



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

INDIRIZZO IN EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI

Responsabile di Indirizzo: Prof.ssa Rosa Maria Pascale

XXVII CICLO

**Ruolo oncogeno della subunità catalitica p110
della fosfoinositide-3-cinasi (PI3KCA) durante la
progressione del carcinoma epatocellulare in
modelli sperimentali murini e la sua importanza
terapeutica**

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof.ssa Maria Maddalena Simile

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Elena Visco

Anno Accademico 2013 – 2014

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2011/2012 – XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1

INDICE

SEZIONE COMPILATIVA

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e principali fattori di rischio	4
2. Cancerogenesi epatica multifasica	12
3. Via di trasduzione del segnale PI3K/AKT/mTOR	15
4. Isoforme PI3K	24
5. Principali mutazioni di PIK3CA e suo ruolo nella cancerogenesi	28
6. Metodica di trasferimento genico idrodinamico “Hydrodynamic Gene Delivery”	31

SEZIONE SPERIMENTALE

1. Introduzione	36
2. Materiali e Metodi	
2.1. <i>Costrutti e reagenti, iniezione idrodinamica</i>	40
2.2. <i>Istologia ed immunoistochimica</i>	41
2.3. <i>Analisi Microarray</i>	42
2.4. <i>Estrazione delle proteine ed analisi Western Blot</i>	44
3. Risultati	
3.1. <i>L'iperespressione di PIK3CA-E545K induce lo sviluppo di carcinomi epatocellulari nel topo</i>	46
3.2. <i>L'analisi microarray ha consentito l'identificazione dei bersagli di PIK3CA mutato nelle lesioni epatiche murine</i>	50
3.3. <i>Conferma di alcuni dei bersagli di PIK3CA mutato identificati con analisi microarray attraverso immunoistochimica e analisi Western blot</i>	55
4. Discussione	60
Bibliografia	63

SEZIONE COMPILATIVA

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e principali fattori di rischio

Il carcinoma epatocellulare (CE o HCC, Hepato Cellular Carcinoma) è una delle più comuni e letali neoplasie maligne al mondo. Il decorso del CE è rapidamente fatale, nella maggior parte dei casi è caratterizzato da una breve aspettativa di vita, circa 6 mesi dal momento della sua diagnosi (1). Per tale motivo è evidente come le neoplasie primitive del fegato costituiscano un importante problema sanitario nei Paesi sviluppati, nei quali si conta più dell'80% dei casi mondiali totali, con oltre 600.000 nuovi casi ogni anno. L'incidenza del CE mostra notevoli differenze legate all'età, al sesso, al gruppo etnico e alla regione geografica. I più alti tassi di incidenza si registrano in Cina (55% del totale mondiale), Giappone, Sud-Est Asiatico e Africa sub-Sahariana, regioni in cui le infezioni da virus dell'epatite B (HBV) e dell'epatite C (HCV) sono endemiche, e nelle regioni dove il consumo di cibo contaminato dalla aflatossina B1 (cancerogeno naturale prodotto dal fungo *Aspergillus Flavus*) è alto (2,3). L'incidenza del carcinoma epatocellulare è in costante ed allarmante aumento, anche nei paesi con incidenza relativamente bassa, soprattutto nel Sud e nell'Europa Occidentale, dove una sempre maggiore percentuale di casi è, invece, legata al consumo cronico di alcol. A prescindere dalla causa di origine, la cirrosi è il principale fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare. Circa l'80% dei pazienti, a cui viene diagnosticato un CE, è affetto da una preesistente cirrosi, le cui principali cause risiedono nell'abuso alcolico e nelle epatiti croniche da virus B e C (4).

Alla maggiore incidenza di CE, si ritiene inoltre che possano contribuire altri fattori di rischio, come l'enorme aumento nella popolazione sia dell'obesità che del diabete, del fumo di sigaretta, l'uso di steroidi contraccettivi e di androgeni anabolizzanti (5). Esistono

molti istotipi di tumori primitivi del fegato, tra cui l'*epatocarcinoma*, il *colangiocarcinoma*, il *cistadenocarcinoma*, l'*epatoblastoma* e l'*emangiosarcoma* (6). L'*epatocarcinoma*, rappresenta più dell'80% dei tumori del fegato primitivi ed è una delle cause più comuni di morte per cancro in tutto il mondo. Risulta essere infatti il terzo tumore più comune negli uomini e il sesto nelle donne, con un rapporto M/F che va da 1.3 a 12.9 in relazione all'area geografica (7). Un forte impatto sulla riduzione dell'incidenza del carcinoma epatocellulare potrebbe essere dato dai programmi di vaccinazione contro il virus dell'epatite B (HBV), dallo screening, dai trattamenti antivirali delle infezioni da virus dell'epatite C (HCV), oltre che dalla lotta all'alcolismo.

Le opzioni terapeutiche dipendono dalle caratteristiche del tumore (sede, estensione, metastasi) e dalla presenza concomitante di cirrosi o di altre malattie del fegato. Ad oggi, le uniche terapie curative sono l'asportazione chirurgica (resezione) parziale e il trapianto di fegato; nei casi in cui il tumore non sia operabile o non sia possibile un trapianto, si ricorre a trattamenti palliativi. Tra questi vi sono l'ablazione percutanea (termoablazione e alcolizzazione), la chemioterapia sistemica o locale, la chemioembolizzazione e, più raramente, la radioterapia (8). Negli ultimi decenni, un gran numero di farmaci citotossici è stato testato in monoterapia o in combinazione; tuttavia, a causa della chemio-resistenza dell'*epatocarcinoma*, pochi agenti hanno evidenziato tassi di risposta superiori al 20% e pertanto sono poco impiegati nella pratica clinica (9). Il sorafenib, un inibitore orale multi-chinasico, è l'unico farmaco approvato per il trattamento del CE; tuttavia mostra un'efficacia limitata, prolungando la sopravvivenza media di pochi mesi rispetto al trattamento con placebo.

La limitata attività anti-neoplastica del Sorafenib è probabilmente dovuta all'attivazione di vie alternative di promozione della sopravvivenza da parte delle cellule tumorali epatiche (9, 10).

In base a queste evidenze cliniche, è pertanto necessaria una conoscenza più approfondita della patogenesi molecolare dell'epatocarcinoma, al fine di identificare nuovi bersagli terapeutici e marcatori prognostici, per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento di questa condizione patologica (11).

Lo sviluppo del CE è un processo multifasico, a lenta evoluzione, che può essere innescato da diversi fattori eziologici, quali l'infezione da virus dell'epatite B (HBV), da virus dell'epatite C (HCV), dall'alcool, da sostanze cancerogene che, direttamente o indirettamente (tramite stress ossidativo), sono in grado di indurre danni al DNA nelle cellule epatiche, con progressivo accumulo di alterazioni genetiche che causano la crescita aberrante e la trasformazione maligna delle cellule parenchimali del fegato (12).

Studi epidemiologici hanno mostrato che il virus dell'epatite B (HBV) infetta circa 2 miliardi di persone in tutto il mondo con 320.000 morti ogni anno. Circa il 30-50% dei decessi per CE sono attribuibili all'infezione cronica da HBV; la neoplasia compare dopo un periodo di 25-30 anni di infezione cronica, generalmente, in fegati cirrotici (13,14).

L'HBV è un virus epatotropico a DNA a doppio filamento, appartenente alla famiglia degli Hepadnaviridae. Il suo genoma codifica diverse proteine virali, essenziali per il suo ciclo vitale, che includono una DNA polimerasi trascrittasi inversa (pol), una proteina del capsido, nota come antigene core del virus B (HBcAg), e proteine dell'envelope. HBV codifica anche una serie di proteine le cui funzioni non sono ancora del tutto note, come la proteina HBx. L'integrazione del genoma virale, all'interno della cellula infettata, avviene

solitamente in prossimità di specifici geni del genoma dell'ospite, coinvolti nel controllo della crescita e dei segnali cellulari come ad esempio TERT (telomerasi trascritti in inversa), PDGFR (recettore per il fattore di crescita piastrinico), o MAPK1 (proteina chinasi 1 mitogeno attivata), inducendo instabilità cromosomica, riarrangiamenti o delezioni (15). La proteina HBx mediante attivazione trascrizionale può alterare l'espressione di geni di controllo della crescita, come le tirosin-chinasi SRC, Ras, Raf, MAPK (ERK, JNK) e altri (16).

HBx, inoltre, si lega al gene oncosoppressore p53, interferendo probabilmente con la sua attività di inibizione della crescita, favorendo la proliferazione e la sopravvivenza cellulare e compromettendo i normali controlli del ciclo cellulare. Pertanto HBV è in grado di sviluppare un'infezione cronica attiva, dove gli epatociti vanno incontro a cicli sostenuti di necrosi, infiammazione e rigenerazione che portano a cirrosi, aumento del turnover cellulare e alterazioni genetiche come riarrangiamenti cromosomici, attivazione di oncogeni e inattivazione di oncosoppressori, e quindi alla progressione del danno epatico con sviluppo del CE.

Un altro importante fattore di rischio per lo sviluppo del CE è l'infezione da virus dell'epatite C (HCV). L'HCV infetta circa 170 milioni di persone in tutto il mondo. Il 20% dei casi circa di HCV cronica sviluppano cirrosi epatica, e il 2,5% di questi sviluppano il CE, soprattutto nei paesi Occidentali e in Giappone dove il tasso di incidenza varia dall'1 al 3% dopo 30 anni dall'infezione (13,14). L'HCV è un virus ad RNA positivo, della famiglia Flaviviridae. Questo virus è in grado di indurre epatocancerogenesi con una frequenza di 10-20 volte più alta rispetto a quella da virus B. HCV causa CE tramite meccanismi indiretti attraverso l'infiammazione cronica, la morte cellulare, accompagnata

da proliferazione, e cirrosi. Recentemente è stato dimostrato che la proteina virale core interagisce direttamente con vie di segnale appartenenti alla famiglia delle MAPK (ERK, MEK e Raf) modulando la proliferazione cellulare e contribuendo alla trasformazione neoplastica delle cellule infette (17). Lo stress ossidativo, attraverso l'elevata produzione di specie reattive tossiche dell'ossigeno (ROS), sembra rappresentare una caratteristica peculiare del danno epatico in seguito ad infezione da HCV ed avere un ruolo chiave nell'inizio e nella progressione degli eventi di cancerogenesi (18). La risposta immunitaria innescata dal virus conduce gli epatociti a morte cellulare e a cicli continui di rigenerazione. Questo fornisce un contesto per l'accumulo e la propagazione di mutazioni, ed induzione di stress ossidativo cronico, con possibile effetto mutageno sul DNA, promuovendo la generazione di fibrosi e cirrosi. Ambiente e stile di vita contribuiscono in maniera decisiva allo sviluppo della patologia (19). Inoltre, si è osservato che individui infettati da HBV ed esposti allo stesso tempo alle aflatossine, micotossine naturalmente presenti, hanno un rischio ancora più elevato di andare incontro allo sviluppo di cancro al fegato, suggerendo un effetto sinergico tra HBV e aflatossina (20).

Le aflatossine crescono su un gran numero di substrati tra cui cereali, mais, arachidi e fagioli di soia fermentati; si producono in condizioni di alta umidità in alcune parti dell'Africa sub-sahariana e in Asia orientale. In queste zone, dove l'ingestione di alimenti contaminati da aflatossine è comune, i tassi di incidenza di CE tendono ad essere alti, molto probabilmente a causa di una mutazione indotta sul gene oncosoppressore p53, mutazione trovata nel 30-60% di tutti i carcinomi epatocellulari in queste aree geografiche. Le mutazioni a livello di p53 possono verificarsi già nelle prime fasi del tumore o nelle fasi più avanzate, a seconda dell'esposizione all'AFB1. Anche l'abuso di alcool (50-70

g/giorno) insieme all'esistenza di uno o più fattori di rischio, promuove attivamente la cirrosi e quindi il rischio di sviluppare il CE.

Oltre ai fattori eziologici già descritti, se pur con frequenza più bassa, sono stati identificati altri fattori di rischio tra cui:

- L'utilizzo prolungato di contraccettivi orali;
- Alcuni disturbi metabolici, quali l'emacromatosi ereditaria, associata ad un aumentato assorbimento di ferro da parte delle cellule del fegato e conseguenti danni epatocellulari; porfiria cutanea tarda, associata ad un'aumentata infiammazione, necrosi e fibrosi; deficit di α -1antitripsina, che comporta la comparsa negli epatociti di polimeri di antitripsina, provocando la morte degli epatociti e cirrosi; tirosinemia ereditaria, ovvero difetti nel metabolismo della tirosina che si traducono in metaboliti tossici nel fegato, con potenziale mutageno.
- Diabete; una più alta incidenza di CE è stata descritta in pazienti diabetici senza una precedente malattia epatica associata ad altri fattori. Questa predisposizione potrebbe riguardare l'insulino resistenza, con un aumento degli acidi grassi liberi nel fegato e l'accumulo di trigliceridi epatici (fegato grasso). Questo accumulo di lipidi intraepatico può portare a lesioni epatocellulari, apoptosi degli epatociti, induzione di citochine e generazione di radicali dell'ossigeno, a causa dell'ossidazione degli acidi grassi ed infine sviluppo di fibrosi.
- Steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e steatoepatite non alcolica (NASH) che contribuiscono allo sviluppo di fibrosi e cirrosi con possibile sviluppo di CE (13).

L'analisi molecolare del carcinoma epatocellulare umano ha mostrato diverse alterazioni genetiche ed epigenetiche indipendenti dall'eziologia, le più importanti sono rappresentate

da: alterazione funzionale dei punti di controllo del ciclo cellulare, alterazione nella regolazione di oncogeni e geni soppressori quali p53, pRB, membri della famiglia recettoriale ErbB, MET e il suo ligando, il fattore di crescita degli epatociti (HGF), p16INK4A, E-caderina e cicloossigenasi 2 (COX-2), attivazione della via di segnale WNT/ β -catenina, attraverso mutazioni a carico dei geni CTNNB1/ β -catenina, AXIN1 e AXIN2, perdita di eterozigosi del locus del gene “insulin-like growth factor 2 receptor” (IGFR2); attivazione della via di segnale Akt, accorciamento telomerico, etc.

P53 è un gene soppressore della crescita, mutato in circa il 50% dei tumori umani; agisce come un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare ed apoptosi, differenziamento, amplificazione genica, ricombinazione del DNA, segregazione cromosomica e senescenza cellulare. È ormai noto che un deficit funzionale del gene oncosoppressore p53 partecipi allo sviluppo del CE; tuttavia, se tale alterazione contribuisca all'avvio e o alla progressione della cancerogenesi epatica, rimane ancora oggetto di studio.

La via di segnale WNT è una delle principali cascate molecolari coinvolte nella cancerogenesi epatica umana; in tale via di segnale, la β -catenina svolge un ruolo centrale. La β -catenina è una componente della placca sub-membranosa di giunzioni aderenti e desmosomi in cellule di mammifero. È fisiologicamente coinvolta in due funzioni principali: l'adesione cellula-cellula per associazione con l'E-caderina, e nella trasmissione del segnale proliferativo della via WNT. Quando la cascata Wnt è attiva, le proteine poliposi adenomatosi coli (APC) ed Axin1 non sono più in grado di legare la β -catenina, la quale in questo modo viene destabilizzata e trasloca dal citoplasma al nucleo dove si associa con i fattori di trascrizione della famiglia Tcf. I fattori di trascrizione Tcf attivano

bersagli genici rilevanti nello sviluppo dei tumori come MYC, ciclina D1, COX2 e metalloproteasi della matrice di tipo 7. E' stato dimostrato che mutazioni dei geni associati al segnale Wnt/ β -catenina contribuiscono allo sviluppo di CE (13,14).

La famiglia dei recettori ad attività tirosin cinasica ErbB consiste di quattro membri (ERBB1-ERBB4), i quali sono implicati nello sviluppo di differenti tipi di tumori umani. E' stato dimostrato che si ha un'iperespressione di ERBB1 nel 68%, di ERBB3 nell'84%, di ERBB2 nel 21% e di ERBB4 nel 61% dei casi di CE (15). Il segnale del fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) è essenziale per molti processi cellulari, quali crescita, differenziazione cellulare ed apoptosi. Nel fegato, il principale ruolo di TGF- β , prodotto dalle cellule stellate non parenchimali, è di limitare la crescita rigenerativa degli epatociti in risposta ad un danno attraverso inibizione della sintesi del DNA ed apoptosi (16). E' stato dimostrato che TGF- β è iperespresso nel CE. L'espressione di TGF- β 1 nel tessuto di CE è correlata con la prognosi. E' stata dimostrata, infatti, una funzione stimolante la crescita da parte di TGF- β durante gli stadi tardivi dello sviluppo del tumore epatico.

La proteina soppressore tumorale del retinoblastoma (RB) è importante per lo sviluppo di differenti tipi di tumore. Rb agisce da soppressore della crescita e quando è in uno stato defosforilato blocca la progressione del ciclo cellulare, bloccando i fattori di trascrizione della famiglia E2F. Prima dell'entrata nella fase S, complessi cinasi ciclina dipendenti (CDK)/ciclina, fosforilano Rb. Quando Rb è mutato, le cellule presentano un ridotto controllo nella progressione del ciclo cellulare e vanno incontro a crescita anomala. La perdita del segnale regolatorio Rb è frequente nell'epatocancerogenesi.

