma Primer3 è stato disegnato un terzo set di primers specifici per il DNA non modificato, necessari per verificare l'efficienza del trattamento col bisolfito (Tabella 3). I campioni di DNA trattati col Na-bisolfito sono stati amplificati con i tre diversi set di primers utilizzando HF Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Dopo un iniziale ciclo di denaturazione di 5 minuti a 94°C, sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione secondo il seguente schema: denaturazione a 94°C per 30 secondi, appaiamento (*annealing*) a 61°C per 30 secondi, estensione a 68°C per 1 minuto. La reazione è stata conclusa con un ultimo *step* a 68°C per 7 minuti ed è stata eseguita su un termociclatore GENEAMP PCR system 9700 v. 3.08 (Applied Biosystems).



PRIMER	PRIMER SEQUENCE	PROD. SIZE
THR $\alpha$ Met F	TTTTTTTTGGTTTTTTAGTTCGATC	174
THR $\alpha$ Met R	AACGCCGAAATATAAATACGAA	
THR $\alpha$ Unmet F	TTAGGTGGTTTGTAGGGAGTAGTTG	183
THR $\alpha$ Unmet R	CCTCCAACACCAAATATAAATACAA	
THR $\alpha$ wt F	GGCCTGCAGGGAGCA	165
THR $\alpha$ wt R	GGTGTGAGTGCGAGTGAGC	
THR $\beta$ Met F	TTTTTTTTGGTTTTTTAGTTCGATC	142
THR $\beta$ Met R	ACACCCAAATAACGAATTACTCG	
THR $\beta$ Unmet F	TTTTTTGGTTTTTTAGTTTGATTGA	143
THR $\beta$ Unmet R	AAAACACCCAAATAACAAATTACTCA	
THR $\beta$ wt F	CCCGTGGCAGGGACA	139
THR $\beta$ wt R	CCGGTAACTTGACGTGGA	

Tabella 3 Elenco dei *primers* utilizzati nell'analisi MSP.

I campioni così amplificati sono stati infine analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di agaroso al 2%.

### Laser Capture Microdissection

I noduli GSTP e CK-19 positivi sono stati evidenziati attraverso colorazione immunohistochimica su sezioni criostatate di fegato dello spessore di 6 µm. Sezioni seriali dello spessore di 15 µm sono state utilizzate per la microdissezione utilizzando uno strumento Leica LMD6000. Immediatamente prima di eseguire la dissezione, ogni sezione è stata rapidamente colorata con Ematossilina-Eosina (H&E) per consentire la localizzazione dei noduli di interesse, precedentemente identificati sulla sezione seriale. Si è successivamente proceduto con l'operazione di dissezione dell'area interessata, eseguita al massimo in 20 minuti per evitare la degradazione dell'RNA. I noduli così isolati sono stati trattati con 50µl di Extraction Buffer (XP) PicoPure, centrifugati a massima velocità per 5'' e incubati per 30' a 42°C per ottenere la lisi del tessuto isolato. Il campione omogenato è stato centrifugato a 800 x g per 2' e conservato a -80°C in attesa di essere utilizzato per l'estrazione dell'RNA.

### Isolamento RNA dai noduli microdissezionati

L'RNA proveniente dai noduli preneoplastici microdissezionati e dai rispettivi fegati di controllo e' stato estratto col kit PicoPure (Arcturus). Brevemente, previo pre-trattamento delle colonnine di estrazione con Conditioning Buffer, e' stato applicato il campione (50µl) contenente il tessuto dissezionato sospeso in Extraction Buffer. Dopo una incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, le colonnine contenenti il campione da estrarre sono state centrifugate a 16000 X G per 1 minuto. Successivamente, alla colonna sono stati aggiunti 20µl di extraction buffer + 20 µl di etanolo al 70%. Il campione e' stato centrifugato e dopo tre

passaggi di lavaggio con Wash Buffer, l'RNA e' stato eluito con 30 µl di acqua trattata con DEPC.

#### Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA proveniente dalla microdissezione

L'integrita' dell'RNA estratto dai noduli preneoplastici e dai rispettivi controlli e' stata valutata analizzando 1 µl di campione mediante lo strumento Agilent Bioanalyzer 2100. Tale strumento opera una microelettroforesi del campione e fornisce un indice di integrita dell'RNA (RNA Integrity Number, RIN). Sono stati ulteriormente processati solo campioni che presentavano un  $RIN \geq 6$  (RIN= 10: qualita' migliore; RIN=0: completa degradazione).

L'RNA estratto e' stato quantificato spettrofotometricamente mediante l'utilizzo dello strumento NanoDrop.

#### Statistica

I dati sono espressi come media +/- deviazione standard (SD). La analisi della significativita' e' stata effettuata attraverso il test t di Student.

## ***Risultati e Discussione***

I meccanismi molecolari responsabili dello sviluppo tumorale nell'HCC rimangono poco conosciuti. Diversi geni sono stati descritti essere alterati in carcinomi epatocellulari umani.

Mutazioni puntiformi, delezioni e perdita dell'espressione dei geni che codificano per i recettori dell'ormone tiroideo triiodotironina (T3), THR $\alpha$  (NR1A1) e THR $\beta$  (NR1A2), sono state descritte in HCC umani con frequenze rilevanti. In particolare, in carcinomi epatocellulari (HCC) umani, entrambi i geni THR $\alpha$  e THR $\beta$  sono stati descritti essere frequentemente mutati (Lin KH, 1997b, Lin KH, 1999) mentre in diversi tipi di tumore alla tiroide è stata riscontrata ipermetilazione del promotore del gene THR $\beta$ .

Per determinare se alterazioni quali mutazioni, delezioni o ipermetilazione dei geni THR $\alpha$  e THR $\beta$  siano un evento precoce o tardivo nello sviluppo del carcinoma epatico, abbiamo utilizzato il modello di cancerogenesi epatica di Solt-Farber (modello dell'Epatocita Resistente) nel quale è possibile studiare lesioni preneoplastiche e neoplastiche in diversi stadi del processo tumorale epatico. È stato osservato che gli HCC originati con il protocollo di Solt-Farber presentano un profilo di espressione genica sovrapponibile a un sottotipo di HCC umano caratterizzato da prognosi particolarmente negativa e contraddistinto da un profilo di espressione genica di tipo epatoblastoide (Andersen et al. 2010).

#### *Classificazione delle lesioni generate dal protocollo di Solt-Farber*

A 10 settimane dalla somministrazione dell'agente iniziante DENA è stato possibile evidenziare, in base alla colorazione immunohistochimica per il GSTP, la presenza di due tipi di noduli: noduli persistenti, caratterizzati da una colorazione

intensa ed uniforme, e noduli rimodellanti, nei quali e' presente una colorazione per il GSTP debole ed irregolare (Fig 19 A). Tra i noduli persistenti GSTP<sup>+</sup> e' stato possibile identificare una popolazione di noduli CK<sup>+</sup> (GSTP<sup>+</sup>, CK19<sup>+</sup>) (Fig 19, A, B). L'analisi immunohistochimica per la proteina CK19 ha messo in evidenza una sottopopolazione di noduli CK19<sup>+</sup> (Fig. 19 B):

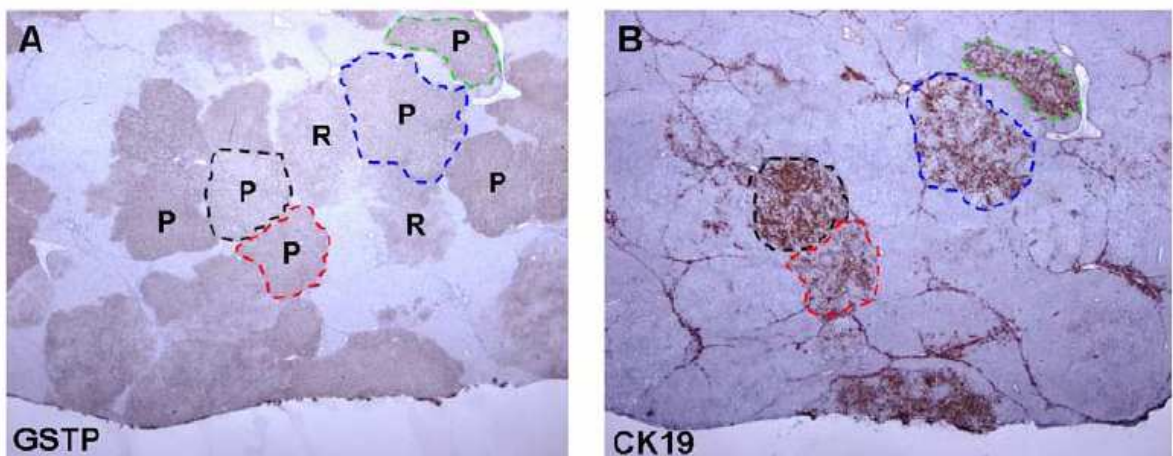


Fig. 19 Noduli preneoplastici generati attraverso il protocollo dell'Epatocita Resistente a 10 settimane dalla somministrazione della DENA. A) La colorazione per il GSTP mette in evidenza la presenza di noduli persistenti (P) e rimodellanti (R). B) La colorazione per la CK19 evidenzia la presenza di una sottopopolazione di noduli GSTP<sup>+</sup> CK19<sup>+</sup>. I noduli evidenziati dal tratteggio sono identificabili nelle due sezioni seriali.

L'analisi delle sezioni di fegato al nono mese dalla somministrazione della DENA ha evidenziato la progressione delle lesioni fino allo stadio di adenoma. Inoltre e' stato possibile dimostrare la presenza di lesioni con segni di atipia nucleare tipica di HCC allo stadio precoce (Fig. 20).

