



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dottorato di Ricerca in:

Organismi Modello Nella Ricerca Biomedica

E Veterinaria

XXVII Ciclo

Tesi di Dottorato:

**“GENERAZIONE DI MODELLI MURINI
PER LO STUDIO DEI PROCESSI DI
TUMORIGENESI”**

Tutor: Ch.mo Prof.
Giuseppe Viglietto

Candidata:
Stefania Belmonte

Coordinatore: Ch.mo Prof.
Paolo De Girolamo

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

CAPITOLO 1: IL TUMORE AL POLMONE	1
1.1 Introduzione	1
1.2 Epidemiologia	1
1.3 Eziologia	4
1.4 Classificazione	6
1.5 Alterazioni genetiche e molecolari.....	8
1.6 Oncogeni, <i>Signaling</i>	8
1.6.1 KRAS	8
1.6.2 BRAF	9
1.6.3 PI3K/AKT/mTOR.....	9
1.7 Oncogeni, Recettori tirosin-chinasici (RTK).....	10
1.7.1 EGFR, HER2.....	10
1.7.2 MET	10
1.7.3 ALK.....	11
1.7.4 ROS1, RET, FGFR1, DDR2	11
1.8 Oncosoppressori.....	12
1.8.1 TP53	12
1.8.2 PTEN.....	12
1.8.3 LKB1 (STK11).....	12
1.8.4 p16 ^{INK4a} -ciclina D1-CDK4-RB pathway.....	13
CAPITOLO 2: I MODELLI MURINI NEL TUMORE AL POLMONE	14
2.1 Modelli murini per lo studio del cancro	14
2.2 L'evoluzione nell'utilizzo di modelli murini nel cancro polmonare	15
2.4 Modelli murini disponibili per i NSCLC	16
2.5 Modelli murini per i SCLC	20
CAPITOLO 3: PI3K_AKT_mTOR	20
3.1 <i>Signalling pathway</i>	20
3.2 AKT origine e caratteristiche strutturali	22
3.3 I substrati di PKB/AKT.....	24
Obiettivo	25

CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI	26
4.2 Mutagenesi sito specifica	26
4.2 Mini prep	26
4.3 Maxi prep	27
4.4 Digestione di DNA plasmidico con enzima di restrizione	27
4.5 Estrazione di DNA da gel di agarosio	28
4.6 Ligasi per DNA	28
4.7 Trasformazione di cellule batteriche elettrocompetenti	28
4.8 Southern blot	29
4.9 Estrazione di DNA da tessuto	31
4.10 Genotipizzazione Akt1 ^{E17K} e Ttf1-Cre	31
4.11 Estrazione di RNA da tessuto	33
4.12 Estrazione proteica da tessuto	34
4.13 Retrotrascrizione da RNA a cDNA	34
4.14 Real Time PCR	35
4.15 Western blot e anticorpi utilizzati	35
4.16 Fissazione e inclusione in paraffina di tessuti	37
4.17 Colorazione ematossilina-eosina	37
4.18 Staining immunoistochimica su sezioni paraffinate	38
4.19 PCR Screening di verifica dell'eliminazione della cassetta di stop	40
4.20 Infezione con Adenovirus	41
4.21 Trattamento con uretano	41
CAPITOLO 5: RISULTATI	41
5.1 Strategia di <i>gene targeting</i> per la generazione del modello murino <i>knock-in</i> R26- Akt1 ^{E17K}	41
5.2 Analisi di espressione di Akt1 ^{E17K} nelle cellule ES R26-Akt1 ^{E17K} ricombinanti	50
5.3 Analisi di espressione di Akt1 ^{E17K} nel modello murino R26-Akt1 ^{E17K}	52
5.4 Il mutante Akt1 ^{E17K/+} accelera lo sviluppo tumorale aumentando numerosità e dimensioni tumorali indotte da uretano	59
Discussione	61
BIBLIOGRAFIA	64

CAPITOLO 1

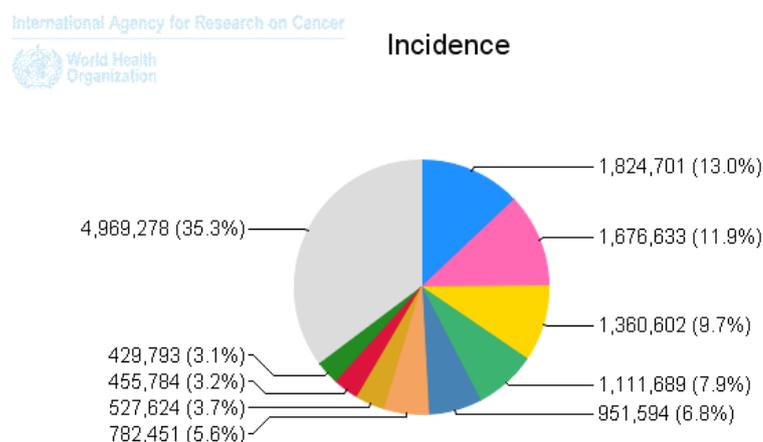
IL TUMORE AL POLMONE

1.1 Introduzione

Il cancro al polmone è la principale causa di morte per cancro sia negli uomini che nelle donne, con più di un milione di decessi all'anno [1]. Nel 1878 i tumori maligni del polmone rappresentavano solo l'1% di tutti i cancri visti al momento dell'autopsia nell'Istituto di Patologia dell'Università di Dresda. Nel 1918 la percentuale sale a quasi il 10% e dal 1927 siamo ad oltre il 14%, la maggior parte dei casi coinvolgeva il sesso maschile e sembrava esserci un costante aumento anche nelle donne. A partire dal 1930 comincia il sospetto di un legame tra fumo di sigaretta e tumore al polmone. Nel 1940 Müller pubblica un articolo in cui ritiene che: "lo straordinario aumento del consumo di tabacco è stata l'unica causa più importante della crescente incidenza di cancro al polmone". Nel 1950 dall'Inghilterra (Doll e Hill) e dagli Stati Uniti (Cuyler Hammond e Ernest Wynder) vengono fornite ulteriori prove dell'associazione tra il fumo e il cancro al polmone, eppure è passato molto tempo, prima che questa verità venisse accettata dai fumatori (tra cui medici). Solo nel 1964 l'opinione pubblica riconosce il fumo come la principale causa [2].