2. Cancerogenesi epatica multifasica

La cancerogenesi epatica è un processo a più stadi, in cui si possono individuare almeno tre momenti principali: induzione, promozione e progressione (Fig.1). Nella prima fase (induzione), a seguito di un danno genomico indotto da un agente iniziante chimico, virale o da un aumentato turnover cellulare, viene innescata una alterata espressione di alcuni proto-oncogeni (ras, myc, fos) e conseguentemente una deregolazione del ciclo cellulare, eventi che portano alcuni epatociti ad andare incontro a morte cellulare per apoptosi, l'espansione clonale delle cellule superstiti iniziate, porta allo sviluppo della lesione, morfologicamente più piccola del CE (29), ovvero allo sviluppo di focolai di epatociti alterati, definiti foci displastici (<1 mm). Questi ultimi si suddividono in piccoli foci displastici (SCD) caratterizzati da epatociti con un diminuito volume citoplasmatico, polimorfismo nucleare ed aumentato rapporto nucleo/citoplasma, e grandi foci displastici (LSD), caratterizzati da aumentate dimensioni cellulari e nucleari, polimorfismo nucleare con nucleoli prominenti e normale rapporto nucleo/citoplasma. I foci SCD hanno un elevato indice proliferativo con caratteristiche morfologiche e istologiche simili al CE e di frequente danno origine a noduli displastici (DN), i quali vengono considerati come lesioni che precedono l'epatocarcinoma a causa della loro frequente associazione con la sua insorgenza. Al contrario, i foci LCD non presentano caratteristiche comuni al CE ed è controverso se si possano considerare come lesioni preneoplastiche; sembrano piuttosto derivare da epatociti senescenti con un'alterata proliferazione cellulare dovuta alla presenza di infiammazione e rigenerazione cronica (20,30).

La seconda fase (promozione) consiste nella proliferazione delle cellule trasformate, che richiede la presenza di uno stimolo continuo o ripetuto, come ad esempio la persistenza del danno necro-infiammatorio cronico (epatite cronica) associata alla rigenerazione (cirrosi) (29). La promozione della neoplasia è contrastata attraverso l'interferenza di ormoni sessuali, citochine, enzimi (es. l'ornitindecarbossilasi, ODC) o cicline (coinvolte nella proliferazione cellulare) (31). La progressione della carcinogenesi fino alla manifestazione clinica della neoplasia è dovuta all'espansione clonale delle cellule neoplastiche, mediata da fattori di crescita (IGF-2, TGF- α , TGF- β) e favorita da ulteriori mutazioni genetiche coinvolgenti geni tumor suppressor come p53 (32). Lo sviluppo di CE in un fegato cirrotico è spesso preceduta e accompagnato da lesioni nodulari macroscopicamente riconoscibili, mostrando da lievi a moderate caratteristiche istologiche atipiche, inclusa la comparsa di cellule caratterizzate dall'accumulo di glicogeno e lipidi al loro interno e dall'aumento del numero di nuclei per unità di area in una lesione. I noduli displastici, sono classificati sulla base di criteri morfologici: di basso grado (LGD) o di alto grado (HGD) (20), e possono evolvere in un periodo di tre-cinque anni, in lesioni maligne quali, appunto l'epatocarcinoma. Quest'ultimo acquisisce la capacità di invadere il tessuto circostante ed i vasi, esplicando le proprie potenzialità metastatiche (33). L'alterata regolazione di alcune vie di trasduzione del segnale gioca un ruolo essenziale nell'epatocancerogenesi (34). Tra queste, la via PI3K/AKT/mTOR sembra avere un ruolo centrale nella progressione tumorale, in quanto è in grado di interferire con eventi chiave della trasformazione e proliferazione della cellula neoplastica.

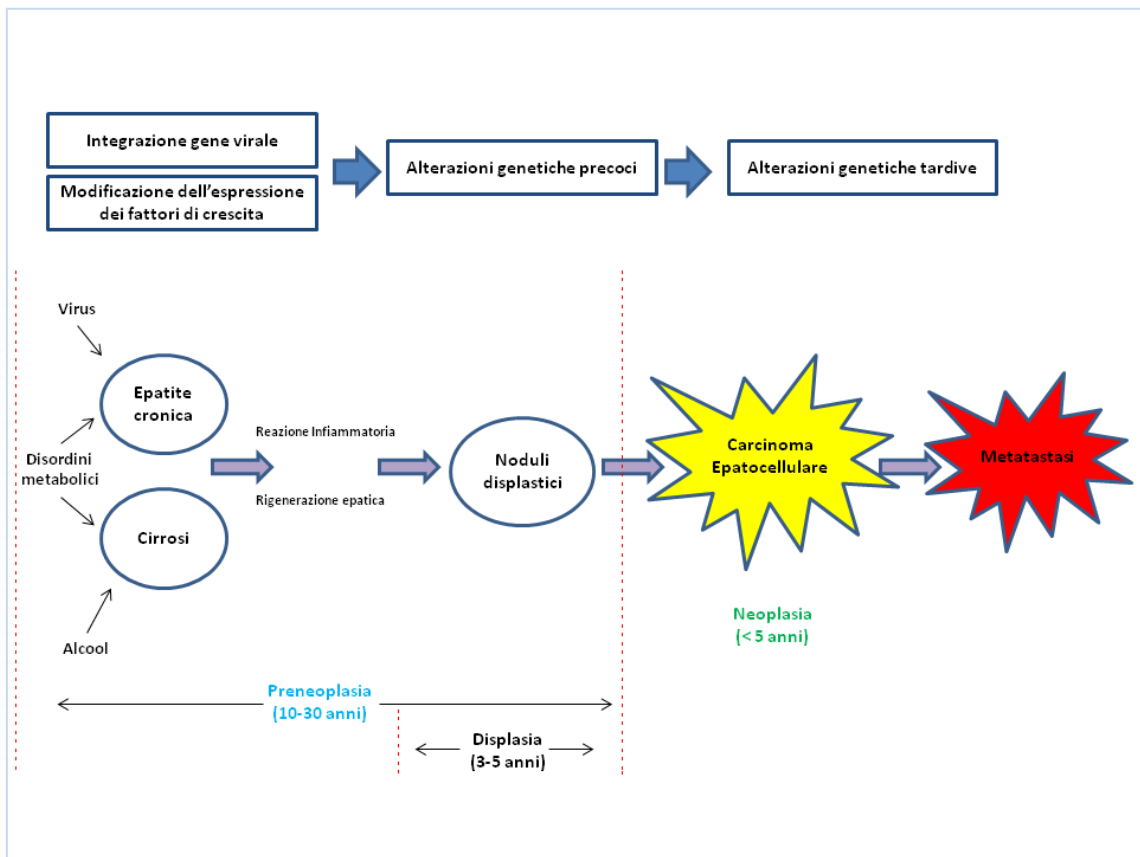


Figura 1. Cancerogenesi epatica multifasica.

3. Via di trasduzione del segnale PI3K/AKT/mTOR

Tra le alterazioni molecolari più frequentemente osservate nei CE umani, vi è l'attivazione della via di segnale PI3K/AKT/mTORC, la quale regola molteplici processi cellulari, tra cui il metabolismo, la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza. Tale via di segnale è stata presa in considerazione come uno dei target più interessanti per lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali (35).

La via è attivata in seguito al legame di un fattore di crescita al proprio recettore, i complessi PI3K attivati da tirosin-chinasi recettoriali, attivano a loro volta, attraverso secondi messaggeri lipidici, una vasta gamma di bersagli a valle, tra cui la Serin-treonin-chinasi AKT, con conseguente induzione dei complessi mTOR1 e 2 (Figura 2).

Fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) costituiscono una famiglia di lipidi chinasi, implicata nella trasduzione del segnale attraverso recettori tirosina chinasi e recettori accoppiati alle proteine G. Le PI3K sono proteine eterodimeriche composte, da una subunità regolatoria p85 e da una subunità catalitica p110 (PIK3CA), capaci di fosforilare un serie di fosfolipidi di membrana, ovvero catalizzano il trasferimento di un gruppo fosfato, a partire da una molecola di ATP, al gruppo -OH in posizione 3 dell'anello inositolo di fosfoinositidi di membrana come il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PtdIns (4,5) P2), formando il secondo messaggero fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (PtdIns (3,4,5) P3) (Figura 3).

L'attività catalitica di PI3K nelle cellule normali è finemente regolata da vari meccanismi. Quello maggiormente accettato, sostiene che il complesso p85-P110 preformato, è presente nel citoplasma delle cellule a riposo in una forma inattiva, il quale viene attivato in seguito al legame di un ligando (fattori di crescita) al proprio

recettore, si verifica così, una trans-fosforilazione della coda citoplasmatica del recettore chinasi, a livello della sequenza consenso di residui di fosfotirosine (YXXM). Di conseguenza il dominio SH2 della subunità p85 interagisce con i residui di fosfotirosina del RTK (o in qualche caso con le molecole segnale intermedie IRS1/IRS2). L'interazione RTK-p85, allevia l'effetto inibitorio che la subunità p85 esercita sull'attività chinasi della subunità P110, come conseguenza di cambiamenti conformazionali del complesso p85-p110, PI3K risulta a questo punto attiva (36). I recettori tirosin-chinasi possono attivare PI3K anche in modo indiretto tramite RAS, che può legarsi e attivare la subunità P110, avviando così la cascata di segnale a valle.

La molecola effettrice primaria della via di segnale PI3K, è la proteina serina-treonina-chinasi Akt (chiamata anche proteina chinasi B), la quale si è mostrata come un'importante molecola segnale all'interno delle cellule eucariotiche, coinvolta in diverse malattie umane che vanno dal cancro alla disfunzione metabolica e alle malattie mentali (37).

AKT agisce come regolatore a valle di PI3K di molti processi biologici, quali la proliferazione, l'apoptosi e la crescita cellulare, si rapporta con una vasta gamma di substrati ed è regolamentata da un duplice meccanismo di attivazione, che consiste sia nella traslocazione a livello della membrana plasmatica, attraverso il contatto diretto del suo dominio pleckstrin-homology (PH) con il substrato PIP3, che nella fosforilazione dei residui Thr308 e Ser473. Thr308 è fosforilata dal fosfoinositide-dipendente della proteina chinasi 1 (PDK1), mentre Ser473 è fosforilata dalla chinasi mTORC2, attività che prima era attribuita ad una proteina-chinasi conosciuta come PDK2 o seconda chinasi dipendente dai fosfoinositidi. Il sequenziamento del genoma umano, rivela che non ci

sono omologhi di PDK1, indicando che probabilmente PDK2 appartiene ad una classe diversa di chinasi (37).

La famiglia AKT è composta da tre membri, AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β), e Akt3 (PKB γ) codificati da tre differenti geni. Tutte le isoforme condividono strutture simili, vale a dire un dominio regolatore N-terminale, un dominio pleckstrin homology (PH), che serve a indirizzare la proteina di membrana per l'attivazione; una regione a cerniera che collega il dominio PH a un dominio chinasi con specificità serina/treonina; ed una regione C-terminale necessaria per l'induzione e il mantenimento della sua attività chinasi (37). Akt1 è ubiquitariamente espressa ad alti livelli, Akt2 è altamente espresso in tessuti insulino-sensibili, compreso il fegato, muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo, la sua espressione aumenta drasticamente durante la differenziazione del tessuto adiposo e del muscolo scheletrico. Akt3 è espressa a più alti livelli nel cervello e nei testicoli, mentre è espressa a livelli inferiori negli organi intestinali e nel tessuto muscolare. L'omologia strutturale, tra le diverse isoforme di AKT conferisce loro una specificità d'interazione con il fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K).

Una regolazione negativa della via PI3K, viene esercitata dall'azione della proteina oncosoppressore, fosfatasi del cromosoma 10 (PTEN), una fosfatasi il cui substrato lipidico principale è PIP3, ma agisce anche su altri substrati come la proteina chinasi di adesione focale (FAK), la proteina di scambio Shc e i regolatori trascrizionali ETS-2 e Sp1 e il recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR). Quando lavora correttamente, aiuta a controllare il ciclo vitale delle cellule, impedendogli di crescere e moltiplicarsi troppo rapidamente ed in modo incontrollato, manda quindi un segnale di stop alla divisione cellulare indirizzando le cellule verso l'apoptosi. Quando invece non

funziona, le cellule possono moltiplicarsi senza controllo per evolvere poi in formazioni tumorali.

PTEN è costituita da quattro domini strutturali principali. Un dominio amino-terminale con attività fosfataseica, fiancheggiato da un dominio C2 responsabile per la localizzazione e il legame alla membrana lipidica, e da due sequenze ricche di prolina (P), acido glutammico (E), serina (S), e treonina (T) (PEST), i domini che regolano la stabilità della proteina. Infine, PTEN ha anche un altro dominio definito PDZ, il quale facilita le interazioni proteina-proteina. Sono state identificate mutazioni puntiformi così come altre modificazioni quali, ipermetilazione del promotore, delezione del gene all'interno del dominio fosfataseico che annullano la funzione endogena di PTEN, che si traduce in una elevata attività di Akt e una regolazione anomala della crescita. Per tale ragione PTEN è diventato un interessante bersaglio terapeutico, in quanto è frequentemente inattivato in molti tumori umani.

Un altro regolatore negativo della via di PI3K è rappresentato dal dominio PH delle proteine fosfatasi caratterizzate da una regione ricca di ripetizioni di leucina (PHLPP). PHLPP defosforila la Ser 473 su Akt, inducendo apoptosi e inibendo la crescita del tumore. Due altre fosfatasi, SH2- contenenti un dominio ad azione fosfataseica, SHIP-1 e SHIP-2, sono in grado di rimuovere il fosfato dalla posizione 5 dell'anello inositolo del PIP3 per la produzione di PIP2 (Figura 3). Mutazioni su queste fosfatasi, possono portare alla progressione tumorale (38).

Le principali conseguenze biologiche dell'attivazione di Akt, risultano di rilevante importanza nello sviluppo e progressione tumorale, e possono essere suddivise in tre fasi; la sopravvivenza, la proliferazione (aumento del numero di cellule) e la crescita

(aumento delle dimensioni delle cellule) (35). AKT mostra importanti effetti anche nell' induzione dell'angiogenesi, mediata in parte, dal fattore di ipossia inducibile 1 α (HIF-1 α) e dal fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF).

Dopo l'attivazione, Akt è in grado di traslocare nel nucleo dove regola l'attività di un certo numero di regolatori trascrizionali come CREB, E2F, il fattore nucleare kappa B (NF-kB), tramite proteina inibitrice kappa B chinasi (I κ -K), i fattori di trascrizione forkhead e murino doppio-minuto 2 (MDM2), che regola l'attività di p53. Questi sono in grado di regolare direttamente o indirettamente la proliferazione cellulare, la sopravvivenza e la transizione epiteliale mesenchimale (EMT). Oltre ai fattori di trascrizione, Akt è in grado di agire anche su altre molecole che incidono sullo stato di sopravvivenza della cellula tra cui: la molecola pro-apoptotica Bcl-2, associato al promotore di morte (BAD), e la glicogeno-sintasi chinasi-3 β (GSK-3 β), la quale regola la stabilità della proteina β -catenina (38).

Uno dei principali bersagli a valle di Akt, che può contribuire alla crescita cellulare anomala è la proteina mTOR, bersaglio della rapamicina nei mammiferi, nota anche come (FRAP1), una serina/treonina chinasi, ubiquitariamente espressa nelle cellule di mammifero. mTOR è la subunità catalitica di due complessi molecolari denominati mTORC1 ed mTORC2. Il complesso mTORC1 è composto da mTOR, dalla proteina G regolatoria Rheb, da una proteina simile alla subunità beta della proteina LST8/G dei mammiferi (mLST8/G β L), da PRAS40, DEPTOR e Raptor (proteina regolatoria associata alla proteina mTOR), e funge da sensore molecolare, che regola la sintesi proteica sulla base della disponibilità di nutrienti, attraverso i suoi effettori a valle, quali 4EBP1 e p70S6 chinasi (S6K), ovvero è coinvolto nella iniziazione della traduzione

ribosomiale di mRNA di proteine necessarie in diversi processi cellulari, come progressione del ciclo cellulare e metabolismo. L'attività di mTORC1 sembra essere regolata da un'interazione dinamica tra mTOR e Raptor, mediata da GβL. Raptor e mTOR condividono una forte interazione a livello della regione N-terminale e una debole interazione nella regione C-terminale, vicino al dominio chinasi di mTOR. In seguito a segnali stimolatori, come alti livelli di nutrienti o di energia, l'interazione tra mTOR e Raptor al C-terminale risulta persa o indebolita, permettendo l'attivazione dell'attività chinasi di mTOR. Quando invece i segnali stimolatori sono rimossi, ad esempio se vi sono bassi livelli di nutrienti, l'interazione tra mTOR e Raptor al C-terminale è rinforzata, disattivando fortemente la funzione chinasi di mTOR (39).

