



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof.ssa Franca Deriu

INDIRIZZO IN EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI

Responsabile di Indirizzo: Prof. ssa Rosa Maria Pascale

XXVI CICLO

La completa inibizione della via di segnale mTORC1 è necessaria per la soppressione dell'epatocancerogenesi indotta dall'iperpressione dei protooncogeni AKT e N-Ras nel topo

Direttore:

Prof.ssa Franca Deriu

Tutor:

Prof.ssa Maria Maddalena Simile

Cotutor:

Dott. Diego Francesco Calvisi

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Maria Giulia Pilo

Anno Accademico 2012 - 2013

INDICE

SEZIONE COMPILATIVA

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e fattori di rischio.....	4
2. Cancerogenesi epatica multifasica.....	13
3. Via di trasduzione del segnale Ras/MAPK.....	16
4. Via di trasduzione del segnale AKT/mTOR.....	22
5. Metodica di trasferimento genico idrodinamico (“hydrodynamic gene delivery”).....	27
6. Modello murino AKT.....	32
7. Modello murino AKT/Ras.....	36
8. La co-attivazione di AKT e Ras nel fegato di topo promuove una rapida cancerogenesi attraverso le vie di trasduzione del segnale mTORC1, FOXM1/SKP2, e c-Myc.....	39
9. Il trattamento con Rapamicina rallenta l’epatocarcinogenesi AKT/Ras indotta, ma innesca un feedback di attivazione della via di segnale MAPK nelle restanti cellule tumorali.....	41
10. La contemporanea inibizione delle vie di trasduzione del segnale mTORC1 e Ras/MAPK è svantaggioso per la crescita delle cellule AKT/Ras <i>in vitro</i>	44

SEZIONE SPERIMENTALE

1. Introduzione.....	47
2. Materiali e Metodi	
2.1. Costrutti e reagenti.....	51
2.2. Iniezione idrodinamica e trattamento dei topi.....	52
2.3. Istologia e immunohistochimica.....	54
2.4. Estrazione delle proteine ed analisi Western blot.....	55
3. Risultati	
3.1. La completa eliminazione di <i>Raptor</i> inibisce l'epatocancerogenesi indotta dai protooncogeni AKT e Ras <i>in vivo</i>	56
3.2. Il blocco della via di trasduzione del segnale di RPS6 attraverso la Rapamicina inibisce l'epatocancerogenesi AKT/Ras indotta.....	59
3.3. L'inibizione dell'asse 4E-BP1/eIF4E ad opera di 4E-BP1A4 ritarda lo sviluppo e la progressione del tumore epatico indotto dai protooncogeni AKT e Ras.....	62
3.4. Il trattamento combinato con Rapamicina ed iperespressione di 4E-BP1A4 inibisce completamente l'epatocancerogenesi indotta da AKT e Ras.....	65
4. Discussione.....	68
Bibliografia.....	71

SEZIONE COMPILATIVA

1. Il carcinoma epatocellulare: epidemiologia e fattori di rischio

Il tumore primitivo del fegato è una delle neoplasie più frequenti, rappresentando infatti il quinto tumore per incidenza ed il terzo per letalità al mondo ⁽¹⁾. Il cancro primitivo del fegato comprende, in base alle caratteristiche istologiche, il carcinoma epatocellulare (che rappresenta l'83% di tutti i casi), il colangiocarcinoma, l'epatoblastoma, il cistadenocarcinoma dei dotti biliari, l'emangiosarcoma e l'emangioendotelioma dell'epitelio ⁽²⁾.

Il carcinoma epatocellulare (CE o HCC, Hepato Cellular Carcinoma) è uno tra i più letali e prevalenti tumori nella popolazione umana ^(3,4). L'HCC rappresenta, infatti, la quinta neoplasia per incidenza, con 0,25-1 milione di nuovi casi diagnosticati ogni anno, e la terza per mortalità, con più di 500.000 morti l'anno ⁽¹⁾. La sua estrema aggressività clinica (risultante in un'aspettativa di vita media di circa sei mesi dal momento della diagnosi) scaturisce in parte dalla sua resistenza agli agenti antitumorali esistenti, in parte da una mancanza di marcatori che rivelino la presenza della patologia nei suoi primi stadi di sviluppo, e dal fatto che fondamentalmente una malattia al fegato limita l'uso di farmaci chemioterapici (in quanto questi ultimi richiedono generalmente attivazione metabolica a livello del fegato). In caso di malattia ai suoi primi stadi di sviluppo, la resezione chirurgica del tumore rappresenta un effettivo approccio terapeutico, così come iniezioni di etanolo o trattamenti di radiofrequenza. Un'opzione alternativa è fornita dal trapianto di fegato,

ma solo in pazienti che presentano determinati requisiti ⁽¹⁻⁴⁾. Il Sorafenib, un inibitore multichinasi, è il solo farmaco approvato per il trattamento dell'HCC ^(6,7). Tuttavia, il suo utilizzo è in grado di prolungare la sopravvivenza in pazienti con HCC non resecabile per un periodo limitato, in genere non superiore ai 3 mesi ⁽⁷⁾. La relativamente scarsa attività anti-neoplastica del Sorafenib è probabilmente dovuta all'attivazione di vie alternative di promozione della sopravvivenza da parte delle cellule tumorali ⁽⁸⁾.

In base a queste evidenze cliniche, è pertanto necessario lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento di questa patologia ⁽⁸⁾. Per raggiungere questo obiettivo, è necessaria una migliore caratterizzazione delle vie di segnale coinvolte nell'epatocancerogenesi. Inoltre, la costituzione di modelli di HCC di topo che ricapitolino le maggiori alterazioni che intervengono durante l'epatocancerogenesi potrebbe essere di notevole beneficio per studi farmacologici preclinici.

Sono state riscontrate differenze significative dell'incidenza dell'HCC nelle varie nazioni, differenze dovute a specifici fattori eziologici così come all'etnicità ⁽¹⁾. Tuttavia, la sua epidemiologia sta rapidamente cambiando, diventando l'HCC sempre più diffuso non solo nel Sud-Est Asiatico e in Africa, ma, a seguito del fenomeno dell'immigrazione, anche in Europa e nel Nord America ^(6,7).

Il carcinoma epatocellulare è prevalentemente associato con il sesso maschile con un rapporto M/F che va da 1.3 a 12.9, in relazione all'area geografica ⁽⁸⁾. Tra i maschi il tasso di incidenza maggiore si trova in Asia orientale, in particolare in Cina dove l'HCC rappresenta la terza causa di morte per cancro.

L'HCC non si sviluppa in tutti gli individui a rischio, suggerendo la presenza contemporanea di vari fattori eziologici, compresa la componente genetica. Tuttavia

gruppi familiari con HCC sono stati osservati di rado nell'uomo, il che suggerisce un ruolo minore della predisposizione genetica o, in alternativa, una predisposizione genetica complessa per lo sviluppo di questa neoplasia. Si potrebbe quindi ipotizzare l'esistenza nell'uomo di diversi alleli di suscettibilità e di resistenza, che possono determinare un rischio basso o elevato a seconda della loro associazione.

Il processo di epatocarcinogenesi è dovuto all'accumulo di numerose alterazioni genetiche, che possono essere suddivise in due grandi gruppi: il primo gruppo di alterazioni è specifico dei fattori di rischio, il secondo gruppo di alterazioni non è correlato all'eziologia e comprende il guadagno e la perdita di cromosomi, la modifica del Gene TP53, l'attivazione della via WNT/ β -catenina attraverso mutazioni a carico dei geni CTNNB1/ β -catenina ed AXIN1 ed AXIN2, l'inattivazione del gene del retinoblastoma e la via di segnale IGF2R attraverso l'inattivazione di RB1 (retinoblastoma 1), P16INK4A e IGF2R. L'analisi complessiva di queste modifiche genetiche ha definito due modelli di epatocarcinogenesi in base alla presenza o all'assenza di instabilità cromosomica.

I fattori di rischio più rilevanti associati all'insorgenza dell'HCC includono le infezioni virali croniche del fegato dovute al virus dell'epatite B (HBV, virus appartenente alla famiglia degli *Hepadnaviridae*), C (HCV, virus appartenente alla famiglia *Flaviviridae*) o D (HDV), consumo cronico di alcool e tabacco, tossine e farmaci, steroidi anabolizzanti, ingestione prolungata di cibo contaminato con aflatossina B1 (AFB1, una tossina mutagenica prodotta come metabolita secondario dal fungo *Aspergillus Flavus*, che è stata trovata in molti cibi quali noci, frutta secca, spezie e olio di semi), malattie metaboliche del fegato (emocromatosi ereditaria, deficienza di α 1-antitripsina, morbo di Wilson) e, virtualmente, tutte le condizioni

inducenti cirrosi ⁽⁹⁾. Tuttavia, anche altri fattori importanti hanno contribuito all'aumento internazionale di insorgenza dell'HCC riscontrato nell'ultimo decennio; tra questi vi sono l'obesità, il diabete e la steatoepatite non alcolica (NASH). Dati emergenti suggeriscono che l'eziologia di molti casi di carcinoma epatocellulare è in realtà multifattoriale, comprendendo l'eziologia infettiva, condizioni di coesistenza di patologie, e fattori ambientali ⁽¹⁰⁾. Nel 80-90% dei casi può essere identificato almeno uno di questi fattori di rischio, da solo o in combinazione con altri; nel restante 10-20% dei casi l'HCC è stato osservato in un fegato non cirrotico e senza lesioni infiammatorie.

A riprova di quanto finora menzionato, studi recenti indicano che il 30-50% dei decessi relativi all'HBV sono attribuibili all'HCC ⁽¹¹⁾, e che i pazienti con epatite B presentano un rischio 25/35 volte maggiore di ammalarsi rispetto ad una persona sana. Per quanto riguarda invece il virus dell'epatite C, questo infetta approssimativamente 170 milioni di individui nel mondo ⁽¹²⁾, nel 60-80% dei casi di HCV cronica i pazienti sviluppano cirrosi epatica, ma solo il 2,5% sviluppano un epatocarcinoma ⁽¹³⁾. Inoltre, una co-infezione HCV/HBV accresce questo rischio di 130 volte ⁽¹⁴⁾. Un altro importante fattore di rischio nello sviluppo dell'epatocarcinoma è la cirrosi epatica; è dimostrato infatti che, dal 70% al 90% degli HCC hanno origine da un fegato con cirrosi ⁽¹⁵⁾. Tale rischio dipende fondamentalmente dall'attività, dalla durata e dall'eziologia della malattia; è più alto nelle cirrosi derivanti da infezioni croniche virali ed emocromatosi, mentre è dovuto in ordine decrescente a cirrosi, epatiti autoimmuni e cirrosi biliare, ed è inoltre basso nella malattia di Wilson.

L'HBV e l'HCV contribuiscono all'oncogenesi epatica giocando un ruolo diretto

nella trasformazione maligna attraverso interazioni dirette tra il virus e i componenti cellulari⁽¹⁶⁾. Si è osservato, infatti, che diverse proteine virali interagiscono con cascate di segnale attivanti fattori di crescita, che influenzano comportamenti cellulari come proliferazione, migrazione e apoptosi; tali interazioni hanno come risultato finale la trasformazione maligna del fegato.

L'infezione da HBV può promuovere la cancerogenesi attraverso almeno tre diversi meccanismi. In primo luogo, l'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite può indurre instabilità cromosomica, e la replicazione continua degli epatociti fornisce uno stimolo per la propagazione delle lesioni neoplastiche e determina erosione dei telomeri. In secondo luogo, l'integrazione dell'HBV in specifici siti, causando microdelezioni nel DNA, attiva geni endogeni come la telomerasi trascrittasi inversa (TERT), il recettore- β del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR β), la proteina chinasi 1 attivata dai mitogeni (MAPK1) ed altri^(17,18). Il terzo meccanismo di cancerogenesi legato all'infezione da HBV si basa sull'espressione di una proteina virale, denominata HBx, che modula la proliferazione cellulare. La proteina HBx è infatti in grado di legarsi alla proteina p53 (un soppressore tumorale che agisce promuovendo l'apoptosi e inducendo l'arresto del ciclo cellulare in presenza di un danno nel DNA o dell'attivazione di un oncogene) e inattiva le attività p53-dipendenti, inclusa l'apoptosi p53-mediata^(5,19), aumentando quindi la proliferazione e la sopravvivenza cellulare^(20,21). L'attività di attivazione trascrizionale della proteina HBx può inoltre alterare l'espressione di geni che controllano la crescita, come la tirosin chinasi SRC, Ras, Raf, MAPK, ERK, JNK ed altri geni⁽²¹⁻²²⁾. Il potenziale onco-genico della proteina HBx è stato inoltre confermato in topi transgenici HBx, che sviluppano HCC nel 90% dei casi^(23,24).

Recenti studi suggeriscono, inoltre, che integrazioni virali in vicinanza di geni che controllano la proliferazione cellulare, la viabilità e la differenziazione sono meccanismi frequentemente coinvolti nell'epatocancerogenesi indotta da HBV. Le mutazioni inserzionali di HBV sono note per attivare i geni endogeni del recettore dell'acido retinoico, ciclina A e mevalonato chinasi, che sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nella proliferazione e differenziazione cellulare ⁽⁵⁾.

Al fine di combattere l'infezione virale, l'organismo induce una forte risposta immunitaria mediata dai linfociti T, evento che tuttavia favorisce a sua volta la cancerogenesi, in quanto contribuisce alla necrosi, infiammazione e conseguente rigenerazione degli epatociti. Nonostante l'infezione sia inizialmente acuta, il 10% degli adulti affetti non eliminano completamente il virus e sviluppano un'epatite cronica ^(25,26,27).

Una mutazione nel genoma dell'HBV può inoltre alterare l'espressione di proteine multiple. In molti casi di HCC in Cina e in Africa, è stata trovata una doppia mutazione nel genoma di HBV, risultante in una sostituzione di adenina con timina al nucleotide 1762 e una traslocazione guanina-adenina al nucleotide 1764 (1762T/1764A). È dimostrato che l'insorgenza di queste mutazioni è associata alla crescente gravità dell'infezione da HBV e cirrosi. La proteina virale HBx inibisce la riparazione del DNA danneggiato negli epatociti trasformati; questo effetto può essere mediato dall'interazione con p53 o con il legame alla proteina che lega il DNA danneggiato (DDB), che svolge un ruolo accessorio nella riparazione per escissione di nucleotidi ⁽⁵⁾.

Un altro meccanismo di cancerogenesi indotto dall'HBV è dovuto all'interazione fisica fra il virus ed il reticolo endoplasmatico (RE) della cellula ospite ⁽²⁸⁾, che causa

stress del RE e induzione di stress ossidativo ⁽²⁹⁾. Questi eventi danno origine a segnali di crescita e di sopravvivenza cellulare, causano mutazioni attraverso la produzione di radicali liberi e l'attivazione delle cellule stellate (associata alla proliferazione cellulare, all'acquisizione della morfologia di miofibroblasti e alla robusta sintesi di componenti della matrice extracellulare come il collagene, che contribuisce allo sviluppo di fibrosi) ^(25,30). Il virus HBV va incontro a numerosi fenomeni di mutazione, di cui si avvale per eludere la risposta immunitaria dell'ospite e/o per la sua ritenzione all'interno della cellula, danneggiando in questo modo gli epatociti e causando una sofferenza del fegato tale da portare allo sviluppo dell'HCC ⁽³¹⁾.

Al contrario, l'HCV causa infezioni croniche nel 60-80% dei casi ⁽²⁷⁾, in quanto l'elevata percentuale di errori di replicazione permette al virus di evadere la risposta immunitaria dell'ospite ^(27,32). L'HCV determina cirrosi epatica nel 5-10% dei pazienti affetti, dopo circa dieci anni dall'infezione; tale frequenza è 10-20 volte più alta rispetto a quella dell'HBV ⁽²⁷⁾. Si è ipotizzato che i continui cicli di morte degli epatociti, determinati dalla risposta immunitaria contro il virus, e la conseguente rigenerazione del tessuto permettano l'accumulo e la stabilizzazione di mutazioni che inducono lo sviluppo di HCC. Tuttavia, le interazioni patologiche fra il sistema immunitario ed l'HCV sono estremamente complesse e non ancora totalmente conosciute. La debole risposta immunitaria è presumibilmente dovuta al fatto che il genoma e/o le proteine del core del virus HCV alterano la funzione delle cellule dendritiche, importanti per l'attivazione delle cellule T ⁽³³⁾. Oltre a ciò, le proteine del core dell'HCV e una proteina non strutturale codificata dal virus, la proteina NS5A, permettono agli epatociti di evitare la morte cellulare immuno-mediata interagendo

con differenti fattori coinvolti nel processo, come il recettore del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e l'interferone- α (INF α)⁽³⁹⁻⁴¹⁾, mentre altre proteine usano le loro funzioni proteasiche per rompere ed attivare componenti importanti nella segnalazione della risposta immune^(34,35).

L'HCV, essendo un virus a RNA, usa il RE della cellula per il proprio processo di replicazione, causando così stress del RE. Le proteine del core interagiscono con vari elementi della via di segnale delle MAPK (quali ERK, MEK e Raf) e modulano così la proliferazione cellulare. La stessa proteina NS5A interagisce con la proteina p53 e la inattiva attraverso il suo sequestro nella membrana perinucleare (36,37). In sintesi, l'HCV è implicato nell'alterazione delle vie regolate da p53 che controllano la progressione del ciclo cellulare, la sopravvivenza cellulare, la risposta a stress genotossici e di ipossia nonché l'angiogenesi tumorale⁽³⁸⁾.

Altro importante fattore di rischio per l'HCC è rappresentato dall'alcool. L'abuso cronico di alcool causa l'attivazione dei monociti e la conseguente produzione di citochine proinfiammatorie⁽³⁹⁾; inoltre l'aumento della concentrazione di endotossine circolanti attiva le cellule di Küpffer (macrofagi localizzati nel fegato) che, in seguito a tali stimoli, rilasciano citochine in grado di determinare morte o danno degli epatociti, fra cui TNF- α , interleuchina 1 β (IL1 β), IL6 e prostaglandina E2. L'esposizione cronica all'etanolo determina un aumento della sensibilità all'effetto citotossico di TNF- α che alimenta i cicli di distruzione-rigenerazione, attivazione delle cellule stellate, cirrosi e, infine, HCC⁽⁴⁰⁾. L'alcool danneggia il fegato mediante stress ossidativo, stress che può contribuire all'epatocancerogenesi promuovendo lo sviluppo della fibrosi e della cirrosi, caratteristiche chiave di un micro-ambiente favorevole all'insorgenza del carcinoma epatico. L'etanolo causa inoltre la

diminuzione della fosforilazione della tirosina di STAT1 (trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 1), riduce l'attivazione del segnale di IFN- γ e causa la perdita dell'effetto protettivo di IFN- γ , controllato da STAT1, con conseguente danno degli epatociti ⁽⁴¹⁾. Anche in questo caso lo stress ossidativo indotto può causare mutazioni oncogeniche, come le mutazioni a carico del gene p53 ⁽⁴²⁾, e può accelerare l'accorciamento dei telomeri, causando instabilità cromosomica ed infine sviluppo di HCC ⁽⁴³⁾.