1.2 Epidemiologia

Il cancro al polmone rimane il cancro più comune nel mondo, sia in termini di nuovi casi (1.8 milioni di casi, 12,9 % del totale) che di morti (1.6 milioni di morti, 19,4%) [3].



Mortality

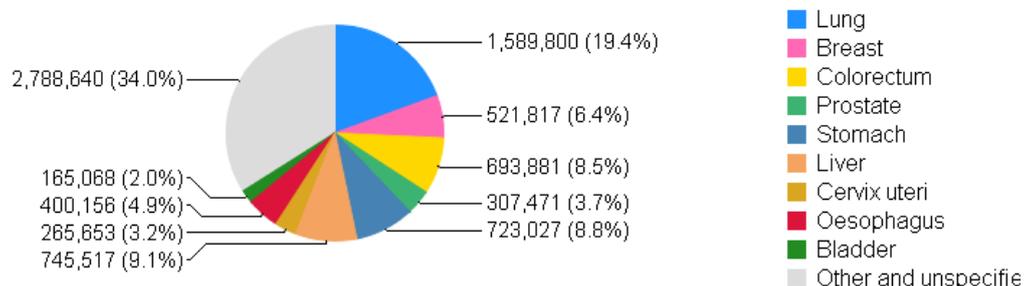


Figura 1. Distribuzione dei casi attesi e della mortalità nel tumore al polmone nel mondo nel 2012, prendendo in considerazione entrambi i sessi (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).

Dei nuovi casi stimati nel 2012, il 58% si verifica nei paesi meno sviluppati. Il tumore al polmone è il cancro più comune nel sesso maschile (1.2 milioni, 16,7% del totale), con i più alti rapporti nel centro-est dell'Europa e nell'estremo oriente. Nelle donne i rapporti di incidenza sono generalmente bassi e i pattern di distribuzione geografica sono diversi in relazione alla distribuzione e al consumo del tabacco: i più alti rapporti sono stimati nel nord America e nel nord Europa rispetto ai bassi rapporti nel centro-est dell'Africa. Il tasso relativamente alto riscontrato nei paesi dell'estremo oriente crea particolare interesse visto che il consumo del fumo di tabacco è, in genere, molto basso.

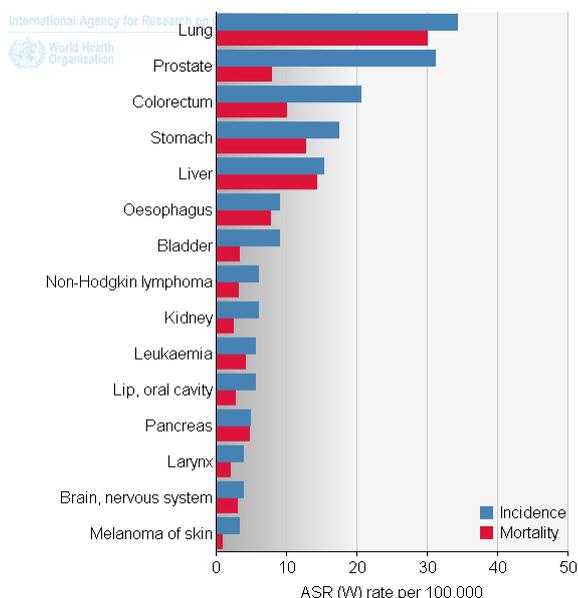


Figura 2a. Stima dei tassi di incidenza e mortalità nel mondo, standardizzati per età riguardanti il sesso maschile (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_pop)

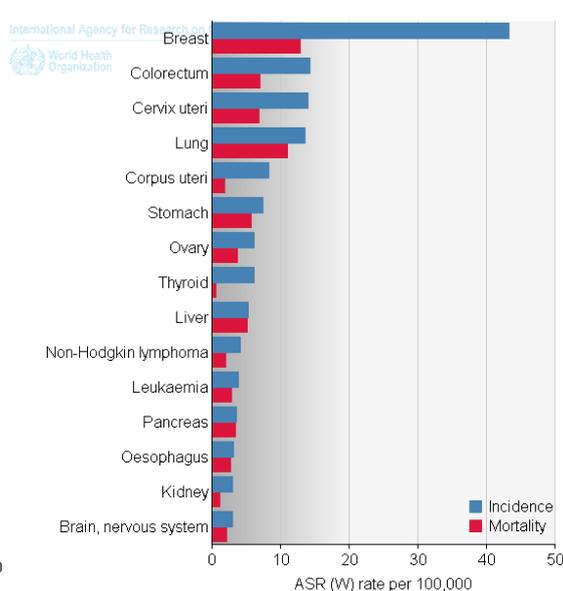


Figura 2b. Stima dei tassi di incidenza e mortalità nel mondo, standardizzati per età riguardanti il sesso femminile (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).