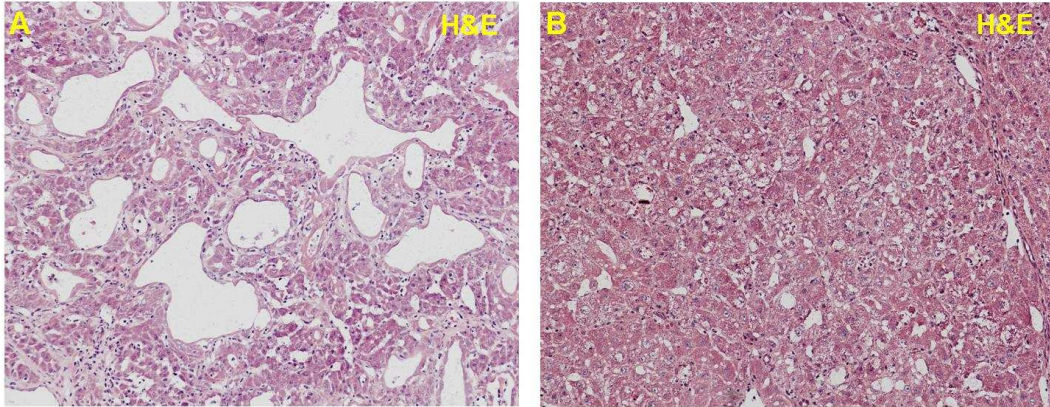


Fig. 20 Microfotografie rappresentanti due epatocarcinomi generati attraverso il modello dell'Epatocita Resistente a 9 mesi dalla somministrazione della DENA.

Al quattordicesimo mese dopo la somministrazione della DENA in tutti i ratti sottoposti al protocollo sperimentale e' stato possibile evidenziare la presenza di uno o piu' HCC in stadio avanzato, principalmente di tipo trabecolare, caratterizzati dalla frequente presenza di corpi apoptotici e mitosi (Fig. 21). In alcuni dei ratti esposti al protocollo e' stato possibile evidenziare la presenza di metastasi polmonari.

I gruppi di controllo non hanno evidenziato la presenza di alcun segno di trasformazione neoplastica.

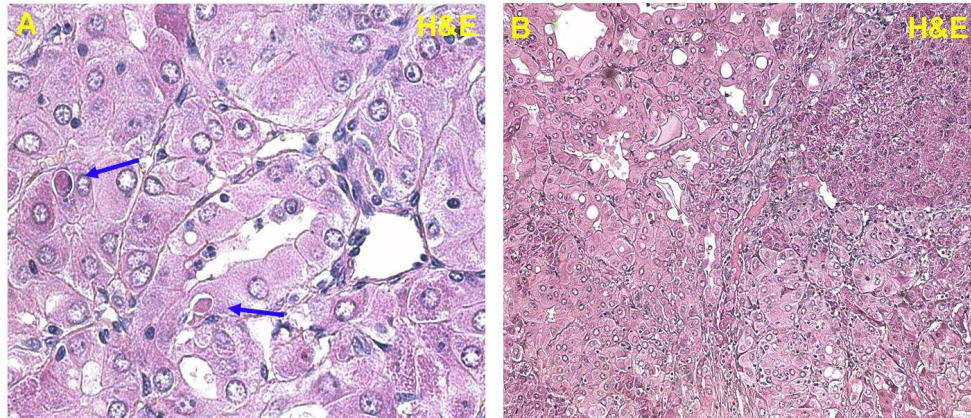


Fig. 21 Microfotografie rappresentanti due epatocarcinomi generati attraverso il modello dell'Epatocita Resistente a 14 mesi dalla somministrazione della DENA. Notare la presenza di corpi apoptotici, indicati dalle frecce blu.

### Analisi delle mutazioni dei geni THR alfa e beta negli HCC

Lo studio della struttura dei geni che codificano per il THR è stato condotto a partire dai 20 HCC isolati al quattordicesimo mese. Abbiamo inizialmente determinato la presenza di mutazioni nei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$ .

Per entrambi i geni sono stati sequenziati gli esoni codificanti e le adiacenti regioni di *splicing*. In particolare, sono stati sequenziati gli otto esoni che codificano per la variante  $\alpha_1$  del THR, i nove esoni che codificano per l'isoforma  $THR\alpha_2$ , gli otto esoni che codificano per l'isoforma  $THR\beta_1$  e i sette esoni codificanti la variante  $\beta_2$ .

Dall'analisi delle sequenze del DNA isolato dagli HCC e dal loro confronto con le sequenze *wild type* (Fig. 22) non è risultata essere presente alcuna mutazione puntiforme per le isoforme codificate dai geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  sia nelle porzioni codificanti che nei siti di *splicing*. Attraverso la corsa elettroforetica dei prodotti di amplificazione corrispondenti ai singoli esoni non è stata inoltre riscontrata la



presenza di bande di migrazione di dimensioni inattese, indicando la assenza di delezioni o duplicazioni intra-esoniche.

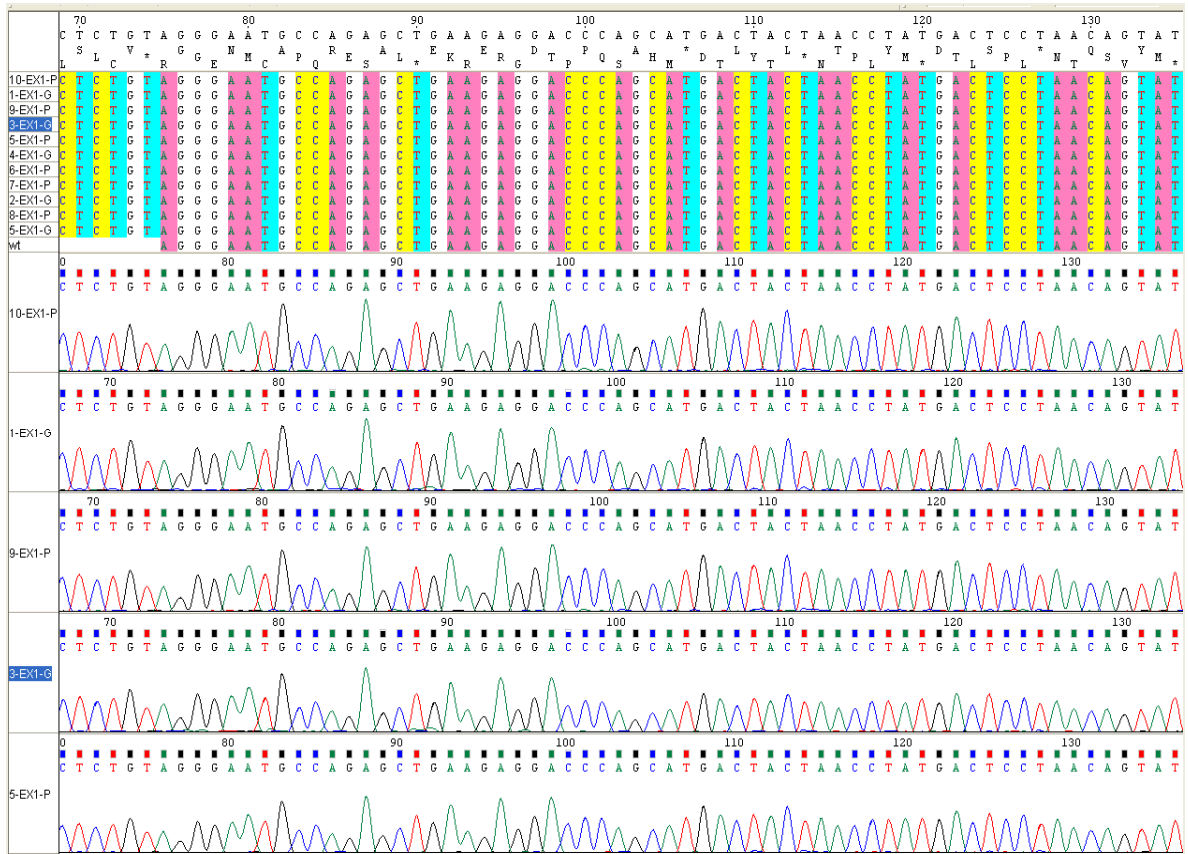


Fig. 22 Allineamento rappresentativo di un frammento delle sequenze esoniche del THRβ relative ai 20 epatocarcinomi analizzati. E' possibile individuare i cromatogrammi relativi a cinque delle sequenze illustrate.

I risultati ottenuti dimostrano quindi che la mutazione dei geni THRα e THRβ non e' un evento frequente negli HCC generati nel ratto mediante il protocollo di Solt-Farber. Contrariamente a quanto da noi rilevato dallo studio dell'HCC nel modello di Solt-Farber, le mutazioni dei geni THRα e THRβ appaiono essere un evento relativamente comune nella epatocancerogenesi umana. Infatti, una serie di studi indicano che i geni THRα e THRβ sono frequentemente mutati nei carcinomi

epatocellulari umani. Tali mutazioni sono per lo più localizzate nella regione C-terminale in cui è sito il Ligand Binding Domain, ovvero il dominio in cui si lega l'ormone tiroideo e compromettono pertanto il legame con il ligando (Lin KH et al. 1996 e Lin KH, 1997). Alterazioni nella sequenza genica del recettore tiroideo sono state descritte nell'oltre il 70% dei carcinomi epatocellulari analizzati (65% a carico del  $THR\alpha_1$ , 76% nel  $THR\beta_1$ ) (Lin KH, 1999). Questa discrepanza tra gli HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber nel ratto e gli HCC umani potrebbe essere dovuta a differenze nei meccanismi di epatocancerogenesi che sono stati dimostrati essere presenti tra due specie (Grisham JW, 1996). D'altra parte è noto che l'HCC umano presenta una marcata eterogeneità con la presenza di diversi sottogruppi identificabili secondo criteri sia clinici che molecolari (Lee JS et al. 2004).

A questo proposito è utile osservare che è stato dimostrato attraverso studi di genomica comparativa funzionale che che gli HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber hanno un profilo di espressione genica sovrapponibile ad un particolare sottotipo di HCC umano caratterizzato da una *signature* di espressione genica tipica di epatoblasti e cellule progenitrici del fegato (Andersen et al 2010).

Non è noto se in questo particolare sottotipo molecolare di HCC umano siano presenti le mutazioni dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  descritte nella generalità degli HCC.