L'infezione cronica da parte del virus dell'epatite B è stata riportata da vari autori come il più forte fattore di rischio di HCC in tutto il mondo. Tuttavia, popolazioni con prevalenza simile di HBV hanno una diversa incidenza di HCC. Questa osservazione epidemiologica suggerisce la presenza di altri importanti fattori di rischio. L'aflatossina B1, una micotossina prodotta dal fungo *Aspergillus Flavus*, è un noto fattore di rischio per l'HCC quando presente nei generi alimentari ⁽⁵⁾; tale tossina induce una specifica mutazione di p53 ^(20,44,45) e coopera all'attivazione mutazionale dell'oncogene *HRAS* ⁽⁴⁶⁾. Il consumo di cibi contaminati da aflatossina B1 non porta allo sviluppo di cirrosi, ma direttamente all'HCC. Alcuni studi epidemiologici e su animali suggeriscono l'esistenza di un'interazione tra l'aflatossina B1 e l'infezione da HBV nell'epatocancerogenesi ⁽⁵⁾. Nonostante alcune comuni modificazioni molecolari, le basi cellulari e molecolari dell'epatocancerogenesi possono probabilmente differire significativamente in presenza di differenti fattori eziologici. E' probabile che tali differenze contengano anche indizi meccanicistici e nuove opportunità preventive o terapeutiche. Una potenziale opportunità può derivare dalla propensione del virus HBV ad integrarsi nel genoma dell'ospite (a differenza del virus dell'HCV), provocando modifiche in

geni cancro-sensibili. È probabile che la prevenzione di questo processo di integrazione offra nuovi approcci preventivi. Ulteriori studi sulle cause non virali di HCC potrebbero aiutare i clinici a concentrarsi su quei fattori di rischio che sono modificabili; con più informazioni in tal senso, gli screening preventivi sarebbero maggiormente mirati verso le popolazioni a maggiore rischio. Si spera che questo approccio preventivo possa portare a una riduzione dell'incidenza di HCC non virali e a una diminuzione della insorgenza della patologia e della mortalità⁽¹⁰⁾.

2. Cancerogenesi epatica multifasica

La trasformazione neoplastica del fegato è un processo multifasico, meno definito rispetto ad altri tipi di tumore, con diverse fasi pre-neoplastiche che precedono la comparsa di lesioni francamente maligne.

Le difficoltà che si incontrano nello studiare, nell'uomo, la sequenza di eventi precoci che portano allo sviluppo dell'HCC, rendono necessario condurre la gran parte degli studi su modelli animali, poi riportati all'uomo per comparazione. Le poche conoscenze attualmente disponibili sugli eventi che precedono lo sviluppo del tumore epatico indicano l'*iperplasia adenomatosa* e la *displasia epatocellulare* come due tipi di lesione preneoplastica epatica ben definita.

Gli epatociti sono cellule stabili, cioè con bassa attività replicativa, sono mitoticamente inattivi, ma possono entrare nel ciclo di divisione cellulare in seguito a particolari stimoli, accumulando così danni indotti dai cancerogeni ⁽⁴⁷⁾.

La trasformazione maligna degli epatociti deriva da un loro accresciuto turnover indotto da un danno cronico del fegato e dalla sua compensatoria rigenerazione nell'ambito di infiammazione e danno ossidativo del DNA. Una crescita incontrollata e veloce aumenta notevolmente le probabilità di danni a livello genetico e diminuisce l'efficienza di una riparazione corretta e completa di eventuali danni al DNA, facendo sì che le anomalie non riparate vengano fissate e quindi trasmesse alla progenie, dando origine a cloni cellulari alterati che nel tempo possono trasformarsi gradualmente in una neoplasia.

La cirrosi, insieme all'iperplasia rigenerativa nodulare e ai foci iperplastici dell'epatite cronica, rappresenta una condizione preneoplastica riconosciuta del carcinoma epatocellulare.

Lo sviluppo di noduli rigenerativi epatici, che hanno normali caratteristiche istologiche, rappresenta un potenziale primo passo nello sviluppo dell'HCC. In alcuni casi tali noduli possono crescere fino a raggiungere dimensioni talmente marcate da apparire simili a tumori. Essi vengono ora definiti "iperplasia adenomatosa" ed anche "noduli macrorigenerativi" e "noduli displastici"; si tratta di lesioni premaligne che hanno caratteristiche istologiche anormali, 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 possono evolvere, in un periodo di tre-cinque anni, in lesioni francamente maligne quali, appunto, l'epatocarcinoma. Quest'ultimo acquisisce la capacità di invadere il tessuto circostante ed i vasi, esplicando le proprie potenzialità metastatiche ⁽³⁾. Nonostante i numerosi studi sinora effettuati, rimane poco chiaro se le lesioni preneoplastiche siano obbligatoriamente precancerose o se possano parzialmente regredire e rimodellarsi, e quali di queste lesioni abbiano un più alto o più basso rischio di diventare maligne. La maggior parte degli studi condotti su quest'argomento ha concluso che le lesioni nodulari che non presentano anomalie strutturali e/o cellulari sono rigenerative, mentre solo quelle che presentano tali anomalie sono precancerose.

Il processo di cancerogenesi multifasica a carico del fegato è schematizzato in Figura 1.

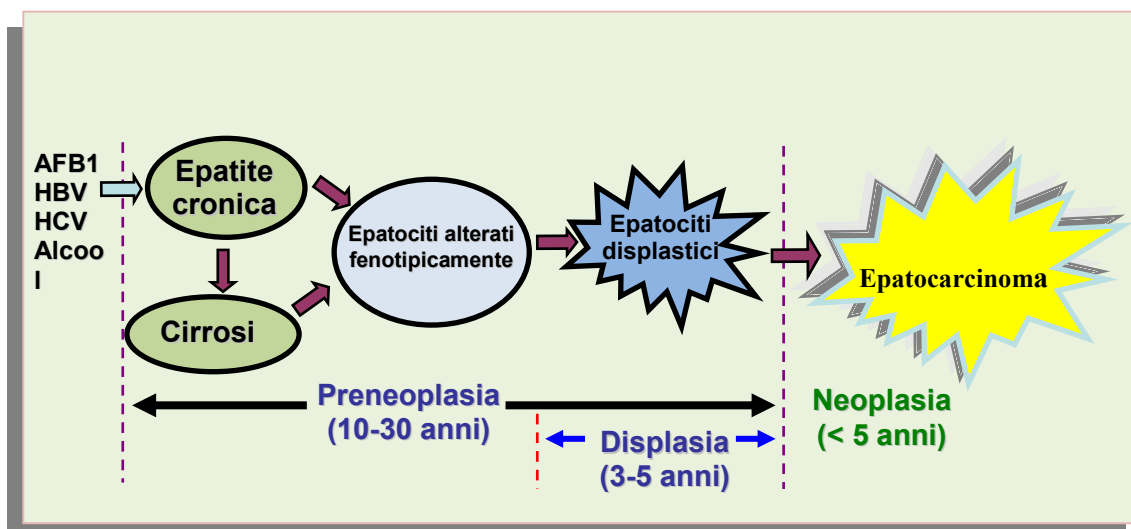


Figura 1. Sequenza cronologica delle alterazioni istopatologiche che conducono allo sviluppo dell'epatocarcinoma nell'uomo. Abbreviazioni: AFB1, aflatoxina B1; HBV, virus dell'epatite B; HCV, virus dell'epatite C.

L'alterata regolazione di alcune vie di trasduzione del segnale gioca un ruolo essenziale nell'epatocancerogenesi ⁽⁹⁾. Tra queste, l'attivazione delle cascate del segnale v-akt thymoma viral oncogene homolog (AKT)/mammalian target of Rapamycin (mTOR) e neuroblastoma ras viral oncogene homolog (Ras)/mitogen activated protein kinase (MAPK) viene osservata frequentemente negli HCC umani. Inoltre, la concomitante attivazione delle vie di trasduzione AKT/mTOR e Ras/MAPK è stato dimostrato essere associata a tumori epatici a fenotipo più aggressivo e cattiva prognosi ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

3. Via di trasduzione del segnale Ras/MAPK

La via di segnale protein-chinasica attivata dai mitogeni (MAPK pathway) comprende diverse cascate molecolari tra cui la via Ras-Raf-MAPK. La via Ras/Raf/MAPK è probabilmente la via di trasduzione del segnale più studiata in biologia cellulare; la sua funzione è quella di trasdurre il segnale dalla superficie extracellulare al nucleo dove vengono attivati specifici geni per la crescita, divisione e differenziazione cellulare. La via di segnale Ras/Raf/MAPK è inoltre coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, guarigione e riparazione dei tessuti e migrazione cellulare. Tale via di segnale è infine in grado di stimolare l'angiogenesi, attraverso la modulazione dell'espressione di geni direttamente coinvolti nella formazione di nuovi vasi sanguigni. Nel complesso, pertanto, la via del segnale Ras/Raf/MAPK regola una varietà di funzioni cellulari che sono potenzialmente importanti nel processo di cancerogenesi. Non è quindi sorprendente che la sregolazione di questa via di trasduzione del segnale sia un evento comune in numerosi tipi di cancro, ed il gene Ras risulti l'oncogene più frequentemente mutato nei tumori umani. ⁽⁴⁸⁾

Ras è un'importante componente della grande famiglia delle GTPasi in cellule di mammifero; è codificato da tre geni altamente omologhi, *H-Ras*, *N-Ras* e *K-Ras* che codificano proteine a basso peso molecolare (21 kDa), identificate come H-RAS, N-RAS e K-RAS (nelle due varianti K-RAS4A e K-RAS4B).

Mutazioni che attivano Ras sono presenti approssimativamente nel 30% di tutti i tumori umani. Mutazioni di Ras sono più frequenti nel tumore pancreatico (~70-80%), colangiocarcinoma (~50%) e tumore del colon (>30%). Inoltre, mutazioni di *B-Raf*, effettore a valle di Ras, si presentano frequentemente nel melanoma umano (~40%) e

nel tumore della tiroide (~30%).⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾

Nella loro forma attiva, le proteine Ras sono localizzate nella parte interna della membrana plasmatica, mentre sono localizzate nel citosol quando in forma inattiva. L'enzima farnesyltransferasi (Ftase) catalizza il trasferimento della catena isoprenoide del carbonio 15 del farnesilpirofosfato (FPP) su un residuo di cisteina sull'estremità carbossilica di Ras. Questo determina l'associazione di Ras sulla membrana intracellulare attraverso il suo gruppo farnesilico. Dopo isoprenilazione, un'endopeptidasi rimuove tre aminoacidi all'estremità carbossi-terminale della proteina e questa estremità viene metilata da parte di una metiltransferasi. In seguito, una palmitoiltransferasi catalizza l'aggiunta di due gruppi di acidi grassi palmitoilici a lunga catena su un residuo di cisteina appena a monte della cisteina carbossi-terminale farnesilata e questo stabilizza l'interazione di RAS con la membrana.

Lo stato di attivazione delle proteine Ras, come illustrato nella Figura 2, dipende dal fatto che queste siano legate a GTP (in questo caso esse sono attive e capaci di interagire con bersagli enzimatici) o GDP (in questo caso esse sono inattive e non sono in grado di interagire con i loro effettori). Nelle cellule normali l'attività delle proteine Ras è controllata dal tasso di GTP e GDP legato. In vitro, Ras purificato possiede una bassa attività GTPasica intrinseca che determina che il GTP legato sia lentamente convertito a GDP. Esso ha anche un lento tasso di scambio nucleotidico tramite il quale GDP legato è gradualmente sostituito da GTP. Questi processi sono catalizzati dentro la cellula da due enzimi: lo scambio nucleotidico da parte di fattori di scambio guanina nucleotide (GEF) e l'idrolisi dei nucleotidi da parte di proteine attivanti le GTPasi (GAP). Il bilancio tra queste proteine determina lo stato di attivazione di Ras e dei suoi bersagli a valle. Molti tipi di recettori, tra cui i recettori tirosin chinasi ed i recettori

accoppiati a proteine G, sono in grado di attivare Ras. In seguito ad attivazione di recettori tirosin chinasi, come il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), il recettore autofosforilato lega domini SH2 della proteina 2 legante il fattore di crescita della proteina adattatrice (GRB2). Attraverso il suo dominio SH3, GRB2 è legato a SOS sulla membrana plasmatica dove si trova Ras in seguito al processo di farnesilazione. La vicinanza di SOS a Ras determina un incrementato scambio nucleotidico di Ras, sul quale GDP è sostituito da GTP. I recettori accoppiati a proteine G possono attivare in Ras la stimolazione di fattori di scambio. In alcuni casi, questo coinvolge la transattivazione di recettori tirosin chinasi per fattori di crescita. Altre proteine non recettoriali possono essere fosforilate su residui di tirosina e favorire l'interazione con GRB2. La diversità di questi fattori di scambio implica che Ras è attivato da molteplici stimoli extracellulari. Quest'attivazione è inibita dagli effetti di differenti GAP che promuovono l'idrolisi di GTP legato a Ras e determinano la rapida inattivazione di Ras dopo stimolazione.

Ras legante GTP è capace di legare e attivare differenti enzimi effettori che partecipano nella regolazione della proliferazione cellulare, sopravvivenza ed altri aspetti del comportamento cellulare che possono contribuire al fenotipo trasformato. Il primo effettore di Ras ad essere caratterizzato nei mammiferi è stata la protein chinasi serina/treonina RAF. Ras legante GTP lega e contribuisce all'attivazione di tre proteine RAF: c-RAF-1, BRAF, ARAF. Questa interazione determina la localizzazione di RAF sulla membrana plasmatica e la sua conseguente attivazione. Una volta attivato, RAF fosforila e attiva a valle le protein chinasi 1 e 2 attivate da mitogeni (MEK1 e MEK2), chinasi che sono capaci di fosforilare e attivare le protein chinasi attivate da mitogeni 1 e 2 (MAPK) ERK1 e ERK2 (chinasi 1 e 2 regolate da segnali extracellulari).

I substrati di ERK1/2 sono proteine citosoliche e nucleari che possono essere trasportate nel nucleo in seguito ad attivazione, come avviene nella regolazione dei fattori di trascrizione che modulano proteine regolatrici del ciclo cellulare, e che rendono le cellule capaci di progredire oltre la fase G1 del ciclo cellulare. L'attivazione di RAF insieme ad altri segnali può promuovere la progressione del ciclo cellulare.

Oltre al segnale Ras/MAPK, Ras è in grado di attivare altri percorsi effettori. Ras può interagire, infatti, con la subunità catalitica del fosfatidilinositolo 3-chinasi di tipo I (PI3K) determinando l'attivazione di una chinasi lipidica come conseguenza della sua traslocazione sulla membrana e del suo cambiamento conformazionale. PI3K fosforila il fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato (PtdIns 4,5 P2) per produrre il fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PtdIns 3,4,5 P3), un secondo messaggero che lega un ampio numero di proteine. PI3K controlla l'attività di un gran numero di enzimi a valle, i più importanti dei quali sono la chinasi PDK1 (protein chinasi 1 dipendente dal 3-fosfoinositide) e AKT. PDK1 è importante per l'attivazione di numerose protein chinasi. AKT ha un grande potere antiapoptotico che svolge attraverso la fosforilazione di numerosi bersagli e ha un ruolo molto importante nel segnale di sopravvivenza generato da Ras.

La cascata Ras, PI3K ed mTOR forma un segnale biochimico che, quando impropriamente attivato, determina la proliferazione cellulare anche in assenza di stimoli ambientali di crescita ⁽⁵¹⁾. Questo segnale contribuisce alla cancerogenesi attraverso la fosforilazione coordinata di proteine che regolano direttamente la sintesi delle proteine, la progressione del ciclo cellulare e il metabolismo e, attraverso la regolazione di fattori di trascrizione, l'espressione di geni coinvolti in questo processo. mTOR è una serina/treonina chinasi altamente conservata che è coinvolta nel controllo della crescita cellulare in risposta a svariati stimoli ambientali. Recenti lavori hanno

dimostrato che Ras e PI3K convergono per attivare mTOR in modo che possa stimolare la crescita cellulare.

Nell'ottica della scoperta e messa a punto di nuovi trattamenti terapeutici target-mirati, ha acquisito un notevole slancio la considerazione dello sviluppo di inibitori delle vie di segnalazione RAS-RAF- MEK-ERK/MAPK e dei loro attivatori a monte ⁽⁵²⁾.

Nell'HCC umano, numerosi studi indicano un'ubiquitaria attivazione della via di segnale Ras/MAPK, supportando il ruolo critico di questa cascata del segnale nelle fasi di inizio e progressione del tumore epatico ⁽⁵³⁾. Inoltre, l'attività anti-tumorale del Sorafenib osservata in pazienti con HCC, che agisce su recettori tirosin chinasi e le Raf chinasi, fornisce ulteriori prove dell'importanza della via di segnalazione Ras/MAPK in questo tipo di tumore ⁽⁵⁴⁾.

È interessante notare che, i membri della famiglia di Ras e B-Raf sono raramente mutati nell'HCC umano ^(49,55,56). Sono stati identificati meccanismi alternativi alla mutazione somatica, che portano all'attivazione delle vie di segnale Ras/MAPK e includono iper-espressione e attivazione di recettori tirosin chinasi, come EGFR e c-Met, così come la perdita dell'espressione degli inibitori della via di segnale Ras, come Spry2, DAB2, RKIP, RASSF1A, e NORE1A ^(57,58). In modelli di topo, non è stata osservata nessuna formazione del tumore quando negli epatociti è espressa solamente la forma attivata mutata di Ras, indicando che l'attivazione della sola via Ras/MAPK non è sufficiente ad indurre la formazione dell'HCC in vivo. Uno scenario possibile nei fegati che iper-esprimono Ras è il verificarsi della senescenza e l'eliminazione degli epatociti senescenti da parte del sistema immunitario. Quindi, presumibilmente è necessario un ulteriore evento oncogenico per indurre l'epatocancerogenesi quando Ras è attivato.

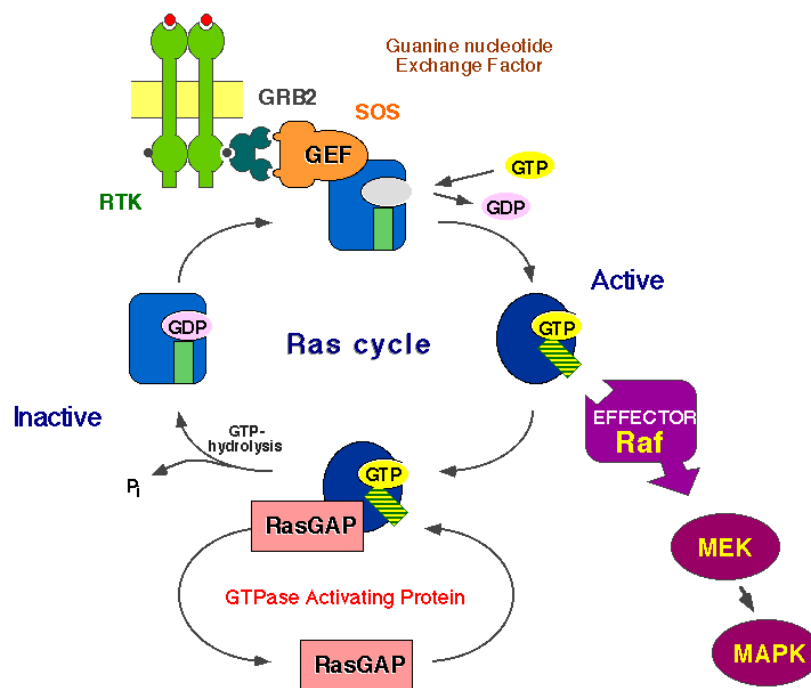


Figura 2. Regolazione della via di segnale Ras/MAP chinasi. Nelle cellule non stimolate, la maggior parte delle proteine Ras si trova nella forma inattiva, legata al GDP; il legame di un fattore di crescita al suo RTK porta alla formazione del complesso attivo Ras-GTP. L'adattatore proteico GRB₂, in associazione con il fattore di scambio guaninico Sos, si attacca al recettore RTK attraverso il suo dominio SH₂. Questo porta il complesso GRB₂-Sos in prossimità della membrana, dove catalizza lo scambio del nucleotide guaninico su Ras. La proteina Ras attivata si associa con la proteina chinasi Raf. La sua localizzazione nella membrana porta all'attivazione e successiva fosforilazione della chinasi con doppia specificità MEK che fosforila ERK su residui tirosina e treonina separati da un singolo aminoacido. La dimerizzazione di ERK espone un peptide segnale che permette alla MAP chinasi di interagire con proteine che lo guidano nel nucleo (traslocazione). (Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJC, Carey FA, Wolf CR. Br J Cancer 2010;102:693-703)

4. Via di trasduzione del segnale AKT/mTOR

La Fosfatidil-Inositol-3-cinasi (PI3K) è una famiglia di chinasi che fosforila l'inositolo a livello del 3'-OH, e che comprende tre classi (I, II e III). Le PI3K di classe I in vivo fosforilano di preferenza il fosfatidil inositolo 4,5 bisfosfato a fosfatidil inositolo 3,4,5 trisfosfato, il quale recluta sulla membrana citoplasmatica proteine contenenti un pleckstrin homology (PH) domain, tra cui AKT e PDK1 ⁽⁵⁹⁾.