In Europa, il cancro al polmone, è stata la causa più frequente di morte per cancro nel 2012 con una stima di 353.000 morti in Europa (un quinto del totale) e continua ad essere la causa principale di morte per cancro nel sesso maschile, mentre nel sesso femminile si colloca al terzo posto, dopo il cancro alla mammella e al colon retto [4]. In particolare nel sesso maschile c'è un'elevata incidenza nel centro e nell'est dei paesi europei e una bassa incidenza nel nord Europa. Il contrario è stato visto nelle donne: elevati rapporti sono stati stimati nel nord Europa e bassi rapporti nell'est Europa. In Italia l'andamento incidenza/mortalità segue quello Europeo [5].

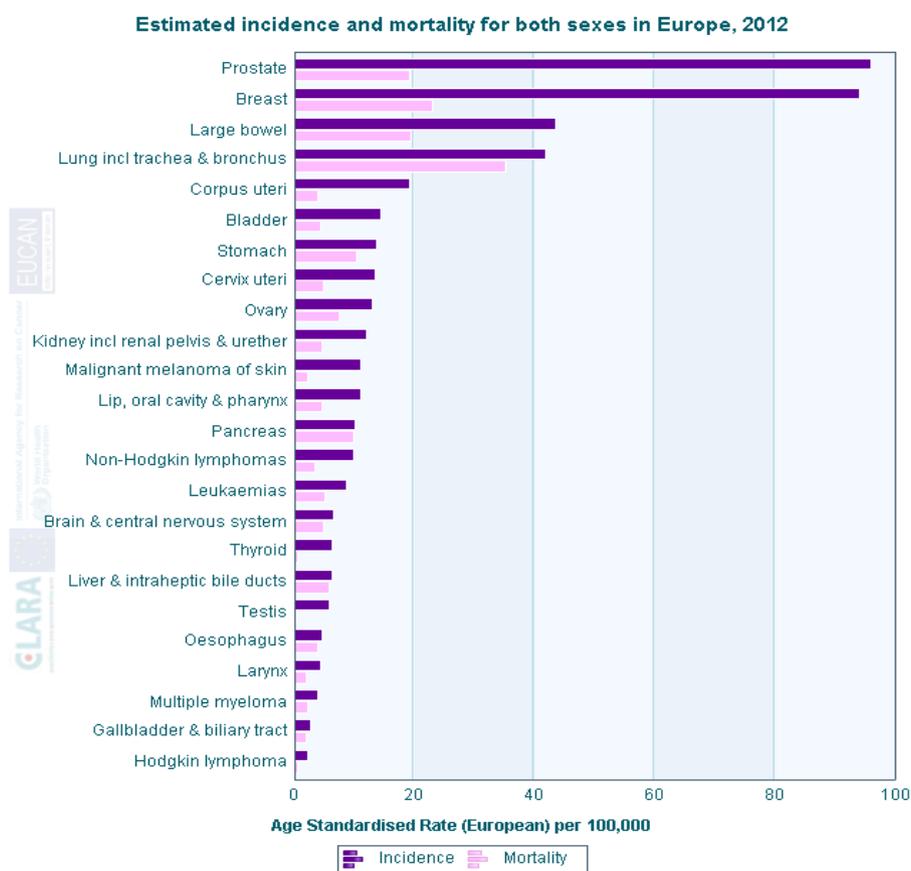


Figura 3. Stima dell'incidenza e della mortalità dei cancro più frequenti in Europa per entrambi i sessi nel 2012 (<http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=968>).

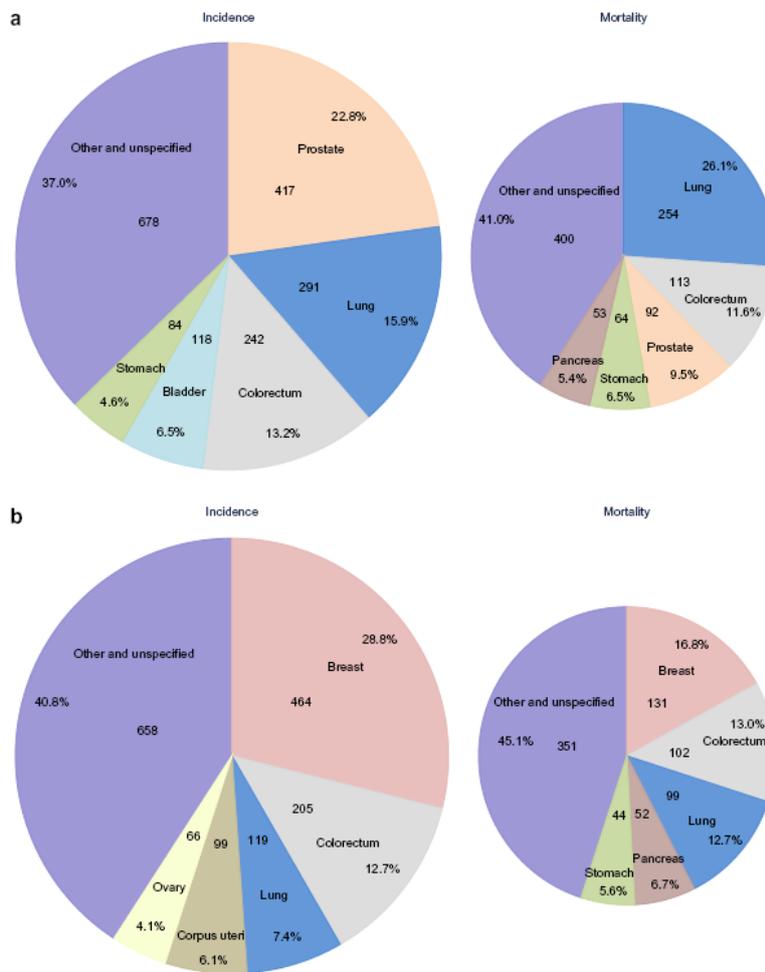


Figura 4. Distribuzione delle morti e dei casi aspettati per i cinque tumori più comuni in Europa nel 2012 nei maschi (a) e nelle femmine (b). Per ciascun sesso, l'area del segmento del grafico a torta riflette la proporzione del numero totale dei casi o dei decessi (J.Ferlay et al, EJM 2013).