Uno dei punti di controllo fondamentali dell'attività di TORC1 è il complesso TSC, contenente le proteine TSC1 (sclerosi tuberosa 1 o amartina), TSC2 (sclerosi tuberosa 2 o tuberina) e TBC1D7. TSC2 è una GTPasi che attiva proteine (GAP), Akt reprime l'attività GAP del complesso TSC1/TSC2, attraverso la fosforilazione diretta di TSC2, la quale funziona in associazione con TSC1. L'inattivazione del complesso TSC permette di mantenere la proteina Rheb in uno stato attivo Rheb-GTP la quale, attraverso un meccanismo non ancora completamente chiarito, attiva la proteina chinasi mTOR quando complessata con la subunità Raptor, DEPTOR e mLST8 (38,39) (figura 4).

Il complesso mTOR2 è composto da mTOR, dalla proteina Rictor, da GβL, dal fattore Sin1 e da DEPTOR. mTORC2 sembra possedere la capacità di fosforilare la chinasi serina/treonina Akt/PKB sul residuo di serina Ser473, tale fosforilazione stimola la seconda fosforilazione necessaria per la completa attivazione di Akt sulla thr308, da

parte della PDK1. Akt e mTOR sono legate tra loro tramite meccanismi finemente regolati positivi e negativi, quando il complesso mTORC1 è formato, potrebbe antagonizzare la formazione del complesso mTORC2 e ridurre l'attività di Akt. Quindi, almeno in linea di principio, l'inibizione del complesso mTORC1 potrebbe causare iperattivazione di Akt. Questo è un problema associato con approcci terapeutici che utilizzano la rapamicina come inibitore di alcune funzioni di mTOR. È stato dimostrato inoltre che mTOR svolge un'importante funzione regolatoria del citoscheletro attraverso la stimolazione di fibre di F-actina.

Originariamente mTORC2 fu identificato come un'entità non sensibile alla rapamicina, poiché un'alta esposizione a questa non influiva sull'attività di mTORC2 o sulla fosforilazione di Akt. Ad ogni modo studi successivi hanno mostrato che, almeno in alcune linee cellulari, l'esposizione cronica alla rapamicina, sebbene non dia effetti diretti sugli mTORC2 pre-esistenti, può legare mTOR libero, inibendo così indirettamente la formazione di nuovi mTORC2. Tuttavia, è improbabile che la via di segnale PI3K-AKT sia l'unico stimolo che induce l'attivazione di mTOR nelle cellule tumorali. Per esempio, mTOR può anche funzionare come un sensore dell'ATP. Nei tumori nei quali vi è un aumentato tasso del metabolismo glicolitico, mTOR è in grado di rilevare l'aumentato livello di ATP e di avviare il segnale per una maggiore biogenesi ribosomale, fenomeno comunemente osservato in differenti tipi di cancro (38).

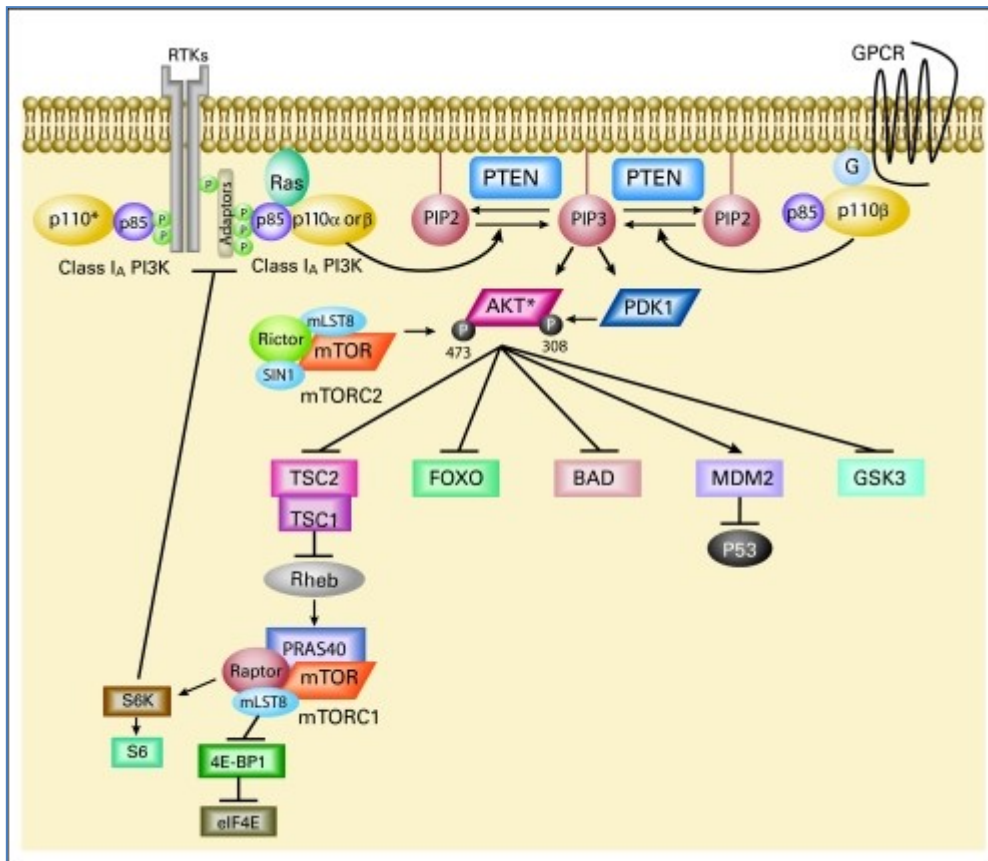


Figura 2. Rappresentazione schematica della via di trasduzione del segnale PI3K/AKT/mTOR. (Courtney et al J Clin Onc 2010;28(6):1075-1083)

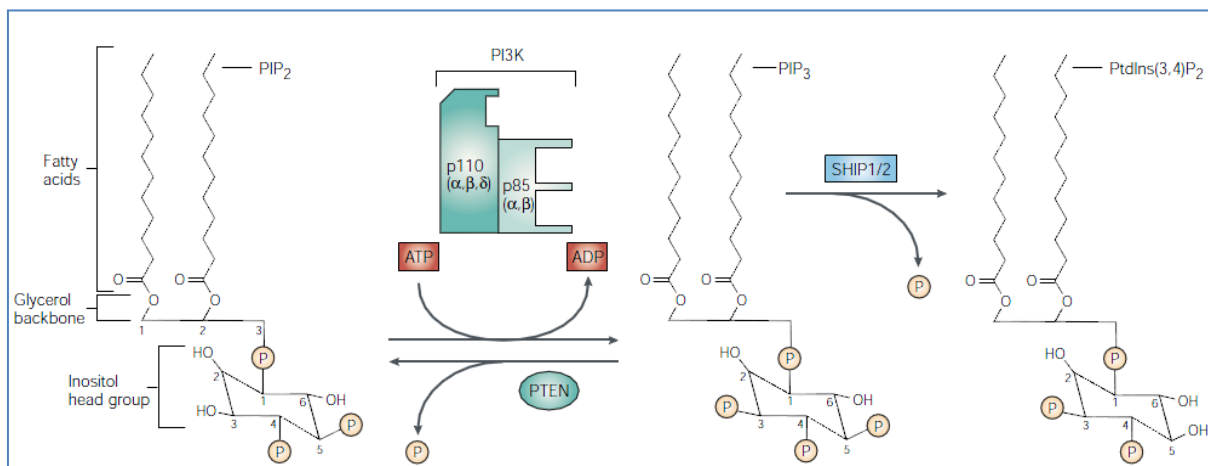


Figura 3. Principale reazione catalizzata da PI3K: conversione del fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato (PIP₂) i fosfatidilinositolo 3,4,4-trifosfato (PIP₃). (Karakas B, Bachman Ke, Park Bh. British Journal of Cancer 2006; 94: 455-459)

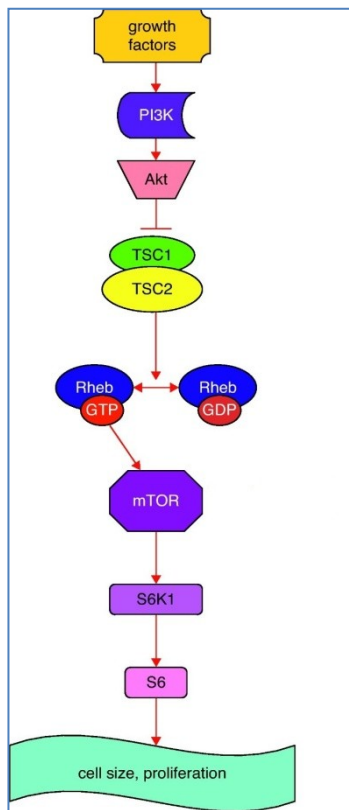


Figura 4. Complesso TSC attivante la proteina mTOR. (Da Silva AM, Moss J Rev Poet Pneumol 2012; 18(3):142-144)

4. Isoforme PI3K

Le PI3K sono chinasi lipidiche eterodimeriche coinvolte nel controllo di importanti processi cellulari quali divisione, sopravvivenza, apoptosi, metabolismo, differenziazione, riorganizzazione del citoscheletro, adesione e migrazione. La famiglia di enzimi PI3K, comprende tre classi (classe I, II e III), classificate sulla base della struttura primaria, regolazione e specificità d'azione verso il substrato (40). Di queste, la classe I è quella meglio caratterizzata e comprende una serie di elementi chiave per l'integrazione di diversi segnali cellulari. Le PI3K di classe I catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosforico dall'ATP sulla posizione D3 del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃), il quale a sua volta funge da ligando per reclutare, sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini Pleckstrin Homology (PH) tra cui Akt e PDK1 (41,42). La classe I viene ulteriormente suddivisa in due sottoclassi, IA e IB. Le PI3K di classe IA vengono attivate da recettori tirosin-chinasi e sono composte da una subunità catalitica del peso di 110 kDa (p110), e da una subunità regolatoria del peso di 85 kDa (p85). La subunità p110 è codificata da tre differenti geni (p110 α , p110 β , p110 δ) e contiene diversi domini: un dominio per il legame della subunità regolatrice p85, un dominio RAS-binding (RBD), un dominio C2 (protein-kinase-C homology-2), un dominio a elica e uno catalitico. Della subunità regolatrice p85 esistono, cinque isoforme p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , o p55 γ , e definite genericamente "p85", generate da fenomeni di splicing alternativo a partire dai prodotti di tre geni. Tutte possiedono due domini SH2 (Rous-sarcoma-oncoprotein homology-2), separati da un dominio per l'interazione con p110 (43). Le tre isoforme della classe

PI3K IA hanno identica attività enzimatica ma funzioni non ridondanti nella segnalazione delle cellule, nel metabolismo e nella tumorigenesi.

Le PI3K della Classe IB sono costituite da un'unica subunità catalitica p110 γ associata ad una subunità regolatrice di 101 kDa, p101 o con p84 e vengono attivate da recettori di membrana associati a proteine G eterotrimeriche (GPCR). Tuttavia, diversi studi hanno collegato le isoforme, p110 β e p110 δ della classe IA, ai recettori GPC e la p110 γ della classe IB ai recettori tirosina chinasi, anche se i meccanismi non sono ancora del tutto chiari (Figura 5) (44). PI3K di classe II (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β e PI3K-C2 γ) non posseggono un dominio legante proteine, ma possiedono un dominio PX e un dominio C2 aggiuntivo al C-terminale. Infine La classe PI3K III possiede una subunità catalitica omologa a quella del lievito Vps 34, che si lega a una proteina adattatrice ad attività chinasi p150 (Figura 6).

La regolazione dell'espressione e la distribuzione tissutale della classe PI3K IA è stata studiata utilizzando diversi approcci sperimentali. L'utilizzo di sistemi di espressione inducibili, come il gene reporter β -Gal-LacZ, inserito per ricombinazione omologa nel locus p110, per esempio, costituisce un approccio importante per valutare, non solo la funzionalità dei singoli PI3K, ma anche delle loro proteine effettrici a valle (45). Tale sistema si è dimostrato molto utile nel determinare la localizzazione delle isoforme p110, ed è emerso che p110 α e p110 β sono ubiquitariamente espresse, mentre la subunità p110 δ è prevalentemente espressa nei linfociti, in qualche tessuto di origine non leucocitaria e in alcune linee di cellule tumorali come nelle cellule del cancro della mammella. Poiché nelle cellule tumorali, a livello del gene PIK3CA, sono state

identificate specifiche mutazioni (gain-of-function), tale gene è un importante oggetto di studio.

Inoltre sono state riportate mutazioni non somatiche a livello dei geni codificanti p110 β o p110 δ . Gene targeting e studi farmacologici hanno rivelato un ruolo chiave di p110 β nella biologia delle piastrine e nella trombosi, mentre recenti studi hanno anche dimostrato un ruolo di p110 β in alcuni tipi di cancro nei quali viene a mancare la funzione di PTEN. Dato che p110 δ è preferenzialmente espresso nei leucociti, il suo ruolo funzionale è stato studiato nel sistema immunitario considerandolo come bersaglio terapeutico in patologie immuno-correlate ed infiammatorie (45,46).

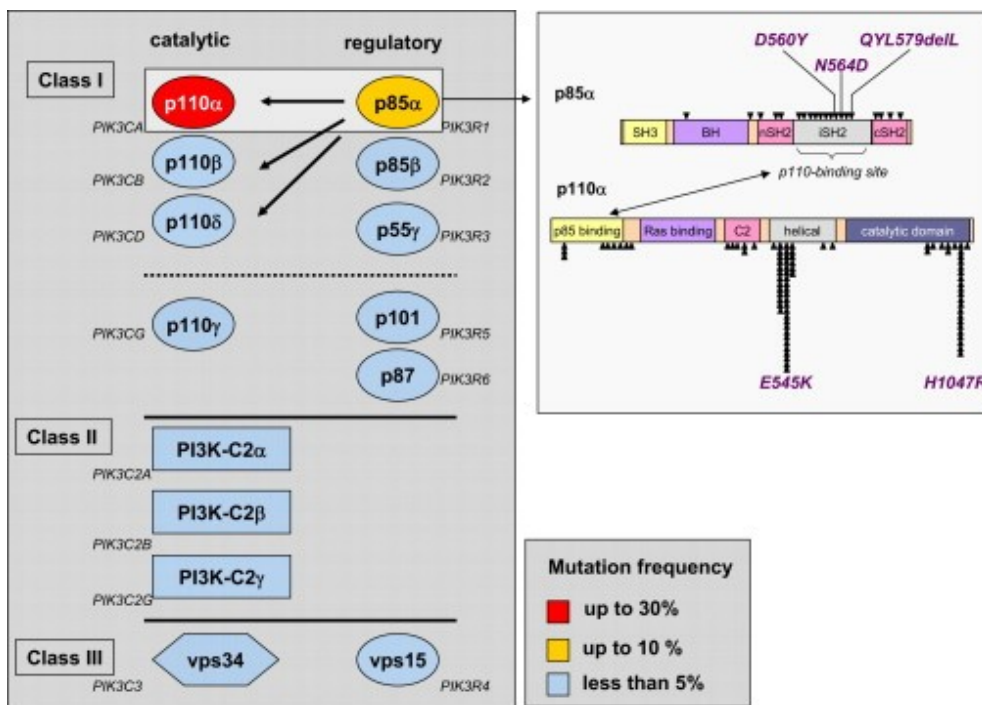


Figura 5. Rappresentazione schematica delle differenti classi della famiglia di enzimi PI3K, con relativa struttura del dominio della subunità catalitica e regolatoria della classe I. (Zaho L, Vogt PK. Oncogene 2008;27: 5486–5496)