La classe I è a sua volta divisa in due sottoclassi: A (chinasi attivate da TKR, Ras e GPCR) e B (attivate da GPCR). Le PI3K di classe IA sono eterodimeri che comprendono una subunità catalitica (p110 α , p110 β , p110 δ) e una regolatrice (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α). Le PI3K di classe IB sono invece composte da una subunità regolatrice p101 e una subunità catalitica p110 γ ⁽⁶⁰⁾.

La classe II comprende tre isoforme di PI3K: PI3K-C2 α , PI3K-C2 β e PI3K-C2 γ , che fosforilano preferenzialmente il fosfatidil inositolo a fosfatidil inositolo-3-fosfato. La classe III comprende solamente vps34 (vacuolar protein sorting 34) che si trova associata come eterodimero alla subunità regolatrice vps15 ⁽⁶¹⁾.

V-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT) è una serina-treonina chinasi, che esiste in tre isoforme con alto grado di omologia di sequenza ma differenze funzionali: AKT1/ α , AKT2/ β e AKT3/ γ . AKT interagisce attraverso il suo dominio PH NH2-terminale con il PI(3,4,5)P3. Quest'ultimo la recluta sulla membrana, dove AKT subisce un cambio conformazionale che le permette di essere attivata in seguito alla fosforilazione da parte di PDK1 sulla Treonina 308 e dal complesso 2 di mTOR (mTORC2), anche se potrebbero essere coinvolte altre chinasi, sulla Serina 473 ⁽⁶²⁾. La fosforilazione di entrambi i siti sopra menzionati è necessaria alla completa

attivazione di AKT, che può quindi spiegare le sue funzioni di chinasi. Al momento sono stati identificati più di 100 substrati di AKT, tutti coinvolti, direttamente o attraverso intermediari, in processi di sopravvivenza o proliferazione cellulare ⁽⁶⁰⁾.

Il mammalian target of rapamicin (mTOR) è un enzima della famiglia delle PI3K-related kinase, ma nonostante una forte omologia di sequenza del suo dominio catalitico COOH-terminale con PI3K, funziona solo come proteina-chinasi ⁽⁶³⁾. mTOR fa parte integrante di due complessi distinti, denominati mTORC1 (composto da mTOR/Raptor/mLST8/PRAS40/FKBP38 e particolarmente sensibile all'antibiotico Rapamicina) e mTORC2 (composto da mTOR/Rictor/mLST8/SIN1/Proctor e sensibile alla Rapamicina ed agli analoghi della Rapamicina solo in seguito a trattamento prolungato).

Il complesso mTORC1 fosforila alcuni elementi del macchinario della sintesi proteica, come 4EBP1 e p70 S6K, in risposta a fattori di crescita o nutrienti. La fosforilazione di 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein1) risulta nel rilascio di eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), che prende parte nella formazione di un complesso iniziatore della traduzione, mentre p70S6 fosforila la proteina ribosomale 40S S6, che partecipa all'attiva traduzione degli mRNA. mTOR assicura, integrando segnali provenienti da fattori di crescita, mitogeni, ossigeno, glucosio e aminoacidi, che la cellula entri nel ciclo cellulare solo se nutrienti ed energia sono sufficienti alla divisione cellulare ⁽⁶⁴⁾.

mTORC1 regola una serie di passaggi critici coinvolti nella sintesi proteica, ma in particolare modula l'espressione di proteine come c-Myc, cyclin D1, cinasi ciclina dipendente 2, la proteina del retinoblastoma, hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , ornitina decarbossilasi, p27Kip1 and VEGF, tutti fattori cruciali nella proliferazione e nella

sopravvivenza cellulare, oltre che nell'angiogenesi ⁽⁶⁵⁾.

AKT regola l'attivazione del complesso mTORC1 attraverso un processo multifasico, fosforilando e inibendo il gene TSC2 (tuberous sclerosis 2 o amartina). Questa è una proteina GAP (GTPase activating protein), che in associazione con TSC1 (tuberous sclerosis 1 o tuberina) inibisce la proteina G Rheb (Ras homolog enriched in brain). L'inibizione di TSC2 da parte di AKT permette a Rheb di accumularsi nella sua forma legata a GTP e attivare mTORC1. Anche ERK1/2 e p90RSK sono in grado di fosforilare TSC2, sopprimendo in tal modo la sua azione inibitrice su Rheb. Le proteine AKT e mTOR sono collegate tra loro da circuiti di regolazione positiva e negativa. Quando AKT attiva mTORC1, infatti, quest'ultimo inibisce AKT attraverso un meccanismo di feedback negativo ⁽⁶⁵⁾. Al contrario, l'inibizione di mTORC1 determina l'iperattivazione di AKT e dei suoi substrati sia in vitro sia in vivo ^(66,67), oltre che l'attivazione delle proteine ERK1 e 2 attraverso la cascata p70S6K/PI3K/Ras/Raf/MEK ⁽⁶⁸⁾. La Rapamicina, un antibiotico appartenente alla famiglia dei Macrolidi con proprietà antifungine e immunosoppressive, si lega alla proteina citoplasmatica FKBP12 (FK506-binding protein-12) e in complesso con questa inibisce le chinasi della famiglia mTOR. Di conseguenza, la Rapamicina e gli altri inibitori di mTOR mostrano una significativa attività contro tumori con attivazione della via di segnale PI3Kinase/AKT/mTOR ⁽⁶⁹⁾. L'attivazione costitutiva della via di segnale PI3K/AKT/mTOR è stata indicata come uno dei principali determinanti di crescita e sopravvivenza cellulare in molti tipi di tumore solido, incluso l'HCC ⁽⁷⁰⁾. Nel contesto della via di segnale PI3K/AKT, l'attivazione di AKT avviene principalmente attraverso due meccanismi, entrambi convergenti su PIP3. Il primo meccanismo prevede l'attivazione di recettori tirosina chinasi, in particolare i già citati IGFR, EGFR,

spesso iper-espressi negli HCC e nei fegati cirrotici ⁽⁷¹⁾ in seguito a stimolo da parte dei rispettivi ligandi, a loro volta iper-espressi negli HCC ⁽⁷²⁾. Il secondo meccanismo molecolare consiste invece nell'attivazione costitutiva di PI3K o la perdita di efficienza di PTEN, il principale inibitore cellulare della sintesi di PIP3. Alterazioni nella funzionalità di PTEN possono portare all'attivazione incontrollata della via di segnale PI3K/AKT/mTOR negli HCC. Il gene PTEN è mutato nel 5% degli HCC, subisce spesso delezioni, e la sua espressione è ridotta in quasi metà degli HCC, risultando pertanto nell'attivazione costitutiva della via di segnale PI3K/AKT/mTOR ⁽⁷³⁾. Inoltre, l'espressione di PTEN può essere ridotta significativamente per via diretta dalla proteina HBx in pazienti infetti da infezione cronica da HBV ⁽⁷⁴⁾. Esistono anche delle evidenze sperimentali che suggeriscono che la via di segnale PI3K/AKT/mTOR possa essere attivata da mutazioni somatiche nel gene PIK3CA, che codifica la subunità catalitica p110 α di PI3K ⁽⁷⁵⁾. Quest'alterazione genica è presente nel 30% degli HCC ed è associata a prognosi infausta ⁽⁷⁹⁾. AKT attivata fosforila diversi bersagli tra cui fattori inibenti la crescita come FOXO1 e FOXO3 (mammalian forkhead members of the class O), la cui fosforilazione ne determina l'accumulo citoplasmatico e l'inattivazione ⁽⁷⁶⁾. Allo stesso modo, AKT fosforila, inattivandole, proteine citoplasmatiche con funzione pro-apoptotica come la proteina BAD (BCL-2 associated death promoter) e la caspasi 9. AKT attiva inoltre, sempre attraverso fosforilazione, il mammalian target of rapamicin, (mTOR) ^(77,78). I complessi formati da mTOR a loro volta regolano la p70 S6 chinasi, una serina-treonina chinasi, e il repressore della traduzione proteica PHAS-1/4E-BP. Queste proteine regolano la traduzione delle proteine regolatrici del ciclo cellulare e promuovono la progressione del ciclo cellulare stesso. La via di segnale AKT/mTOR è illustrata nella Figura 3.

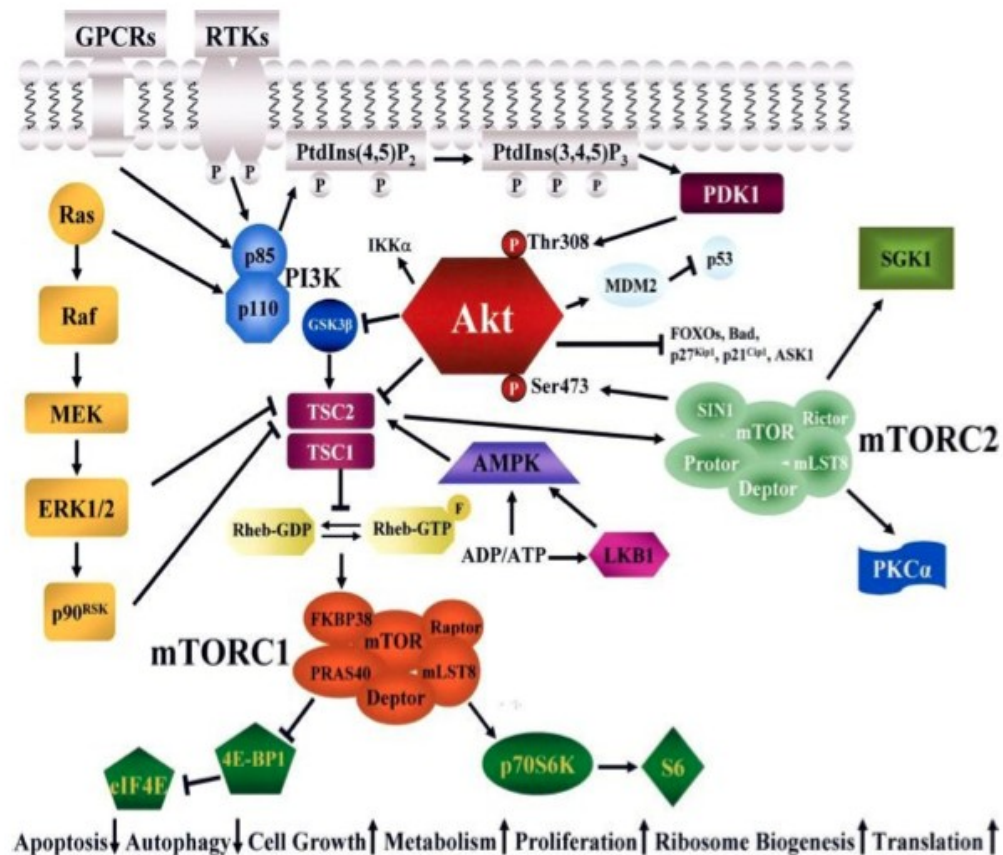


Figura 3. Rappresentazione schematica della via di segnale AKT/mTOR (Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* 2010;1:89-103).

5. Metodica di trasferimento genico idrodinamico (“hydrodynamic gene delivery”)

Il trasferimento genico idrodinamico è un efficiente, sicuro ed economico metodo che consente l'introduzione di materiale genetico all'interno delle cellule. Recentemente tale metodica ha aperto nuovi orizzonti per gli studi di terapia genica in vivo attraverso l'utilizzo di una rapida iniezione di un volume di DNA “nudo” relativamente grande nei vasi sanguigni. Questo metodo risulta attualmente essere superiore a simili metodiche già esistenti per la sua semplicità, efficienza e versatilità. L'ampio successo nell'applicazione dei principi di iniezione idrodinamica di DNA, RNA, proteine, e composti sintetici in cellule di vari tessuti di piccoli animali, ha spinto di recente la ricerca a mettere a punto tale metodica per l'uso clinico.⁽⁸⁰⁾

I primi studi sono stati condotti alla fine degli anni 90 su topi e ratti iniettando la soluzione di DNA nella vena epatica e nella vena porta. Da allora, il trasferimento genico idrodinamico è diventato un metodo comune per l'introduzione di DNA e RNA in roditori e si è rivelato utile in un'ampia area di applicazioni. Per esempio, l'introduzione di DNA plasmidico attraverso la vena caudale è stato utilizzato per accertare il coinvolgimento di specifici geni nello sviluppo o regressione di condizioni fisiopatologiche soprattutto a carico del fegato. Più recentemente, il trasferimento genico idrodinamico è stato utilizzato per l'introduzione di small interfering RNA (siRNA) per studi di funzionalità genica⁽⁸⁰⁾.

Il termine “idrodinamico” è dovuto alla necessità di utilizzare appunto grandi volumi e tempi ristretti per ottenere nei capillari la pressione necessaria a incrementare la permeabilità delle cellule endoteliali e parenchimatose.

Inoltre, il trasferimento genico idrodinamico è stato adoperato per incrementare

l'efficienza di trasduzione di vettori virali.

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 l'endotelio capillare e le cellule parenchimatose sono strettamente associati, consentendo un immediato accesso del DNA alle cellule parenchimatose una volta distrutta la barriera endoteliale. In aggiunta, 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^(81,82). Con il tempo, i pori della membrana si chiudono intrappolando le molecole all'interno. In generale, l'efficienza della procedura del trasferimento genico idrodinamico è determinata dalla struttura capillare, dall'architettura delle cellule circostanti i capillari, e dalla forza idrodinamica applicata all'interno del vaso^(83,84,85,86). Tra i due tipi di capillari, i capillari fenestrati o sinusoidi sono più sensibili alla procedura idrodinamica rispetto ai capillari continui perché hanno delle fenestrature tra le cellule endoteliali adiacenti e non presentano lamina basale, oppure, quando presente, è più sottile⁽⁸⁷⁾. Una volta endocitato, il DNA di interesse viene stabilmente integrato nel genoma dell'epatocita attraverso una transposasi. La transposasi viene clonata all'interno di un plasmide ed iniettata attraverso la vena caudale nella soluzione contenente il DNA "nudo". La transposasi generalmente più utilizzata è la "Sleeping Beauty"^(83,84,85,86).

Al giorno d'oggi, sono stati effettuati numerosi studi mettendo a punto metodiche di trasferimento genico idrodinamico in diversi tessuti (principalmente fegato, muscolo scheletrico e reni) e diversi modelli animali (tra cui topo, ratto, coniglio, maiale, scimmia)⁽⁸⁰⁾.

Il maggiore successo nell'applicazione del trasferimento genico idrodinamico si è ottenuto nel trasferimento genico in epatociti di roditori. La procedura standard implica l'iniezione nella vena caudale in 5-7 secondi di una soluzione fisiologica, equivalente all'8-10% del peso corporeo^(90,91). Meccanicamente, il passaggio di un così grande volume di soluzione di DNA direttamente nella vena cava inferiore estende le fibre miocardiche oltre la lunghezza ottimale per la contrazione, induce congestione cardiaca, e determina un flusso retrogrado della soluzione iniettata verso il fegato^(81,88,89).

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 e endotelio dei capillari, né per semplice iniezione via catetere, attraverso la vena giugulare o l'arteria femorale fino alla vena cava inferiore⁽⁹²⁾, e neppure in seguito a clampaggio della vena porta⁽⁸⁶⁾. Infatti, sebbene in principio si sia ipotizzato che il trasferimento del materiale genetico avvenisse attraverso un meccanismo mediato da recettori⁽⁹³⁾, risulta più probabile che il passaggio attraverso la membrana citoplasmatica avvenga per idroporazione in seguito alla distensione dei tessuti

epatici a seguito dell'aumento della pressione intravascolare⁽⁸¹⁾.

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⁽⁹⁴⁾. Affinchè l'iniezione generi una pressione adeguata, la velocità del flusso non è sufficiente: uguale volume di soluzione iniettata attraverso la vena caudale o la vena porta in un modello di ratto dà luogo a efficienze di trasferimento molto diverse. La differenza è probabilmente dovuta al fatto che nel primo caso le reti capillari ai due lati della vena porta possono offrire un'adeguata resistenza elastica, mentre nel secondo caso la soluzione iniettata è facilmente dissipata nel circolo venoso.

Gli animali sottoposti ad iniezione idrodinamica sopravvivono bene, nonostante siano documentati effetti temporanei quali disfunzioni cardiache, aumento della pressione intraepatica, espansione e deformazione strutturale del fegato⁽⁹⁴⁾, e il loro tasso di crescita successivo al trattamento rimane paragonabile a quello osservato negli animali di controllo⁽⁹¹⁾. La possibilità di ottenere una pressione intravascolare adeguata ad un efficiente trasferimento di DNA riducendo il volume di soluzione iniettata, permetterebbe di limitare gli effetti collaterali legati ad 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 genico idrodinamico assistita da computer, dove il volume e il flusso di soluzione iniettata vengano gestiti da un software che li regolerebbe in maniera da mantenere la pressione indotta all'interno dei vasi costante a un valore ideale.