1.3 Eziologia

Il fumo di sigaretta, derivato dalla combustione del tabacco, è il principale fattore di rischio per il cancro polmonare ed esiste una relazione diretta tra numero di sigarette fumate e rischio di contrarre cancro polmonare [6,7]. Il fumo di sigaretta contiene approssimativamente 4000 sostanze chimiche, delle quali circa 60 sono state identificate dall'*International Agency for Researchon Cancer* (IARC) come cancerogene, le più importanti sono gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) tra i quali abbiamo il benzo [a] pirene, i nitrati, le N-nitrosamine TSNA (specifiche del tabacco) e in particolare l'NNK o 4-(methylnitrosamino)-1-(13-pyridyl-1-butanone). Questi cancerogeni possono legarsi al DNA e formare degli addotti in un processo chiamato attivazione metabolica (DNA-cancerogeno, legati covalentemente). I meccanismi di riparo possono rimuovere gli addotti, oppure le cellule possono essere avviate all'apoptosi. Se i meccanismi di riparo non si avviano si genera una mutazione permanente. La suscettibilità allo sviluppo del cancro dipende dall'equilibrio tra attivazione metabolica e detossificazione dei potenziali cancerogeni nei fumatori.

Anche se non vi è nessuna causa predominante che può spiegare l'insorgenza di questa patologia nei non fumatori (ovvero che hanno fumato meno di 100 sigarette in tutta la loro vita), i fattori di rischio considerati importanti includono: il fumo passivo, l'esposizione a sostanze ambientali o strettamente correlate al lavoro (come l'arsenico, l'asbesto, berillio, cadmio, cromo, nichel, radon, idrocarburi policiclici aromatici); altri fattori come la presenza di una storia di malattia polmonare, il sesso e naturalmente fattori genetici.

La componente genetica è rappresentata dalla suscettibilità individuale allo sviluppo del cancro al polmone con o senza esposizione al fumo di sigaretta. Diversi studi dimostrano l'influenza di una storia familiare di cancro sul rischio di sviluppare il cancro al polmone nei non fumatori, ex-fumatori e fumatori; ci sono anche dei possibili geni di suscettibilità coinvolti nell'assorbimento, metabolismo e accumulo dei cancerogeni nel tessuto polmonare, tra i più studiati abbiamo i polimorfismi del citocromo P450 e della glutadione S-transferasi, e quelli dei geni coinvolti nel riparo del DNA.

Lo sviluppo della malattia è più comune nelle donne non fumatrici rispetto alla controparte maschile, probabilmente ciò è dovuto a una maggiore suscettibilità del sesso femminile verso i cancerogeni ambientali non legati al tabacco, o una maggiore esposizione al fumo passivo o a differenze legate al sesso nel metabolizzare questi cancerogeni ambientali.

La presenza di malattie polmonari già pre-esistenti, come la bronco pneumopatia cronica ostruttiva (causata prevalentemente dal fumo di sigaretta), la polmonite, l'asma e la fibrosi polmonare idiopatica o comunque la presenza di una malattia cronica infiammatoria del polmone conferisce un rischio leggermente più elevato di sviluppare il cancro al polmone.

Il legame fra fumo attivo e cancro al polmone ha spinto a studiare ampiamente l'associazione tra fumo passivo e sviluppo di tale cancro. Il fumo passivo rappresenta una miscela di fumo rilasciato da sigaretta, sigaro e pipa e il fumo espirato dal fumatore; nei non fumatori esposti a fumo passivo sono stati detectati metaboliti urinari dei cancerogeni specifici del tabacco, come l'NNK, fornendo una prova biologica del ruolo del fumo passivo nello sviluppo del cancro al polmone. È stato stimato che almeno il 17% dei tumori al polmone nei non fumatori sono dovuti ad alti livelli di esposizione al fumo passivo durante l'infanzia e l'adolescenza, infatti un incremento del rischio è stato riscontrato anche nei non fumatori che hanno vissuto con un fumatore. L'inquinamento

atmosferico è diventato un problema mondiale, vista la rapida globalizzazione e industrializzazione. Dal 1927 è stata suggerita una correlazione tra inquinamento ambientale e tumore al polmone, studi successivi hanno confermato la correlazione tra il rischio di sviluppo della malattia e gli elevati livelli di inquinamento ambientale da polveri sottili (particolare importanza assumono le particelle inferiori a 2,5 µm di diametro), il rischio è maggiore nei fumatori.

Tra i fattori di rischio dobbiamo considerare anche l'esposizione alle sostanze cancerogene utilizzate nei diversi settori lavorativi, come: l'arsenico, l'amianto, il berillio, il cadmio, gli eteri cloro metilici, cromo, nichel, radon, silice e cloruro di vinile; tra questi l'asbesto (o amianto) e il radon sono i più diffusi. [8-11]

1.4 Classificazione

I tumori del polmone possono essere schematicamente suddivisi in tre grandi categorie: i) tumori derivati dagli epitelii bronchiale ed alveolare che rappresentano oltre il 95% di tutte le neoplasie di questo organo, costituiti in massima parte da carcinomi, ii) tumori non epiteliali di derivazione mesenchimale, sia benigni che maligni, iii) tumori originati dal tessuto linfatico normalmente rappresentato nel polmone (malattie linfoproliferative).