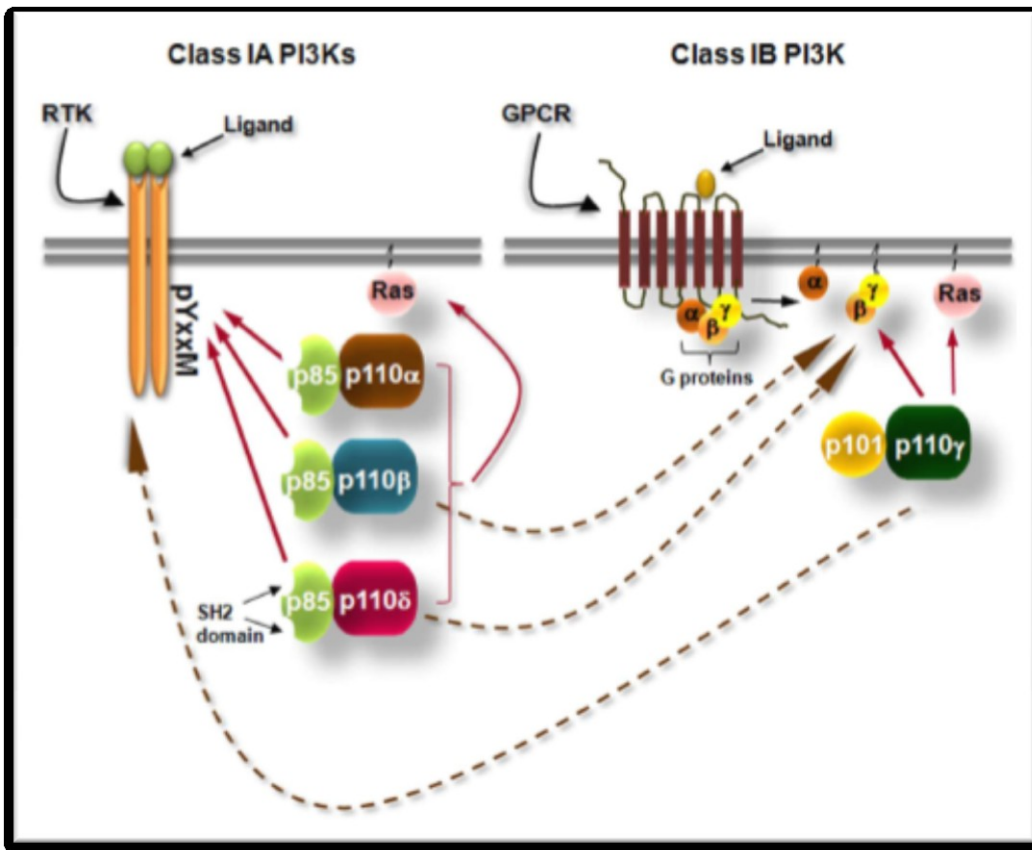


Figura 6. Schema semplificato dei diversi meccanismi di attivazione delle isoforme di classe IA e IB. (Tzenaki N, Papakonstanti EA. *Frontiers in Oncology* 2013; 3:1-15)

5. **Principali mutazioni di PIK3CA e suo ruolo nella cancerogenesi**

È ormai noto che il cancro è una malattia genetica e che mutazioni somatiche a livello di oncogeni e oncosoppressori sono gli iniziatori del processo cancerogeno. In studi precedenti è stato osservato un coinvolgimento della via di segnale PI3K nella tumorigenesi; in particolare, le ricerche finora condotte suggeriscono un ruolo fondamentale della subunità catalitica fosfatidilinositolo 3-chinasi (PIK3CA) nei tumori umani (47,48). La prima evidenza dell'attività chinasi di PI3K è stata identificata associata ad oncoproteine virali. Studi successivi, attraverso l'uso di topi knockout, sia per la subunità catalitica che per quella regolatoria di PIK3, hanno messo in evidenza alcune alterazioni importanti, tra cui letalità embrionale, difetti delle cellule B, necrosi del fegato e cancro del colon-retto, mettendo in evidenza quindi che PI3K funziona come oncogene (40, 49). PIK3CA è un gene di 34 kb situato sul cromosoma 3q26.3 che consiste di 20 esoni codificanti per 1068 aminoacidi, i quali sintetizzano una proteina di 124 kDa (Figura 7). Amplificazioni, delezioni e più recentemente, mutazioni somatiche missenso, a livello del gene PIK3CA, sono state identificate in molti tipi di cancro umano, tra cui i tumori di colon, mammella, cervello, fegato, stomaco e polmone (40,50). In particolare, i tumori di colon-retto, cervello e stomaco mostrano un alto tasso di mutazione genica di PIK3CA con frequenze di 32, 27 e 25% rispettivamente, il tumore della mammella e del polmone presentano invece un tasso di mutazioni, relativamente basso (8 e 4%, rispettivamente). PIK3CA è mutato nel 35,6% dei casi di carcinoma epatocellulare (HCC) (46,50,51). Tali mutazioni inducono un aumento dell'attività chinasi di PIK3CA, contribuendo alla trasformazione cellulare. Le mutazioni missenso somatiche di tale gene sono state identificate nella maggior parte

delle sequenze esoniche, prevalentemente localizzate a livello dei domini chinasi ed elicoidali. Mutazioni ricorrenti sono state trovate a livello dell'esone 9 (E542K, E545K) e nell'esone 20 (H1047R) (52). Generalmente il gene *pik3ca* è regolato dal gene PTEN, un oncosoppressore. L'iperattivazione o l'attivazione costitutiva di PI3K e la perdita della funzione di PTEN provoca l'accumulo di PIP3 cellulare e l'attivazione dei suoi effettori a valle, tra cui PDK1 e AKT/PKB (53,54). Le conseguenze biologiche dell'attivazione di AKT sono ampie, tra cui la regolazione della proliferazione, sopravvivenza e motilità cellulare. Una perdita di espressione di PTEN può derivare da diversi tipi di mutazioni, come un inserimento nella sequenza, che alterano il quadro di lettura oppure delezioni, metilazione del promotore, le quali portano ad una iperattività dell'oncogene PIK3CA. L'inibizione dell'attività di PTEN porta a delle rotture del centromero e ad instabilità cromosomica. Studi precedenti hanno mostrato che l'alterazione del gene soppressore tumorale PTEN incrementa l'abilità delle cellule a migrare (55). L'identificazione di tutte queste specifiche alterazioni ha importanti implicazioni cliniche nella diagnosi, nella prognosi e nella terapia. Utilizzando diversi approcci (nel caso in cui l'esame istologico non sia del tutto chiaro), come la PCR e il sequenziamento delle mutazioni hotspot, si potrebbe ottenere un aumento della sensibilità nella diagnosi di alcune neoplasie (56).

L'identificazione delle mutazioni all'interno di PIK3CA rende tale gene un eccellente marcatore diagnostico e un importante strumento di monitoraggio della progressione tumorale. Qualora esperimenti futuri confermassero che l'attivazione mutazionale di PIK3CA è essenziale per la crescita tumorale, specifici inibitori di PIK3CA, potrebbero

essere sviluppati per il trattamento di un ampio numero di pazienti con tali mutazioni (52).

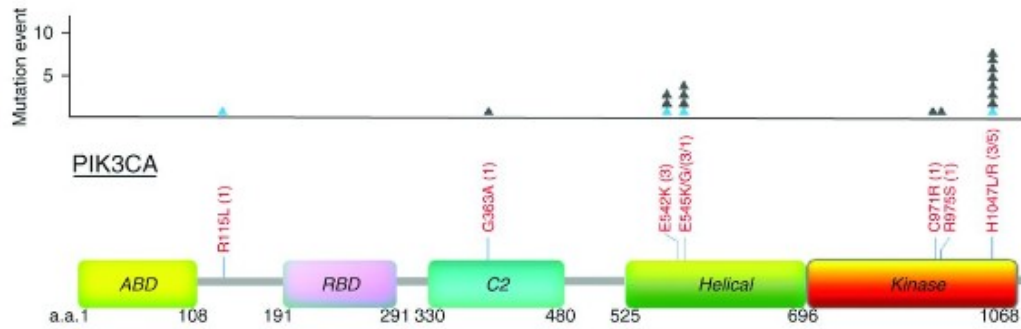


Figura 7. Rappresentazione schematica dei domini funzionali della subunità catalitica p110 α di PI3K (PIK3CA), con indicate le più frequenti mutazioni somatiche a carico del gene. (Lui VWY, Hedberg ML et al. Cancer Discovery 2013: 761-769)

6. Metodica di trasferimento genico idrodinamico “Hydrodynamic Gene Delivery”

Nel corso degli ultimi anni, la metodica di trasferimento genico idrodinamico si è affermata come una tecnica semplice e molto efficace nel trasferire materiale genetico, quale DNA “nudo”, RNA, proteine e composti sintetici, in cellule di vari tessuti di piccoli animali, attraverso una rapida iniezione del materiale d’interesse, in soluzione fisiologica, all’interno dei vasi sanguigni. L’ampio successo nell’applicazione dei principi dell’iniezione idrodinamica, consente una vasta gamma di esperimenti in vivo, come la sperimentazione di elementi regolatori, la generazione di anticorpi, la valutazione di approcci di terapia genica, la creazione di modelli transgenici per lo studio della biologia di base e per le condizioni patologiche (57). L’alta efficienza di tale metodica ha spinto di recente la ricerca ad utilizzarla per l’uso clinico (58). La prima descrizione della tecnica è stata pubblicata nel 1999 e ad oggi ci sono centinaia di lavori che descrivono il metodo, ormai comune, per l’introduzione di DNA e RNA in roditori, in un’ampia area di applicazioni. Per esempio, l’introduzione di DNA plasmidico attraverso la vena caudale è stata utilizzata per accertare il coinvolgimento di specifici geni nello sviluppo o regressione di condizioni fisiopatologiche, soprattutto a carico del fegato. Recentemente, il trasferimento genico idrodinamico è stato anche utilizzato per l’introduzione di small interfering RNA (siRNA), per studi di funzionalità genica (57). Ad oggi molte pubblicazioni condividono una serie di osservazioni convergenti, riguardo il meccanismo di trasferimento genico idrodinamico. La procedura standard consiste in una rapida iniezione (5-9 secondi), nella vena della coda, di soluzione fisiologica pari al 10% del peso corporeo (59), in cui il DNA plasmidico è

diluito. Meccanicamente, l'ingente volume di soluzione iniettata comporta una distensione delle fibre miocardiche tale da indurre una congestione cardiaca, che induce un flusso retrogrado della soluzione verso il fegato. Questo evento comporta infatti cambiamenti della funzionalità cardiaca e della pressione venosa. Il fegato è l'organo del corpo che maggiormente assorbe il DNA plasmidico, approssimativamente possono essere transfettati dal 10% al 40% degli epatociti. L'efficienza di transfezione negli altri organi tra cui rene, milza, polmoni, e cuore, è inferiore allo 0,1% rispetto a quella del fegato. Pertanto, questa tecnologia di transfezione sembra essere piuttosto specifica per il fegato (60). Gli animali sopravvivono bene, nonostante siano documentati effetti temporanei di alterazioni funzionali e strutturali del fegato, la lesione è transitoria con una guarigione in una settimana circa (61,62). È stato osservato infatti che l'iniezione idrodinamica, eseguita in animali anestetizzati con il fegato visivamente esposto, tramite un'incisione addominale, comporta, come effetto immediato, una significativa espansione del fegato ed un cambiamento del colore, dalla sua normale tonalità rossastra ad un colore biancastro, per poi tornare alla sua tonalità normale in breve tempo. Questa scoperta suggerisce che la soluzione iniettata, sposta e diluisce transitoriamente il sangue che scorre attraverso il fegato. Inoltre, tali osservazioni indicano che il DNA entra nel fegato prima che possa verificarsi la miscelazione omogenea con il sangue (59). Il metodo di trasferimento genico idrodinamico è stato sviluppato basandosi sui progressi nella comprensione della struttura e delle caratteristiche dei vasi sanguigni e sulle proprietà dei fluidi che passano attraverso tali vasi. La principale ragione per cui le cellule parenchimatose sono il bersaglio dell'iniezione idrodinamica è perché queste sono strettamente associate all'endotelio

capillare consentendo un immediato accesso del DNA alle cellule parenchimatose una volta distrutta la barriera endoteliale. Inoltre, la parete capillare è sottile e relativamente facile da rompere. Il trasferimento genico idrodinamico usa la forza idrodinamica generata dall'iniezione a pressione di un grande volume di DNA nel vaso sanguigno in modo da permeare l'endotelio capillare e generare dei "pori" nella membrana plasmatica delle cellule parenchimali circostanti, così che il DNA o le altre macromolecole di interesse possano raggiungere l'interno della cellula. In breve tempo i pori si richiudono, intrappolando il materiale all'interno e il sistema cardiovascolare viene ripristinato. Il fatto che meno della metà degli epatociti totali siano sensibili alla transfezione idrodinamica indica che l'impatto idrodinamico a livello cellulare non è omogeneo. Questo potrebbe essere spiegato dalle differenze a livello della struttura capillare del fegato (59, 63, 64). Uno dei principali limiti di applicazione della transfezione idrodinamica, in particolare nella ricerca sul cancro del fegato, risiede nel fatto che i geni transfettati negli epatociti sono rapidamente degradati. Infatti, il picco di espressione del gene di interesse si manifesta da 8 a 24 ore dopo il trattamento, e la diminuzione è maggiore di 1000 volte già dopo 7 giorni (60). Tuttavia, per poter indurre la formazione di cancro al fegato, i geni devono essere espressi negli epatociti in modo continuo. Per ovviare a questo limite, il DNA di interesse viene integrato stabilmente nel genoma dell'epatocita attraverso una transposasi. La transposasi maggiormente utilizzata è la "Sleeping Beauty" (SB) (63,64,65); quest'ultima viene iniettata attraverso la vena caudale nella soluzione contenente il DNA "nudo". La SB è uno strumento prezioso per lo studio della funzionalità genomica in diversi organismi modello e rappresenta un promettente vettore per la terapia genica umana (65,66,67). La

possibilità di ottenere una pressione intravascolare adeguata per un efficiente trasferimento di DNA, riducendo il volume di soluzione iniettata, permetterebbe di limitare gli effetti collaterali legati alle aritmie cardiache, rendendo la tecnica abbastanza sicura da poter essere utilizzata sull'uomo a fini terapeutici. A questo scopo sarebbe utile una tecnica di trasferimento idrodinamico assistita da computer, dove il volume e il flusso di soluzione iniettata sono gestiti da un software che li regola in maniera da mantenere la pressione, indotta all'interno dei vasi, costante a un valore ideale. Fino ad oggi, sono stati effettuati numerosi studi mettendo a punto metodiche di trasferimento genico idrodinamico in diversi tessuti, principalmente fegato, muscolo scheletrico e reni e in diversi modelli animali tra cui topo, ratto, coniglio, maiale e scimmia. L'efficienza di trasferimento si è dimostrata molto inferiore in animali di dimensioni superiori rispetto a modelli come topi ratti o conigli, ma non è ancora chiaro se questo dipenda dalle diverse dimensioni del fegato o piuttosto da differenze nella sensibilità dell'organo alla tecnica (61). L'approccio idrodinamico consente il trasferimento di materiale genetico senza l'utilizzo di vettori virali o non virali, rendendo la tecnica vantaggiosa ai fini di un utilizzo clinico, ma un utilizzo a fini terapeutici sull'uomo presenta ancora problemi di carattere pratico.

Sebbene infatti l'utilizzo di vene periferiche nei modelli di topo e ratto, abbia eliminato la necessità di interventi chirurgici al fine di ostruire le vie di deflusso della soluzione iniettata, in studi su esseri umani non si è potuta ottenere una pressione sufficiente a indurre la permeabilizzazione delle membrane di epatociti, parenchima ed endotelio dei capillari, né per semplice iniezione via catetere, attraverso la vena giugulare o l'arteria

femorale fino alla vena cava inferiore, e neppure in seguito a clampaggio della vena porta (68).

Infatti, sebbene in linea di principio si sia ipotizzato che il trasferimento del materiale genetico avvenga attraverso un meccanismo mediato da recettori, risulta più probabile che il passaggio attraverso la membrana citoplasmatica si verifichi per idroporazione in seguito alla distensione dei tessuti epatici a seguito dell'aumento della pressione intravascolare (59, 69).

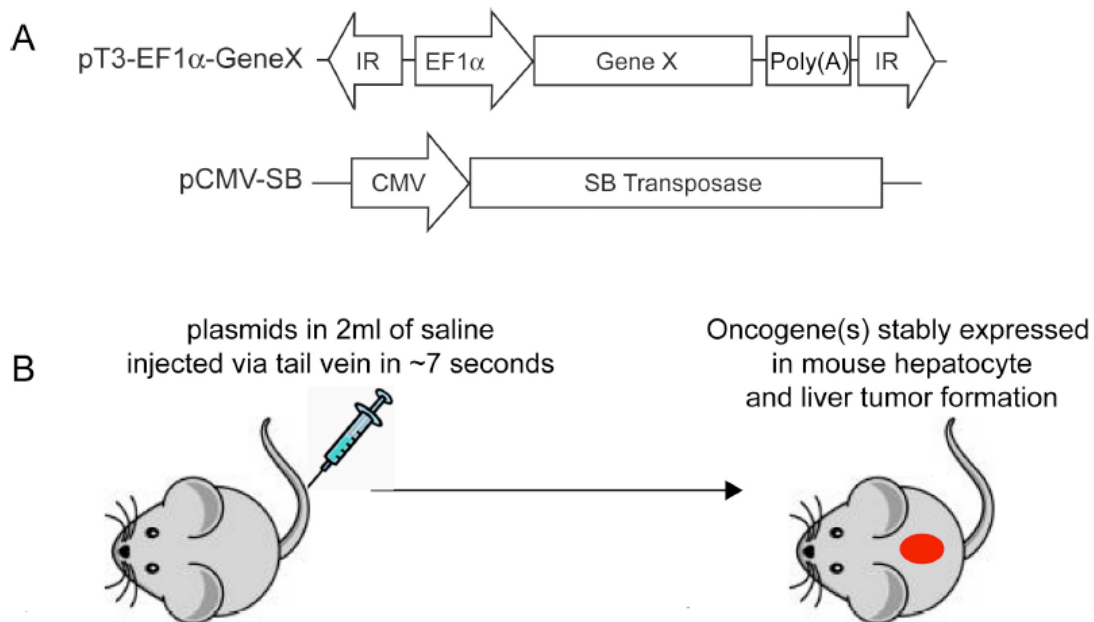


Figura 8. Principio della metodica di trasferimento genico idrodinamico per l'induzione del tumore epatico nel topo. (A) Struttura del plasmide utilizzato per lo studio contenente il gene di interesse (gene X) ed il plasmide contenente la transposasi "Sleeping Beauty" (SB). (B) Rappresentazione schematica della metodica. (Chen X, Calvisi DF. The American Journal of Pathology 2014;184:912-921)

SEZIONE SPERIMENTALE

1. Introduzione

Il carcinoma epatocellulare (CE) rappresenta un importante problema sanitario in tutto il mondo. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, questo rappresenta la terza causa di morte per cancro a livello mondiale, e risulta essere il quinto tumore umano per frequenza. Il carcinoma epatocellulare costituisce circa l'80% di tutti i tumori del fegato primario. Studi epidemiologici e molecolari hanno dimostrato che lo sviluppo di CE è in continuo aumento da diversi decenni. I pazienti con epatite B (HBV) o epatite C (HCV) cronica, soprattutto se accompagnata da cirrosi epatica, hanno un rischio molto più elevato di sviluppare il carcinoma epatocellulare rispetto alle persone non infette. Altri importanti fattori di rischio per lo sviluppo del CE comprendono l'abuso di alcol, il diabete, l'obesità e le sindromi correlate al metabolismo (60,70). Lo sviluppo del CE è un processo a più fasi. Nonostante l'infezione da HBV o da HCV sia chiaramente collegata alla patogenesi del CE, gli eventi molecolari alla base di questa associazione rimangono poco chiari. Poiché il carcinoma epatocellulare spesso nasce nell'ambito di un fegato cirrotico, è stato ipotizzato che lo sviluppo della patologia potrebbe essere innescata dai cicli ripetuti di morte degli epatociti e successiva proliferazione che si verificano nel fegato cirrotico. Tale fenomeno, potrebbero generare un microambiente favorevole per il verificarsi di cambiamenti genetici ed epigenetici, che comportano l'attivazione di oncogeni e o la perdita di funzione dei geni oncosoppressori, portando infine allo sviluppo del CE.