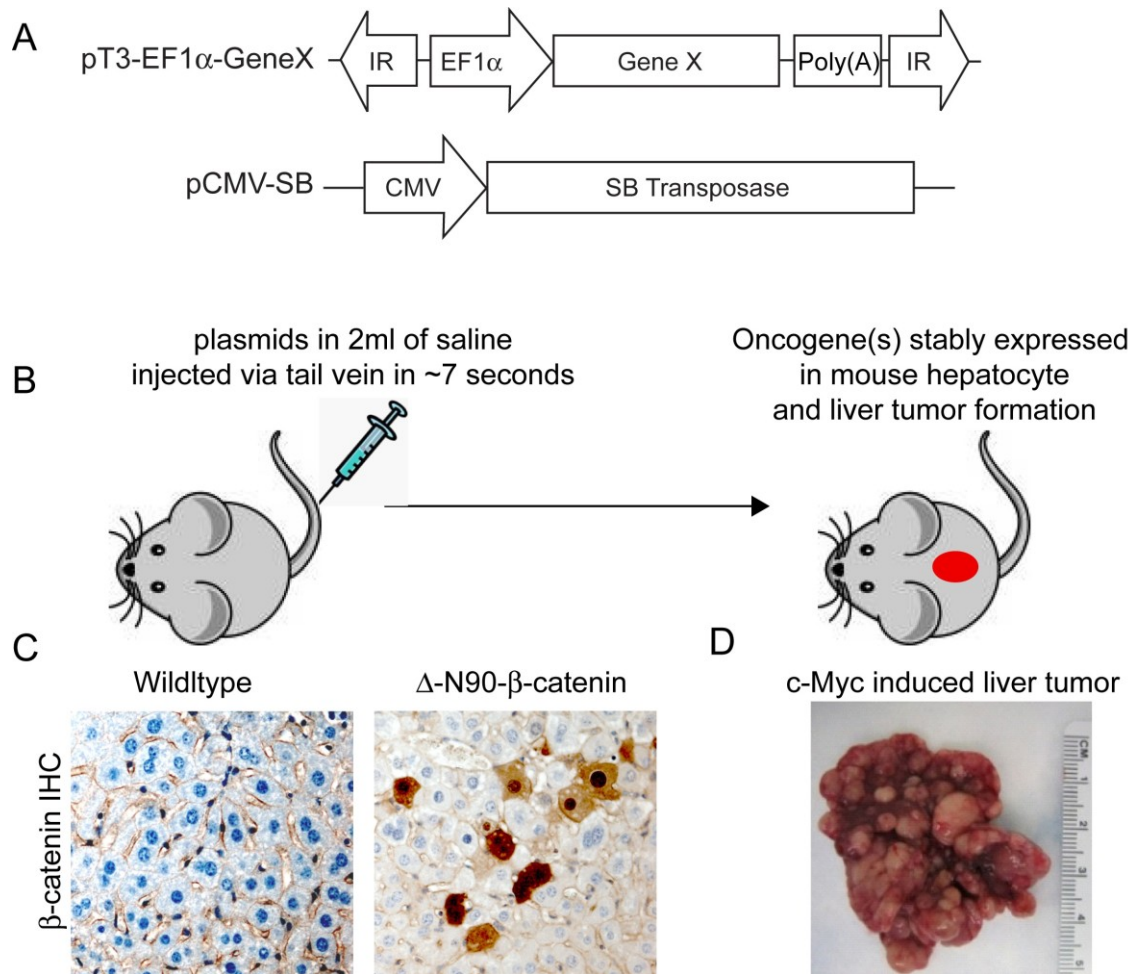


Figura 4. Principio della metodica di trasferimento genico idrodinamico per l'induzione del tumore epatico nel topo. (A) Struttura del plasmide utilizzato per lo studio contenente il gene di interesse (gene X) ed il plasmide contenente la transposasi "Sleeping Beauty" (SB). (B) Rappresentazione schematica della metodica. (C) Colorazione immunoistochimica della β -catenina nel fegato del topo wild-type non iniettato (pannello di sinistra) e della forma attivata della β -catenina (Δ -N90- β -catenin) nel fegato di topo iniettato (pannello di destra). È evidente la sporadica localizzazione nucleare/citoplasmatica di Δ -N90- β -catenin negli epatociti trasfettati con il costrutto (pannello di destra), mentre, la β -catenina è localizzata a livello della membrana plasmatica nei fegati dei topi wild-type (pannello di sinistra). Ingrandimento originale 200x; (D) Immagine macroscopica di tumori epatici multipli sviluppati nel topo in seguito ad iniezione idrodinamica del protooncogene c-Myc.

6. Modello murino AKT

Per esaminare come l'iper-espressione di AKT contribuisca ad una aberrante sintesi lipidica e all'epatocancerogenesi *in vivo*, abbiamo sviluppato un modello di topo. Combinando l'iniezione idrodinamica con l'integrazione somatica mediata da Sleeping Beauty, abbiamo espresso stabilmente AKT miristilata HA tag (myr-AKT) negli epatociti dei topi wild-type FBV/N⁽⁹⁵⁾.

Sebbene l'iniezione di altri vettori da soli o di altri oncogeni, inclusi Bmi1 o NRasV12, non inducessero cambiamenti istologici nel fegato⁽⁹⁶⁾, l'espressione di myr-AKT ha avuto un forte impatto sulla struttura del fegato. Già tre giorni dopo l'iniezione idrodinamica, il fegato era morfologicamente alterato; erano visibili, infatti, singole cellule o piccoli nidi di cellule alterate. Queste cellule mostravano grossi accumuli chiari nel citoplasma, dovuti all'accumulo di glicogeno e lipidi. L'analisi immunohistochimica con l'anticorpo HA-tag ha confermato che queste cellule avevano incorporato il costrutto iniettato. Un'indicazione dell'attività proliferativa era dimostrata dall'aumentata espressione del "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA) nei nuclei cellulari quando comparate agli epatociti circostanti. Dodici settimane dopo l'iniezione, i fegati erano ingrossati e il colore era cambiato, diventando meno omogeneo, irregolare e pallido rispetto ai controlli normali. Circa il 50% del tessuto epatico era occupato da numerose lesioni preneoplastiche. I foci individuali erano formati da un numero superiore a 30 epatociti alterati, tutti mostravano una morfologia a cellule chiare e un alto contenuto lipidico. Tre dei cinque animali presi in esame presentavano un piccolo adenoma epatocellulare, della misura variabile tra 0.7 e 1.8 mm di diametro. Ventotto settimane dopo l'iniezione, la continua proliferazione delle cellule preneoplastiche ha

condotto ad un ingrossamento massivo e alla deformazione dei fegati. Infatti, i tessuti lesionati in ognuno dei cinque animali presi in esame occupavano un volume di fegato maggiore dell'80%. Sebbene la maggior parte delle lesioni fossero di tipo preneoplastico, ciascuno degli animali presentava numerosi tumori. In tutti i topi sono stati riscontrati adenomi cellulari multipli, dal diametro non superiore ai 13 mm. Tuttavia tre dei cinque topi mostravano un HCC della misura non superiore ai 12 mm di diametro. Sebbene il fenotipo cellulare con depositi chiari di lipidi fosse quello predominante nei foci preneoplastici e nell'adenoma epatocellulare, le cellule di HCC mostravano un aumento della basofilia citoplasmatica e una diminuzione di lipidi intracitoplasmatici, ma conservavano la crescita di tipo trabecolare ed erano ben differenziate. Nell'HCC sono state osservate figure mitotiche, corpi apoptotici e aree di necrosi. Sebbene la differenziazione epatocellulare predominasse durante il processo di epatocancerogenesi (tessuto alterato >90%), emergeva una piccola porzione di foci simili a tumori duttali, adenomi epatocellulari-duttali, e, molto raramente, puri tumori colangiocellulari ⁽⁹⁶⁾.

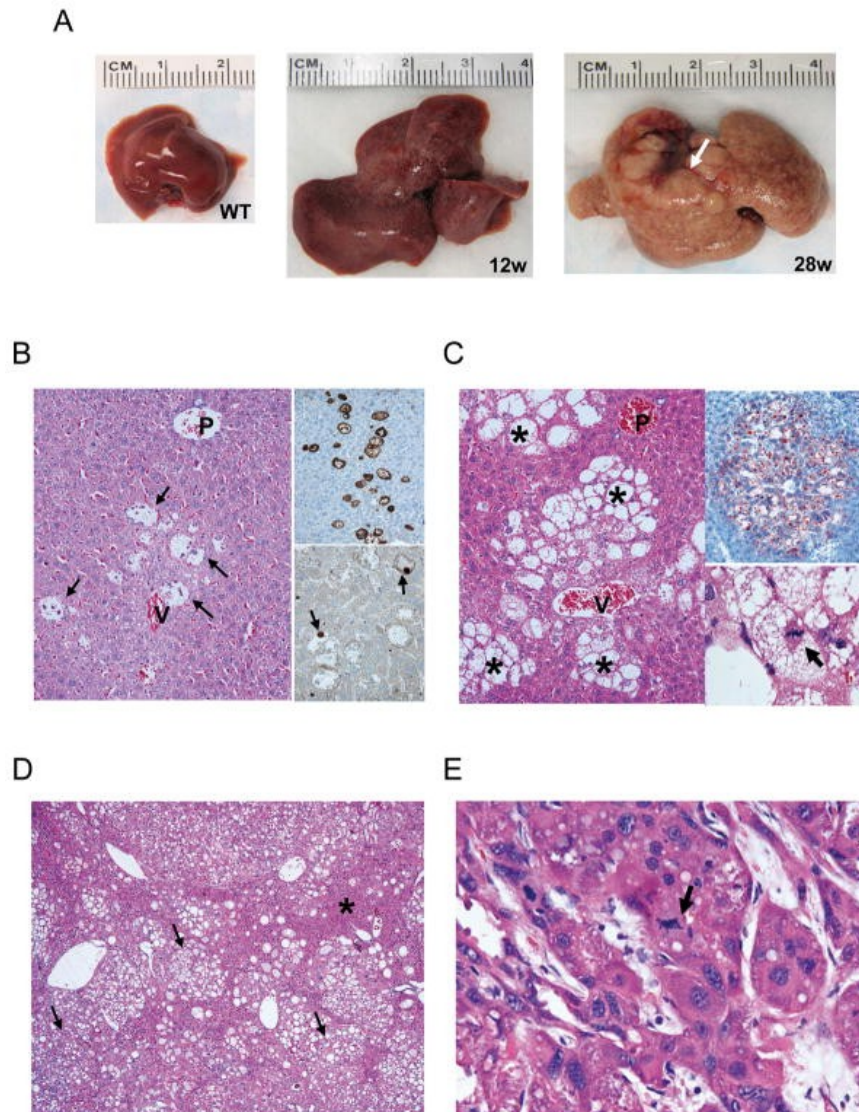


Figura 5. Epatocancerogenesi multifasica in topi che iperesprimono AKT a seguito di trasferimento genico idrodinamico. (A) Aspetto macroscopico del fegato dei topi wild-type e dei topi iniettati con AKT (questi ultimi analizzati a 12 e 28 settimane dopo l'iniezione). I fegati dei topi iniettati con AKT miristilato a 12 settimane (12w) mostrano un aspetto discutibile e più pallido rispetto ai controlli normali (topi wild-type; WT) e hanno dimensioni considerevolmente maggiori, come indicato dalla scala graduata sopra di essi. A 28 settimane dall'iniezione (28w), i cambiamenti sono molto più evidenti e i tumori estremamente più sviluppati; la freccia indica un HCC di grandi dimensioni. (B) Caratteristiche istologiche dei fegati con iperespressione di AKT, esaminati 3 giorni dopo l'iniezione idrodinamica. In questa prima fase si notano le primissime alterazioni nel tessuto epatico (alcune indicate dalla freccia), caratterizzate da una notevole espansione del citoplasma chiaro. Le cellule lesionali sono principalmente localizzate nella zona 3 dell'acino epatico (v, vena epatica) mentre gli epatociti periportali (zona 1 dell'acino epatico; p, tratto portale) rimangono inalterati. 35

(B; foto principale). Immunoistochimicamente, queste cellule mostrano possedere HA-Tag (colorazione marrone; B, foto in alto a destra), e un aumento dell'espressione nucleare di PCNA (indicato dalla freccia; foto in basso a destra) indice della loro attività proliferativa. (C) Dodici settimane dopo l'iniezione idrodinamica, come conseguenza della proliferazione delle cellule preneoplastiche iperesprimenti AKT, circa il 50% del fegato è occupato da foci preneoplastici a cellule chiare, formati da numerosi gruppi di cellule (indicate dall'asterisco; foto principale). A causa delle loro dimensioni, le lesioni risultano più spesso presenti nell'area periportale (zona 1 e 2 dell'acino epatico), anche se sono state ugualmente riscontrate anche nella zona 3 dell'acino epatico (v: vena epatica; p: tratto portale). Il citoplasma delle cellule alterate è ricco di lipidi come indicato dalla colorazione Oil red O (C; foto in alto a destra). Nelle grandi lesioni occasionalmente sono state riscontrate figure mitotiche (indicate dalla freccia; C, foto in basso a destra). (D) Ventotto settimane dopo l'iniezione idrodinamica, circa l'80% del fegato è occupato da tessuto lesionato (indicato dalla freccia; l'asterisco indica invece un'area di tessuto normale), e sono presenti carcinomi epatocellulari. (E). Questi tumori mostrano una crescita macrotrabecolare, presenza notevolmente inferiore di lipidi ma un aumento della basofilia citoplasmatica, significativa atrofia nucleare, e numerose figure mitotiche (indicate dalla freccia). Il bordo inferiore della figura del pannello rappresenta: 0.4 mm (B pannello principale in basso a destra; C, pannello principale e in alto a destra); 0.2 mm (B, pannello in alto a destra; E); 0.1 mm (C; pannello in basso a destra); 2.5 mm (D). (Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, Destefanis G, Delogu S, Zimmermann A, Ericsson J, Brozzetti S, Staniscia T, Chen X, Dombrowski F, Evert M. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1071-83)

7. Modello murino AKT/Ras

Numerose evidenze sperimentali indicano che l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale AKT e Ras sia un evento chiave nell'epatocancerogenesi umana^(97,98). Tuttavia, ad oggi sono state condotte poche indagini per svelare l'effetto funzionale dell'interazione tra le due cascate del segnale nel tumore epatico. A questo proposito, abbiamo recentemente generato un modello di topo caratterizzato dalla co-espressione nel fegato delle forme attivate dei protooncogeni AKT e N-Ras (AKT/Ras). Specificatamente, abbiamo co-espresso (myr)-AKT1-miristilato e N-RasV12 attraverso trasferimento genico idrodinamico⁽⁵³⁾. In tale modello, abbiamo osservato che l'iperespressione del solo gene N-RasV12 non induce anomalie dal punto di vista istologico nel fegato murino; al contrario, l'iperespressione del solo myr-AKT1 (AKT) induce lipogenesi e proliferazione degli epatociti che portano allo sviluppo di adenomi epatocellulari e HCC a ~12 e ~ 24 settimane rispettivamente⁽⁵³⁾. In forte contrasto, la co-espressione di myr-AKT1 e N-RasV12 nel topo accelera la tumorigenesi, portando ad un ingrossamento dell'addome e a letalità, rispettivamente a 4 e 6 settimane dopo l'iniezione idrodinamica⁽⁵³⁾. Il nostro studio, pertanto, fornisce un'importante prova che la concomitante attivazione delle vie di AKT e Ras promuove rapidamente l'epatocancerogenesi nel topo.

A livello cellulare, la co-attivazione di AKT e N-Ras determina un incremento della proliferazione e dell'angiogenesi se comparato con i topi AKT, portando ad una rapida trasformazione maligna e progressione del tumore. A livello molecolare, più alti livelli di mTORC1, e dei suoi effettori a valle coinvolti nella trascrizione proteica (activated/phosphorylated S6K and inactivated/phosphorylated 4E-BP1), angiogenesi

(HIF-1 α , VEGF- α), e apoptosi (MCL-1) sono presenti nei tumori in topi AKT/Ras quando comparati con le corrispondenti lesioni in topi AKT.

In contrasto, una simile iperespressione dei bersagli di mTORC2 (LIPIN1, SGK1) viene osservata in topi AKT e AKT/Ras quando comparati con topi wild-type. I risultati suggeriscono dunque un ruolo cruciale della via Ras/MAPK nell'amplificazione dell'attivazione di mTORC1 guidata da AKT ⁽⁵³⁾. In aggiunta, si è visto che l'aumento dell'attivazione di mTORC1 nelle cellule tumorali AKT/Ras è la conseguenza, almeno in parte, della fosforilazione/inattivazione del residuo di serina 664 del gene TSC2, un soppressore di mTORC1, mediata da Ras/MAPK ⁽⁵³⁾.

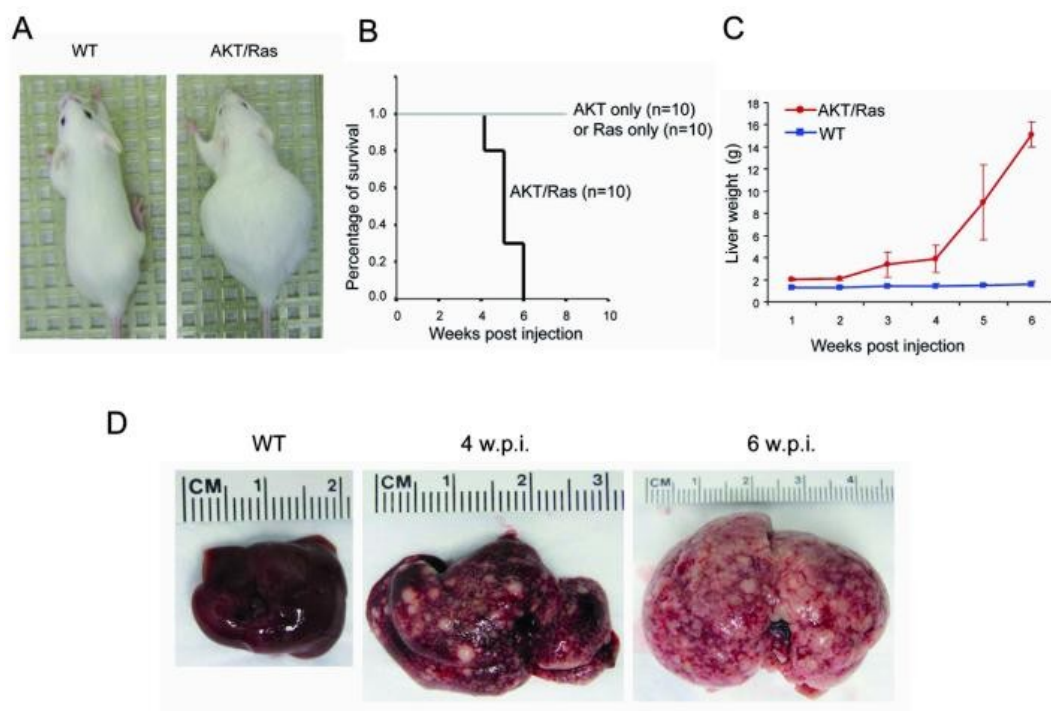


Figura 6. La co-espressione di AKT1 miristilata (myr-AKT) e della forma mutata di N-Ras (N-RasV12) induce un rapido sviluppo del tumore epatico nel topo. (A) Fenotipo del topo wild-type e del topo AKT/Ras (4 settimane dopo l'iniezione). (B) Curva di sopravvivenza dei topi iniettati con solo AKT, solo Ras, e AKT combinato con Ras. (C) Peso del fegato dei topi wild-type e dei topi AKT/Ras a differenti intervalli di tempo (da 1 a 6 settimane dall'iniezione). (D) Immagine dei fegati dei topi wild-type (WT) e dei fegati dei topi AKT/Ras 4 o 6 settimane dopo l'iniezione (w.p.i). (Ho C, Wang C, Mattu S, Destefanis G, Ladu S, Delogu S, Armbruster J, Fan L, Lee SA, Jiang L, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Calvisi DF. AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-Ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-Myc pathways. *Hepatology* 2012;55:833-45).

8. La co-attivazione di AKT e Ras nel fegato di topo promuove una rapida cancerogenesi attraverso le vie di trasduzione del segnale mTORC1, FOXM1/SKP2, e c-Myc

Allo scopo di identificare le vie di trasduzione del segnale che determinano un'accelerata epatocancerogenesi nei topi AKT/Ras, sono stati precedentemente valutati in topi wild-type, AKT e AKT/Ras i livelli delle proteine del ciclo cellulare e degli inibitori del ciclo cellulare. È stata osservata una forte iperespressione del fattore trascrizionale forkhead box M1 (FOXM1) e dei suoi geni bersaglio responsabili della progressione del ciclo cellulare, inclusi i membri del complesso di degradazione SCF (SKP2 e CKS1), quasi esclusivamente nelle lesioni epatiche AKT/Ras preneoplastiche e neoplastiche.