Nell'ambito clinico il cancro al polmone è suddiviso in due grandi gruppi istologici:

- a. **NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer**, che comprende l'80% dei casi totali, distinto in varie sottoclassi istologiche: carcinoma a cellule squamose o carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule; gruppo appartenente alla classe dei carcinomi;
- b. **SCLC: Small Cell Lung Cancer** o microcitoma che include il 20% dei casi totali, classificato nei tumori neuroendocrini.

A loro volta, queste due categorie vengono suddivise su base meramente morfologica in diversi istotipi, nella classificazione più recente, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) 2004, ha identificato almeno 47 differenti tipi di carcinoma del polmone [12].

Per tutti i tipi di cancro la sopravvivenza a 5 anni è del 15% , lo stadio della malattia al momento della diagnosi è l'indicatore prognostico più importante [13]. Tutti i maggiori tipi istologici sono associati con il fumo, ma in particolar modo il microcitoma, il carcinoma squamoso. L'adenocarcinoma è l'istotipo più comune nei non fumatori [11].

Negli ultimi decenni la percentuale mondiale (33%) dei carcinomi squamosi si è ridotta, probabilmente per i cambiamenti nei confronti del fumo; di solito origina dall'epitelio bronchiale e si sviluppa come tumore centrale nei bronchi, primari, secondari o terziari.

Le caratteristiche morfologiche della futura differenziazione squamosa includono la presenza di ponti intercellulari, la cheratinizzazione in singole cellule e formazioni squamose a perla.

L'adenocarcinoma è il sottotipo istologico dominante, il più comune nei non fumatori e nelle donne; nella maggior parte dei casi ha origine periferica; istologicamente è caratterizzato dalla presenza di mucina e/o differenziazione ghiandolare, con un pattern di crescita acinare, papillare, bronchio-alveolare o solido con mucina oppure un mix di questi pattern.

La diagnosi del carcinoma a grandi cellule è di esclusione ossia in assenza di caratteristiche morfologiche dell'adenocarcinoma, del carcinoma squamoso e del microcitoma. Questi tumori tendono ad essere periferici, grandi, parzialmente necrotici, costituiti da nidi e fogli di cellule poligonali grandi con nuclei vescicolari e nucleoli prominenti.

Il microcitoma è un tumore maligno neuroendocrino, molto aggressivo. La maggioranza dei pazienti al momento della diagnosi presenta metastasi con una sopravvivenza a 5 anni del 5-8% dei pazienti. Mostra caratteristiche citologiche ben distinte: cellule con bordi non definiti, scarso citoplasma, cromatina nucleare granulare senza nucleoli evidenti, inoltre presenta un elevato rapporto mitotico (una media di 60 mitosi/2mm²) e vi è spesso una necrosi estesa. La classificazione WHO (*World Health Organization*) riconosce il microcitoma misto e combinato. Quest'ultimo è la forma istologica più classica e presenta una componente di ciascun sottotipo di NSCLC (molto spesso carcinoma squamoso o a grandi cellule) [14,15].

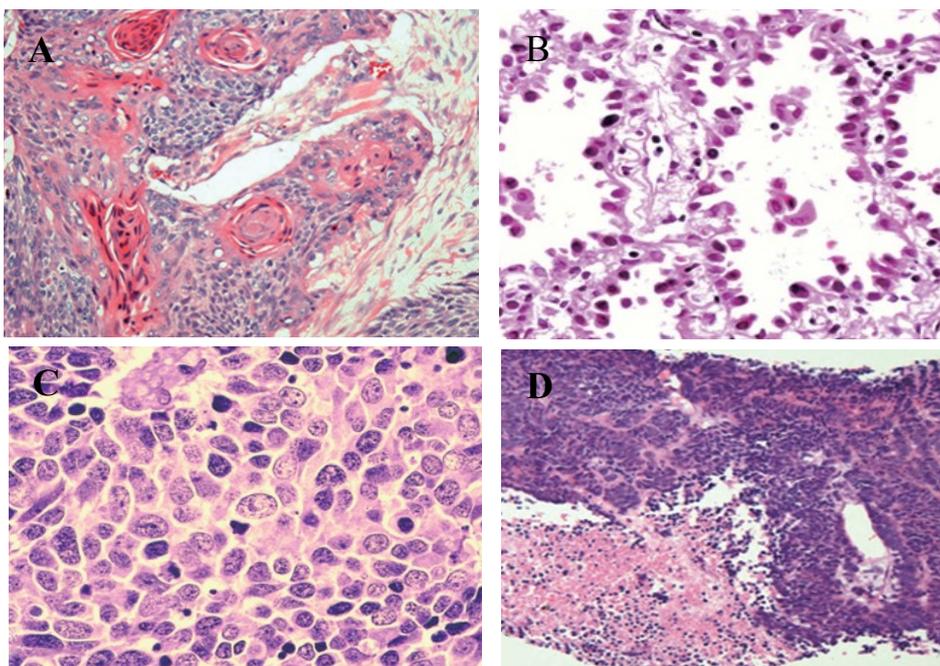


Figura 5. Colorazione ematossilina-eosina di un carcinoma squamoso (a), di un adenocarcinoma (b), di un carcinoma a grandi cellule (c) e di un microcitoma (d) (Morgan R. Davidson et al, J Thorac Dis 2013).