Le alterazioni molecolari più frequentemente osservate nei CE umani comprendono le mutazioni a carico dei geni beta-catenina, p53, PIK3CA, l'attivazione di recettori

tirosina cinasi come EGFR, c-Met e IGFR, e l'aberrante metilazione di geni oncosoppressori come PTEN, APC, E-caderina, e RASSF1A (71,72).

Il CE è una malattia mortale con limitate opzioni di trattamento; la resezione del tumore e il trapianto di fegato, infatti, possono essere applicati solo a un numero limitato di pazienti. Inoltre, l'unico farmaco disponibile per il trattamento del CE non resecabile è il sorafenib, un inibitore multichinasico il quale prolunga la sopravvivenza dei pazienti solo di 2 o 3 mesi rispetto al trattamento con placebo. Per questo, lo studio dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e progressione del CE si rende necessario per identificare nuovi bersagli per la diagnosi precoce, la chemoprevenzione e il trattamento di questa patologia (73). I meccanismi molecolari alla base dello sviluppo del CE sono in gran parte sconosciuti. Tra le alterazioni molecolari maggiormente osservate nei CE umani vi è l'attivazione della via di segnale fosfoinositide-3-cinasi (PI3K/AKT/mTOR). Questa regola molteplici processi cellulari, tra cui il metabolismo, la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza. Le PI3K, una volta attivate, catalizzano la produzione di lipidi sulla membrana cellulare e attivano una vasta gamma di bersagli a valle, tra cui la serina-treonina protein chinasi AKT, con la conseguente induzione dei complessi mTORC1 e mTORC2. AKT esercita numerosi dei suoi effetti sugli epatociti attraverso il suo effettore chiave, il complesso 1 di mTOR (mTORC1) (74,75). AKT può attivare mTORC1 sia in modo dipendente che indipendente da TSC1/2. AKT è infatti in grado di fosforilare e inattivare direttamente il complesso TSC1/2, che presiede all'inibizione di mTORC1. Il complesso TSC1/TSC2, quando attivo, esercita il suo effetto inibitorio agendo sull'attivatore a monte di mTORC1, rappresentato da una piccola GTPasi chiamata Ras homolog enriched in

brain (Rheb). AKT inoltre è in grado di attivare mTORC1 fosforilando direttamente PRAS40 (una proteina che interagisce fisicamente con Raptor) e eliminando l'azione inibente di quest'ultima proteina sul complesso mTORC1. L'asse PI3K/AKT/mTOR è frequentemente attivato in numerosi tumori solidi, compreso il CE umano (76). L'attivazione della via di segnale PI3K/AKT/mTOR è coinvolta nell'insorgenza, progressione e metastatizzazione del carcinoma epatocellulare umano (36-76), come conseguenza di diverse alterazioni genetiche, tra cui l'amplificazione e mutazioni somatiche, o la perdita dell'oncosoppressore PTEN oppure per mutazioni a carico del gene PIK3CA. Mutazioni puntiformi come H1047R, a livello della subunità regolatoria e E545K a carico della subunità catalitica delle PI3K, denominata p110 alfa e codificata dal gene PIK3CA, inducono l'attivazione costitutiva della medesima proteina e sono state descritte nell'HCC umano. Tuttavia, i meccanismi molecolari attivati da PIK3CA rimangono sconosciuti. In particolare, non è chiaro se i pazienti affetti da CE con mutazioni a carico di PIK3CA rispondano efficacemente agli inibitori di mTOR, come la Rapamicina ed i suoi analoghi o a farmaci più recenti, come i doppi inibitori AKT/mTOR.

Per indagare quali geni sono necessari allo sviluppo e alla progressione tumorale possono essere utilizzati diversi approcci, per esempio l'utilizzo di modelli murini può essere di fondamentale importanza per validare il potenziale oncogenico di un evento genetico o identificare un'alterata via di segnale. Tali modelli rappresentano inoltre uno strumento essenziale nello screening *in vivo* in quanto permettono di identificare approcci terapeutici innovativi contro questa neoplasia mortale.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di esaminare l'importanza del gene PIK3CA nell'epatocancerogenesi. Pertanto, per meglio delineare il potenziale oncogeno PIK3CA nella cancerogenesi epatica umana, abbiamo iperespresso il medesimo gene, nella sua forma mutata (E545K), nel fegato di topi mediante trasferimento genico idrodinamico. Successivamente, abbiamo identificato i bersagli molecolari di PIK3CA attraverso la comparazione dei profili di espressione genica globale (microarray) dei tumori sviluppati dai topi iniettati con la forma mutata di PIK3CA E545K e con i fegati di topi iniettati con il vettore vuoto (controllo).

2. Materiali e Metodi

2.1. Costrutti e reagenti, iniezione idrodinamica

Dieci μg del plasmide pCMV contenente la transposasi Sleeping Beauty (SB), del costrutto pT3-EF1 α -HA-PIK3CA-E545K (contente la forma mutata di PIK3CA, E545K) o del vettore vuoto sono stati diluiti in un rapporto 1:25 in 2 mL di soluzione di NaCl 0.9%. Tale soluzione è stata poi filtrata e iniettata nella vena laterale della coda di topi di 7 settimane d'età in circa 7-9 secondi. Tutti i plasmidi sono stati purificati utilizzando il kit Endotoxin free Maxi prep (Sigma, St. Louis, MO). Per le iniezioni, sono stati utilizzati topi femmine 129/Sv-C57BL/6. Tali topi sono stati ottenuti dall'incrocio tra topi 129/Sv e topi C57BL/6, precedentemente forniti da Charles River (Wilmington, MA). Un gruppo di topi è stato iniettato con il vettore vuoto (n=20) ed un altro gruppo di topi con il plasmide contenente il gene PIK3CA-E545K (n=20). Dieci animali di ogni gruppo sono stati sacrificati tre mesi dopo l'iniezione idrodinamica, e i rimanenti dieci animali di ogni gruppo dopo ulteriori tre mesi. I topi sono stati accuditi, alimentati e monitorati in accordo con i protocolli approvati dai comitati per la ricerca sugli animali dell'Università di Sassari (Sassari, Italia) e dell'Università di Greifswald (Greifswald, Germania).

2.2. Istologia ed immunoistochimica

I fegati sono stati fissati in paraformaldeide al 4% ed inclusi in paraffina. Le lesioni preneoplastiche e neoplastiche epatiche sono state colorate con ematossilina ed eosina, analizzate e classificate da due esperti anatomopatologi (Prof. Frank Dombrowski e Prof. Matthias Evert, Istituto di Patologia, Università di Greifswald, Greifswald, Germania). Per la colorazione immunoistochimica, le sezioni deparafinizzate sono state incubate in perossido di idrogeno al 3% disciolto in metanolo per 30 minuti allo scopo di eliminare le perossidasi endogene. Per lo smascheramento dell'antigene, i vetrini sono stati scaldati in buffer citrato 10 mM (pH 6.0) per 10 minuti ed infine sono stati incubati con l'anticorpo monoclonale di coniglio anti-HA-tag (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluito 1:100, l'anticorpo monoclonale di topo anti-FASN (BD Biosciences, San Jose, CA) diluito 1:100, l'anticorpo monoclonale di coniglio anti-SCD1 (Cell Signaling Technology) diluito 1:100, o l'anticorpo monoclonale di coniglio anti-Ki67 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX) diluito 1:200. L'immunoreattività è stata visualizzata utilizzando il kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA), ed utilizzando il Vector NovaRED™ (Vector Laboratories) come cromogeno. La colorazione dei vetrini ottenuta con il cromogeno è stata poi contrastata utilizzando l'ematossilina di Mayer.

2.3. Analisi Microarray

Duecento nanogrammi di RNA totale proveniente da 4 fegati di topi iniettati con il solo Vettore Vuoto (gruppo A), da 4 fegati non neoplastici di topi iniettati con la forma mutata PI3KCA-E545K topi (tessuto preneoplastico; gruppo B) e dai rispettivi tumori (tumori; gruppo C) sono stati estratti, convertiti in cDNA attraverso la sintesi del DNA complementare doppia elica, convertiti in cRNA, marcati con i fluorocromi Cy3-dCTP per il gruppo A (controllo) e con Cy5-dCTP per i gruppi B e C (trattati), ed ibridizzati. I diversi passaggi sono stati eseguiti in accordo con le istruzioni della ditta produttrice Agilent Technologies (Santa Clara, CA). L'RNA è stato denaturato a 65 °C per 15 min, e raffreddato in ghiaccio. Per trasformare l'RNA primer in cDNA (DNA complementare) abbiamo aggiunto 2 µl di 5X First Strand Buffer, 1 µl di 0.1 M DDT, 0,5 µl di dNTP 10 mM e 1,2 µl di blocco mix Affinity Script RNase (Agilent Technologies). Dopo 120 min. di incubazione a 40°C, l'RNA è stato denaturato a 70°C per 15 min. All' RNA abbiamo aggiunto 2 µl di Spike A Mix (1:80, per Cy3) e Spike B Mix (1:80, per Cy5), 0,8 µl di Primer T7 e 1 µl di H₂O priva di nucleasi (Agilent Technologies). Per convertire il cDNA in cRNA marcato con i coloranti Cy3 o Cy5 abbiamo aggiunto 0,75 µl di acqua priva di nucleasi, 5X Transcription Buffer 3,2 µl, 0,6 µl di DTT 0.1 M, 1,1 µl mix NTP, 0,2 µl di miscela T7 RNA polimerasi e 0,24 µl di Cy3 o 0,24 µl di coloranti Cy5 (Agilent Technologies). Dopo 120 min di incubazione a 40 ° C, il cRNA è stato fatto raffreddare in ghiaccio-acqua ed è stato purificato con RNasi Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Per la frammentazione di 825 ng di cRNA abbiamo aggiunto 11,5 µl di agente di blocco e 2,2 µl di Fragmentation Buffer (Agilent Technologies). Dopo 30 minuti a 60 °C abbiamo aggiunto 55 µl di HiRPM, tampone di

ibridazione e i vetrini microarray cRNA sono stati incubati per 17 ore a 65 ° C (Agilent Technologies, Whole Genome mouse 4x44 K oligo). I vetrini microarray, dopo ibridazione, sono stati lavati con le soluzioni di lavaggio “Agilent washing solution” 1 e 2, ed asciugati all’aria. Si è quindi misurata l’intensità di fluorescenza con lo scanner, ScanArray Express Microarray Scanner (Packard Bioscience, Stati Uniti), con una risoluzione a 5 micron, alla tensione PMT variabile per ottenere un’intensità di segnale massima con meno dell’1% di saturazione della sonda. Gli spot sono selezionati sulla base della differenza di intensità di fluorescenza rispetto al background (regione intorno allo spot). Le immagini ottenute sono state quindi analizzate tramite Ima-Gene 9.0. I risultati microarray sono stati analizzati attraverso False Discovery Rate (FDR). Ed è stato considerato significativo un valore $P < 0.05$. Il rapporto dei valori di fluorescenza dei due canali (Cy3 e Cy5), normalizzati rispetto al background, indica la differenza di espressione e ha un cut-off di 0,3. Il rapporto di espressione è stato trasformato nel logaritmo in base 2. I valori di espressione genica del fegato normale sono stati comparati con quelli dei noduli e dei CE. E’ da notare che l’espressione genica del fegato normale dei due ceppi di ratto non ha mostrato differenze significative. L’analisi del cluster gerarchico è stata eseguita utilizzando un algoritmo basato sul coefficiente di correlazione di Pearson.

2.4. Estrazione delle proteine ed analisi Western blot

I fegati di topo sono stati omogenizzati in buffer di lisi [30 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 10% glicerolo, and 2 mM EDTA] contenente il Cocktail completo di inibitori di proteasi (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), e sonicati. Le concentrazioni proteiche sono state determinate utilizzando il Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizzando l'albumina bovina sierica come standard. Per l'analisi Western blot, sono state denurate aliquote di 80 µg di lisato proteico mediante bollitura in Tris-Glycine SDS Sample Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), separate con SDS-PAGE, e trasferite su membrane di nitrocellulosa (Invitrogen) mediante elettroblotting. Le membrane sono state bloccate in 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline contenente Tween 20 allo 0.1% per 1 ora e marcate con i seguenti anticorpi: anticorpi monoclonali di coniglio anti-p110 alfa (PIK3CA), anti-p-AKT, anti-SCD1, anti-COX-2, anti-p-SGK3, anti-p-ERK1/2, anti-p-Stat3 (Cell Signaling Technology), anticorpo monoclonale di topo anti-FASN (BD Biosciences), e anticorpo policlonale anti-Scl39A4/ZIP4 (Abcam, Cambridge, MA). Tutti gli anticorpi sono stati utilizzati alla diluizione di 1:300. Ciascuna membrana è stata incubata overnight con l'anticorpo primario, cui è seguita l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-coniglio (goat anti-rabbit HRP-conjugate; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluito 1:5000 per 1h. Successivamente le membrane sono state rivelate con il Super Signal West Pico (Pierce Chemical Co., New York, NY). I livelli di ciascuna proteina sono stati normalizzati sui livelli di β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; diluizione 1:20000)

e l'uguale caricamento di proteine nelle diverse corsie del gel è stato verificato attraverso colorazione reversibile con Red Ponceau.

3. Risultati

3.1. L'iperespressione di PIK3CA-E545K induce lo sviluppo di carcinomi epatocellulari nel topo.

Per valutare le capacità oncogene di PIK3CA nel fegato abbiamo iperespresso la forma mutata (E545K) nel fegato murino attraverso iniezione idrodinamica. Mentre l'iniezione del plasmide vuoto non ha indotto nessuna modificazione significativa della morfologia epatica, l'iniezione di PIK3CA-E545K ha determinato delle alterazioni caratteristiche (Figura 9 B,C).

Tre mesi dopo iniezione idrodinamica, infatti, sebbene macroscopicamente non fossero visibili alterazioni, a livello microscopico erano visibili numerose lesioni preneoplastiche focali nel parenchima epatico dei topi PIK3CA-E545K (Figura 9 B,C). Tali foci consistevano generalmente di più di 30 epatociti alterati, tutti mostravano la stessa morfologia a cellule chiare e forte contenuto lipidico, ed erano situati soprattutto nella zona 3 (area della vena centrolobulare) degli acini epatici. Non erano invece presenti lesioni neoplastiche in nessuno dei topi PIK3CA-E545K esaminati.