È interessante notare che attraverso esperimenti in vitro è stato dimostrato che l'aumento dell'espressione di FOXM1 e c-Myc nelle cellule tumorali derivate da tumori AKT/Ras è indipendente da mTORC1, poichè il silenziamento del componente RAPTOR di mTORC1 nelle medesime cellule tumorali non è in grado di inibire l'espressione di FOXM1 e c-Myc ⁽⁵³⁾.

Successivamente, è stato valutato il ruolo delle vie di segnale mTORC1, FOXM1/SKP2 e c-Myc nel mediare la proliferazione cellulare nell'HCC indotto da AKT e N-Ras. I risultati ottenuti indicano che il silenziamento di RAPTOR, FOXM1 o c-Myc da soli determina una diminuzione, in vitro, della crescita della linea cellulare AKT/Ras, mentre la concomitante soppressione dei tre geni porta ad un completo arresto della crescita cellulare. Questi dati indicano che le vie di segnale mTORC1, FOXM1/SKP2 e c-Myc hanno bersagli distinti nel fegato dei topi AKT/Ras.

Tali studi, pertanto, hanno dimostrato che l'attivazione delle cascate del segnale di AKT e Ras è sinergica nel promuovere una rapida epatocancerogenesi attraverso un meccanismo sia dipendente che indipendente da mTORC1. In particolare, le vie di segnale di mTORC1, FOXM1/SKP2 e c-Myc contribuiscono tutte significativamente all'attivazione dell'epatocancerogenesi nel modello AKT/Ras.

9. Il trattamento con Rapamicina rallenta l'epatocancerogenesi AKT/Ras indotta, ma innesca un feedback di attivazione della via di segnale MAPK nelle cellule tumorali residue

Per definire meglio il ruolo di mTORC1 nell'epatocancerogenesi indotta da AKT/RAS, è stato precedentemente determinato se l'inibizione farmacologica di mTORC1 possa inibire lo sviluppo dell'HCC indotto da AKT/Ras in questi topi. A questo proposito, i topi AKT/Ras sono stati sottoposti sia alla somministrazione di Rapamicina (un inibitore specifico di mTORC1), sia a quella del veicolo per tre settimane, dopo tre settimane dall'iniezione idrodinamica (quando nel fegato dei topi AKT/Ras i piccoli noduli diventano visibili microscopicamente). Sorprendentemente, tutti i topi trattati con Rapamicina apparivano macroscopicamente sani, mentre tutti i topi trattati con il veicolo sviluppavano grandi tumori epatici che richiedevano l'eutanasia dei medesimi animali. Macroscopicamente, i fegati dei topi trattati con Rapamicina apparivano normali e pesavano approssimativamente solo un quinto dei fegati dei topi trattati con il veicolo. Tuttavia è interessante notare che la valutazione istologica rivelava la presenza di lesioni microscopiche che persistevano nei fegati AKT/Ras trattati con Rapamicina. Questo risultato suggerisce che il trattamento con Rapamicina inibisce solo parzialmente la progressione del tumore epatico indotto dalla co-espressione dei protooncogeni AKT e Ras ⁽¹⁰³⁾.

Per spiegare meglio i meccanismi molecolari coinvolti nell'attività di inibizione tumorale mediata dalla Rapamicina, sono state indagate le vie di segnale chiave a valle di mTOR in fegati di topi AKT/Ras non trattati, trattati con veicolo e trattati con Rapamicina. È importante notare che, come mostrato dall'analisi western blot, la

Rapamicina è in grado di inibire in maniera efficace l'espressione di p-AKT, p-TOR e p-RPS6. In accordo con altre ricerche il trattamento con Rapamicina mostrava invece una scarsa efficacia nel ridurre i livelli di p-4EBP1 ⁽¹⁰³⁾. Un'incrementata lipogenesi è uno dei maggiori indizi dell'attivazione di mTORC1 nel fegato ed è mediata principalmente dall'induzione di SREBP1 attraverso l'asse S6K1/RPS6 ⁽¹⁰³⁾. Di conseguenza, i livelli delle proteine coinvolte nella biosintesi lipidica, che includono FASN, ACAC, ACLY e SCD1, nei tessuti epatici AKT/Ras trattati con Rapamicina erano ridotti. Inoltre, la sintesi degli acidi grassi e i livelli di colesterolo erano marcatamente ridotti in seguito alla somministrazione di Rapamicina ⁽¹⁰³⁾. Il trattamento con Rapamicina inoltre era in grado di indurre l'apoptosi ed inibire l'angiogenesi nei tessuti tumorali dei topi AKT/Ras, e questo era accompagnato dall'induzione della forma attivata/clivata del mediatore apoptotico caspasi 3, e dalla riduzione dei fattori pro-angiogenetici, quali HIF1 α e VEGF- α . Infine, il trattamento con Rapamicina determinava una forte diminuzione della glicolisi. Pertanto, tutti questi fattori contribuiscono in maniera determinante alla forte attività di anti-oncogenica svolta dalla Rapamicina nei topi AKT/Ras ⁽¹⁰³⁾.

Recenti studi suggeriscono l'esistenza di numerosi processi di feedback tra le vie AKT e Ras durante lo sviluppo del tumore ^(99,100,101,102). In particolare, una precedente analisi aveva mostrato che in campioni di tumori umani l'inibizione di mTORC1 determina un'attivazione della via di segnale MAPK attraverso un feedback S6K/PI3K dipendente ⁽¹⁰²⁾. Di conseguenza, è stato determinato se lo stesso accade in topi AKT/Ras in seguito a trattamento con Rapamicina. I risultati dell'analisi di western blot hanno mostrato la presenza di elevati livelli di ERK fosforilato/attivato e dei suoi effettori a valle, p-MNK1 e p-eIF4E, nei tessuti epatici AKT/Ras trattati con Rapamicina. In accordo

con ciò, la colorazione immunohistochimica ha mostrato un'intensa positività per p-ERK nelle cellule tumorali residue dei topi AKT/Ras sottoposti al trattamento con Rapamicina.

Per valutare se le cellule tumorali residue a seguito della somministrazione di Rapamicina erano ancora in grado di formare tumori più grandi, un gruppo di topi AKT/Ras è stato sottoposto alla somministrazione di Rapamicina per due settimane, a partire da tre settimane dopo l'iniezione idrodinamica ⁽¹⁰³⁾. Successivamente, il trattamento con Rapamicina è stato sospeso ed i topi AKT/Ras sono stati seguiti per ulteriori tre settimane. Sorprendentemente, il blocco della somministrazione della Rapamicina portava ad una proliferazione incontrollata delle cellule residue, che portava allo sviluppo di grandi tumori che occupavano l'intero parenchima epatico dei topi AKT/Ras. Sia l'analisi istopatologica che quella immunohistochimica dei principali componenti delle vie di segnale AKT/mTOR e Ras/MAPK hanno mostrato che i tumori sviluppati a seguito dell'interruzione della somministrazione della Rapamicina erano identici a quelli formati nei topi AKT/Ras non trattati ⁽¹⁰³⁾.

Riassumendo, tali studi indicano che il trattamento con Rapamicina riduce, ma non inibisce completamente, l'epatocancerogenesi indotta da AKT/Ras attraverso la soppressione della cascata del segnale mTORC1/RPS6. L'interruzione del trattamento con Rapamicina porta allo sviluppo di tumori epatici aggressivi iniziati dalle cellule residue iperespressanti AKT e N-Ras. Dal punto di vista molecolare, il trattamento con Rapamicina innesca una iper-regolazione compensatoria della via di segnale MAPK nel fegato di topi AKT/Ras ⁽¹⁰³⁾.

10. La contemporanea inibizione delle vie di trasduzione del segnale mTORC1 e Ras/MAPK è svantaggioso per la crescita delle cellule AKT/Ras *in vitro*

Successivamente è stato valutato l'effetto dell'inibizione combinata delle vie AKT/mTOR e Ras/MAPK nella crescita delle cellule AKT/Ras ⁽¹⁰³⁾. A questo proposito, sono state utilizzate linee cellulari derivate da HCC sviluppati nei topi AKT/Ras. Il trattamento con entrambi gli inibitori di mTORC1, Rapamicina e l'inibitore di MEK, U0126, ha portato ad una significativa riduzione della crescita della linea cellulare AKT/Ras dovuta ad una diminuzione della proliferazione e ad un aumento dell'apoptosi nelle cellule tumorali ⁽¹⁰³⁾. Sorprendentemente, i risultati hanno mostrato che la somministrazione contemporanea di Rapamicina e U0126 determinava una completa inibizione della crescita delle linee cellulari AKT/Ras come conseguenza di una forte riduzione della proliferazione e di massiva apoptosi ⁽¹⁰³⁾. A livello molecolare, è stato dimostrato che il trattamento con Rapamicina è in grado di sopprimere gli effettori a valle della via AKT/mTOR, quali p-RPS6 e le proteine lipogeniche, ma non ha effetto sui livelli di p-4EBP1 ⁽¹⁰³⁾. Tuttavia, la Rapamicina determinava una iper-regolazione compensatoria dell'asse pERK1/2/p-MNK1/p-eIF4E ed inoltre la glicolisi era inibita solo marginalmente a seguito del trattamento con Rapamicina. A seguito del trattamento della linee cellulari AKT/Ras con U0126 è stata evidenziata l'inibizione della via pERK1/2/p-MNK1/p-eIF4E e della glicolisi, mentre non vi erano effetti sulla cascata del segnale AKT/mTOR e sulla lipogenesi ⁽¹⁰³⁾. Stranamente, invece, è stata riscontrata una forte induzione di p-RPS6 a seguito del medesimo trattamento. Tale osservazione implica l'esistenza di un'iper-regolazione compensatoria della via AKT/mTOR in risposta all'inibizione di MAPK. Tuttavia, tale feedback

compensatorio veniva completamente abolito quando la Rapamicina e U0126 venivano somministrati in associazione ⁽¹⁰³⁾.

La concomitante attivazione delle vie AKT/mTOR e Ras/MAPK è stata frequentemente osservata durante l'epatocancerogenesi umana ^(97,98). I dati riassunti dimostrano l'interazione funzionale delle vie di segnale AKT/mTOR e Ras/MAPK nella promozione in vivo dell'epatocancerogenesi; inoltre sono state identificate nuove interazioni biochimiche e cascate del segnale la cui attivazione è coinvolta nella trasformazione maligna e progressione del tumore promossa dalle vie AKT/mTOR e Ras/MAPK. Nello specifico, i risultati ottenuti dimostrano il coinvolgimento di meccanismi mTORC1-dipendenti e mTORC1-indipendenti, comprendenti l'attivazione di FOXM1/SKP2 e c-Myc, nello sviluppo del tumore epatico indotto dall'iperespressione di AKT e N-Ras. Inoltre, tali studi forniscono un modello preclinico prezioso che può essere utilizzato per caratterizzare il potenziale chemopreventivo e terapeutico di piccole molecole che interferiscono con le vie di segnale AKT/mTOR e/o Ras/MAPK. Questi studi dimostrano inoltre che il trattamento con Rapamicina inibisce significativamente lo sviluppo del tumore epatico AKT/Ras indotto attraverso l'inibizione della cascata del segnale mTORC1/RPS6, senza tuttavia avere un effetto sui livelli di p-4EBP1, che è noto essere un effettore chiave a valle di mTORC1 in alcuni tipi di tumore. Inoltre, si è dimostrato che il trattamento con Rapamicina innesca un meccanismo compensatorio che porta all'induzione della via di segnale MAPK. L'attivazione di tale cascata molecolare probabilmente è responsabile della sopravvivenza delle cellule tumorali residue nei topi AKT/Ras trattati con Rapamicina ⁽¹⁰³⁾.

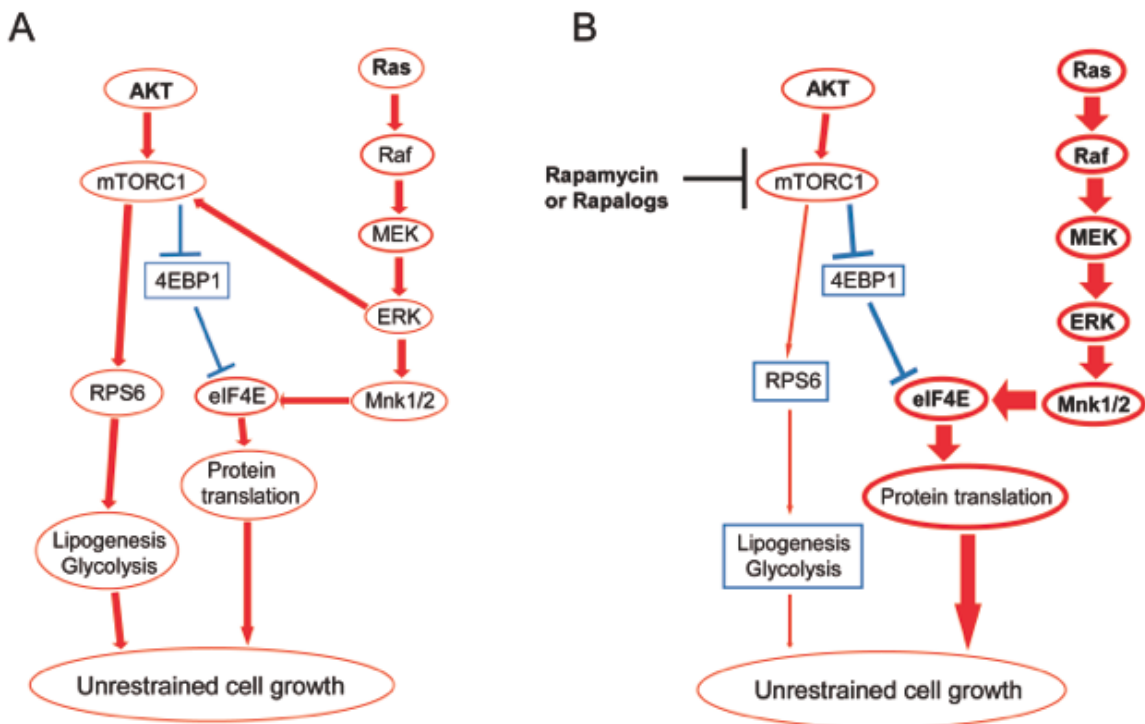


Figura 7. Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari che intercorrono tra le vie di trasduzione del segnale AKT e Ras/MAPK per promuovere la cancerogenesi epatica nel topo e l'effetto del trattamento con Rapamicina su tali vie. (A) AKT induce l'attivazione (indicata dalla freccia rossa) di mTORC1, con la conseguente attivazione di RPS6, lipogenesi, e glicolisi, ma anche l'inattivazione (indicata dalla freccia blu) della proteina 4EBP1. A seguito dell'inattivazione di 4EBP1, mTORC1 rilascia la proteina eIF4E, innescando la traduzione proteica. Ras attiva invece la cascata del segnale Raf/MEK/ERK/eIF4E, che in seguito attiva mTORC1 e eIF4E. L'interazione tra AKT attivato e Ras porta infine ad una crescita cellulare incontrollata. (B) La Rapamicina induce una riduzione (indicata dalle sottili frecce rosse) dell'attività di mTORC1 e AKT, ma è inefficace sulla proteina 4EBP1 e induce una attivazione compensatoria (indicata dalle frecce rosse più spesse) della via del segnale Ras/Raf/MEK/ERK e di eIF4E. (Wang C, Cigliano A, Delogu S, Armbruster J, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Calvisi DF. Functional crosstalk between AKT/mTOR and Ras/MAPK pathways in hepatocarcinogenesis: implications for the treatment of human liver cancer. *Cell Cycle* 2013;12:1999-2010).

SEZIONE SPERIMENTALE

1. Introduzione

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più comune tipo di tumore epatico primitivo e rappresenta la terza causa di morte per tumore al mondo ⁽¹⁰⁴⁾. Le opzioni terapeutiche per la cura dell'HCC sono estremamente limitate e generalmente inefficaci. Solo una piccola percentuale di pazienti con HCC, infatti, viene diagnosticata in uno stadio precoce della malattia in cui è possibile l'utilizzo di trattamenti terapeutici "risolutivi" quali la resezione chirurgica o il trapianto di fegato. La maggior parte dei pazienti vengono invece diagnosticati ad uno stadio avanzato di HCC, quando i potenziali trattamenti curativi risultano inefficaci ^(97,106). Il solo farmaco chemioterapico approvato a livello internazionale per il trattamento di HCC allo stadio avanzato è il Sorafenib, una piccola molecola che inibisce numerose proteine con attività tirosin-chinasica (RAF, VEGFR2, PDGFBR), ma complessivamente l'efficacia del Sorafenib è estremamente limitata ⁽¹⁰⁸⁾. Il trattamento con tale farmaco, infatti, prolunga la sopravvivenza dei pazienti affetti da HCC di un periodo in genere non superiore alle 10-14 settimane in comparazione ai pazienti trattati con placebo. È pertanto imperativo lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento dell'HCC in stadio avanzato. Per questo scopo risulta dunque fondamentale un'approfondita analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione dell'epatocarcinoma ⁽¹⁰⁸⁻⁵⁴⁾.

Lo sviluppo del tumore epatico è un processo multifasico in cui numerose vie di trasduzione del segnale sono alterate. Una delle cascate molecolari più frequentemente

attivate nell'HCC è rappresentata dalla via PI3K/AKT/mTOR, che risulta implicata nelle fasi di inizio, progressione e metastasi^(98,110). PI3K (phosphoinositide 3-Kinase) è attivato da un recettore tirosin-chinasico o da una proteina G associata al recettore⁽⁹⁸⁾. Conseguentemente all'attivazione di PI3K, AKT (v-akt murine thyoma viral oncogene homolog) viene reclutato sulla superficie interna della membrana e fosforilato⁽¹¹⁰⁾. Negli epatociti di topo, l'iper-espressione di una forma attivata di AKT (Myr-AKT) attraverso trasferimento genico idrodinamico induce lipogenesi e proliferazione degli epatociti, conducendo infine allo sviluppo di tumori epatici in circa cinque-sei mesi. AKT esercita numerosi dei suoi effetti sugli epatociti attraverso il suo effettore chiave, il complesso 1 di mTOR (mTORC1)^(110,111). AKT può attivare mTORC1 attraverso una maniera dipendente e 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^(110,112).

L'asse di mTOR è frequentemente attivato in numerosi tumori solidi, compreso l'HCC umano⁽¹¹³⁾. Utilizzando topi con una delezione fegato-specifica di TSC1 e Raptor (proteina regolatoria associata a mTORC1, e un essenziale componente di mTORC1), un recente studio ha dimostrato che mTORC1 controlla la chetogenesi nei topi in risposta al digiuno e alla sua modulazione in base all'età⁽¹¹⁴⁾. Inoltre è stato evidenziato che l'attivazione cronica di mTORC1 nei topi con delezione fegato-specifica di

TSC1 è sufficiente per indurre il processo di epatocancerogenesi⁽¹¹⁵⁾.