1.5 Alterazioni genetiche e molecolari

I cancro polmonari sono la conseguenza di un processo multistep di cancerogenesi, ossia cambiamenti genetici ed epigenetiche guidano le cellule cancerose a una progressione maligna. Questo processo parte dall'evoluzione clonale di cellule polmonari. L'iniziazione consiste nell'acquisizione di specifiche alterazioni genetiche progenitrici (riguardanti un piccolo numero di geni) che conferiscono un vantaggio proliferativo che facilita la progressione verso il carcinoma invasivo: delezioni, instabilità cromosomica e disequilibrio, mutazioni in oncogeni e oncosoppressori, silenziamento epigenetico di un gene attraverso ipermetilazione del promotore e espressione aberrante di geni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare. Molti cancerogeni presenti nel fumo di tabacco o inquinanti industriali possono agire come iniziatori per le cellule epiteliali bronchiolari-alveolari o dei bronchi. La frequenza delle alterazioni genetiche è diversa nei NSCLC e SCLC [15].

Di seguito vengono riportate le alterazioni più comuni e maggiormente rilevanti da un punto di vista clinico.

1.6 Oncogeni, *Signaling*

1.6.1 KRAS

HRAS, NRAS, KRAS fanno parte della stessa famiglia di GTPasi coinvolte nella trasduzione dei segnali di crescita e sopravvivenza correlativi agli RTK (Recettori Tirosin Chinasi) legati in membrana. KRAS codifica una proteina G coinvolta nella proliferazione cellulare, differenziazione e sopravvivenza. L'attivazione da RAS-GDP a RAS-GTP determina l'attivazione dei *pathway* a valle: RAS/RAF/MEK/MAPK e PI3K/AKT/mTOR. Mutazioni attivanti la GTPasi incrementano i *signalling* dei *pathway* a valle. Le mutazioni in H e NRAS sono molto rare. Mutazioni attivanti di KRAS ricorrono nel 25-40% degli adenocarcinomi, molto comuni nelle popolazioni dell'est rispetto a quelle Asiatiche, molto diffuse nei maschi e fumatori, rare o assenti nei SCLC e nell'istotipo squamoso. Negli adenocarcinomi non associati al fumo di sigaretta sono state riportate mutazioni nel 0-15% dei casi. Negli adenocarcinomi polmonari le mutazioni consistono di una singola sostituzione amminoacidica localizzata prevalentemente nel codone 12 e molto più rara nei codoni 13 e 61. Le mutazioni più comuni nei fumatori (~84%) sono trasversioni G-T, mentre nei non fumatori sono più comuni le transizioni G-A. Le forme attive dei carcinogeni NNK e

BPA del tabacco formano degli addotti con KRAS che interessano in particolare il codone 12, mutando le prime due basi del codone (normalmente GGT che codifica per una glicina) in cisteina (TGT) o valina (GTT) [1, 11, 16].

1.6.2 BRAF/MEK

BRAF è una *serin/treonin protein* chinasi, effettore a valle della proteina KRAS e attiva il *pathway* di trasduzione del segnale MAPK coinvolto nella regolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare. Mutazioni attivanti di BRAF si verificano nel 3% dei NSCLC. Nell'adenocarcinoma la variante nell'esone 15 V600E rappresenta più del 50% delle mutazioni riscontrate, seguita da G469A nell'esone 11 e D594G nell'esone 15. Alcune mutazioni nei NSCLC ricorrono nel dominio chinamico (come V600E, D594G, e L596R), mentre altre nel dominio di attivazione del loop-G del gene (come G465V e G468A). Le mutazioni non V600E sono tipiche degli ex-fumatori e dei fumatori, mentre la V600E è più comune nelle donne che non fumatrici [16].

MEK1 è una *serin treonin* chinasi, svolge la sua funzione come *target* a valle di KRAS, attraverso l'attivazione di ERK1 e ERK2 a valle di BRAF. Mutazioni somatiche di MEK1 sono state riportate in rari casi di NSCLC: circa l'1% di mutazioni attivanti (localizzate nell'esone 2, non coinvolge il dominio chinamico) sono state identificate negli adenocarcinomi [16,17].

1.6.3 PI3K/AKT/mTOR

Il *pathway* PI3K/AKT/mTOR è coinvolto nella trasduzione del segnale di processi biologici quali proliferazione e sopravvivenza cellulare, differenziazione, adesione e motilità. Le alterazioni a carico delle componenti di questa via di trasduzione si riscontrano sia nel NSCLC che nello SCLC. Il *pathway* è attivato attraverso l'attivazione dei recettori tirosin chinasi (TKR) di membrana come EGFR, Her2, IGFR, VEGFR e PDGFR. L'attivazione dei TKR recluta in membrana PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*) che fosforila i PIP2 (*Phosphatidyl Inositol 4,5-bis phosphate*) in PIP3 (*phosphatidyl inositol 3,4,5-tri phosphate*), questi ultimi a loro volta reclutano in membrana Akt che sarà fosforilata in maniera dipendente da PI3K e mTOR. Il *pathway* è deregolato nel 50-70% dei NSCLC e in particolare nel 47% dei carcinomi a cellule squamose. Mutazioni attivanti e amplificazioni di PI3K determinano l'attivazione costitutiva del *pathway* indipendenti dal ligando. La maggior parte delle mutazioni coinvolge il dominio catalitico e ricorre in circa l'1-3% dei NSCLC, più comune nell'istotipo squamoso (33,1%) che nell'adenocarcinoma (6,2%) o nelle linee di SCLC (4,7%). Le amplificazioni sono più comuni nell'istotipo squamoso e un aumento del

copy number di PI3K è stato riscontrato in linee cellulari di SCLC. Mutazioni in Akt sono state riportate nello 0,5-2% dei NSCLC in particolare nell'istotipo squamoso. Le mutazioni più frequenti colpiscono due residui (Glu 542 e Glu 545) dell'esone 9 facenti parte del dominio catalitico, mentre la regione cromosomica 3q (3q25-27) è prevalentemente amplificata, in particolare nell'istotipo squamoso [16,17].