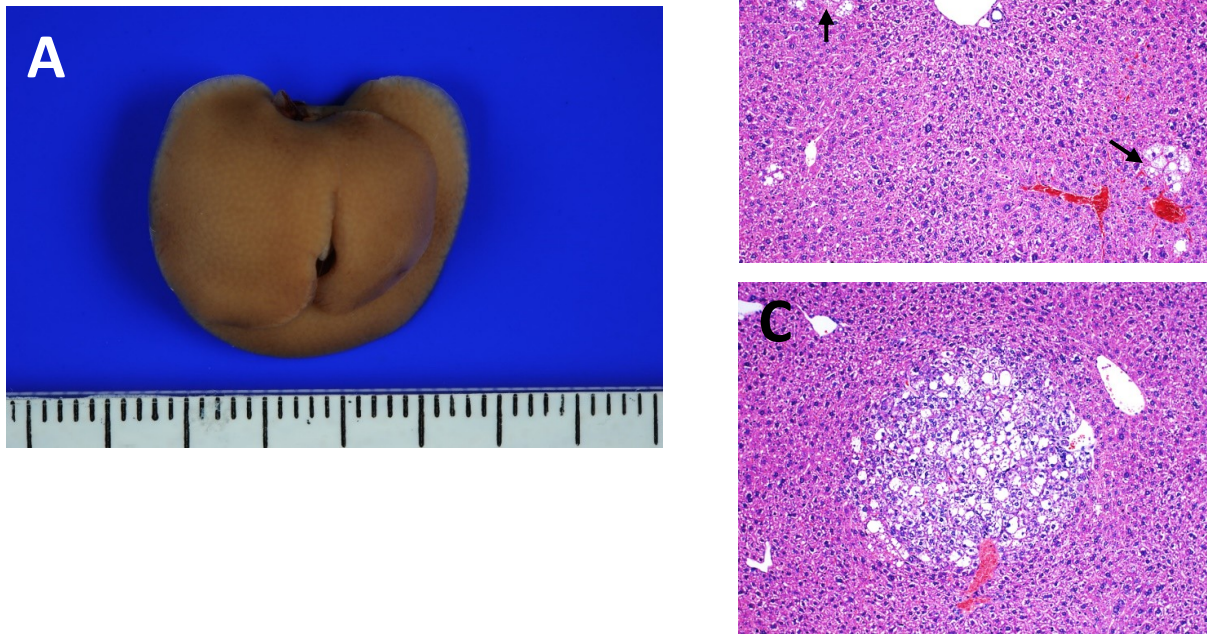


Figura 9. L'iniezione idrodinamica del gene PIK3CA-E545K induce lo sviluppo di lesioni preneoplastiche nel fegato di topo tre mesi dopo iniezione. (A) A livello macroscopico l'aspetto del fegato appare normale. (B,C) A livello microscopico, invece, si apprezzano numerose lesioni preneoplastiche focali (indicate dalle frecce). (C) Alcune di tali lesioni appaiono abbastanza voluminose. Tali lesioni appaiono composte da epatociti rigonfi con abbondante citoplasma ed aspetto a "cellule chiare", a causa del loro elevato contenuto in lipidi e glicogeno. Ingrandimenti originali: x 100 in B e C.

Sei mesi dopo l'iniezione idrodinamica del plasmide PIK3CA-E545K, il fegato di tutti i topi PIK3CA-E545K risultava in larga parte sostituito da formazioni tumorali occupanti porzioni consistenti dei lobi epatici. Tali formazioni erano facilmente identificabili a livello macroscopico come aree pallido-biancastre, di consistenza più molle rispetto al parenchima circostante e frequentemente caratterizzate da accumulo di liquido al loro interno (Figura 10 A e B). A livello microscopico tali lesioni erano costituite in maniera predominante da cellule con ampio citoplasma chiaro, a causa dell'elevato contenuto in lipidi e glicogeno (Figura 10 C e D).

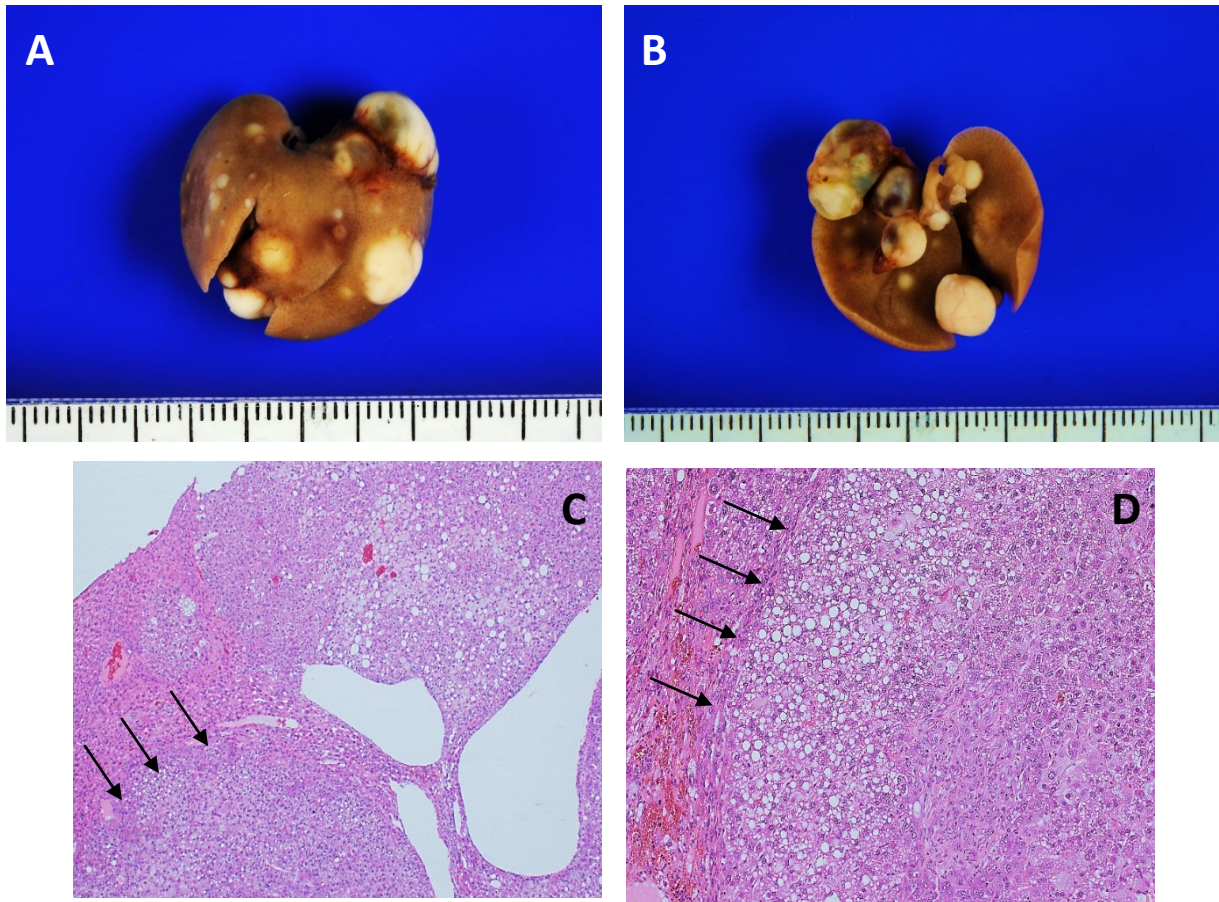


Figura 10. L'iniezione idrodinamica del gene PIK3CA-E545K induce lo sviluppo di lesioni neoplastiche multiple nel fegato di topo sei mesi dopo iniezione. (A,B) A livello macroscopico l'aspetto del fegato appare alterato, per la presenza di numerose formazioni nodulari di colore bianco-giallastro. (C) A livello microscopico, tali noduli risultano costituiti da tumori epatocellulari (indicati dalle frecce). (D) A maggiore ingrandimento, il tumore appare formato da numerose cellule con citoplasma chiaro, a causa dell'elevato contenuto in glicogeno e lipidi. Ingrandimenti originali: x40 in C; x100 in D.

3.2. L'analisi microarray ha consentito l'identificazione dei bersagli di PIK3CA mutato nelle lesioni epatiche murine

Per identificare i geni e le vie di segnale indotte dall'attivazione di PIK3CA, sono stati analizzati i profili di espressione genica nei fegati normali (A), tessuti circostanti i tumori (contenenti lesioni preneoplastiche; B) e nei fegati tumorali (C). Il clustering gerarchico ottenuto, ha mostrato due gruppi ben separati di cDNA di topi transfettati con la forma mutata PI3KCAE545K ed i loro controlli appaiati, sulla base di pattern di espressione simili (Figura 11). L'analisi dei dati eseguita, utilizzando un'alta stringenza statistica, ha rivelato che vi è una significativa differenza d'espressione di 31 geni tra i campioni del gruppo A con quelli del gruppo B ($p < 0.05$). L'iper-regolazione dei geni dei campioni del gruppo B interessa geni coinvolti nel trasporto dell'ossigeno (Hbb-b1), nella regolazione della crescita cellulare (IGFBP1), nella risposta di difesa ai batteri (Hamp1) e nel trasporto degli ioni calcio (ATP2A1). Inoltre, sono stati identificati 23 geni ipoespressi (Tabella 1). L'iper-regolazione di PIK3CA ha mostrato 57 geni differentemente espressi nel fegato tumorale rispetto ai fegati normali, 40 geni iper-regolati e 17 ipo-regolati (Tabella 2). È stato interessante osservare un cambiamento significativo risultante dal confronto tra i profili di espressione dei campioni del gruppo B (lesioni preneoplastiche) con quelli del gruppo C (campioni tumorali). Soltanto 4 geni, infatti, ossia Slc39a4, FASN, APOC2 e Fabp1, risultano espressi in modo diverso e sono sovraregolati nei tumori rispetto ai tessuti circostanti i tumori (Tabella 3).

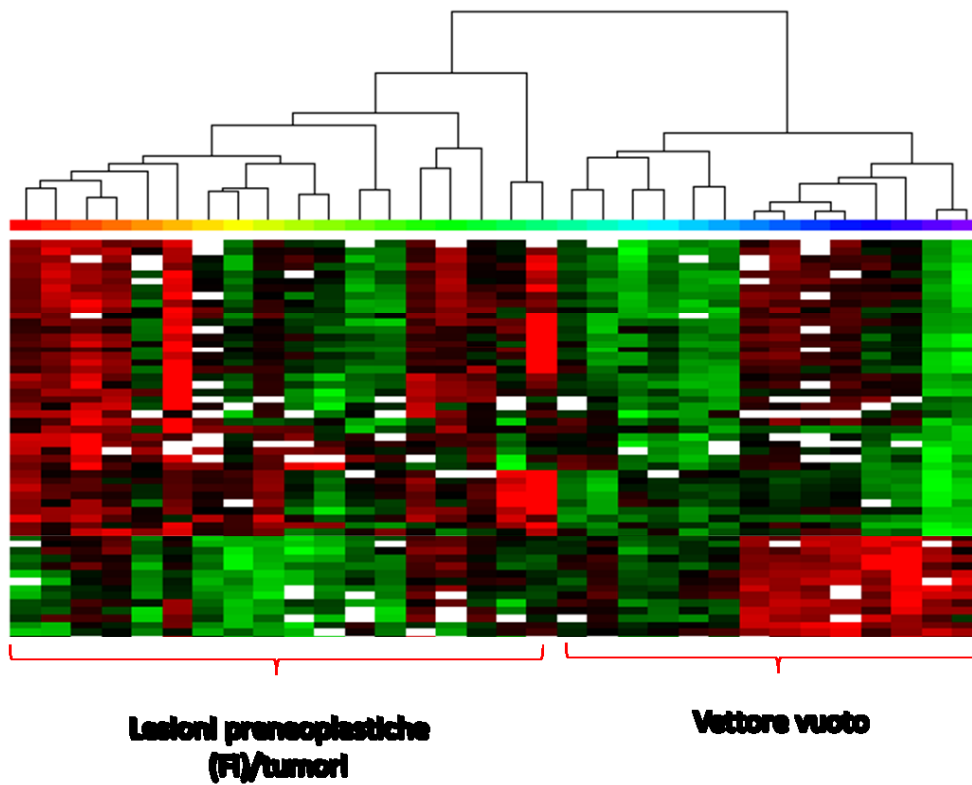


Figura 11. Cluster gerarchico, dove sono rappresentati tutti i geni suddivisi in due raggruppamenti principali sulla base di pattern di espressione simili, geni espressi in maniera simile saranno funzionalmente correlati.

TargetID	Gene Symbol	Biological Process	Sets	<Fi> vs. <vv> (31:21)		
			/	Log ...	Q-V...	
NM_024437	Nudt7	acetyl-CoA catabolism, coenzyme A catabolism			-1.5149	0.0184
NM_011314	Saa2	acute-phase response			-2.1904	0.0000
AK011413	Mup1				-1.7890	0.0000
NM_028341	2810439F02Rik				-0.8266	0.0379
NM_175250	2810007J24Rik				-0.8644	0.0461
NM_008648	Mup4	transport			-2.2022	0.0001
NM_008768	Orm1	acute-phase response, transport			-0.8007	0.0262
NM_011315	Saa3	acute-phase response			-1.2131	0.0000
NM_009117	Saa1	acute-phase response			-2.4405	0.0000
NM_013541	Gstp1	glutathione metabolism, metabolism			-0.8842	0.0223
NM_144511	EG13909				-0.9309	0.0223
TC1755975					-1.1202	0.0025
NM_031188	Mup1				-3.1259	0.0000
AF288221					-0.9785	0.0116
NM_017399	Fabp1	transport			-1.2255	0.0024
NAP112201-1					-1.6050	0.0000
NAP102507-1					-1.2968	0.0003
NM_009117	Saa1	acute-phase response			-1.9029	0.0000
NM_011458	Serpina3k				-0.9331	0.0461
BC037152	Mup1				-1.7790	0.0000
AK031235	9430028L06Rik				-1.2036	0.0147
NM_001081285	RP23-68L5.1				-1.1277	0.0027
NM_008649	Mup5	transport			-3.0745	0.0000
AK039091					1.4833	0.0147
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, transport			1.0572	0.0009
NM_008341	Igfbp1	regulation of cell growth			0.9732	0.0253
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, transport			0.7799	0.0355
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, transport			0.7651	0.0147
NM_001039678	EG231903				1.8028	0.0001
NM_032541	Hamp1	defense response to bacteria, defense resp...			0.8932	0.0092
NM_007504	Atp2a1	calcium ion transport, ion transport, regulati...			1.0346	0.0105

Tabella 1. Lesioni preneoplastiche vs Vettore vuoto.

TargetID	Gene Symbol	Biological Process	Sets	<tumor> vs. <vv> (57:48)	
				/	Log R... Q-Value
NM_011314	Saa2	acute-phase response	█	↓	-2.4964 0.0000
NM_008648	Mup4	transport	█	↓	-2.0301 0.0000
AK013640	2900042K05Rik		█	↓	-0.9894 0.0374
XM_979235	EG665756		█	↓	-1.2301 0.0472
NM_011315	Saa3	acute-phase response	█	↓	-1.1773 0.0002
NM_009117	Saa1	acute-phase response	█	↓	-2.6656 0.0000
NM_031188	Mup1		█	↓	-3.0793 0.0000
AF288221			█	↓	-1.0029 0.0181
NM_130887	Papln		█	↓	-1.0170 0.0472
NAP112201-1			█	↓	-1.5207 0.0000
NM_009117	Saa1	acute-phase response	█	↓	-2.7221 0.0000
BC037152	Mup1		█	↓	-1.6699 0.0000
AK031235	9430028L06Rik		█	↓	-1.3813 0.0020
NM_001081285	RP23-68L5.1		█	↓	-1.1645 0.0058
NM_008649	Mup5	transport	█	↓	-2.9371 0.0000
NM_001001980	3732412D22Rik		█	↓	-0.9691 0.0426
BC067070	4932415G12Rik		█	↓	-0.9042 0.0314
NM_028064	Slc39a4	transport, zinc ion homeostasis, zinc io...	█	↑	0.7703 0.0406
NM_007475	Arbp		█	↑	0.8513 0.0475
NM_007990	Fau	protein biosynthesis, protein modification	█	↑	0.9637 0.0284
NM_007474	Aqp8	transport, water transport	█	↑	0.9204 0.0223
NM_009690	Cd5l	apoptosis	█	↑	0.9713 0.0058
NM_007438	Aldoa	glycolysis	█	↑	0.7319 0.0472
NM_031170	Krt8	cytoskeleton organization and biogene...	█	↑	0.7698 0.0420
NM_007980	Fabp2	transport	█	↑	0.8228 0.0406
NM_007988	Fasn	Fatty acid synthase	█	↑	0.9248 0.0123
ENSMUST0000008...	COX2	Cytochrome c oxidase	█	↑	0.8998 0.0418
NM_009695	Apoc2	lipid catabolism, lipid metabolism, lipid t...	█	↑	1.4048 0.0002
NM_011295	Rps12		█	↑	1.0205 0.0072
NM_009076	Rpl12		█	↑	0.9634 0.0367
NM_009080	Rpl26		█	↑	0.7923 0.0406
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, trans...	█	↑	1.5790 0.0000
NM_009997	Cyp2a4	electron transport, transport	█	↑	1.2571 0.0104
NM_007899	Ecm1	transport	█	↑	0.9028 0.0343
NM_013465	Ahsg	ossification	█	↑	0.9283 0.0284
NM_009673	Anxa5	blood coagulation	█	↑	0.8266 0.0472
NM_008155	Gpi1	gluconeogenesis, glycolysis	█	↑	0.8429 0.0326
NM_008341	Igfbp1	regulation of cell growth	█	↑	1.5861 0.0001
NM_010359	Gstm3	metabolism	█	↑	1.3661 0.0001
NM_010358	Gstm1	metabolism	█	↑	1.2839 0.0011
NM_013913	Angptl3		█	↑	0.7545 0.0406
NM_008143	Gnb2l1	intracellular signaling cascade, protein ...	█	↑	0.8614 0.0475
NM_009450	Tubb2a	microtubule-based process	█	↑	1.0431 0.0236
NM_027015	Rps27		█	↑	0.9768 0.0239
M20632			█	↑	0.8609 0.0447
M10466	Hba-a2		█	↑	1.1188 0.0121
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, trans...	█	↑	1.1351 0.0017
NM_009373	Tgm2	G-protein signaling, coupled to IP3 sec...	█	↑	0.8206 0.0241
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, trans...	█	↑	1.2468 0.0001
NM_008218	Hba-a1	oxygen transport, transport	█	↑	1.0446 0.0465
NM_007954	Es1		█	↑	0.8378 0.0382
NM_010358	Gstm1	metabolism	█	↑	1.0452 0.0027
NM_145146	Afm	transport	█	↑	0.8596 0.0407
NM_016844	Rps28		█	↑	0.8246 0.0472
NM_032541	Hamp1	defense response to bacteria, defens...	█	↑	1.2600 0.0001
NM_009127	Scd1	fatty acid biosynthesis, lipid biosynthesis	█	↑	1.0332 0.0201
NM_009997	Cyp2a4	electron transport, transport	█	↑	0.8405 0.0472

Tabella 2. Tumore vs Vettore vuoto











TargetID	Gene Sym...	Biological Process	Sets treatment - <tumor> vs. <Fi> (5:5)			
				/	Log Ratio	Q-Value
NM_001039678	EG231903				-2.2436	0.0016
NM_028064	Slc39a4	transport, zinc ion homeostasis, zinc ion transport			1.1142	0.0175
NM_007988	Fasn	fatty acid synthesis			1.2552	0.0075
NM_009695	Apoc2	lipid catabolism, lipid metabolism, lipid transport, transport			1.3075	0.0042
NM_017399	Fabp1	transport			1.3094	0.0026

Tabella 3. Tumore vs lesioni preneoplastiche

3.3. Conferma di alcuni dei bersagli di PIK3CA mutato identificati con analisi microarray attraverso immunohistochimica e analisi Western blot.