I maggiori regolatori della sintesi proteica a valle di mTORC1 sono 4E-BP1 e p70S6K1/2^(112,116). In particolare, 4E-BP1 regola negativamente eIF4E, un fattore chiave di inizio velocità-limitante per la traduzione CAP-dipendente. La fosforilazione di 4E-BP1 da parte di mTORC1 determina la sua dissociazione da eIF4E, consentendo dunque la formazione del complesso di inizio della traduzione all'estremità 5' dell'mRNA. È stato dimostrato che il controllo trascrizionale mediato da 4E-BP1/eIF4E sembra essere *in vivo*⁽¹¹⁷⁾ un segnale chiave a valle di mTORC1 nella linfomagenesi indotta da AKT, e un mediatore critico della proliferazione cellulare indotta da mTORC1⁽¹¹⁸⁾. Tuttavia, 4E-BP1/eIF4E sembra anche essere uno dei maggiori effettori dell'attivazione oncogenica delle vie di segnale AKT e ERK nelle linee cellulari tumorali e nei modelli di xenotrapianto⁽¹¹⁹⁾. Le proteine p70S6K1 e 2 rappresentano altri effettori cruciali a valle di mTORC1. Una volta fosforilate e attivate da mTORC1, le proteine p70S6K1 e 2 attivano a loro volta la proteina S6 ribosomiale 40S (RPS6) ed altre proteine che regolano il controllo della traduzione proteica⁽¹²⁰⁾. È stato dimostrato che la perdita della proteina RPS6 negli epatociti di topo inibisce la proliferazione cellulare dopo epatectomia parziale^(121,122). Quando tutti e cinque i residui di serina fosforilabili di RPS6 sono rimpiazzati da alanina non fosforilabile, i topi risultanti (denominati topi P-/-) mostrano un difetto nella crescita cellulare⁽¹²³⁾. Utilizzando questo modello di topo, uno studio precedente ha mostrato che è sufficiente una minore fosforilazione di RPS6 per la linfomagenesi mediata dal protooncogene AKT⁽¹¹⁷⁾.

La Rapamicina è un parziale inibitore allosterico di mTORC1. La Rapamicina e i suoi analoghi (detti Rapalogs) sono stati testati clinicamente come agenti anti-tumorali in numerosi tipi di neoplasie^(124,125). Tuttavia, gli studi condotti finora hanno dimostrato

che i Rapalogs presentano una modesta efficacia terapeutica. Questa mancanza di efficacia anti-tumorale è probabilmente dovuta a meccanismi multipli ⁽¹²⁶⁾. Uno dei meccanismi chiave è rappresentato dal fatto che la Rapamicina ed i suoi analoghi inibiscono solo parzialmente mTORC1 attraverso la soppressione della fosforilazione di RPS6 ma non di 4E-BP1 ^(127,128).

L'attivazione contemporanea delle vie di trasduzione del segnale AKT/mTOR e Ras/MAPK è un evento molecolare frequentemente riscontrato negli HCC umani ^(113,129). Allo scopo di comprendere le interazioni molecolari e biochimiche che intervengono tra le due vie di segnale durante l'epatocancerogenesi, abbiamo generato un nuovo modello murino di tumore epatico caratterizzato dalla co-espressione delle forme attivate di AKT e N-Ras. Successive analisi biochimiche hanno dimostrato che entrambe le vie di trasduzione del segnale, mTORC1-dipendente e mTORC1-indipendente, sono responsabili dell'epatocancerogenesi nei topi AKT/Ras ⁽⁵³⁾. Nel presente studio, abbiamo indagato il coinvolgimento della via di mTORC1, inclusi i suoi effettori a valle, 4E-BP1/eIF4E e RPS6, nell'epatocancerogenesi AKT/Ras-indotta *in vivo*. I nostri dati dimostrano che entrambe le cascate del segnale (4E-BP1/eIF4E e RPS6) hanno un ruolo critico nella patogenesi del tumore epatico AKT/Ras-indotto, ed è richiesta la completa inibizione di mTORC1 per bloccare completamente l'epatocancerogenesi guidata dagli oncogeni N-Ras e AKT nei topi.

2. Materiali e Metodi

2.1. Costrutti e reagenti

Dieci μg del plasmide pCMV contenente la transposasi Sleeping Beauty (SB) e dei costrutti pT3-EF1 α -HA-myr-AKT e pT2CAGGS-NRasV12 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. I plasmidi pBabe-4E-BP1A4 e pBabe-4E-BP1WT sono stati forniti dal Dr. Davide Ruggero dell'Università della California San Francisco (UCSF). I geni 4E-BP1A4 e 4E-BP1WT sono stati clonati nel vettore pT3-EF1 α con una tag HA N-terminale oppure con una tag V5 al C-terminale. Il plasmide pT3-EF1 α -Cre è stato generato partendo dal vettore pBS185 CMV-Cre, acquistato dall'Addgene (www.addgene.com; numero di catalogo 11916), e suo successivo clonaggio nel vettore pT3-EF1 α . Tutti i plasmidi sono stati purificati utilizzando il kit Endotoxin free Maxi prep (Sigma, St. Louis, MO).

2.2. Iniezione idrodinamica e trattamento dei topi

Topi femmine del ceppo FVB/N wild-type sono stati forniti da Charles River (Wilmington, MA). I topi femmine sono stati preferiti ai topi maschi a causa dell'estrema aggressività di questi ultimi. I topi *Raptor fl (flox)/+* sono stati acquistati dalla Jackson Laboratories (Sacramento, CA; Stock: 013188), e incrociati tra di loro allo scopo di generare topi *Raptor fl/fl*. Per eliminare *Raptor* mentre AKT e/o Ras erano coespressi, abbiamo iniettato alte dosi del costrutto p-T3-EF1 α -Cre (20 μ g) insieme a basse dosi dei plasmidi AKT (4 μ g) e Ras (4 μ g). Il costrutto p-T3-EF1 α -Cre contiene l'enzima Cre-recombinasi, in grado di determinare la delezione dei segmenti di DNA compresi tra due loci flox. Il plasmide contenente la forma wild-type di 4EBP1 oppure la sua forma non fosforilabile da parte di mTORC1 (denominata 4EBP1A4) è stato iniettato ad alte dosi (20 μ g) insieme a basse dosi dei plasmidi AKT (4 μ g) e Ras (4 μ g). La Rapamincina (6mg/Kg/day) o il veicolo, sono stati somministrati ai topi per via intraperitoneale per sette settimane. Lo schema del trattamento e del trasferimento genico idrodinamico è riassunto in Figura 8. I topi sono stati accuditi, alimentati e monitorati in accordo con i protocolli approvati dal comitato per la ricerca sugli animali della University of California, San Francisco.

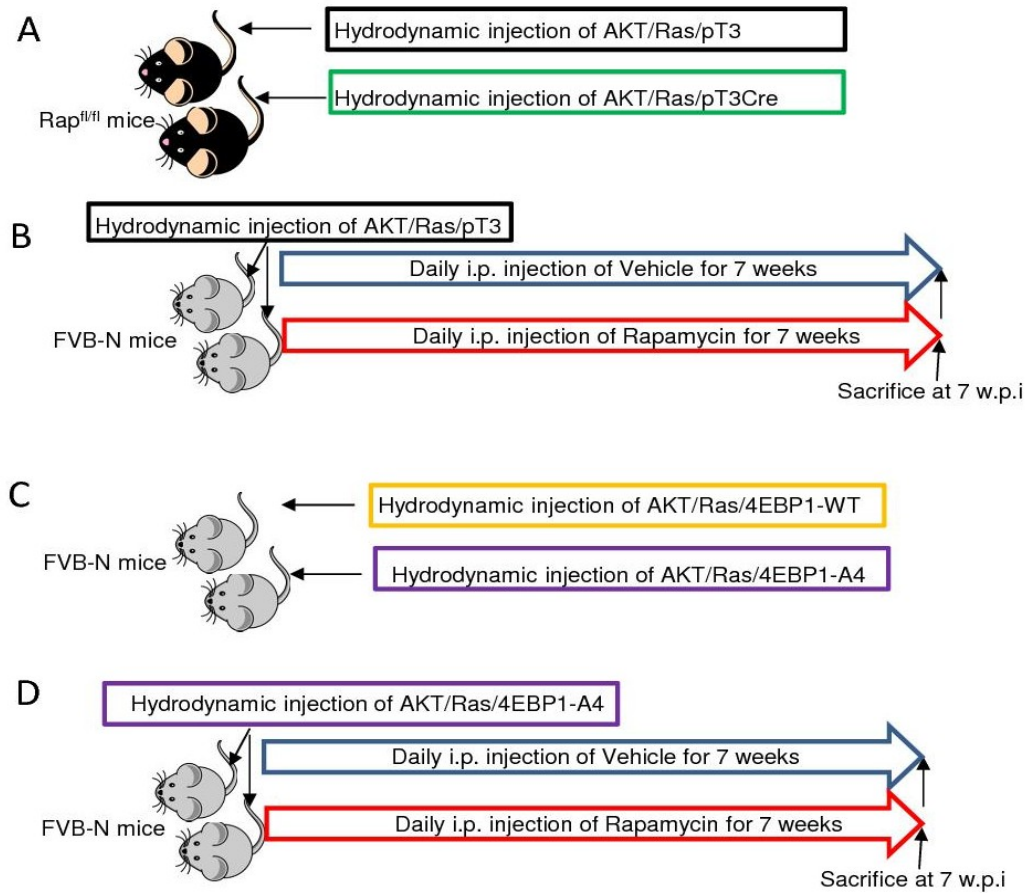


Figura 8. Schema che riassume il trattamento ed i geni iniettati attraverso trasferimento genico nel topo nel presente studio. Abbreviazioni: w.p.i., weeks post injection (settimane dopo l'iniezione); WT, wild-type.

2.3. Istologia e 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 anatomico-patologi (Prof. Frank Dombrowski e Prof. Matthias Evert, Istituto di Patologia, Università di Greifswald, Greifswald, Germania) in accordo con i criteri di Frith et al.⁽¹³¹⁾. 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-Ki67 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX) alla diluizione di 1:1000. 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.

2.4. 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 denaturate 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 primari di coniglio: anti-AKT, anti-p-AKT, anti-p-RPS6, anti-p-4EBP1, anti-p-ERK1/2 e anti-HA-tag. Tutti gli anticorpi sono stati acquistati dalla Cell Signaling Technology (Danvers, MA) ed utilizzati alla diluizione di 1:300. Ciascuna membrana è stato 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 (Chemicon International, Temecula, CA; diluizione 1:20000)

3. Risultati

3.1. La completa eliminazione di *Raptor* inibisce l'epatocancerogenesi indotta dai protooncogeni AKT e Ras *in vivo*

L'attivazione delle cascate del segnale di AKT e Ras è frequentemente osservata nell'HCC umano ^(129,95). Per comprendere le capacità oncogene di queste vie di trasduzione del segnale nell'epatocancerogenesi, abbiamo precedentemente iperespresso le forme attivate dei protooncogeni AKT (myr-AKT) e/o di N-Ras (RasV12) negli epatociti di topo mediante la tecnica di iniezione idrodinamica. I nostri dati indicano che, da un lato l'iperespressione del protooncogene Ras da solo non è in grado di indurre epatocancerogenesi mentre, dall'altro lato, l'iperespressione del solo AKT induce proliferazione degli epatociti e lipogenesi, con sviluppo di HCC dopo una latenza di 5-6 mesi ⁽⁹⁵⁾. L'attivazione contemporanea di Ras e AKT, invece, accelera significativamente la formazione del tumore epatico, con una forte attivazione della via di mTORC1 ⁽⁵³⁾. Nel presente progetto, abbiamo cercato di meglio comprendere il contributo funzionale di mTORC1 nel modello di tumore epatico di topo AKT/Ras utilizzando approcci genetici. Poiché Raptor è un componente essenziale di mTORC1, abbiamo determinato se mTORC1 è richiesto per l'epatocancerogenesi indotta da AKT/Ras *in vivo*. A tale scopo, abbiamo co-iniettato i plasmidi AKT/Ras/pT3 e pT3-EF1 α -Cre (AKT/Ras/Cre) in topi *Raptor fl/fl* (Figura 8). I topi *Raptor fl/fl* iniettati con il vettore AKT/Ras/pT3 hanno sviluppato grossi tumori epatici circa 6 settimane dopo l'iniezione idrodinamica ed è stato necessario sottoporli ad eutanasia. In forte contrasto, i topi *Raptor fl/fl* iniettati con AKT/Ras/Cre non hanno sviluppato alcun tumore

(Figura 9). L'aumento dei livelli di p-AKT e p-ERK sono stati determinati in tutti i tessuti di fegato di topo, confermando con successo l'espressione degli oncogeni iniettati ectopicamente nel fegato di topo (Figura 9). Dal punto di vista istologico, i tumori epatici da iniezione di AKT/Ras/pT3 in topi *Raptor fl/fl* erano simili a quelli precedentemente descritti quando i geni AKT e Ras erano co-espresi nei topi wild-type⁽⁵³⁾ (Figura 9). Al contrario, i fegati dei topi *Raptorfl/fl* iniettati con AKT/Ras/Cre erano completamente normali, senza nessun segno di lesione preneoplastica o neoplastica. Per determinare se, dopo lungo tempo, potesse svilupparsi il tumore epatico, abbiamo seguito i topi *Raptorfl/fl* iniettati con AKT/Ras/Cre fino a 20 settimane dopo l'iniezione. I topi *Raptorfl/fl* iniettati con AKT/Ras/Cre non sviluppano alcun tumore nemmeno dopo 20 settimane dall'iniezione. Istologicamente, i fegati di topo *Raptor fl/fl* iniettati con AKT/Ras/Cre appaiono normali. In conclusione, i nostri risultati indicano che lo sviluppo del tumore epatico indotto dagli oncogeni AKT e Ras richiede l'attivazione funzionale di mTORC1 *in vivo*.

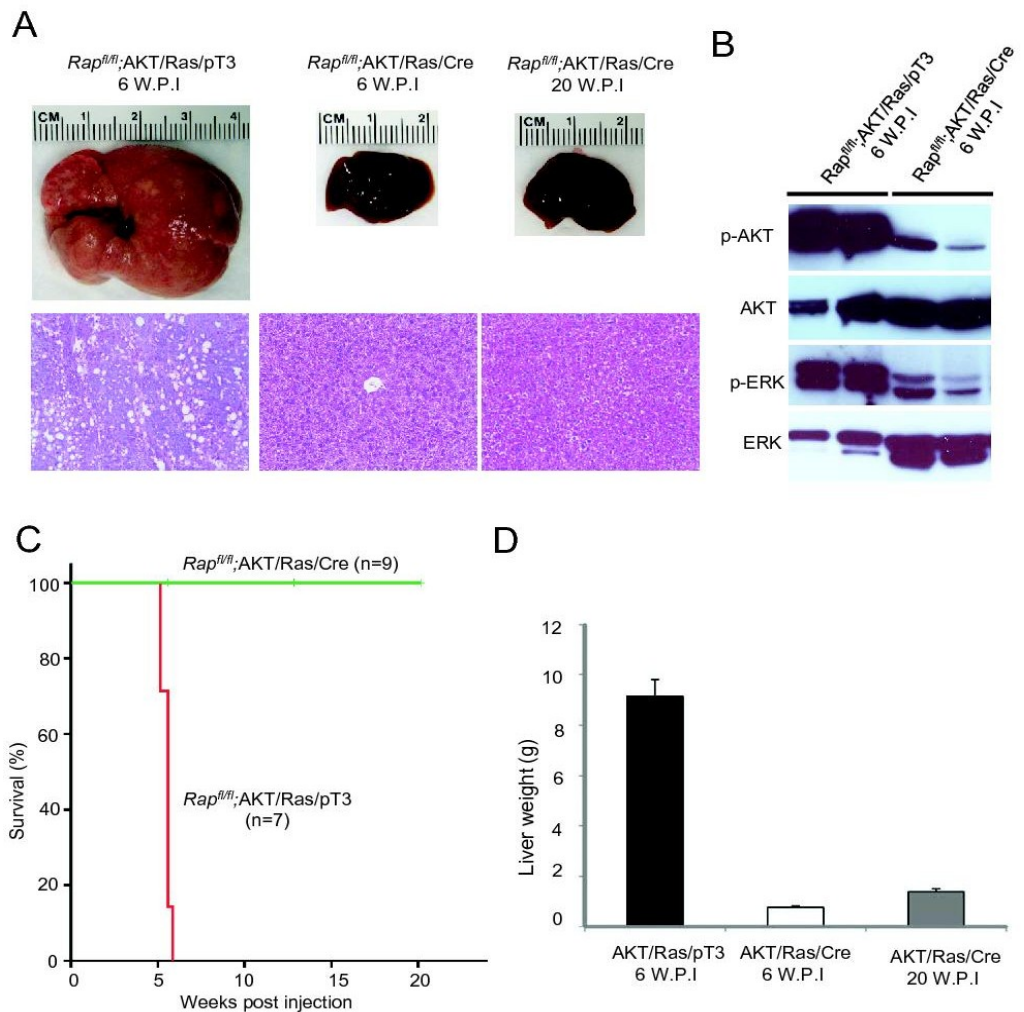


Figura 9. L'eliminazione di Raptor, membro cardine del complesso mTORC1, determina l'inibizione della cancerogenesi indotta dai protooncogeni AKT e Ras. (A) Aspetto macroscopico ed istologico dei fegati iniettati con AKT/Ras/pT3 o (pannelli a sinistra) p-T3-EF1 α -Cre (AKT/Ras/Cre; pannelli a destra) nei topi *Raptor fl/fl*. I fegati dei topi iniettati con p-T3-EF1 α -Cre sono stati prelevati a sei o venti settimane dopo il trasferimento genico idrodinamico. (B) Analisi Western blot che dimostra la diminuzione dei livelli delle proteine AKT ed ERK fosforilate/attivate nei fegati iniettati con p-T3-EF1 α -Cre nei topi *Raptor fl/fl*. (C) Curva di sopravvivenza dei topi *Raptor fl/fl* iniettati con i plasmidi AKT/Ras/pT3 o p-T3-EF1 α -Cre. Peso del fegato dei topi *Raptor fl/fl* iniettati con i plasmidi AKT/Ras/pT3 o p-T3-EF1 α -Cre.

3.2. Il blocco della via di trasduzione del segnale di RPS6 attraverso la Rapamicina inibisce l'epatocancerogenesi indotta dai protooncogeni AKT e Ras

Successivamente, abbiamo indagato il contributo dell'asse di RPS6 e 4E-BP1/eIF4E sull'epatocancerogenesi indotta da AKT e Ras. Per questo scopo abbiamo sottoposto i topi FVB/N wild-type iniettati con gli oncogeni AKT e Ras al trattamento con Rapamicina (AKT/Ras/Rapa) o con il veicolo (AKT/Ras/Veh) giornalmente per 7 settimane, iniziando il trattamento appena dopo l'iniezione idrodinamica (Figura 10). I risultati ottenuti indicano che il trattamento continuo con Rapamicina impedisce efficacemente la progressione dell'epatocancerogenesi indotta da AKT e Ras. Dopo 7 settimane di trattamento, infatti, nessuno dei topi AKT/Ras/Rapa ha sviluppato tumori epatici palpabili mentre tutti i topi AKT/Ras/Veh hanno sviluppato grossi tumori epatici letali (Figura 10). Istologicamente, le lesioni epatiche dei topi AKT/Ras/Rapa consistevano solamente in piccoli cluster di cellule preneoplastiche ricche di lipidi. Al contrario, le lesioni epatiche dei topi AKT/Ras/Veh erano, in maniera predominante, HCC con una piccola presenza di colangiocarcinomi intraepatici (Figura 10). Il peso del fegato dei topi AKT/Ras/Rapa era solo un quinto del peso del fegato dei topi AKT/Ras/Veh (Figura 10). Successive analisi di western blot hanno confermato che la Rapamicina inibisce p-RPS6 ma non p-4E-BP1 nei tessuti epatici iniettati con AKT/Ras (Figura 11). A causa dello stress imposto ai topi quotidianamente con l'iniezione intraperitoneale, non abbiamo potuto continuare il trattamento oltre le 7 settimane, per cui non è chiaro se il tumore epatico potrebbe eventualmente svilupparsi tardivamente nel gruppo di topi trattati con Rapamicina.