1.7 Oncogeni, Recettori tirosin-chinasici (RTK)

1.7.1 EGFR, HER2

Il recettore del fattore di crescita epidermico comprende quattro membri: c-erbB-1 (EGFR, HER-1), c-erbB-2 (HER-2/neu), c-erbB-3, c-erbB-4 [1]. EGFR codifica una tirosin chinasi transmembrana con un dominio di legame per il ligando e un componente intracellulare con un dominio tirosino chinasi. EGFR è coinvolto nella regolazione di numerose funzioni oncogeniche: proliferazione cellulare, sopravvivenza, differenziazione, neovascolarizzazione, invasione e metastasi. Mutazioni che rendono EGFR può essere costitutivamente attivo e presentare un incremento del *copy number*. Le mutazioni cadono nel dominio tirosin chinasi intracellulare, in genere nell'esone 19 con delezioni *in frame* (~45%), ne esistono oltre 20 varianti, la più comune è la delE746-A750. Seguono le mutazioni missenso, in particolare la L858R, una singola mutazione puntiforme nell'esone 21 con sostituzione di una leucina con un'arginina (~40%). Le mutazioni meno comuni includono duplicazioni o inserzioni *in frame* nell'esone 20 (~5-10%). Quasi tutte le mutazioni ricorrono nell'adenocarcinoma, più comuni nelle donne giovani senza una storia di fumo; molto raramente nel carcinoma squamoso, mentre l'overespressione proteica e il *gain copy number* sono molto più comuni nell'istotipo squamoso [16].

Il recettore tirosin chinasi HER-2 può intervenire nell'attivazione di diverse chinasi che coinvolgono i *pathway* PI3K, MAPK, JAK/STAT. L'overespressione di Her-2 ricorre nel 20%, l'amplificazione genica nel 2% e mutazioni attivanti nel 1,6-4% dei NSCLC. Le più comuni mutazioni attivanti *in frame* sono quelle dell'esone 20. Le alterazioni di HER2 sono frequenti nell'adenocarcinoma e le mutazioni le ritroviamo in pazienti *wilde type* per EGFR e KRAS. Le mutazioni comprendono inserzioni/duplicazioni *in frame* nell'esone 20 (tra il codone 774 e 779) determinando l'attivazione costitutiva del recettore [16,17].

1.7.2 MET

MET, conosciuto anche come recettore per il fattore di crescita degli epatociti è una tirosin chinasi di membrana che dopo il legame con il suo ligando si attiva e si inserisce

nei *signalling* RAS/RAF/MEK/MAPK/PI3K/AKT e della chinasi c-SRC. MET è anche considerato un promotore della transizione epitelio mesenchimale tramite attivazione di SRC. Le amplificazioni del gene ricorrono nell'1-7% dei NSCLC ed è stato riportato nel 21% dei pazienti. L'aumento del *copy number* è più diffuso nell'istotipo squamoso che non nell'adenocarcinoma ed è mutualmente esclusivo con le mutazioni di KRAS. Le amplificazioni di MET inducono una overespressione della proteina recettoriale e attivazione dei *pathway* di trasduzione a valle [16,17].

1.7.3 ALK

La chinasi del linfoma anaplastico (ALK) è spesso coinvolta in disordini ematologici attraverso fusioni geniche. L'attivazione di ALK è correlata alla proliferazione cellulare e inibizione dell'apoptosi mediata dai *signalling pathway* RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT e jak3-STAT3. ALK normalmente non è espressa nel polmone, la fusione tra il suo dominio chinamico intracellulare con la regione ammino terminale di EML4 (*echinoderm microtubulo associated protein-like 4*) si verifica attraverso una piccola inversione nel cromosoma 2p, in tal modo, nella variante più comune, l'introne 13 di EML4 è fuso all'introne 19 di ALK. Le fusioni ALK-EML4 e le mutazioni in EGFR o KRAS si escludono a vicenda. I riarrangiamenti di ALK sono stati identificati in circa il 4% dei NSCLC, prevalentemente in adenocarcinomi di pazienti giovani e nei non fumatori [1,16].

1.7.4 ROS1, RET, FGFR1, DDR2

ROS1 è un recettore transmembrana, facente parte della famiglia dei recettori dell'insulina, con un'alta omologia con il dominio chinamico di ALK, una volta attivato agisce attraverso i *signalling pathway* PI3K/AKT/mTOR, STAT3, RAS/MAPK/ERK. Nell'1,7 % dei NSCLC ritroviamo riarrangiamenti di ROS1, con una maggiore tendenza in pazienti giovani, che non hanno mai fumato e affetti da adenocarcinoma [16,17].

RET codifica per un recettore coinvolto nello sviluppo della cresta neurale. L'attivazione di RET attraverso riarrangiamenti cromosomali è stata identificata in una piccola parte di NSCLC: le fusioni (sono state descritte di sette tipi diversi) KIF5B-RET ricorrono in ~2% degli adenocarcinomi polmonari di non fumatori e non coesistono con altre mutazioni *driver* che coinvolgono EGFR, KRAS o ALK [16,17].