Successivamente abbiamo confermato alcuni risultati ottenuti con la metodica microarray attraverso immunohistochimica. Come atteso, una forte immunoreattività per le proteine bersaglio di PIK3CA, FASN e SCD1, è stata evidenziata nelle lesioni preneoplastiche e nei tumori epatocellulari dei topi iniettati con il plasmide PIK3CA-E545K (Figura 13,14), mentre tali proteine erano scarsamente espresse nei fegati dei topi normali (dati non mostrati) ed in quelli dei topi iniettati con il vettore vuoto (Figura 12).

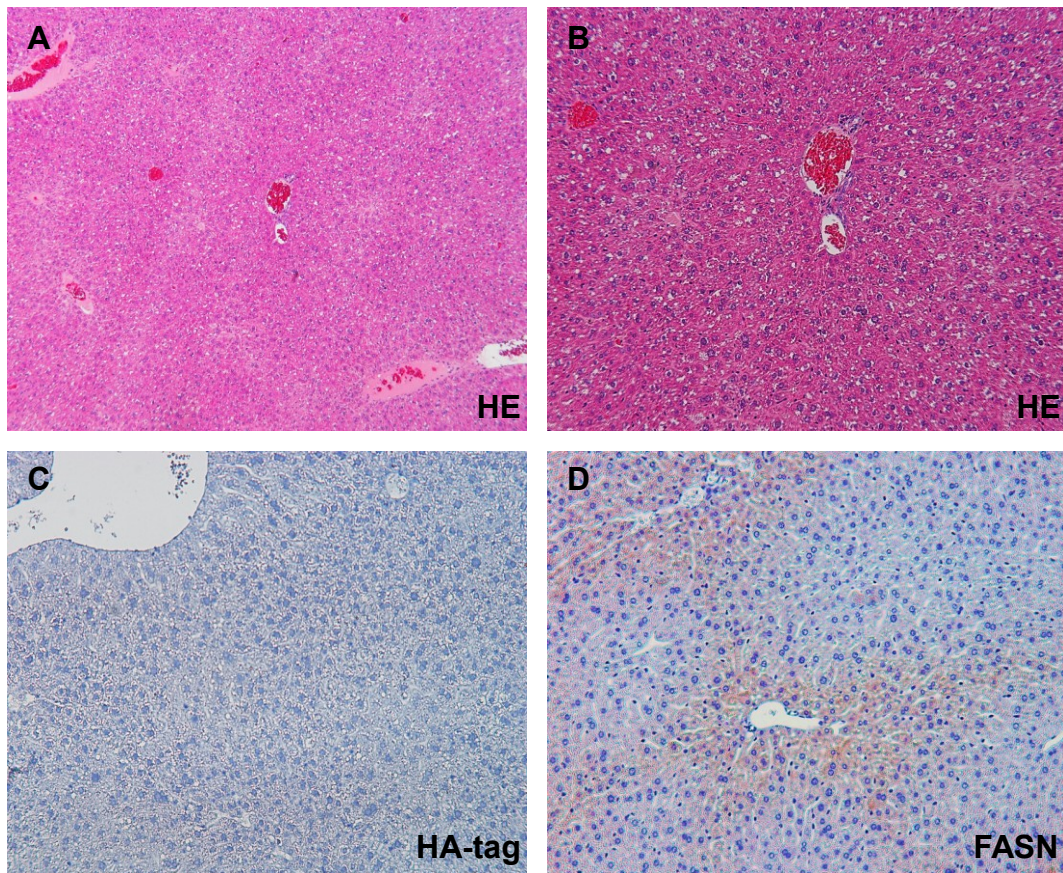


Figura 12. I fegati dei topi iniettati con vettore vuoto mostrano scarsa immunoreattività ai bersagli di PIK3CA. (A,B) Assenza di alterazioni istologiche di rilievo nei preparati colorati con ematossilina e eosina (HE) a minore e maggiore ingrandimento, rispettivamente. Il fegato dei topi iniettati con vettore vuoto (6 mesi dopo iniezione idrodinamica) non presenta, come atteso, positività alla colorazione per l'HA-tag, ossia il marcatore del plasmide PIK3CA, (C) e bassa immunoreattività per i bersagli molecolari di PIK3CAE545K (FASN è mostrato in D). Ingrandimento: x40 in A; x100 in B-D.

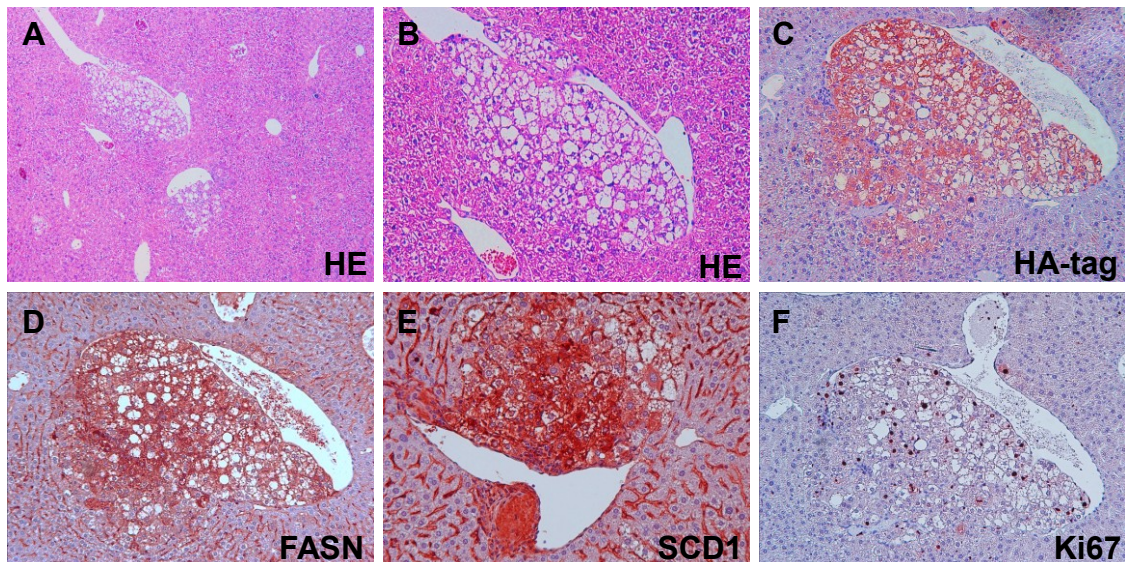


Figura 13. L'iniezione idrodinamica del gene PIK3CAE545K induce lo sviluppo di lesioni preneoplastiche nel fegato di topo che esprimono elevati di FASN e SCD1. (A,B) A minore e maggiore ingrandimento si apprezza la presenza di lesioni preneoplastiche focali nel fegato di topo a partire da 3 mesi dopo iniezione idrodinamica. Le lesioni sono positive, a livello immunoistochimico, per il costrutto iniettato (indicato dalla positività alla colorazione per l'HA-tag; C) e per i bersagli molecolari di PIK3CAE545K (la colorazione per FASN e SCD1 è mostrata rispettivamente in D ed E). L'attività proliferativa delle lesioni è evidenziata dalla positività delle medesime alla colorazione nucleare per Ki67 (mostrato in F; le frecce indicano due figure mitotiche). Ingrandimento: x40 in A; x100 in B-F.

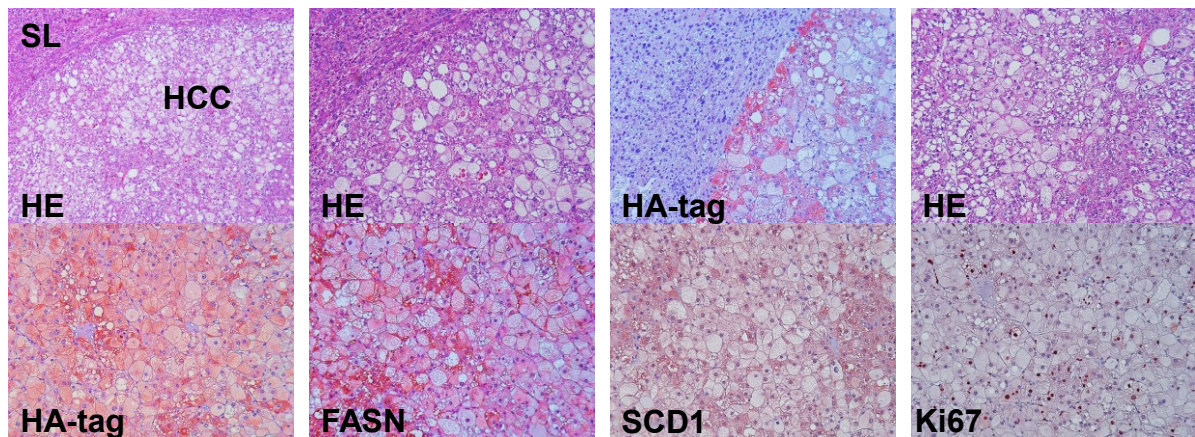


Figura 14. L'iniezione idrodinamica del gene PIK3CAE545K induce lo sviluppo di carcinomi epatocellulari (HCC) nel fegato di topo che mostrano immunoreattività per FASN e SCD1. (A,B) A minore e maggiore ingrandimento si apprezza la presenza di HCC, che tendono ad espandersi nel fegato circostante (SL). Gli HCC iniziano a comparire nei topi iniettati con PIK3CAE545K a partire dal 5 mese dopo iniezione idrodinamica. La colorazione per il costrutto iniettato (HA-tag) è limitata alle cellule tumorali (C). Le lesioni tumorali sono costituite da epatociti maligni di grandi dimensioni e citoplasma chiaro, a causa dell'accumulo intracellulare di lipidi (D). Le lesioni sono positive, a livello immunohistochimico, per il costrutto iniettato (indicato dalla positività alla colorazione per l'HA-tag; E) e per i bersagli molecolari di PIK3CAE545K (la colorazione per FASN e SCD1 è mostrata rispettivamente in F e G). L'attività proliferativa delle lesioni maligne è dimostrata dalla positività alla colorazione nucleare per Ki67 (mostrato in H). Ingrandimento: x40 in A; x100 in B-G.

I livelli di FASN e SCD1, così come quelli di altri bersagli di PIK3CA (COX2 e ZIP4) sono stati valutati attraverso analisi Western blot dei fegati di topi iniettati con vettore vuoto, tessuti circostanti i tumori (lesioni preneoplastiche) ed i tumori. Come atteso, i livelli di FASN, SCD1, COX2 e ZIP4 erano più elevati nei tumori rispetto agli altri gruppi, mentre non erano visibili differenze tra i fegati dei topi iniettati con vettore vuoto ed i fegati circostanti i tumori (Figura 15). L'assenza di differenze tra gli ultimi

gruppi è presumibilmente dovuta alla presenza di ampie parti di tessuto sano nei fegati circostanti i tumori con conseguente annullamento delle differenze medesime.

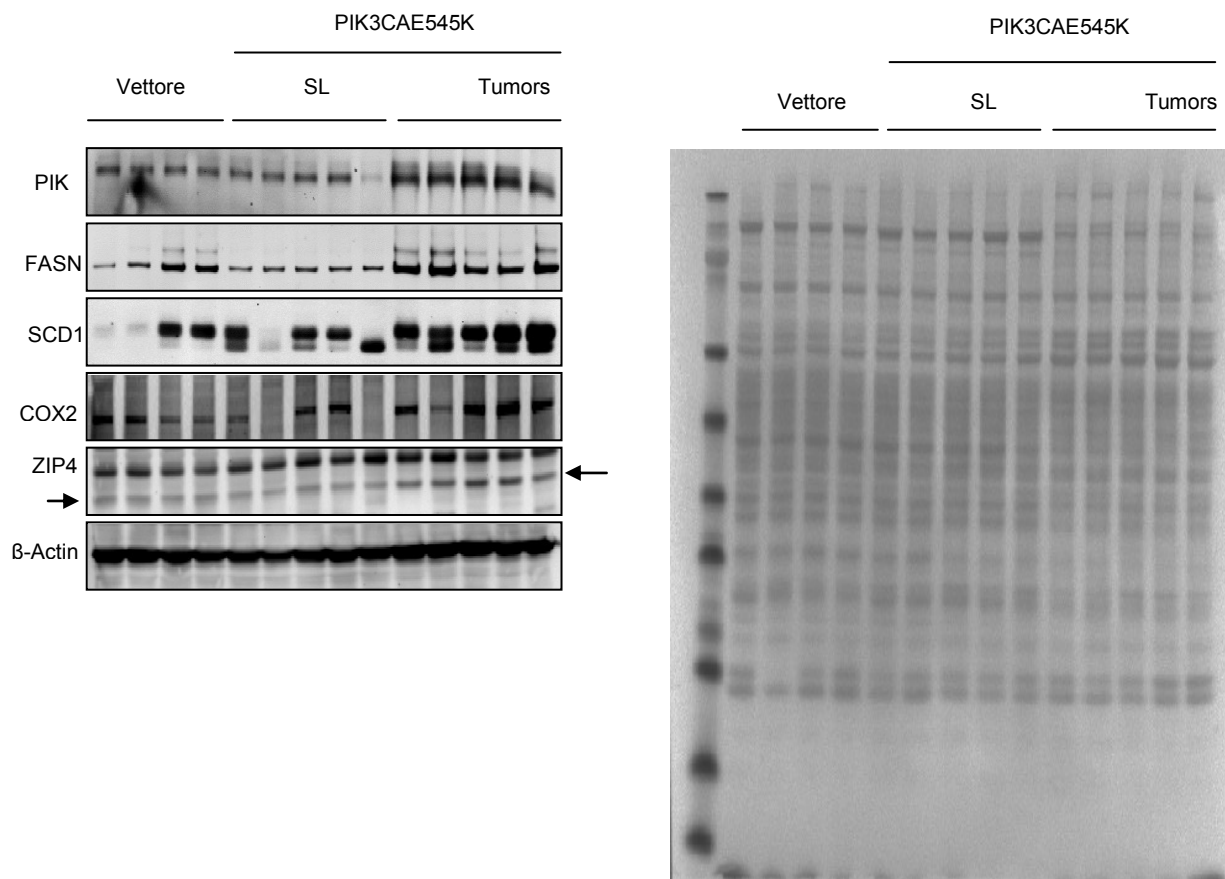


Figura 15. (A) Analisi Western blot dei fegati iniettati con il vettore vuoto (Vettore), e fegati circostanti i tumori ed i tumori dei topi iniettati con il plasmide PIK3CA-E545K. Da quattro a sette campioni per gruppo sono stati valutati. I risultati indicano un'elevata espressione, oltre che di PIK3CA, di FASN, SCD1, COX2 e ZIP4 nei tumori dei topi PIK3CA-E545K. **(B)** Colorazione al Rosso Ponceau che indica il caricamento di un'equivalente contenuto di proteine totali in ciascun campione .