In diversi tumori umani, quali il carcinoma della mammella e alcuni tumori della tiroide, è stato dimostrato un meccanismo di inattivazione dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  alternativo alla mutazione. In questi tumori infatti è stata dimostrata una perdita della espressione delle diverse isoforme in seguito alla metilazione delle isole CpG presenti nei promotori dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  (Biju J, 2007, Yaqin L, 2010).

Abbiamo quindi proseguito lo studio analizzando i livelli di espressione dell'mRNA delle diverse isoforme THR  $\alpha$  e  $\beta$  nei tumori generati secondo il protocollo di Solt-Farber e nei rispettivi controlli mediante l'utilizzo della Real Time PCR.

### Analisi dei livelli di espressione dei geni THR alfa e beta negli HCC

Abbiamo iniziato le analisi di espressione genica a partire da 19 campioni di HCC isolati al quattordicesimo mese del protocollo dell'epatocita resistente, comprendenti gli HCC precedentemente sottoposti all'analisi delle mutazioni, e dai rispettivi controlli. I dati ottenuti per la isoforma THR $\beta_1$  hanno mostrato una riduzione significativa dell'espressione dell'mRNA di questa isoforma nei tessuti tumorali rispetto i controlli ( $p < 0.001$ ) con una massima riduzione dell'espressione di circa 10 volte rispetto ai controlli (Fig. 23).

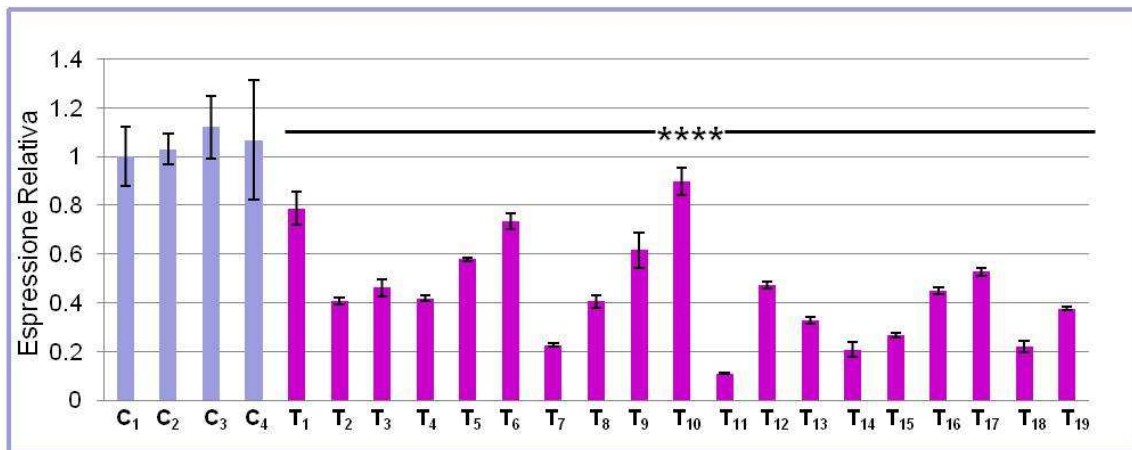


Fig. 23 Espressione dell'mRNA per l' isoforma THR $\beta_1$  in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C4: controlli (C1, controllo-calibratore); T1-T19: HCC. (\*\*\*\*=  $p < 0.001$ )

L' espressione dell' isoforma  $THR\beta_1$  risulta essere negli HCC analizzati mediamente pari al 42% dell' espressione osservata nei controlli (controlli  $1.05\pm 0.05$ ; HCC  $0.44\pm 0.21$ ) (Fig. 24).

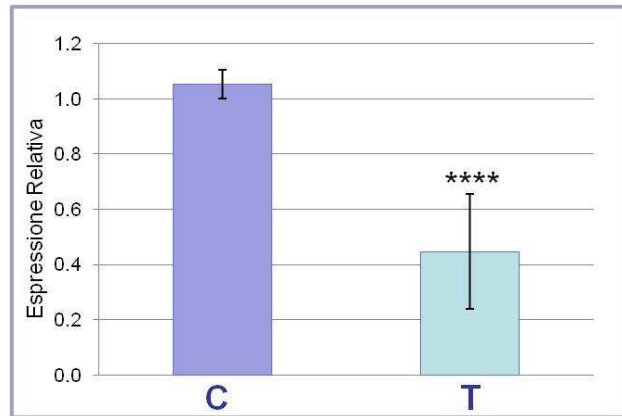


Fig. 24 Espressione media dell' isoforma  $THR\beta_1$  in HCC generati col modello dell' Epatocita Resistente (media  $\pm$  St. Dev) (\*\*\*\* =  $p < 0.001$ ).

Non essendo disponibile una sonda TaqMan che permetta l'analisi di espressione della sola isoforma  $THR\beta_2$ , abbiamo effettuato un' analisi dell' espressione cumulativa delle due isoforme  $\beta_1$  e  $\beta_2$  grazie all' utilizzo di una sonda che riconosce entrambe le isoforme. I dati ottenuti hanno mostrato una deregolazione che presenta lo stesso profilo della down regolazione riscontrata dall' analisi dell' isoforma  $THR\beta_1$ , in accordo col fatto che la  $THR\beta_2$  è un' isoforma espressa a livelli trascurabili nel fegato (Fig. 25 e 26).

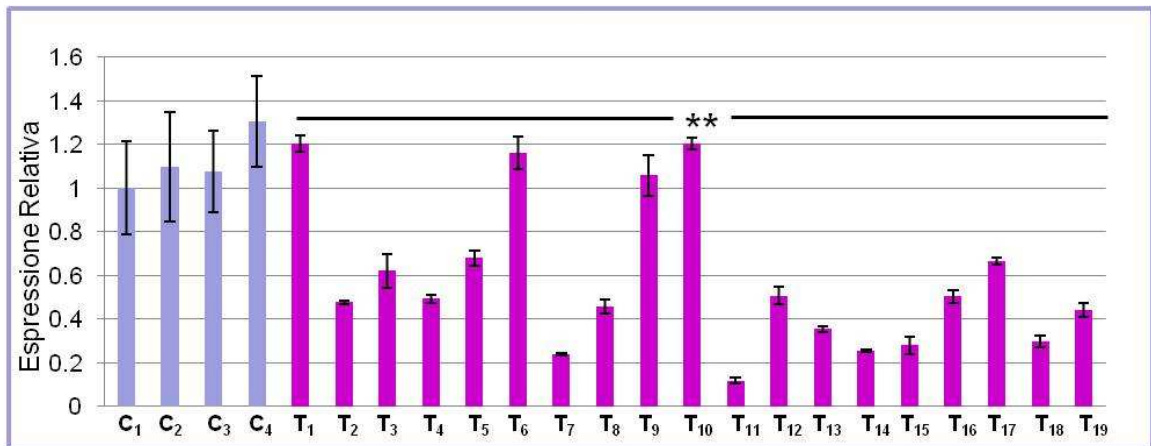


Fig. 25 Espressione cumulativa dell'mRNA per le isoforme THRβ<sub>1</sub> e THRβ<sub>2</sub> in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C4: controlli (C1, controllo-calibratore); T1-T19: HCC. (\*\*= p<0.01)

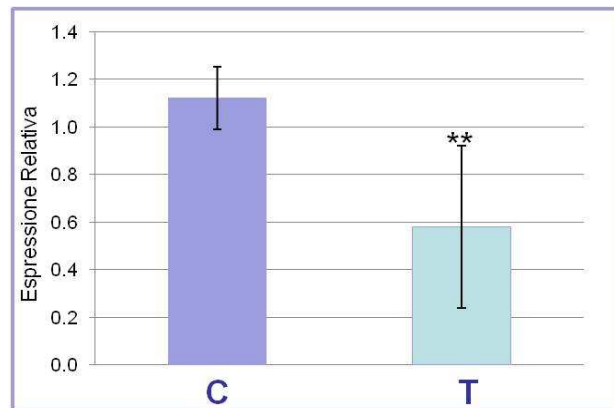


Fig. 26 Espressione media per le isoforme THRβ<sub>1</sub> e THRβ<sub>2</sub> in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente (media±St. Dev) (\*\*= p<0.01).

L'espressione delle due isoforme THRβ<sub>1</sub>/THRβ<sub>2</sub> risulta quindi anche in questo caso essere significativamente inferiore negli HCC analizzati rispetto ai controlli (p<0.005) (controlli 1.12±0.13; HCC 0.58±0.34).

L'analisi delle due varianti del THRα ha mostrato una riduzione significativa dell'espressione dell'mRNA nei tumori rispetto ai controlli (THRα<sub>1</sub>: p<0.001; THRα<sub>2</sub>: p<0.05) con una riduzione dell'espressione fino alle 6 volte, rispetto ai controlli (Fig. 27).

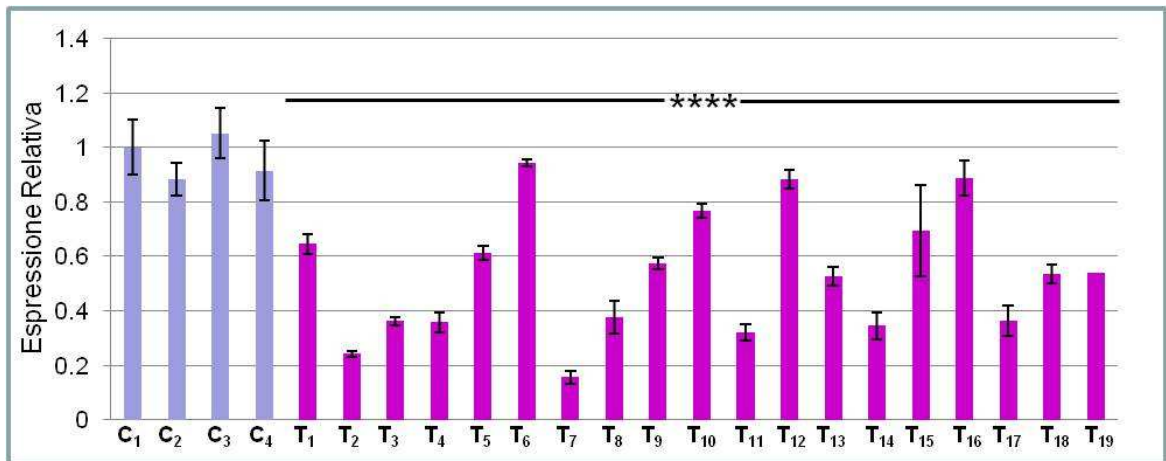


Fig. 27 Espressione dell'mRNA per la isoforma THR $\alpha_1$  in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C4: controlli (C1, controllo-calibratore); T1-T19: HCC. (\*\*\*\*= p<0.001)

L'espressione dell' isoforma THR $\alpha_1$  risulta essere negli HCC analizzati mediamente pari al 55% dell' espressione osservata nei controlli (Fig. 28).