Tuttavia, i nostri risultati dimostrano chiaramente che RPS6 è un importante effettore a valle di mTORC1, ed è richiesta la sua attivazione nell'epatocancerogenesi AKT/Ras indotta.

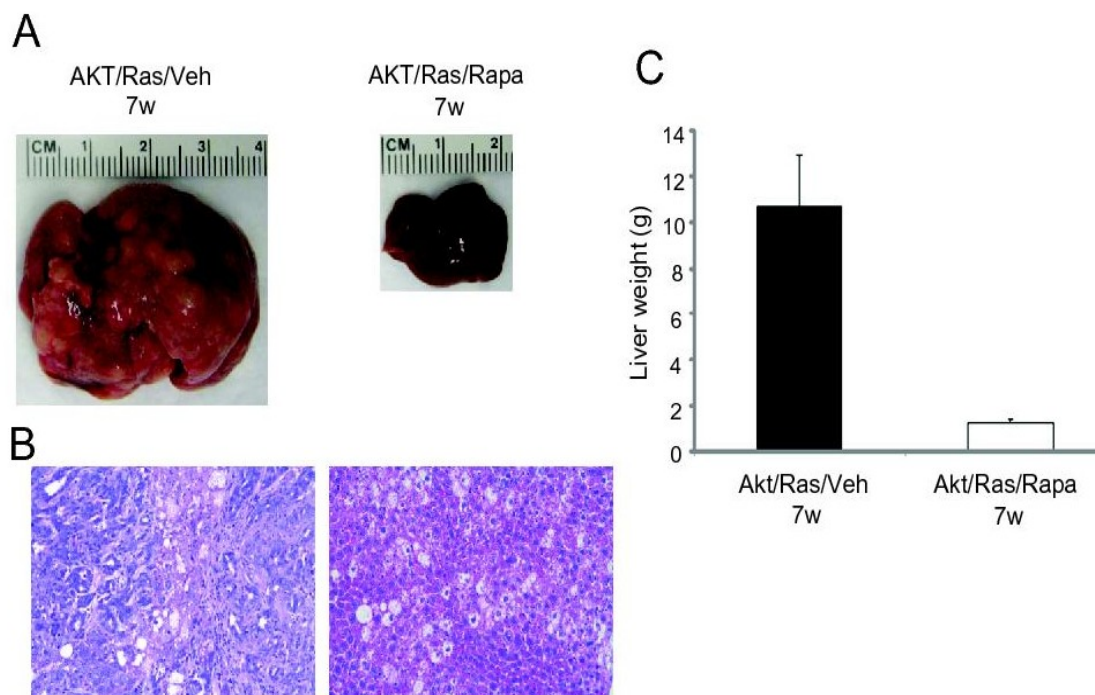


Figura 10. La somministrazione di Rapamicina inibisce lo sviluppo di tumori epatici nei topi AKT/Ras. Aspetto macroscopico (A) ed istologico (B) dei fegati di topi AKT/Ras trattati con veicolo (AKT/Ras/Veh; pannelli a sinistra) o Rapamicina (AKT/Ras/Rapa; pannelli a destra). (C) Peso del fegato dei topi AKT/Ras trattati con veicolo (AKT/Ras/Veh) o Rapamicina (AKT/Ras/Rapa).

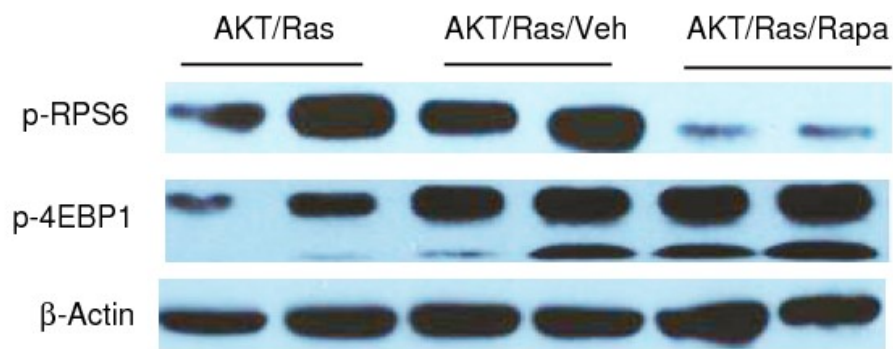


Figura 11. Analisi western blot dei livelli dei due effettori a valle di mTORC1, RPS6 e 4E-BP1 nei topi AKT/Ras non trattati (AKT/Ras), trattati con il veicolo (AKT/Ras/Veh) o trattati con Rapamicina (AKT/Ras/Rapa).

3.3. L'inibizione dell'asse 4E-BP1/eIF4E ad opera di 4E-BP1A4 ritarda lo sviluppo e la progressione del tumore epatico indotto dai protooncogeni AKT e Ras

Per studiare il contributo dell'asse di 4E-BP1/eIF4E sulla cancerogenesi epatica indotta da AKT e Ras, abbiamo iniettato nel fegato di topi FVB/N wild-type i seguenti plasmidi: pT3-EF1 (vettore vuoto, controllo), 4E-BP1 wild-type (4E-BP1WT), o 4E-BP1A4 (un mutante non fosforilabile di 4E-BP1), insieme con AKT e Ras. Studi precedenti mostrano che 4E-BP1A4, ma non 4E-BP1WT, è capace di bloccare l'inizio della trascrizione CAP dipendente mediata da eIF4E a valle di mTORC1⁽¹¹⁷⁾. Abbiamo riscontrato che sette settimane dopo l'iniezione idrodinamica nessuno dei topi AKT/Ras/4E-BP1A4 aveva sviluppato alcuna massa palpabile al fegato, mentre tutti i topi iniettati con AKT/Ras/pT3 e AKT/Ras/4E-BP1WT sviluppavano voluminosi tumori epatici letali. Sono stati infatti riscontrati solo pochi piccoli noduli nei fegati dei topi AKT/Ras/4E-BP1A4, mentre nei topi AKT/Ras/pT3 o AKT/Ras/4E-BP1WT, a sette settimane dall'iniezione intraperitoneale, si sviluppavano noduli grandi e numerosi (Figura 12).

Successivamente, abbiamo mantenuto in vita i topi AKT/Ras/4E-BP1 per determinare se in questi topi potessero eventualmente svilupparsi dei tumori epatici. I risultati ottenuti indicano che i topi AKT/Ras/4E-BP1A4 sviluppavano masse epatiche palpabili circa 21 settimane dopo l'iniezione. Istologicamente, i noduli nei fegati dei topi AKT/Ras/4E-BP1A4 a sette settimane dall'iniezione consistevano di lesioni preneoplastiche, mentre piccoli adenomi epatocellulari erano presenti 21 settimane dopo il trasferimento genico idrodinamico.

Per contro, i noduli tumorali nei fegati dei topi AKT/Ras/pT3 o dei topi AKT/Ras/4E-BP1WT consistevano di voluminosi HCC e ICC (colangiocarcinomi intraepatici) (Figura 12).

In sintesi, i nostri esperimenti indicano che l'inizio della trascrizione CAP dipendente mediata da 4E-BP1/eIF4E ha un ruolo critico nello sviluppo e nella progressione del tumore epatico indotto da AKT e Ras. L'inibizione di 4E-BP1/eIF4E ritarda l'epatocancerogenesi nei topi AKT/Ras, anche se è incapace di prevenire completamente lo sviluppo di lesioni epatiche.

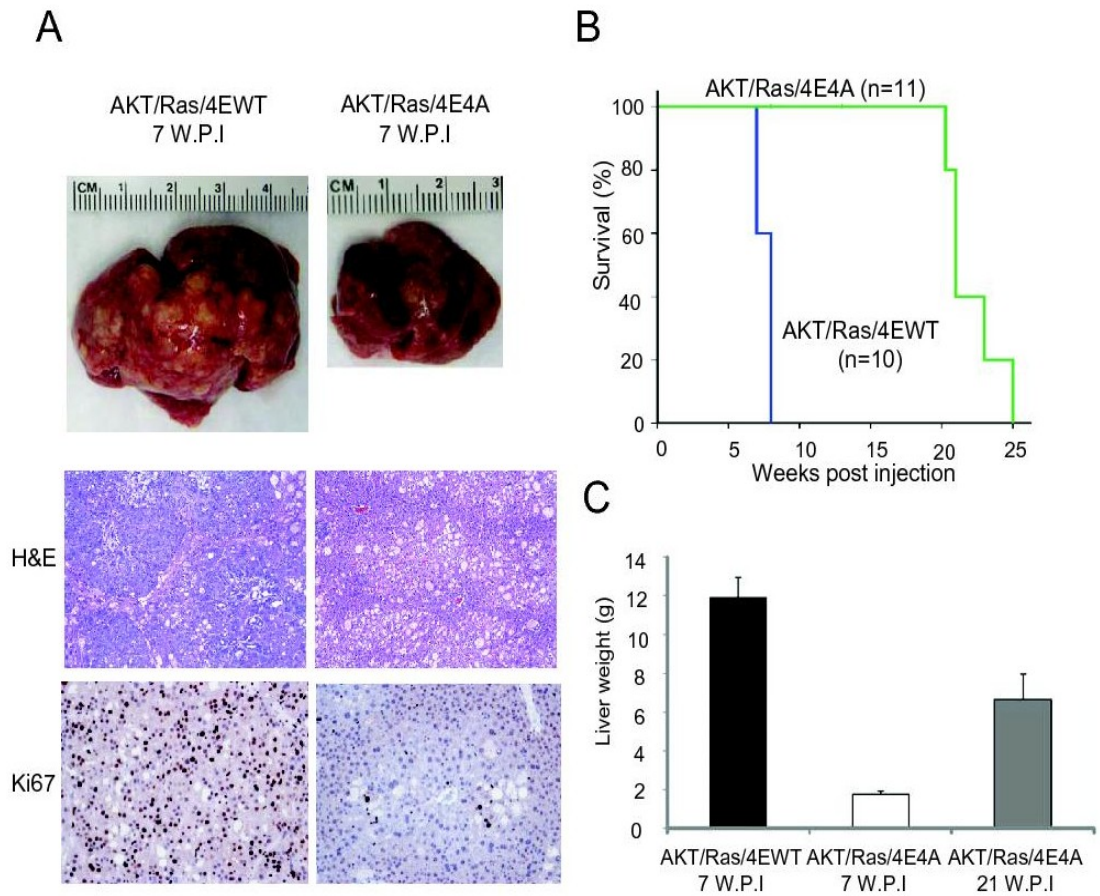


Figura 12. Il trasferimento idrodinamico di 4E-BP1A4 ritarda notevolmente lo sviluppo di tumori epatici nei topi AKT/Ras. Aspetto macroscopico (pannelli superiori) ed istologico (pannelli inferiori) dei fegati di topi AKT/Ras iniettati con 4E-BP1 wild-type (AKT/Ras/WT) o con 4E-BP1A4 (AKT/Ras/4E4A). Da notare che le lesioni dei topi AKT/Ras/WT mostrano un elevato tasso di proliferazione (come indicato dalla positività al marcatore Ki67), mentre solo poche cellule sono positive per lo stesso marcatore nelle lesioni dei topi AKT/Ras/4E4A. (B) Curva di sopravvivenza dei topi AKT/Ras/WT e AKT/Ras/4E4A. (C) Peso del fegato dei topi AKT/Ras/WT e AKT/Ras/4E4A.

3.4. Il trattamento combinato con Rapamicina ed iperespressione di 4E-BP1A4 inibisce completamente l'epatocancerogenesi indotta da AKT e Ras

I risultati ottenuti dimostrano che mTORC1 è strettamente necessario per l'epatocancerogenesi indotta da AKT e Ras indotta. Tuttavia, lesioni preneoplastiche erano osservabili in seguito ad inibizione di RPS6 con la Rapamicina, o inibizione di 4E-BP1/eIF4E attraverso trasferimento idrodinamico del gene 4E-BP1A4. Abbiamo pertanto indagato se la concomitante inibizione di RPS6 e di 4E-BP1/eIF4E fosse in grado di inibire completamente la cancerogenesi epatica indotta dai protooncogeni AKT e Ras. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo dunque co-iniettato i topi con AKT, Ras e 4E-BP1A4, e li abbiamo sottoposti a trattamento con Rapamicina (AKT/Ras/4E-BP1A4/Rapa) o con il veicolo (AKT/Ras/4E-BP1A4/Veh) per sette settimane. I topi AKT/Ras/4E-BP1A4/Rapa, all'esame macroscopico, non presentavano alcun nodulo tumorale. L'esame istologico ha rivelato che i tessuti di fegato dei topi AKT/Ras/4E-BP1A4/Rapa erano pressoché normali (Figura 13). Il fenotipo era molto simile a quello dei topi *Raptor^{fl/fl}* iniettati con AKT/Ras/Cre. Dal punto di vista molecolare, i topi AKT/Ras/4E-BP1A4/Rapa hanno mostrato una marcata riduzione dei livelli proteici di AKT fosforilato, RPS6 fosforilato e 4E-BP1 fosforilato (Figura 14).

Questi risultati indicano che entrambi gli effettori a valle di mTORC1, RPS6 e 4E-BP1/eIF4E, giocano un ruolo cardine nello sviluppo del tumore epatico indotto da AKT e Ras. Una completa inibizione di mTORC1 è necessaria per inibire l'epatocancerogenesi in questo modello di tumore epatico.

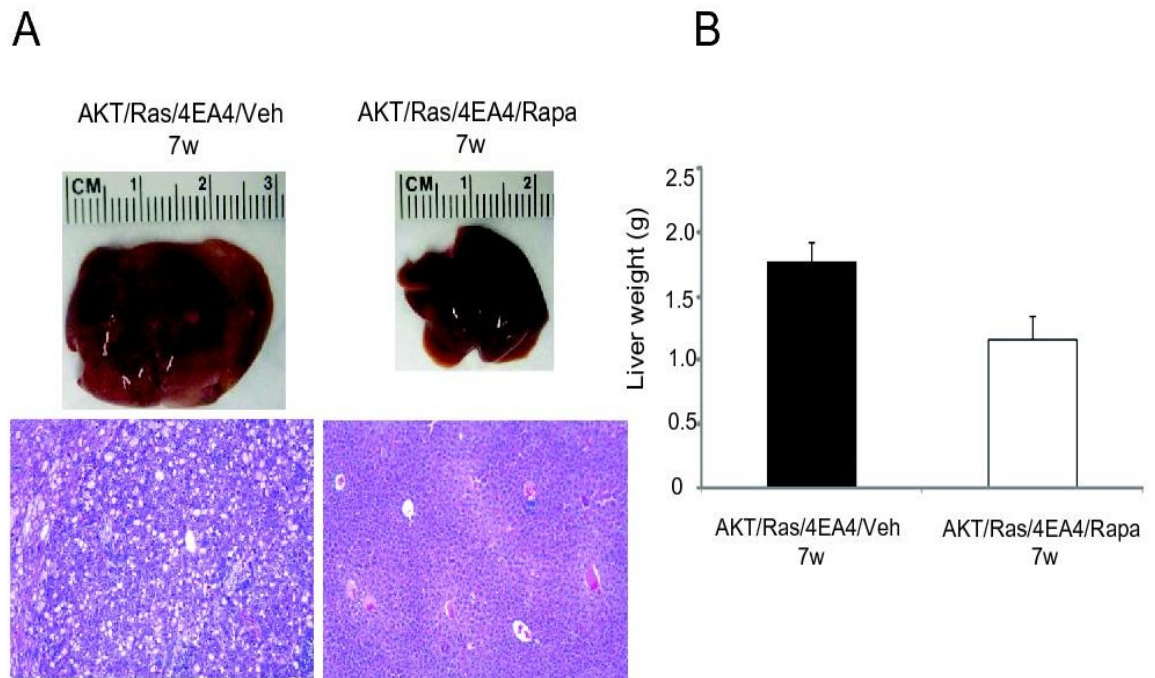


Figura 13. Il trasferimento idrodinamico della forma non fosforilabile da parte di mTORC1 della proteina 4E-BP1 (4E-BP1A4) combinato al trattamento con Rapamicina inibisce completamente l'epatocancerogenesi nei topi AKT/Ras. Aspetto macroscopico (pannelli superiori) ed istologico (pannelli inferiori) dei fegati di topi AKT/Ras iniettati con 4E-BP1A4 trattati con il veicolo (AKT/Ras/4E4A/Veh) o con la Rapamicina (AKT/Ras/4E4A/Rapa). (B) Curva di sopravvivenza dei topi AKT/Ras/4E4A/Veh e AKT/Ras/4E4A/Rapa.

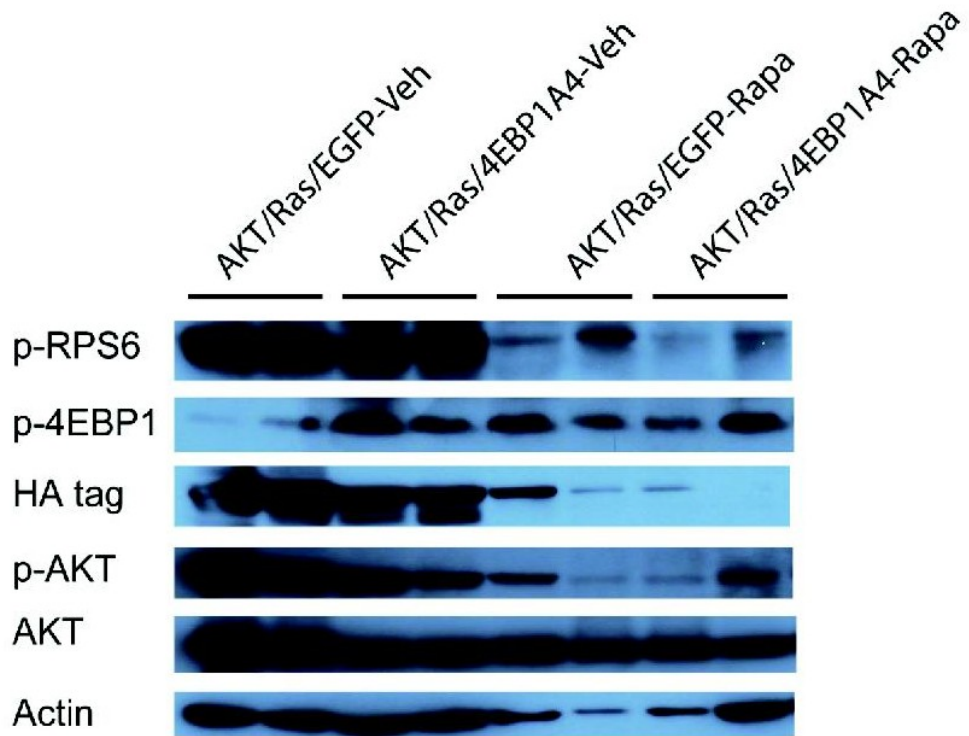


Figura 14. Analisi Western blot dei fegati dei topi controllo (AKT/Ras/EGFP-Veh), iniettati con 4E-BP1 e trattati con veicolo (AKT/Ras/4E-BP1A4/Veh), trattati con Rapamicina (AKT/Ras/EGFP-Rapa), oppure iniettati con 4E-BP1 e trattati con Rapamicina (AKT/Ras/4E-BP1A4/Rapa).