4. **Discussione**

Alterazioni a livello della via di segnale PI3K/AKT/mTOR sono comuni a differenti tumori solidi, e la sua aumentata attivazione può essere il risultato di mutazioni a livello dei geni PI3K o AKT, della perdita di funzione della proteina PTEN, o dell'attivazione costitutiva dei recettori tirosin-chinasi a monte di PI3K. La scoperta di biomarcatori, che possano funzionare da bersagli molecolari, per contrastare lo sviluppo e la progressione di differenti neoplasie, è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi farmaci di successo. Un biomarcatore può essere un gene mutato che comporta una alterazione oncogena nota, una proteina iperespressa oppure una proteina che riflette lo stato di attivazione di una specifica via di segnale (77). Le PI3K svolgono un ruolo importante nel cancro umano. Il gene che codifica la subunità p110 α , PIK3CA, è spesso mutato nei più comuni tumori umani, tra cui il carcinoma della mammella, della prostata, del colon e dell'endometrio.

Mutazioni a livello di PIK3CA, comprese quelle che riguardano i domini catalitici ed elicoidali comportano numerose lesioni molecolari, le quali possono favorire la capacità oncogena di PIK3CA. Inoltre, tali mutazioni possono avere diversi ruoli funzionali, anche se non completamente definiti, e un comportamento clinico differente a seconda del tipo di tumore. Ad esempio, recenti studi hanno dimostrato che per quanto riguarda il cancro alla mammella, le mutazioni PIK3CA mostrano un esito diverso a seconda che il tumore sia positivo o negativo ai recettori degli estrogeni e se HER2 (recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano) è iper-espresso o amplificato rispetto a HER2-normale (78). Inoltre le mutazioni PIK3CA sono associate ad una bassa espressione di Ki67.

Nel caso del carcinoma endometriale (EC), gli studi indicano alterazioni molecolari differenti rispetto al carcinoma non endometriode (NEC). Il EC coinvolgere mutazioni a livello delle proteine PTEN, PIK3CA, K-ras, e β -catenina, e difetti nel meccanismo di riparazione del DNA. Invece il NEC, presenta principalmente alterazioni a livello di p53 (nel 90% dei casi) e sovraespressione del recettore per il fattore di crescita epidermico umano HER-2 (79).

Di recente sono stati identificati diversi bersagli della via PI3K/AKT capaci di promuovere la sopravvivenza cellulare. Tali substrati includono due componenti del macchinario della morte cellulare intrinseca, BAD, caspasi 9, fattori di trascrizione della famiglia forkhead, e una chinasi IKK, che regola il fattore di trascrizione NF-kB (80). Un recente studio ha mostrato, nel caso del carcinoma epatocellulare, fosforilazioni a livello delle chinasi a valle di PI3K, quali mTOR e P70S6 rispettivamente nel 15 e 45% dei casi di CE (81). Analisi biochimiche su cellule del carcinoma del colon-retto (CRC) hanno mostrato che PIK3CA mutante, regola selettivamente la fosforilazione di AKT e la trascrizione dei fattori forkhead FKHR e FKHL1. Inoltre le mutazioni PIK3CA inducono l'attenuazione dell'apoptosi e facilitano l'invasione tumorale (82). Dalla letteratura si evince che il ruolo oncogeno di PIK3CA nell'induzione del CE rimane ancora poco definito. Tuttavia, attraverso gli esperimenti condotti nella presente ricerca si evidenzia che l'iperespressione del gene PI3KCA E545K ha indotto significative modificazioni morfologiche nel fegato dei topi sottoposti a trasferimento genico idrodinamico dimostrando quindi che l'introduzione della forma mutata è sufficiente per l'induzione della neoplasia epatica.

In particolare, l'analisi microarray ha rivelato la presenza di una serie di geni alterati nelle lesioni preneoplastiche e nei carcinomi epatocellulari dei topi PIK3CA-E545K rispetto ai fegati di controllo.

Il presente studio fornisce dunque un dettagliato quadro dei meccanismi molecolari coinvolti nell'epatocancerogenesi indotta dall'oncogene PIK3CA. L'evidenza attuale indica che numerosi tumori epiteliali sono caratterizzati da una aumentata sintesi lipidica. A livello molecolare, l'aumentata lipogenesi comporta, nelle cellule neoplastiche, un'induzione progressiva dell'attività e dell'espressione di diversi enzimi lipogenici, come l'acido grasso sintetasi o FASN; ATP citrato liasi o ACLY; Acetil-CoA carbossilasi o ACC e stearoil-CoA desaturasi 1 o SCD1. Tali enzimi sono responsabili del metabolismo del glucosio, con conseguente sintesi degli acidi grassi. In particolare, FASN catalizza la condensazione del malonil-CoA per produrre il palmitato, mentre SCD1 catalizza la sintesi di acidi grassi monoinsaturi, utilizzati come substrati per la sintesi di trigliceridi, esteri del colesterolo e fosfolipidi (83-84). Recenti studi hanno mostrato una lipogenesi alterata, correlata con l'aggressività clinica del CE e l'attivazione della cascata PI3K/AKT/mTOR (85). Questi enzimi, sono attivati a livello trascrizionale dalla sterol regulatory element-binding protein (SREBP)1, dal liver X Receptor (LXR) alfa e beta, e dalla carbohydrate responsive element binding protein (chREBP) (86). Le SREBP svolgono importanti ruoli nella regolazione del metabolismo lipidico. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che l'espressione di FASN è controllata anche da altri fattori di trascrizione, come le proteine della famiglia p53 e dalla proteina nucleare collegata alla lipogenesi, SPOT14, la quale risulta sovraespressa nei tumori della mammella (87). I livelli di espressione di SCD1 sono spesso elevati in diversi tipi

di cancro. Alcuni studi, centrati sugli effetti indotti dall'inibizione di SCD1, sulla crescita del tumore, hanno mostrato una diminuzione modesta della crescita cellulare, delle cellule del carcinoma renale a cellule chiare (ccRCC) (88,89,90), delle cellule del carcinoma gastrico (91) e delle cellule tumorali del colon (92). Inoltre, è stato visto che in vitro, l'inibizione di SCD1 porta ad induzione di stress cellulare correlato al reticolo endoplasmatico e apoptosi nelle linee cellulari multiple (89,91). L'importanza della lipogenesi anomala nel cancro è sottolineata da una recente serie di dati che mostrano come la soppressione dei principali enzimi lipogenici sia in grado di ridurre fortemente la crescita di varie linee cellulari tumorali in vitro e di ridurre la tumorigenesi in vivo (93).

La valutazione del ruolo di FASN come eventuale oncogene metabolico sarà utile per fornire nuove informazioni in grado di correlare obesità, diabete di tipo 2, steatosi epatica non alcolica con l'epatocancerogenesi.

Altri importanti bersagli molecolari di PI3KCA, coinvolti nella trasformazione tumorale, sono l'enzima ciclo ossigenasi 2 (COX-2) e il trasportatore di zinco ZIP4. COX-2, è un enzima chiave per la sintesi dei prostanoidei il quale sintetizza il mediatore pro-infiammatorio PGE2. In alcuni studi è stato osservato un aumento dei livelli di COX-2 e PGE2 nei carcinomi colo rettali, i quali sono in grado di promuovere l'invasività, l'angiogenesi e il potenziale metastatico (94). L'espressione di COX-2 svolge un importante ruolo nella sopravvivenza delle cellule tumorali del colon in condizioni di ipossia (95). Nei modelli animali, così come nell'uomo, l'inibizione di COX-2 riduce in modo significativo lo sviluppo dei tumori del colon (96). Per quanto riguarda ZIP4, diversi studi indicano che il trasporto e il metabolismo dello zinco è

associato con la progressione del cancro, soprattutto nel cancro al seno (97,98). Tuttavia, il meccanismo molecolare di come i trasportatori di zinco, regolino la crescita tumorale rimane poco chiaro. Inoltre altri dati, hanno dimostrato che la sovraespressione di ZIP4, è significativamente aumentata nella maggior parte delle linee di cellule di cancro pancreatico umano e nei campioni chirurgici di adenocarcinoma umano. L'analisi di tali meccanismi sarà di indubbio aiuto per una migliore comprensione della patogenesi molecolare dell'epatocarcinoma e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche contro questo tumore.

Bibliografia

1. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002;122:1609-1619.
2. Venook AP, Papandreou C et al. The Incidence and Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: A Global and Regional Perspective. *The Oncologist* 2010;15:5-13.
3. Nordenstedt H, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42:S206–S214.
4. Eskens FA, van Erpecum KJ et al. Hepatocellular carcinoma: Dutch guideline for surveillance, diagnosis and therapy. *The Journal of Medicine* 2014;72:299-304.
5. Kudo M. Management of hepatocellular carcinoma: from prevention to molecular targeted therapy. *Oncology* 2010;781:1-6.
6. Paraskevi A et al. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:674-687.
7. Sherman M. Epatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening. *Semin Liver Dis* 2005;25(2):143-154.
8. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11:97-107.
9. Boucher E et al. New drugs for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver International* 2009;29:148-158.
10. Kudo M. Hepatocellular carcinoma in 2011 and beyond: from the pathogenesis to molecular targeted therapy. *Oncology* 2011;81:1-10.
11. Simile MM, Frau M, Pascale RM, Feo F. New putative prognostic markers and therapeutic targets for the molecular approach to treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 2011;1(2):85-97.
12. Feo F, De Miglio MR., Simile MM, Muroni MR, Calvisi DF et al. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1765:126–147.
13. Bertino G. et al. Hepatocellular carcinoma: Novel molecular targets in carcinogenesis for future therapies. *BioMed Research International* 2014; 1-15.
14. Gomaa AI, Khan SA et al. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and Pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2008;14(27):4300-4308.
15. Block T M, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003;22:5093-5107.

16. Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001; 276:34671-34680.
17. Tagger A, Donato F et al. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. *Int J Cancer* 1999;81:695-699.
18. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res* 2012;42:741-749.
19. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005;436:946–952.
20. Teoh NC. Proliferative drive and liver carcinogenesis: Too much of a good thing? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2009;24:1817–1825.
21. Kirstein MM, Vogel A. The Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis* 2014;32:545-553.
22. Dong Y, Wang A. Aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma tumor suppression. *Oncology Letters* 2014;8:963-968.
23. Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:2271-2282.
24. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19:877-890.
25. Ishizaki Y et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of β -catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2004;24:1077–1083.
26. Edamoto Y et al. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer* 2003;106:334-341.
27. Ito Y et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001;84:1377-1383.
28. Feitelson MA et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:2593-2604.
29. Dragani TA. Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics *Journal of Hepatology* 2010;vol.52:252-257.
30. Libbrecht L, Desmet V et al. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver International* 2005;25:16-27.
31. Biggs JR, Fraft AS. Inhibitors of cyclin-dependent kinase and cancer. *J Mol Med* 1995;73:509-514.

32. Bressac B, Galvin KM, Liang TJ et al. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Acad Sci USA* 1990;87:1973-1977.
33. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:225-237.
34. Calvisi DF, Frau M, Tomasi ML, Feo F, Pascale RM. Deregulation of signalling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: Novel insights from interspecies comparison. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1826:215-237.
35. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296(5573):1655-7.
36. Vivanco I, Sawyers CL. The Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002; 489-501.
37. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 2008;27:6473-6488.
38. Steelman LS, Chappell WH et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *AGING* 2011;3:192-222
39. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Molecular and Cellular Oncology* 2014;4:64:1-11.
40. Karakas B. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers, *British Journal of Cancer* 2006;94: 455-459.
41. Franke TF, Hornik CP, et al. "PI3K/Akt and apoptosis: size matters". *Oncogene* 2003; 22:8983-8998.
42. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochemical Sciences* 2004;29:233-42.
43. Bijay S, Jaiswal et al. Somatic Mutations in p85a Promote Tumorigenesis through Class IA PI3K Activation, *Cancer Cell* 2009;16:463-474.
44. Zaho L Vogt PK. Class I in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008;27: 5486-5496.
45. Tzenaki N. p110 δ PI3 kinase pathway:emerging roles in cancer. *Molecular and Cellular Oncology*2013;40,3:1-16.
46. Martelli AM, Nyakern M, et al. "Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukaemia".*Leukemia* 2006; 20:911-928.
47. German S et al, Carcinogenesis of PIK3CA. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* e2013;11:5.
48. Ocana A et al, Activation of the PI3K/mTOR/AKT Pathway and Survival in Solid Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis, *PLOS ONE* 2014; 9, 4.

49. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17: 615-675.
50. Y Tanaka et al. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients, *Oncogene* 2006;25:2950-2952.
51. Yardena S et al. Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;347:21-41.
52. Yardena S et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers, *SCIENCE* 2004; 304.
53. Carnero A, Paramio JM. The PTEN/PI3K/AKT pathway in vivo, cancer mouse models. *Frontiers in Oncology* 2014; 4:252.
54. Weigelt B, Downward J. Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer, *Frontiers in Oncology* 2012;2:109.
55. Yardena S et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells, *Cancer Cell* 2005;7:561-672.
56. Alyssa L, Kennedy et al. Activation of the PIK3CA/AKT Pathway Suppresses Senescence Induced by an Activated RAS Oncogene to Promote Tumorigenesis, *Molecular Cell* 2011;42:36–49.
57. Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene Therapy* 2007;14:99–107.
58. Takeshi S, Dexi L. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. *Molecular Therapy* 2007;15:2063-2069.
59. G Zhang, X Gao et al, Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Therapy* 2004;11:675-682.
60. Chen X, Calvisi DF. Hydrodynamic Transfection for Generation of Novel Mouse Models for Liver Cancer Research, *The American Journal of Pathology* 2014;Vol.184:912-923.
61. Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, et al. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Current gene therapy* 2009; 9:128-135.
62. Liu F, Song Y, Liu D.: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258–1266.
63. Maruyama H et al. Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats. *Hum Gene Ther* 2002;13:455-468.
64. Tsoulfas G et al. Hydrodynamic plasmid DNA gene therapy model in liver transplantation. *J Surg Res* 2006;135:242-249.

65. Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 2006;13:1696–1702.
66. Turchiano G et al. Genomic Analysis of Sleeping Beauty Transposon Integration in Human Somatic Cells, *PLOS ONE* 2014; Volume 9, Issue 11.
67. Bell JB, Podetz-Pedersen KM et al. Preferential delivery of the Sleeping Beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection, *Nature Protocols* 2007;2:3153-3165.
68. Budker VG et al. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000;2:874-888.
69. Khorsandi SE et al. Minimally invasive and selective Hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther* 2008;15:225-230.
70. Feitelson et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis *Oncogene* 2002;21:2593 -2604.
71. Hashem B et al. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
72. Bruix J et al, Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2004; 5(3):215-9.
73. Calvisi DF et al, Dissection of Signal Transduction Pathways as a Tool for the Development of Targeted Therapies of Hepatocellular Carcinoma *Recent Clinical Trials* 2007; 2:217-236.
74. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-1274.
75. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.
76. Villanueva A et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1972-198.
77. Ocana A et al. Activation of the PI3K/mTOR/AKT Pathway and Survival in Solid Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One* 2014;9(4):1-8.
78. Barbareschi M et al. Different Prognostic Roles of Mutations in the Helical and Kinase Domains of the PIK3CA Gene in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13(20):6064-6069.
79. Ying Dong MD et al. PIK3CA mutations in endometrial carcinomas in Chinese women: phosphatidylinositol 3-kinase pathway alterations might be associated with favorable prognosis. *Human Pathology* 2012;43:1197-1205.
80. Sandeep Robert Datta, Anne Brunet, and Michael E. Greenberg Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & Development* 1999;13:2905–2927

81. Tanaka Y et al. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Oncogene* 2006;25:2950-2952.
82. Yardena S et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005; 7:561-573.
83. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008;29:2959-2971.
84. Flowers MT, Ntambi JM.: Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:248-256.
85. Calvisi DF et al. Increased Lipogenesis, Induced by AKT-mTORC1-RPS6 Signaling, Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1071-1083
86. Kuhajda FP. Fatty-acid Synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000;16:202–208.
87. Mashima T, Seimiya H, and Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer* 2009;100:1369-1372.
88. Ackerman D, Simon MC. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends in Cell Biology* 2014;24:472-478.
89. Von Roemeling CA et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2013;19:2368–2380.
90. Leung JY, Kim WY. Stearoyl Co-A desaturase 1 as a ccRCC therapeutic target: death by stress. *Clin. Cancer Res* 2013;19:3111-3113.
91. Roongta UV et al. Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol. Cancer Res* 2011;9:1551-1561.
92. Mason, P. et al. (2012) SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLoS ONE* 7, e33823
93. Hatzivassiliou, G. et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 2005;8:311–321.
94. Sansone P et al. Cyclooxygenase-2/carbonic anhydrase-IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13: 3876-3887.
95. Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, et al. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res.*2006; 66: 6683-91.

96. Gupta RA, DuBois RN, and Wallace MC. New avenues for the prevention of colorectal cancer: targeting cyclo-oxygenase-2 activity. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 2002; 16: 945-956.
97. Kagara N et al. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci* 2007; 98:692-697.
98. Min Li et al Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Pnas* 2007;104:18636-18641.