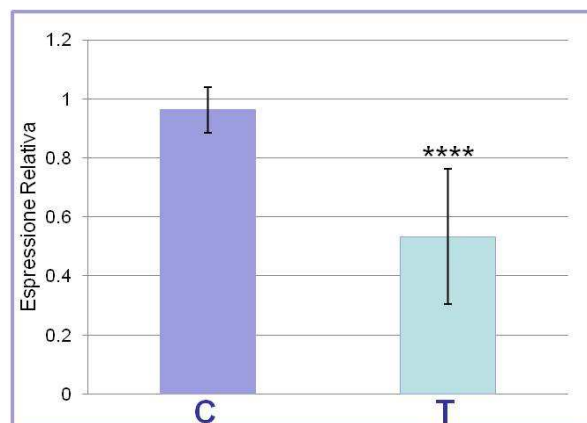


Fig. 28 Espressione media dell' isoforma THR $\alpha_1$  in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente (media $\pm$ St. Dev) (\*\*\*\*= p<0.001).

Tale riduzione dell' espressione e' tuttavia meno marcata rispetto alle due isoforme  $\beta$  (THR $\alpha_1$ : controlli 0.95 $\pm$ 0.08; HCC 0.53 $\pm$ 0.22)(Fig. 25 e 26) (THR $\alpha_2$ : controlli 0.99 $\pm$ 0.13; HCC 0.61 $\pm$ 0.29) (Fig. 29 a e 29 b).

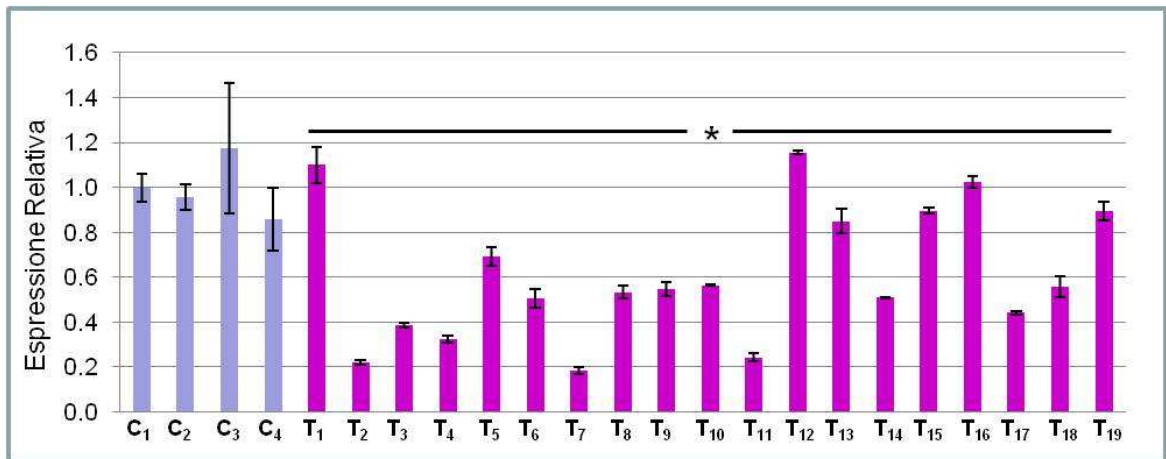


Fig. 29 a Espressione dell'mRNA per la isoforma THR $\alpha_2$  in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C4: controlli (C1, controllo-calibratore); T1-T19: HCC. (\*=  $p < 0.05$ )

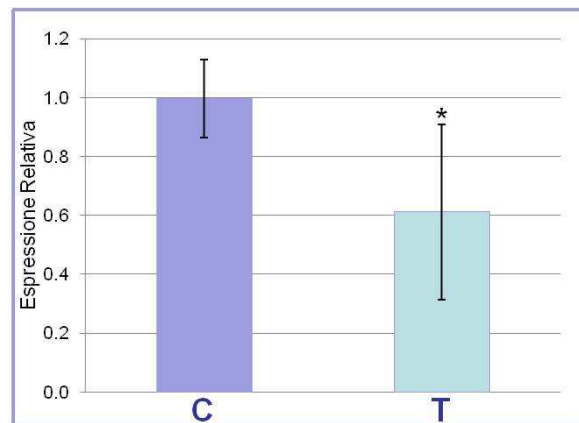


Fig. 29 b Espressione media dell' isoforma THR $\alpha_1$  in HCC generati col modello dell'Epatocita Resistente (media $\pm$ St. Dev) (\*=  $p < 0.05$ ).

Complessivamente, l'analisi di espressione genica per i geni THR $\alpha$  e THR $\beta$ , condotta su 19 HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber ha evidenziato per tutte le isoforme analizzate una significativa riduzione della espressione. In particolare, diversi HCC hanno subito una perdita quasi completa della espressione di una o piu' isoforme, suggerendo in questi tumori la presenza di un meccanismo di inattivazione genica alternativo alla mutazione.

Abbiamo quindi riscontrato per gli HCC da noi analizzati una condizione simile a quella descritta per diversi tumori umani, quali il carcinoma della mammella e

alcuni tumori della tiroide, in cui in assenza di mutazioni a carico dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  e' stata riscontrata la perdita di espressione di diverse isoforme. (Biju J, 2007, Yaqin L, 2010).

Per determinare se la perdita dell' espressione dell'mRNA per il recettore degli ormoni tiroidei osservata negli HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber sia un evento tardivo o sia presente anche negli stadi precoci del processo tumorale epatico abbiamo analizzato l'espressione delle medesime isoforme recettoriali in 15 campioni di noduli  $GSTP^+$ ,  $CK19^+$  isolati alla decima settimana dalla somministrazione della DENA. E' importante sottolineare che si e' scelto di analizzare la popolazione di noduli preneoplastici  $GSTP^+$ ,  $CK19^+$  in quanto studi di genomica comparativa hanno dimostrato che gli HCC generati nel protocollo di Solt-Farber si sviluppano quasi esclusivamente a partire da tali lesioni (Andersen et al. 2010). Pertanto, in questo modello, i noduli  $GSTP^+$ ,  $CK19^+$  possono essere considerati i precursori degli HCC.

I livelli di espressione delle diverse isoforme nei noduli sono stati comparati sia a controlli in cui sono stati omessi sia il trattamento iniziante con la DENA, sia il trattamento promovente costituito da 2-AAF/PH (controlli assoluti), sia a controlli che non sono stati trattati con la DENA ma che hanno ricevuto il trattamento promovente costituito da 2-AAF/PH. Inoltre e' stato incluso nell'analisi il controllo calibratore utilizzato nell'analisi degli HCC, per consentire una comparazione dei livelli di espressione relativa tra noduli e HCC.

I dati ottenuti hanno mostrato, anche allo stadio di lesione preneoplastica, una significativa diminuzione dei livelli di espressione della isoforma recettoriale  $\beta_1$  nei noduli sia rispetto ai controlli assoluti ( $p < 0.001$ ) che rispetto ai controlli AAF/PH ( $p < 0.005$ ), con una riduzione dell'espressione fino a 3,1 volte rispetto ai controlli



assoluti (controlli assoluti  $0.98\pm 0.05$ ; controlli AAF-PH  $0.89\pm 0.32$ ; noduli  $0.46\pm 0.16$ ) (Fig. 30).

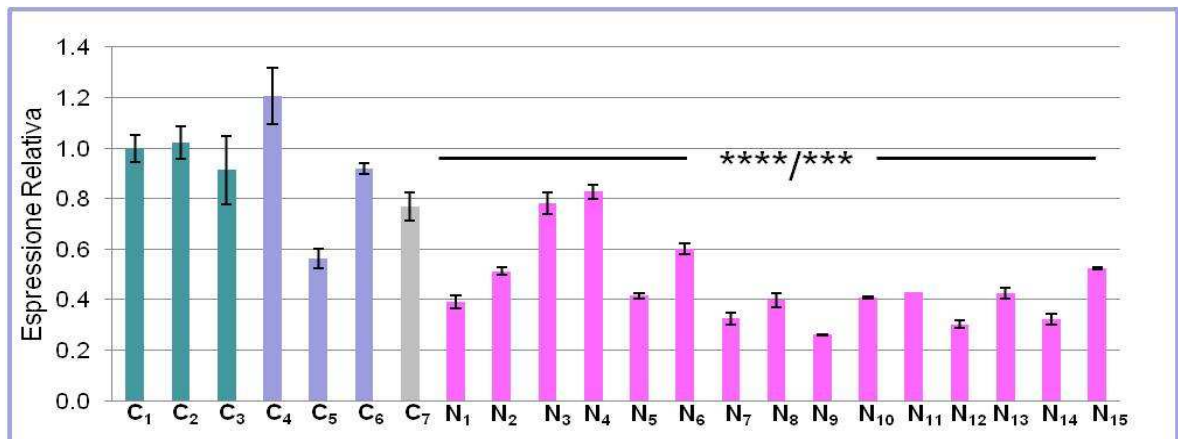


Fig. 30 Espressione dell'mRNA per la isoforma  $THR\beta_1$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C3: controlli assoluti (C1, controllo calibratore); C4-C6: controlli AAF-PH; C7: controllo calibratore utilizzato nelle analisi su HCC; N1-N15: Noduli preneoplastici GSTP+/CK19+. (\*\*\*\*=  $p < 0.001$  rispetto ai controlli assoluti e \*\*\* $p < 0.005$  rispetto ai controlli AAF-PH)

L' espressione dell' isoforma  $THR\beta_1$  osservata nei noduli risulta essere mediamente pari al 47% dell' espressione osservata nei controlli assoluti e al 51% rispetto all'espressione osservata nei controlli AAF-PH (Fig. 31).