4. Discussione

La traduzione dell'mRNA è un fondamentale processo biologico che regola la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. L'inizio della traduzione è mediata da un processo multiproteico chiamato eukaryotic translation initiation factors (eIFs). Il complesso eIF4 consiste di una proteina CAP-binding eIF4E, una proteina adattatrice eIF4G, una RNA elicasi eIF4A e il suo cofattore eIF4B. La formazione del complesso eIF4 è regolata da numerose vie di trasduzione del segnale. Per esempio, 4E-BPs sono proteine che legano eIF4E bloccando l'interazione di eIF4E con eIF4G. La fosforilazione di 4E-BPs tramite mTORC1 rilascia eIF4E da questa inibizione, consentendo quindi un efficiente inizio della traduzione. eIF4E è inoltre regolato dalle chinasi MNK1/2 a valle della via di trasduzione del segnale Ras/MAPK. Alterazioni nella regolazione della traduzione dell'mRNA e l'iperpressione di eIF4E sono note essere implicate in numerose condizioni patologiche, incluso il cancro. In particolare, eIF4E è altamente espresso in una varietà di tumori umani,^(133,134) e gioca un ruolo importante per l'insorgenza, l'invasione e le capacità metastatiche di una serie di neoplasie, quali i carcinomi della testa e del collo a cellule squamose⁽¹³⁵⁾, il carcinoma polmonare non a piccole cellule, il cancro della laringe^(136,137,138), della mammella^(139,140,141,142,143,144), della tiroide, dell'esofago, dello stomaco, del colon⁽¹⁴⁵⁾, il linfoma non-Hodgkin^(147,148) e la leucemia mieloide acuta e cronica⁽¹⁴⁶⁾. È interessante notare che, sebbene eIF4E regoli la traduzione a livello globale, questo protooncogene promuova la cancerogenesi tramite la regolazione di un piccolo set di proteine che hanno un ruolo chiave nella proliferazione, la sopravvivenza ed il metabolismo cellulare, quali le cicline (ciclina D1, ciclina B1 e ciclina E), VEGF-alfa, ODC e c-

Myc⁽¹⁴⁹⁾.

Il ruolo funzionale della sregolazione della traduzione nella patogenesi dell'HCC rimane tuttora poco definita. Un recente studio ha mostrato un aumento dell'espressione di eIF4E in campioni di HCC e questo aumento dell'espressione di eIF4E era associato con una prognosi peggiore ed un aumentato rischio di recidiva tumorale⁽¹³²⁾. Il nostro studio è stato il primo ad analizzare il ruolo critico dell'asse 4E-BP1/eIF4E nel contesto dell'attivazione delle cascate del segnale AKT/mTOR e Ras/MAPK nella patogenesi dell'HCC. Attraverso gli esperimenti condotti nella presente ricerca, abbiamo dimostrato che bloccando l'attività di eIF4E attraverso una forma mutante non fosforilata di 4E-BP1 (4E-BP1A4) si ha un ritardo significativo dello sviluppo e della progressione del tumore epatico indotto dall'iperespressione dei protooncogeni AKT e Ras. I nostri dati indicano, infatti, che l'inibizione di eIF4E attraverso il trasferimento genico idrodinamico di 4E-BP1A4 determina un notevole ritardo nello sviluppo di tumori nei topi AKT/Ras. Inoltre le lesioni sviluppate in tali topi raggiungono un basso grado di malignità. In accordo con questi risultati, i nostri recenti studi hanno mostrato che l'iperespressione di eIF4E coopera con N-Ras per indurre lo sviluppo di HCC nel topo (dati non pubblicati). I presenti risultati indicano inoltre che nonostante la forte attività di soppressione tumorale, l'iperespressione di 4E-BP1A4 da sola non è capace di inibire completamente lo sviluppo del tumore epatico nei topi AKT/Ras. Quest'ultima osservazione suggerisce che lo sviluppo del tumore epatico indotto dai protooncogeni AKT e Ras sarebbe in grado di aggirare la mancanza di regolazione della traduzione CAP-dipendente mediata da eIF4E. Il preciso meccanismo alla base di questa osservazione è tuttora sconosciuto e richiede pertanto ulteriori analisi.

I presenti risultati sottolineano inoltre il ruolo chiave della cascata a valle della proteina RPS6 nel trasdurre gli stimoli di crescita indotti nel fegato dall'iperpressione combinata di AKT e Ras. In particolare, l'osservazione che l'inibizione combinata della proteina RPS6 e dell'asse 4E-BP1/eIF4E è in grado di inibire completamente l'epatocancerogenesi indotta da AKT e Ras indica che entrambe la cascate del segnale (4E-BP1/eIF4E e RPS6) hanno un ruolo critico nell'epatocancerogenesi di questo modello murino. Questi dati hanno indubbiamente delle importanti implicazioni cliniche. Sebbene ulteriori evidenze sperimentali siano necessarie, le presenti osservazioni indicano che nei tumori umani (non limitati agli HCC) caratterizzati da una marcata attività di mTORC1, la soppressione di entrambe le sue branche principali, ossia eIF4E e RPS6, deve essere perseguita per ottenere un potente effetto anti-neoplastico.

Il presente studio, infine, supporta ulteriormente l'importanza della metodica del trasferimento genico idrodinamico come utile sistema per lo studio della patogenesi molecolare del tumore epatico e per lo sviluppo di terapie innovative contro questa patologia così aggressiva e letale.

Bibliografia

1. Hertl M, Cosimi AB. Liver transplantation for malignancy *Oncologist* 2005;10:269-281.
2. Anthony P. in *Pathology of the Liver* (eds MacSween R, Burt A, Portmann B, Ishak K, Scheuer P, Anthony P.) 2002;711-775
3. Okuda K. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32:225-237.
4. Wands JR. Prevention of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2004;351:1567-1570.
5. Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms *African Health Sciences*; 2010;10:93-98.
6. Sherman M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2010;781:7-10.
7. Kudo M. Management of hepatocellular carcinoma: from prevention to molecular targeted therapy. *Oncology* 2010;781:1-6.
8. Sherman M. Epatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening. *Semin Liver Dis* 2005;25(2):143-154.
9. Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* 2000;76:4-11.
10. Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma *World J Gastroenterol* 2010;16:3603-3615.
11. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004;11:97-107.
12. Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005;436:930-932.
13. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005;436:946-952.
14. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, Albertini A, Fasola M, Boffetta P, Nardi G. 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. *Brescia HCC Study. Int J Cancer* 1999;81:695-699.
15. Wands JR, Moradpour D. The molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 1994;1(1):17-31.

16. Kolke K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;10:S132-135.
17. Zucman-Rossi J. Human and mouse hepatocellular adenoma and carcinoma display similar tumorigenesis pathway alterations. *J Hepatol* 2008;48:884-886.
18. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 2005;54:1162–1168.
19. Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117.
20. Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:2593–2604.
21. Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, Jay G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nature Genet* 1995;9:41–47.
22. Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Kumar V, Sarkar DP. An internal segment (residues 58–119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett* 2001;504:59–64.
23. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 1991;351:317–320.
24. Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H, Han YM, Lee CS, Park JS, Lee CH, Hyun BH, Murakami S, Lee KK. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999;31:123–132.
25. Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003;22:5093–5107.
26. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4398–4402.
27. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Rev Immunol* 2005;5:215–229.

28. Kojima T. Immune electron microscopic study of hepatitis B virus associated antigens in hepatocytes. *Gastroenterol Jpn* 1982;17:559–575.
29. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994;54:3171–3172.
30. Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2- mediated mechanism. *Hepatology* 2005;41:1074–1084.
31. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006;130:1153–1168.
32. Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, Dehne K, Coussens LM, Hanahan D. Immune enhancement of skin cancerogenesis by CD4+ T cells. *J Exp Med* 2003;197:1017–1028.
33. Pachiadakis I, Pollara G, Chain BM, Naoumov NV. Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? *Lancet Infect Dis* 2005;5:296–304.
34. Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2986–2991.
35. Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/ 4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2992–2997.
36. Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002;37:883–887.
37. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Saksela K, Harris M. The hepatitis C virus nonstructural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem* 2003;278:17775–17784.
38. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 2001;75:1401–1407.

39. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002;27:53–61.
40. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002;27:63–68.
41. Osna NA, Clemens DL, Donohue TM. Ethanol metabolism alters interferon- γ signaling in recombinant HepG2 cells. *Hepatology* 2005;42:1109–1117.
42. Marrogi AJ, Khan MA, van Gijssel HE, Welsh JA, Rahim H, Demetris AJ, Kowdley KV, Hussain SP, Nair J, Bartsch H, Okby N, Poirier MC, Ishak KG, Harris CC. Oxidative stress and p53 mutations in the cancerogenesis of iron overload-associated hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1652–1655.
43. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:2417–2426.
44. Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, Cerutti P. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 1994;264:1317–1319.
45. Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991;338:1356–1359.
46. Riley J, Mandel HG, Sinha S, Judah DJ, Neal GE. In vitro activation of the human Harvey-ras protooncogene by aflatoxin B1. *Cancerogenesis* 1997;18:905–910.
47. Ballardini G, Groff P, Zoli M, Bianchi G, Giostra F, Francesconi R, Lenzi M, Zauli D, Cassani F, Bianchi F. Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation. *J Hepatol* 1994;2:218–222.
48. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1263–1284.

49. Stieglitz B, Bee C, Schwarz D, Yildiz O, Moshnikova A, Khokhlatchev A, Herrmann C. Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II. *EMBO J* 2008;27:1995-2005.
50. Guachalla LM, Rudolph KL. The GAPs between hepatocellular carcinoma and RAS. *J Hepatol* 2011;54:191-192.
51. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;44:424-430.
52. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:103-119.
53. Ho C, Wang C, Mattu S, Destefanis G, Ladu S, Delogu S, Armbruster J, Fan L, Lee SA, Jiang L, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Calvisi DF. AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-Ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-Myc pathways. *Hepatology* 2012;55:833-845.
54. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48:1312-1327.
55. Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011;2:344-358.
56. Lee SA, Ho C, Roy R, Kosinski C, Patil MA, Tward AD, Fridlyand J, Chen X. Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer. *Hepatology* 2008;47:1200-1210.
57. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns M, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Luedde T, Longerich T, Kubicka S, Zender L. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 2011;479:547-551.
58. Huynh H. AZD6244 (ARRY-142886) enhances the antitumor activity of rapamycin in mouse models of human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2010;116:1315-1325.

59. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 2004;29:233-242.
60. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 2008;27:6473-6488.
61. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(9):1333-1349.
62. Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:256-261.
63. Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 2009;21:656-664.
64. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-484.
65. Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal* 2009;21:827-835.
66. Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1533-1540.
67. Breuleux M, Klopfenstein M, Stephan C, Doughty CA, Barys L, Maira SM, Kwiatkowski D, Lane HA. Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther* 2009;8:742-753.
68. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3065-3074.
69. Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 2004;91:1420-1424.
70. Chen YL, Law PY, Loh HH. Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005;5:575-589.

71. Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1003–1015.
72. Yeh YC, Tsai JF, Chuang LY, Yeh HW, Tsai JH, Florine DL, Tam JP. Elevation of transforming growth factor alpha and its relationship to the epidermal growth factor and alpha-fetoprotein levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1987;47:896–901.
73. Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, Changchien CS, Lee CM, Tai MH. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;97:1929–1940.
74. Feitelson MA, Pan J, Lian Z. Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy. *Surg Clin North Am* 2004;84:339–354.
75. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005;24:1477–1480.
76. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005;24:7410–7425.
77. Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3866–3884.
78. Roberts LR, Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 2005;25:212–225.
79. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2008;48:83–90.
80. Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther* 2007;15:2063–2069.
81. Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 2004;11:675–682.

82. Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K and Takakura Y. Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 2004;6:584–592.
83. Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Hirahara H, Iino N, Kameda S, Kawachi H, Yaoita E, Gejyo F, Miyazaki J. Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats. *Hum Gene Ther* 2002;13:455–468.
84. Tsoulfas G, Takahashi Y, Liu D, Yagnik G, Wu T, Murase N, Geller DA. Hydrodynamic plasmid DNA gene therapy model in liver transplantation. *J Surg Res* 2006;135:242–249.
85. Danialou G, Comtois AS, Matecki S, Nalbantoglu J, Karpati G, Gilbert R, Geoffroy P, Gilligan S, Tanguay JF, Petrof BJ. Optimization of regional intraarterial naked DNA-mediated transgene delivery to skeletal muscles in a large animal model. *Mol Ther* 2005;11:257–266.
86. Yoshino H, Hashizume K and Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 2006;13:1696–1702.
87. Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol* 1959;196:381–390.
88. Crespo A, Peydró A, Dasí F, Benet M, Calvete JJ, Revert F, Aliño SF. Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Ther* 2005;12:927–935.
89. Suda T, Gao X, Stolz DB, Liu D. Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Ther* 2007;14:129–137.
90. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999;6:1258–1266.
91. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999;10:1735–1737.
92. Khorsandi SE, Bachellier P, Weber JC, Greget M, Jaeck D, Zacharoulis D, Rountas C, Helmy S, Helmy A, Al-Waracky M, Salama H, Jiao L, Nicholls J, Davies AJ, Levicar N, Jensen S, Habib N. Minimally invasive and selective Hydrodynamic gene therapy of liver segments in the pig and human. *Cancer Gene Ther* 2008;15:225-230.

93. Budker VG, Budker T, Zhang G, Subbotin VM, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000;2:874–888.
94. Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, Whitehorne M, Zhang X, Fabre JW. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Curr Gene Ther* 2009;9:128-135.
95. Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, Destefanis G, Delogu S, Zimmermann A, Ericsson J Brozzetti S, Staniscia T, Chen X, Dombrowski F, Evert M. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1071-1083.
96. Xu CR, Lee S, Ho C, Bommi P, Huang SA, Cheung ST, Dimri GP, Chen X. Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 2009;7:1937–1945.
97. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208-1236.
98. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-5510.
99. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of cell biology* 2004;166:213-223.
100. Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Hérault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42-52.
101. Fujiwara Y, Hoon DS, Yamada T, Umeshita K, Gotoh M, Sakon M, Nishisho I, Monden M. PTEN/MMAC1 mutation and frequent loss of heterozygosity identified in chromosome 10q in a subset of hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:287-292.
102. Wang L, Wang WL, Zhang Y, Guo SP, Zhang J, Li QL. Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007;37:389-396.
103. Wang C, Cigliano A, Delogu S, Armbruster J, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Calvisi DF. Functional crosstalk between AKT/mTOR and Ras/MAPK pathways in hepatocarcinogenesis: implications for the treatment of human liver cancer. *Cell Cycle* 2013;12:1999-2010.

104. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
105. Bruix J, Sherman M. American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011;53:1020-1022.
106. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118-1127.
107. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390.
108. Villanueva A, Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2011;140:1410-1426.
109. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010;29:4989-5005.
110. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-1274.
111. 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.
112. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-293.
113. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Roayaie S, Minguez B, Sole M, Battiston C, Van Laarhoven S, Fiel MI, Di Feo A, Hoshida Y, Yea S, Toffanin S, Ramos A, Martignetti JA, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Schwartz M, Meyerson M, Friedman SL, Llovet JM. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1972-1983.e1-11.
114. Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 2010;468:1100-1104.
115. Menon S, Yecies JL, Zhang HH, Howell JJ, Nicholatos J, Harputlugil E, Bronson RT, Kwiatkowski DJ, Manning BD. Chronic activation of mTOR complex 1 is sufficient to cause hepatocellular carcinoma in mice. *Sci Signal* 2012;5:ra24.

116. Hung CM, Garcia-Haro L, Sparks CA, Guertin DA. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(12).
117. Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, Meyuhas O, Shokat KM, Ruggero D. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 2010;17:249-261.
118. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* 2010;328:1172-1176.
119. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, Solit DB, Rosen N. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell* 2010;18:39-51.
120. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 2012;441:1-21.
121. Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E, Grompe M, Kozma SC, Thomas G. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 2000;288:2045-2047.
122. Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, Natt F, Schwemberger S, Hall J, Babcock GF, Bernardi R, Pandolfi PP, Thomas G. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* 2009;11:501-508.
123. Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T, Cohen H, Stolovich-Rain M, Nir T, Dor Y, Zisman P, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 2005;19:2199-2211.
124. Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009;2:pe24.
125. Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest* 2011;121:1231-1241.
126. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:868-880.

127. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17414-17419.
128. Choo AY, Blenis J. Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle* 2009;8:567-572.
129. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM, Thorgeirsson SS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006;130:1117-1128.
130. Carlson CM, Frandsen JL, Kirchoff N, McIvor RS, Largaespada DA. Somatic integration of an oncogene-harboring Sleeping Beauty transposon models liver tumor development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17059-17064.
131. Frith CH, Ward JM, Turusov VS. Tumours of the liver. *IARC Sci Publ* 1994;111:223-269.
132. Wang XL, Cai HP, Ge JH, Su XF. Source Detection of eukaryotic translation initiation factor 4E and its clinical significance in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012;18:2540-2544.
133. Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, Petroulakis E, Robichaud N, Pollak M, Gaboury LA, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14134–14139.
134. Fan S, Ramalingam SS, Kauh J, Xu Z, Khuri FR, Sun SY. Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1463–1469.
135. Sunavala-Dossabhoj G, Palaniyandi S, Clark C, Nathan CO, Abreo FW, Caldito G. Analysis of eIF4E and 4EBP1 mRNAs in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2011;121:2136–2141.
136. Khoury T, Alrawi S, Ramnath N, Li Q, Grimm M, Black J, Tan D. Eukaryotic initiation factor-4E and cyclin D1 expression associated with patient survival in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2009;10:58–66.
137. Wang R, Geng J, Wang JH, Chu XY, Geng HC, Chen LB. Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and its clinical significance in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2009;66:237–244.
138. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, Hewitt SM, Fujii T, Cordon-Cardo C, Jen J, Travis WD. Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:240–248.

139. Holm N, Byrnes K, Johnson L, Abreo F, Sehon K, Alley J, Meschonat C, Md QC, Li BD. A prospective trial on initiation factor 4E (eIF4E) overexpression and cancer recurrence in node-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2008;15:3207–3215.
140. Wang GP, Liu C, Zhou M. Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer. *BMC Cancer* 2006;6:231.
141. Wolfort R, de Benedetti A, Nuthalapaty S, Yu H, Chu QD, Li BD. Up-regulation of TLK1B by eIF4E overexpression predicts cancer recurrence in irradiated patients with breast cancer. *Surgery* 2006;140:161–169.
142. Flowers A, Chu QD, Panu L, Meschonat C, Caldito G, Lowery-Nordberg M, Li BD. Eukaryotic initiation factor 4E overexpression in triple-negative breast cancer predicts a worse outcome. *Surgery* 2009;146:220–226.
143. Coleman LJ, Peter MB, Teall TJ, Brannan RA, Hanby AM, Honarpisheh H, Shaaban AM, Smith L, Speirs V, Verghese ET, McElwaine JN, Hughes TA. Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity. *Br J Cancer* 2009;100:1393–1399.
144. Hiller DJ, Chu Q, Meschonat C, Panu L, Burton G, Li BD. Predictive value of eIF4E reduction after neoadjuvant therapy in breast cancer. *J Surg Res* 2009;156:265–269.
145. Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, Savas L, London IM, Pullman J. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene* 1999;18:2507–2517.
146. Topisirovic I, Guzman ML, McConnell MJ, Licht JD, Culjkovic B, Neering SJ, Jordan CT, Borden KL. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:8992–9002.
147. Inamdar KV, Romaguera JE, Drakos E, Knoblock RJ, Garcia M, Leventaki V, Medeiros LJ, Rassidakis GZ. Expression of eukaryotic initiation factor 4E predicts clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma treated with hyper-CVAD and rituximab, alternating with rituximab, high-dose methotrexate, and cytarabine. *Cancer* 2009;115:4727–4736.

148. Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 2004;10:484–486.
149. De Benedetti A, Harris AL. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:59–72.