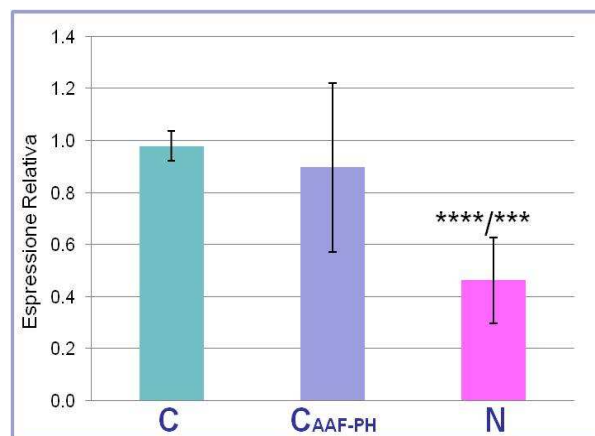


Fig. 31 Espressione media dell' isoforma  $THR\beta_1$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente (media±St. Dev) (\*\*\*\*=  $p < 0.001$  rispetto ai controlli assoluti e \*\*\* $p < 0.005$  rispetto ai controlli AAF-PH).

Come già riscontrato nell' analisi degli HCC, l'andamento dell' espressione cumulativa delle due isoforme  $THR\beta_1/THR\beta_2$  e' risultato essere sovrapponibile al profilo di espressione dell'isoforma  $THR\beta_1$ . La riduzione dell' espressione per le due isoforme e' risultata essere significativa sia nei confronti dei controlli assoluti che dei controlli AAF-PH ( $p < 0.001$ ) (controlli assoluti  $1.06 \pm 0.07$ ; controlli AAF-PH  $0.94 \pm 0.27$ ; noduli  $0.49 \pm 0.13$ ) (Fig. 32 a e 32 b).

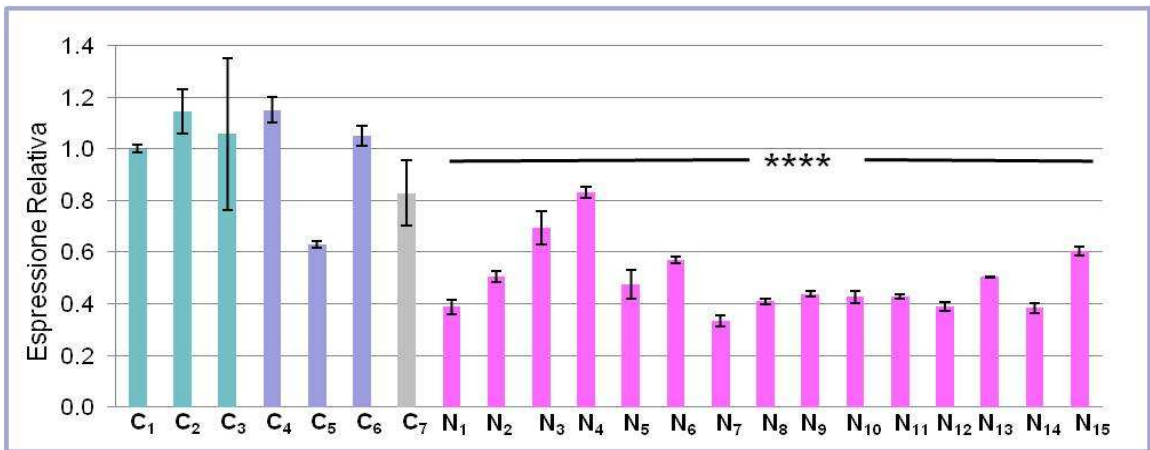


Fig. 32 a Espressione cumulativa delle isoforme  $THR\beta_1$  e  $THR\beta_2$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C3: controlli assoluti (C1, controllo-calibratore); C4-C6: controlli AAF-PH; C7: controllo calibratore utilizzato nelle analisi su HCC; N1-N15: Noduli preneoplastici GSTP+/CK19+. (\*\*\*\*=  $p < 0.001$  rispetto ai controlli assoluti e ai controlli AAF-PH)

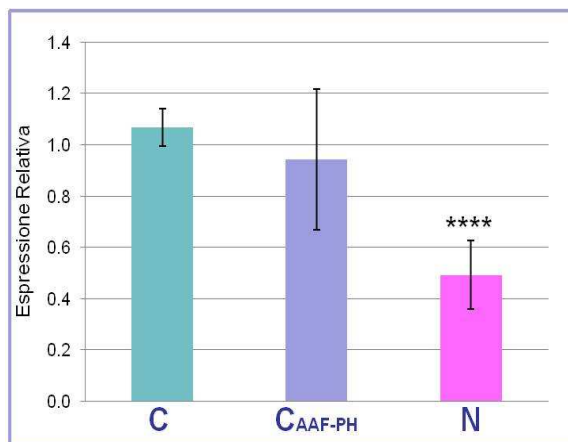


Fig. 32 b Espressione media dell' isoforma  $THR\beta_1$  e  $THR\beta_2$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente (media $\pm$ St. Dev) (\*\*\*\*=  $p < 0.001$  rispetto ai controlli assoluti e \*\*\* $p < 0.005$  rispetto ai controlli AAF-PH).

L'analisi dell'espressione delle due isoforme del recettore  $\text{THR}\alpha$  non ha rivelato una riduzione significativa dell'espressione nei noduli, rispetto a ciascuno dei controlli utilizzati ( $\text{THR}\alpha_1$ : controlli assoluti  $0.91\pm 0.08$ ; controlli AAF-PH  $0.94\pm 0.17$ ; noduli  $0.64\pm 0.22$ ;  $\text{THR}\alpha_2$ : controlli assoluti  $0.92\pm 0.06$ ; controlli AAF-PH  $1.16\pm 0.47$ ; noduli  $0.69\pm 0.23$ ) (Fig. 33 a,b e 34 a,b).

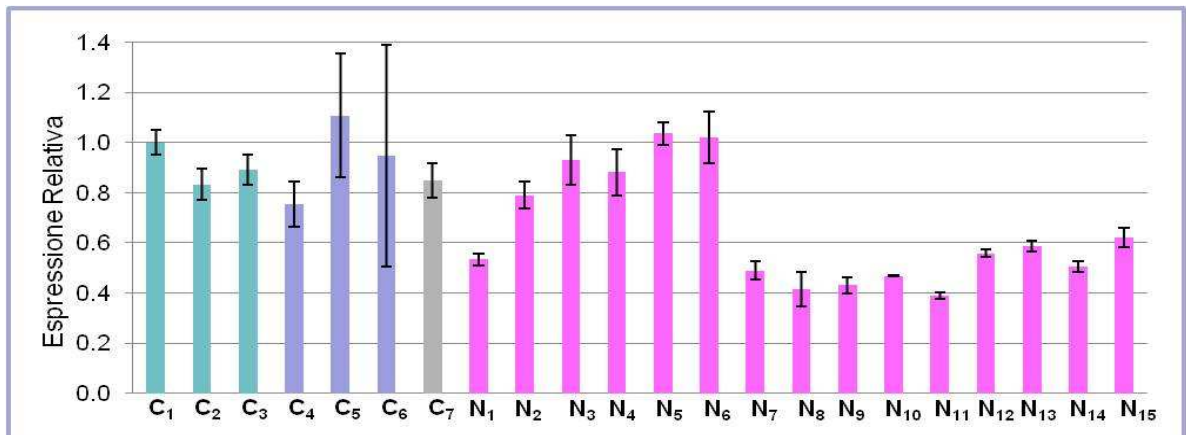


Fig. 33 a Espressione dell'mRNA per l'isoforma  $\text{THR}\alpha_1$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C3: controlli assoluti (C1, controllo-calibratore); C4-C6: controlli AAF-PH; C7: controllo calibratore utilizzato nelle analisi su HCC; N1-N15: Noduli preneoplastici GSTP+/CK19+.

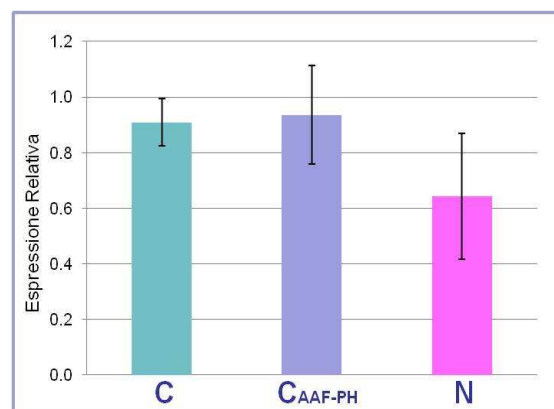


Fig. 33 b Espressione media per l'isoforma  $\text{THR}\alpha_1$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente (media $\pm$ St.Dev)

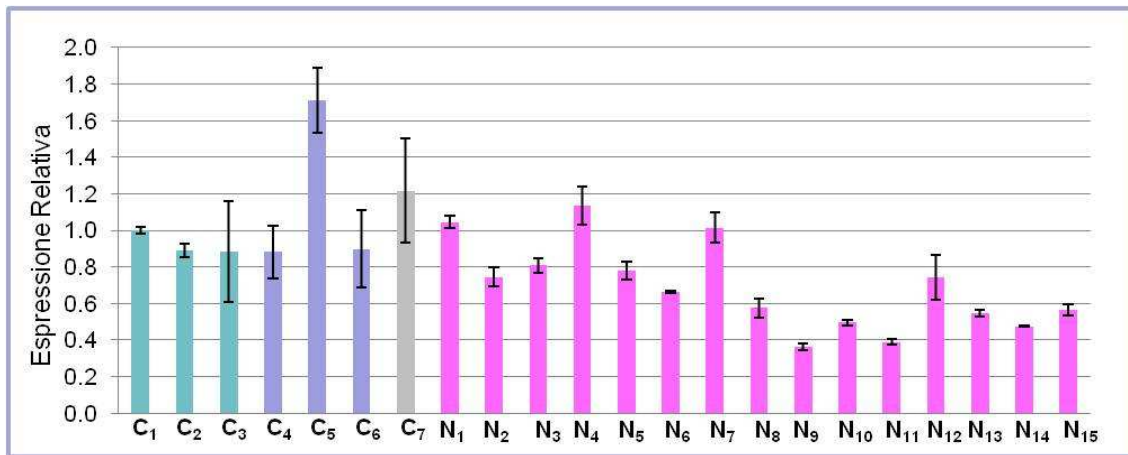


Fig. 34 a Espressione dell'mRNA per l' isoforma  $THR\alpha_2$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente. C1-C3: controlli assoluti (C1, controllo-calibratore); C4-C6: controlli AAF-PH; C7: controllo calibratore utilizzato nelle analisi su HCC; N1-N15: Noduli preneoplastici GSTP+/CK19+.

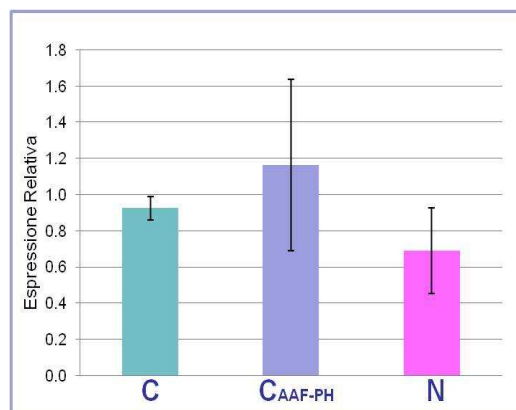


Fig. 34 b Espressione media per l' isoforma  $THR\alpha_2$  in noduli preneoplastici generati col modello dell'Epatocita Resistente (media $\pm$ St.Dev)

Complessivamente l'analisi dell' espressione del gene  $THR\beta$  nelle lesioni preneoplastiche a 10 settimane ha rivelato una significativa riduzione della sua espressione, mentre l'espressione del gene  $THR\alpha$  non e' risultata significativamente modificata. La perdita di espressione delle isoforme  $THR\beta$ , già osservata negli HCC analizzati, e' pertanto un evento che si verifica nelle fasi precoci dello sviluppo tumorale nel modello dell'Epatocita Resistente. Al contrario, la perdita di espressione delle isoforme  $\alpha$ , pure osservate negli HCC, appaiono

essere un evento più tardivo. E' pertanto possibile che la perdita progressiva dell'espressione del gene  $THR\beta$  abbia un ruolo significativo nello sviluppo dell' HCC nel modello dell'Epatocita Resistente.

Per indagare i meccanismi responsabili della perdita dell'espressione dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  durante lo sviluppo tumorale nel modello dell'Epatocita Resistente abbiamo effettuato l' analisi dello stato di metilazione delle isole CpG presenti nella regione promotrice dei geni che codificano per il recettore degli ormoni tiroidei.

E' stato descritto per diversi tumori umani caratterizzati dalla perdita di espressione dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$ , quali il carcinoma della mammella e alcuni tumori della tiroide, che il meccanismo responsabile del silenziamento genico osservato e' costituito dalla metilazione delle isole CpG dei promotori dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  (Biju J, 2007, Yaqin L, 2010).

Abbiamo perciò deciso di determinare se lo stesso meccanismo di silenziamento genico, cioè la metilazione delle isole CpG, sia attivo anche negli HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber.

E' stato quindi analizzato attraverso Methylation Specific PCR (MSP) lo stato di metilazione delle isole CpG dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  nel DNA proveniente da 20 HCC precedentemente sottoposti all'analisi di espressione genica.

I dati ottenuti hanno permesso di riscontrare la metilazione della regione promotrice del gene  $THR\beta$  in un solo campione su 20 HCC analizzati (5%) e in nessuno dei campioni osservati per quanto riguarda il gene  $THR\alpha$  (Fig. 34). E' interessante osservare che l'HCC in cui e' stata rilevata la metilazione dell'isola

CpG del gene  $THR\beta$ , identificato dalla sigla T11, tra gli HCC analizzati e' quello che presenta la piu' bassa espressione del gene (Fig 35, Fig 23).

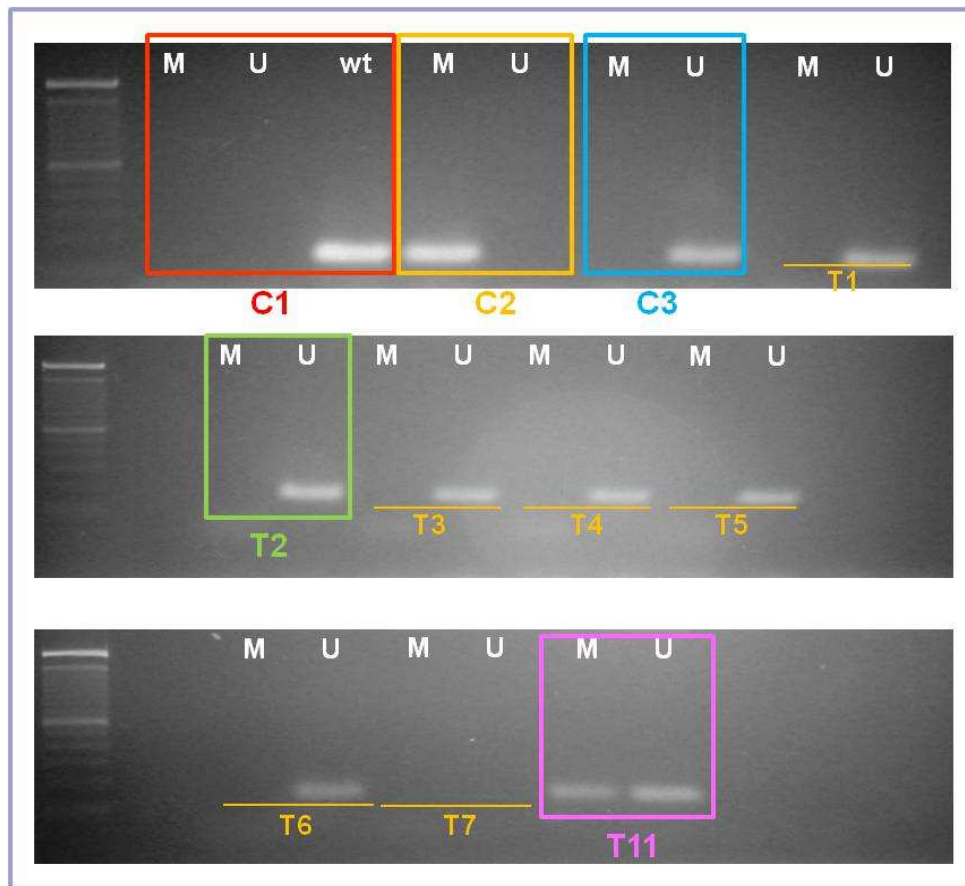


Fig. 35 Gel rappresentativo i dati ottenuti mediante MSP. C1 controllo non trattato; C2 controllo positivo (metilato); C3 controllo negativo (non metilato); T1-T11 tumori: T2 esempio in cui il campione presenta assenza di metilazione della regione promotrice del gene, T11 esempio in cui il campione presenta metilazione incompleta della regione promotrice del gene.

Complessivamente, gli studi di metilazione hanno dimostrato che la metilazione delle isole CpG dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  non rappresenta, se non in minima parte, il meccanismo responsabile della perdita di espressione dei geni  $THR\alpha$  e  $THR\beta$  comunemente osservata negli HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber. Altri meccanismi, ancora da determinare, sono perciò responsabili del

silenziamento dei geni codificanti il recettore per gli ormoni tiroidei negli HCC generati nel ratto mediante il protocollo di Solt-Farber. A questo proposito sarebbe interessante investigare un eventuale ruolo dei microRNA nel silenziamento dei geni THR $\alpha$  e THR $\beta$ .

Nel complesso, il nostro studio ha dimostrato che gli HCC generati attraverso il protocollo di Solt-Farber sono caratterizzati dalla perdita di espressione dei geni THR $\alpha$  e THR $\beta$ . In particolare la perdita di espressione del gene THR $\beta$  e' un evento precoce, osservabile allo stadio di lesione preneoplastica, e quindi potenzialmente rilevante nello sviluppo dell'HCC. Gli HCC da noi studiati sono molto simili da un punto di vista molecolare ad un sottotipo di HCC umano dalla prognosi particolarmente sfavorevole. Sarebbe perciò utile indagare, anche nella prospettiva di eventuali applicazioni terapeutiche, se anche i tumori umani di questo sottotipo siano caratterizzati dalla parziale perdita di espressione dei geni THR $\alpha$  e THR $\beta$ .

## ***Bibliografia***



Andersen JB, Loi R, Perra A, Factor VM, Ledda-Columbano GM, Columbano A, Thorgeirsson SS, *Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat*, Hepatology. 2010;51(4):1401-9

Ando S, Sarlis NJ, Oldfield EH, Yen PM. *Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor*. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 5572–5576

Apriletti JW, Ribeiro RC, Wagner RL, Feng W, Webb P, Kushner PJ et al. *Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors*. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl 1998; 25: S2–S11

Aranda A and Pascual A, *Nuclear hormone receptor and gene expression*, Physiological Reviews 2001; Vol. 81

Aravalli RN, Steer CJ, Cressman ENK, *Molecular mechanism of hepatocellular carcinoma*, Hepatology 2008;48:2047-2063

Baba M, Yamamoto R, Iishi H, Tatsuta M, *Ha-ras mutations in N-nitrosomorpholine-induced lesions and inhibition of hepatocarcinogenesis by antisense sequences in rat liver*, Int J Cancer. 1997 Sep 4;72(5):815-20

Bai F, Nakanishi Y, Takayama K, Pei XH, Inoue K, Harada T, Izumi M, Hara N, *Codon 64 of K-ras gene mutation pattern in hepatocellular carcinomas induced by bleomycin and 1-nitropyrene in A/J mice*, Teratog Carcinog Mutagen. 2003;Suppl 1:161-70

Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai S, Tsai MJ, O'Malley BW, *Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Oct 1;90(19):8832-6

Barlow C, Meister B, Lardelli M, Lendahl U, Vennstrom B. *Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA*. EMBO J 1994; 13: 4241–4250

Becker PB and Horz W, *ATP-dependent nucleosome remodeling*, Annu Rev Biochem. 2002;71:247-73

Belandia B, Latasa MJ, Villa A, Pascual A, *Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene*, J Biol Chem. 1998 Nov 13;273(46):30366-71

Bestor TH, *Transposons reanimated in mice*, Cell. 2005 Aug 12;122(3):322-5

Bird AP, *CpG-rich island and the function of DNA methylation*, Nature. 1986 May 15-21;321(6067):209-13

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R, *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*, Gastroenterology 2004;127:S5-S16

Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M, *Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa*, Nature. 1991 Apr 4;350(6317):429-31

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ, *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*, N Engl J Med. 2003 Apr 24;348(17):1625-38

Challen C, Guo K, Collier JD, Cavanagh D, Bassendine MF, *Infrequent point mutations in codons 12 and 61 of ras oncogenes in human hepatocellular carcinomas*, J Hepatol. 1992 Mar;14(2-3):342-6

Chan IH and Privalsky ML. *Thyroid hormone receptors mutated in liver cancer function as distorted antimorphs*. Oncogene 2006; 25, 3576–3588

Chassande O, A. Fraichard, K. Gauthier, F. Flamant, C. Legrand, P. Savatier, V. Laudet, and J. Samarut, *Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities*, Mol. Endocrinol. 1997; 11:1278–290

Cheng SY *Thyroid hormone receptor mutations in cancer*. Mol Cell Endocrinol 2003; 213:23–30

Cheng SY, Leonard JL and Davis PJ, *Molecular aspects of thyroid hormone actions*, Endocrine Reviews 2010; 31(2):139-170

Chevret S, Trinchet JC, Mathieu D, Rached A, Beaugrand M and Chastang C, *A new prognostic classification for predicting survival in patients with hepatocellular carcinoma*, J Hepatol. 1999; 31:133-141

Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF, Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1, *Science* 1997;277:1996-2000

Costello JF and Plass C, *Methylation matters*, *J Med Genet* 2001;38:285-303

D'Errico A, Baccharini P, Fiorentino M, Ceccarelli C, Bonazzi C, Ponzetto A, Scoazec JY, Mancini AM, Grigioni WF, *Histogenesis of primary liver carcinomas: strengths and weaknesses of cytokeratin profile and albumin mRNA detection*, *Hum Pathol.* 1996 Jun;27(6):599-604

Di Bisceglie AM, *Hepatitis C and hepatocellular carcinoma*, *Hepatology* 1997; 26(3 Suppl 1):34S-38S

Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G, *Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women*, *Am J Epidemiol.* 2002;155(4):323-31

Dragani T, *Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics*, *Journal of Hepatology* 2010;52:252-257

Eckey M, Moehren U and Baniahmad A, *Gene silencing by the thyroid hormone receptor*, *Mol. and Cell. Endocr.* 2003; 213:13-22

El-Serag HB, *Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view*, J Clin Gastroenterol 2002;35(Suppl. 2):S72-S78

Elzouki AN, Eriksson S, *Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ): is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma?*, Eur J Gastroenterol Hepatol. 1996;8(10):989-94

Enomoto K, Farber E, *Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis*. Cancer Res 1982; 42:2330-2335

Esteller M, *Epigenetics in cancer*, N Engl J Med, 2008;358:1148-1159

Evans RM, *The steroid and thyroid hormone receptors superfamily*. Science, 240: 889-895, 1988

Fairbanks KD, Tavill AS, *Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review*, Am J Gastroenterol. 2008;103(8):2136-41; quiz 2142

Forrest D, Sjoberg M, Vennstrom B, *Contrasting developmental and tissue-specific expression of  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor genes*. EMBO J 1990; 9:1519–1528

Forrest D, Hallbook F, Persson H and Vennstrom B, *Distinct functions for thyroid hormone receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in brain development indicated by differential expression of receptor genes*. EMBO J 1991; 10:269–275

Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, Curran T  
*Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor 1: evidence for tissue-specific modulation of receptor function.* EMBO J 1996; 15:3006–3015

Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedingier M, Malaval L, Rousset B, Samarut J *The T3R gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production.* EMBO J 1997; 16:4412–4420

Garner RC, Miller EC, Miller JA, *Liver microsomal metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530,* Cancer Res. 1972;32(10):2058-66

Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J, *Different functions for the thyroid hormone receptors TR and TR1 in the control of thyroid hormone production and post-natal development.* EMBO J 1999; 18:623–631

Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O, *Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor locus.* Mol Cell Biol 2001; 21:4748–4760

Gonzalez-Sancho JM, Garcia V, Bonilla F and Muñoz A, *Thyroid hormone receptor/THR genes in human cancer*, Cancer Letters 2003; 192:121-132

Greenspan FS, *The thyroid gland. Basic, clinical endocrinology*. 1997; 5<sup>th</sup> ed. Stamford, CT: Appleton, Lange; 192-262

Grisham JV, *Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications for cancer risk assessment*, Carcinogenesis 1996;18(1): pp.59-81

Gullberg H, Rudling M, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B *Thyroid hormone receptor  $\beta$ -deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol*. Mol Endocrinol 2000; 14:1739–1749

Hadzic E, Desai-Yajnik V, Helmer E, Guo S, Wu S, Koudinova N, Casanova J, Raaka BM, Samuels HH, *A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB*, Mol Cell Biol. 1995 Aug;15(8):4507-17

Harvey CB, J H D Bassett, P Maruvada, P M Yen and G R Williams. *The Rat Thyroid Hormone Receptor (TR) 3 Displays Cell-, TR Isoform-, and Thyroid Hormone Response Element-Specific Actions*. Endocrinology 2007; 148(4):1764–1773

Herbst A, Kolligs FT, *Wnt signaling as a therapeutic target for cancer*, Methods Mol Biol. 2007;361:63-91

Herman JG, Baylin SB, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*, N Engl J Med 2003;349:2042-54

Higgins GM, Anderson RM. *Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the rat following partial surgical removal*. Arch. Pathol. 1931;12:186-202

Hodin RA, Lazar MA, Chin WW *Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone*. J Clin Invest 1990; 85:101–105

Holliday R, *The inheritance of epigenetic defect*, Science 1987;238:163-70

Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. *Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas*, Nature 1991;350:427-428

Hu X and Lazar MA, *The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors*, Nature. 1999 Nov 4;402(6757):93-6

Hussain K, El-Serag HB, *Epidemiology, screening, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma* Minerva Gastroenterol Dietol, 2009;55:123-38



Johansson C, Gothe S, Forrest D, Vennstrom B, Thoren P *Cardiovascular phenotype and temperature control in mice lacking thyroid hormone receptor-  $\beta$  or both  $\alpha 1$  and  $\beta$* . Am J Physiol 1999; 276:H2006–H2012

Jones PA and Laird PW. 1999. Cancer epigenetics comes of age. Nat. Genet. 21:163-167

Jones PA and Baylin SB. 2002. the fundamental role of epigenetics events in cancer. Nat Rev Genet 3:415-428

Kamiya Y, Puzianowska-Kuznicka M, McPhie P, Nauman J, Cheng SY, Nauman A. *Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma*. Carcinogenesis 2002; 23: 25–33

Karpf AR, Matsui S, *Genetic distribution of cytosine DNA methyltransferase enzyme induced chromosomal instability in human cancer cells*, Cancer Res 2005;65:8635-9

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, et al. *Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus*, Hepatology. 1990 Oct;12(4 Pt 1):671-5

Koenig RJ, Warne RL, Brent GA, Harney JW, Larsen PR, Moore DD, *Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(14):5031-5

Kowdley KV, *Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma*, Gastroenterology. 2004;127(5 Suppl 1):S79-86

Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C, *Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis*, Oncogene 2006 Jun 26;25(27):3823-33

La Vecchia C, *Alcohol and liver cancer*, Eur J Cancer Prev. 2007;16(6):495-7

Laurent-Puig P and Zucman-Rossi J, *Genetics of hepatocellular tumors*, Oncogene 2006 Jun 26;25(27):3778-86

Lazar M A, Hodin R A, Darling D S and Chin W W. *Identification of a rat c-erbA alpha-related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone*. Mol. Endocrinol. 1988; 2:893–901

Lazar M A, *Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities*, Endocr. Rev. 1993;14:184–193

Ledda-Columbano GM, Perra A, Loi R, Shinozuka H, and Columbano A. *Cell Proliferation Induced by Triiodothyronine in Rat Liver Is Associated with Nodule Regression and Reduction of Hepatocellular Carcinomas*, Cancer Research 2000; 60, 603–609, Feb. 1

Ledda-Columbano GM, Perra A, Piga R, Pibiri M, Loi R, Shinozuka H and Columbano A. *Cell Proliferation induced by 3-3',5-triiodo-L-thyronine is associated with a reduction in the number of preneoplastic hepatic lesions.* Carcinogenesis 1999; 20 (12):2299-2304

Lee KL, Sun SC, and Miller O. Stimulation of incorporation by triiodothyronine of thymidine-methyl-3H into hepatic DNA of the rat. Arch Biochem. Biophys. 125:751-757, 1968

Lee JS, Thorgeirsson SS, *Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets,* Gastroenterology 2004;127:S51-S55

Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, et al. *A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells.* Nat Med 2006;12:410-416.

Li J, Lin Q, Wang W, Wade P, Wong J, *Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression,* Genes Dev. 2002 Mar 15;16(6):687-92

Liao Y, Tang ZY, Liu KD, Ye SL, Huang Z, *Apoptosis of human BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells released by antisense H-ras DNA--in vitro and in vivo studies,* J Cancer Res Clin Oncol. 1997;123(1):25-33

Lin KH, Zhu XG, Shieh HY, Hsu HC, Chen ST, McPhie P, Cheng SY, *Identification of naturally occurring dominant negative mutants of thyroid hormone alpha 1 and beta 1 receptors in a human hepatocellular carcinoma cell line*, *Endocrinology*. 1996 Oct;137(10):4073-81

Lin KH, Zhu XG, Hsu HC, Chen SL, Shieh HY, Chen ST et al. *Dominant negative activity of mutant thyroid hormone alpha1 receptors from patients with hepatocellular carcinoma*. *Endocrinology* 1997; 138(12): 5308–15

Lin KH, Shieh HY, Chen SL, Hsu HC. *Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells*. *Mol Carcinog* 1999; 26(1): 53–61

Lin KH, Wu YH, Chen SL. *Impaired interaction of mutant thyroid hormone receptors associated with human hepatocellular carcinoma with transcriptional coregulators*. *Endocrinology* 2001; 142(2): 653–62

Llovet JM, Beaugrand M, *Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects* *Journal of Hepatology* 38 (2003) S136-S149

Mack GS, *Epigenetics cancer therapy makes headway*, *J Natl Cancer Inst*. 2006 Oct 18;98(20):1443-4

Mai W, Janier MF, Allioli N, Quignodon L, Chuzel T, Flamant F, Samarut J *Thyroid hormone receptor is a molecular switch of cardiac function between fetal and postnatal life*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:10332–10337

Makowski A, Brzostek S, Cohen RN, Hollenberg AN, *Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor*, Mol Endocrinol. 2003 Feb;17(2):273-86

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich, P, Schutz, G, *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell 83:835, 839, 1995

McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BV, *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*, Endocr Rev. 1999 Jun;20(3):321-44

McKenna NJ, O'Malley BV, *Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators*, Cell. 2002 Feb 22;108(4):465-74.

Merle P, Kim M, Herrmann M, Gupte A, Lefrançois L, Califano S, Trépo C, Tanaka S, Vitvitski L, de la Monte S, Wands JR, *Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma*, J Hepatol. 2005 Nov;43(5):854-62

Mitsuhashi T, Tennyson G E and Nikodem V M. *Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:5804–5808

Monk M, Boubelik M, Lehnert S, *Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development*, Development. 1987 Mar;99(3):371-82

Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM, *Alcohol and hepatocellular carcinoma*, Gastroenterology. 2004;127(5 Suppl 1):S87-96

Nan X, Cross S, Bird A, *Gene silencing by methyl-CpGbinding-binding proteins*. Novartis Found Symp 1998;214:6-16, discussion 16-21, 46-50

Naugler WE, Schwartz JM, *Hepatocellular Carcinoma*, Dis Mon. 2008 Jul;54(7):432-44

Nussbaum T, Samarin J, Ehemann V, Bissinger M, Ryschich E, Khamidjanov A, Yu X, Gretz N, Schirmacher P, Breuhahn K, *Autocrine Insulin-like Growth Factor-II Stimulation of Tumor Cell Migration Is a Progression Step in Human Hepatocarcinogenesis*, Hepatology 2008;48:146-156

O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, Williams GR *A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone*. Mol Endocrinol 2003; 17:1410–1424

O'Shea PJ, Bassett JH, Sriskantharajah S, Ying H, Cheng SY, Williams GR *Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  or  $\beta$* . Mol Endocrinol 2005; 19:3045–3059

Ohashi H, Yang YF, Walfish PG, *Rat liver c-erb A beta 1 thyroid hormone receptor is a constitutive activator in yeast (Saccharomyces cerevisiae): essential role of*

*domains D,E and F in hormone-independent transcription*, Biochem Biophys Res Commun. 1991 Aug 15;178(3):1167-75

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E, *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development*, Cell 1999;99:247-57

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Strait KA, *The molecular basis of thyroid hormone action*. 1996 In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *The thyroid: a fundamental and clinical text*. New York: Lippincott-Raven; 162-184

Perra A, Kowalik MA, Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Columbano A, *Thyroid hormone receptor ligands induce regression of rat preneoplastic liver lesions causing their reversion to a differentiated phenotype*.

Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J, Chassande O *Functional interference between thyroid hormone receptor  $\alpha$ (TR $\alpha$ ) and natural truncated TR $\Delta\alpha$  isoforms in the control of intestine development*. Mol Cell Biol 2001; 21:4761–4772

Puzianowska-Kuznicka M, Krystyniak A, Madej A, Cheng SY, Nauman J. *Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer*. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:1120–1128

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. *The JAK/STAT signaling pathway*, J Cell Sci. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1281-3

Refetoff S. *Resistance to thyroid hormone*. Clin Lab Med 1993; 13: 563–581

Riggs AD, Martienssen RA and Russo VEA. 1996. Introduction. In Epigenetic mechanisms of gene regulation (ed. VEA Russo et al.) pp1-4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Rosenfeld MG and Glass CK, *Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors*, J Biol Chem. 2001 Oct 5;276(40):36865-8

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB, *DNMT1 bind HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci*, Nat Genet 2000;25:269-77

Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H and Vennstrom B. *The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone*. Nature 1986; 324:635–640

Scott CR, *The genetic tyrosinemias*, Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2006;142C(2):121-6

Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK, *Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence*, Nature. 2005 Jun 30;435(7046):1262-6



Shi Y, Downes M, Xie W, Kao HY, Ordentlich P, Tsai CC, Hon M, Evans RM, *Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation*, Genes Dev. 2001 May 1;15(9):1140-51

Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW, *Molecular biology of thyrotropin*, Endocr. Rev. 10:459-475, 1989

Sjoberg M, Vennstrom B, Forrest D *Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for and N-terminal variant receptors*. Development 1992; 114:39-47

Sohn YC, Kim SW, Lee S, Kong YY, Na DS, Lee SK, Lee JW, *Dynamic inhibition of nuclear receptor activation by corepressor binding*, Mol Endocrinol. 2003 Mar;17(3):366-72. Epub 2002 Dec 18

Solt DF, *New principle for analysis of liver carcinogenesis*. Am J Pathol 1976; 88, 595-618

Stewart HLW, Keysser G, Lombard CH, Montali LS, *Institute of Laboratory Animal Resources: Histological typing of liver tumors of the rat*. Journal of National Cancer Institute 1980; 64, 179-206

Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA, Liu W, *Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*, Oncogene. 2002 Jul 18;21(31):4863-71

Tenbaum S, Baniahmad A. *Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease*. Int J Biochem Cell Biol 1997; 29:1325–1341

Terris B, Pineau P, Bregeaud L, Valla D, Belghiti J, Tiollais P, Degott C, Dejean A, *Close correlation between b-catenin gene alterations and nuclear accumulation of the protein in human hepatocellular carcinomas*, Oncogene 1999; 18:6583-6588

Thorgeirsson SS, Grisham JW, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*, Nat Genet. 2002 Aug;31(4):339-46

Thormeyer D, Baniahmad A, *The v-erbA oncogene*. Int J Mol Med 1999;4:351–358

Trevisani F, De NS, Rapaccini G, Farinati F, Benvegnù L, Zoli M, Grazi GL, Del PP, Di N, Bernardi M, *Semiannual and annual surveillance of cirrhotic patients for hepatocellular carcinoma: effects on cancer stage and patient survival (Italian experience)*, Am J Gastroenterol. 2002 Mar;97(3):734-44

Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, Bernardi M, *Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma*, Carcinogenesis, vol.29 no.7 pp. 1299-1305, 2008

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*, Nat Genet 2007;39:457-66

Weinberger C, Thompson C C, Ong E S, Lebo R, Gruol D J and Evans R M. *The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor*. Nature 1986; 324:641–646

Werner M, Almer S, Prytz H, Lindgren S, Wallerstedt S, Björnsson E, Bergquist A, Sandberg-Gertzén H, Hultcrantz R, Sangfelt P, Weiland O, Danielsson A, *Hepatic and extrahepatic malignancies in autoimmune hepatitis. A long-term follow-up in 473 Swedish patients*, J Hepatol. 2009 Feb;50(2):388-93

Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thoren P, Vennstrom B *Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor  $\alpha 1$* . EMBO J 1998; 17:455–461

Williams GR, Harney JW, Forman BM, Samuels HH, Brent GA, *Oligomeric binding of T3 receptor is required for maximal T3 response*, J Biol Chem. 1991 Oct 15;266(29):19636-44

Williams GR, *Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor isoforms*. Mol Cell Biol 2000; 20(22):8329–8342

Winter WE, Signorino MR. *Review: molecular thyroidology*. Ann Clin Lab Sci 2001; 31:221–244

Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Côté J, Wang W, *NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities*, Mol Cell. 1998 Dec;2(6):851-61

Yaqin L, Xiaoying X, Jie H, Xiaoling L, Xiaopin D, Xin L,, Xingxu Z. *Aberrant methylation of the THRB gene in tissue and plasma of breast cancer patients.* Cancer Genet Cytogenet 196: 140-145, 2010.

Yen PM, *Physiological and molecular basis of thyroid hormone action,* Physiological Reviews 2001; Vol. 81

Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, Inoue O, Yano M, Tanaka M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Kuroki T, Imazeki F, Yokosuka O, Kinoyama S, Yamada G, Omata M, *Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan,* Ann Intern Med. 1999 Aug 3;131(3):174-81

Yu MW and Chen CJ, *Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma,* Cancer Res. 1993; 53(4):790-4

Yu MW, Yang YC, Yang SY, Cheng SW, Liaw YF, Lin SM, Chen CJ, *Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men,* J Natl Cancer Inst. 2001; 93(21):1644-51

Yuen MF, Cheng CC, Lauder IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL, *Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience,* Hepatology. 2000 Feb;31(2):330-5

Zhang XK, Kahl M, *Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors,* Trends Endocrinol Metab. 1993 Jul;4(5):156-62

Zhao LJ, Wang L, Ren H, Cao J, Li L, Ke JS, Qi ZT, *Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors*, Exp Cell Res. 2005 Apr 15;305(1):23-32