FGFR1 recettore di membrana che regola la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione dei *pathway* PI3K e MAPK; amplificazioni di FGFR1 sono state riscontrate in ~20% dei carcinomi squamosi [16].

DDR2, recettore legato alla membrana che lega il collagene ed è coinvolto nella proliferazione cellulare e sopravvivenza. Da uno *screening* di sequenziamento del chimoma sono state identificate mutazioni nel 3,8% dei carcinomi squamosi [16].

1.8 Oncosoppressori

La perdita di funzione di un oncosoppressore è un importante meccanismo di carcinogenesi e richiede l'inattivazione di entrambi gli alleli del gene secondo l'ipotesi delle due *hit* di Knudson. In un allele l'inattivazione spesso avviene attraverso mutazioni, silenziamento epigenetico o altre aberrazioni mentre il secondo allele è spesso inattivato attraverso la perdita di eterozigosi (LOH: *Loss Of Eterozigosity*) attraverso cui la regione del cromosoma viene persa per eliminazione, traslocazione non reciproca o ricombinazione mitotica [16].

1.8.1 TP53

L'inattivazione di TP53 è una delle anomalie più frequenti nel tumore polmonare con la delezione in emizigosi del *locus* 17p13 del gene TP53 nel 90% dei SCLC e ~65% dei NSCLC. Mutazioni inattivanti (prevalentemente missenso nel dominio di legame al DNA) sono riportate nell'80-100% dei SCLC. Mutazioni del gene sono state trovate nell'81% dei carcinomi squamosi e nel 45% degli adenocarcinomi. Le mutazioni di TP53 sono associate al fumo o all'esposizione del fumo di tabacco e lo spettro delle mutazioni differiscono tra fumatori e non, con un'alta percentuale di trasversioni (G-T) e transizioni (G-A) rispettivamente. Mutazioni in TP53 possono verificarsi in concomitanza con EGFR e KRAS [16].

1.8.2 PTEN

L'inattivazione di PTEN porta all'attivazione non ristretta di Akt. L'oncosoppressore è mutato nel 5% dei NSCLC. In particolare nel 10,2 e 1,7% degli istotipi squamosi e degli adenocarcinomi; in questi ultimi le mutazioni sono associate al fumo. La riduzione dell'espressione proteica è stata riportata nel 75% dei NSCLC [16]. La perdita in eterozigosi di PTEN è stata riscontrata nel 91% dei SCLC [35] e in circa il 50% dei NSCLC [36] e in particolare nell'istotipo squamoso con formazioni metastatiche [37].

1.8.3 LKB1 (STK11)

Nel tumore polmonare LKB1 viene inibito attraverso mutazioni somatiche o delezioni che producono una proteina tronca con inattivazione di LKB1 nell'11-30% degli adenocarcinomi, ed è la terza aberrazione più comune negli adenocarcinomi dopo TP53 e KRAS, meno comune nei carcinomi squamosi. Esistono alcune evidenze della

correlazione tra mutazioni di LKB1 e una storia di fumo nel sesso maschile e con le mutazioni di KRAS [16].

1.8.4 p16^{INK4a}-ciclina D1-CDK4-RB pathway

Il pathway p16^{INK4a}/RB regola la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla S. RB1 è un oncosoppressore che codifica per la proteina RB che regola la transizione G1/S attraverso il legame al fattore di trascrizione E2F, è stato il primo oncosoppressore ad essere descritto nei tumori polmonari ed è inattivato in circa il 90 % dei SCLC e solo nel 10-15% dei NSCLC. Nei NSCLC il pathway è inattivato attraverso alterazioni della ciclina D1, CDK4 e CDKN2A inibitore di p16. p16^{INK4a} inibisce la ciclina D1, in dipendenza dalla fosforilazione di RB, previene la transizione del ciclo cellulare tramite il checkpoint G1/S. p16^{INK4a} è inattivato in circa l'80% dei NSCLC ed è alterato nel 72% dei carcinomi squamosi prevalentemente attraverso delezione in omozigosi, metilazione o mutazioni inattivanti. L'overespressione della ciclina D1, tramite amplificazione genica o altri meccanismi, in circa il 40% dei NSCLC [16].

Group	EGFR	PTEN	STK11	ALK	KRAS	c-Met	PIK3CA	BRAF	DDR2	FGFR2
NSCLC	28.4%(147/517)	9.5%(21/220)	7.9%(8/101)	6.3%(15/239)	5.4%(27/498)	4.5%(20/448)	4.4%(20/452)	1.5%(7/452)	1.2%(2/166)	0.6%(1/165)
Non-smoker	40.9%(119/291)	6.3%(7/112)	2.1%(1/48)	6.4%(8/125)	3.6%(10/279)	4.3%(11/255)	4.6%(12/260)	1.5%(4/260)	0%(0/91)	0%(0/90)
Smokers	12.4%(28/226)	13.0%(14/108)	13.2%(7/53)	6.1%(7/114)	7.8%(17/219)	4.7%(9/193)	4.2%(8/192)	1.6%(3/192)	2.7%(2/75)	1.3%(1/75)
AC	40.3%(140/347)	7.0%(8/115)	8.6%(5/58)	7.7%(10/130)	7.1%(24/340)	4.5%(14/308)	4.2%(13/307)	2.3%(7/307)	0%(0/97)	0%(0/96)
SCC	4.4%(6/144)	10.6%(10/94)	6.1%(2/33)	4.1%(4/93)	1.5%(2/132)	5.2%(6/116)	5.8%(7/121)	0.0%(0/121)	3.3%(2/61)	1.6%(1/61)
LCC	3.8%(1/26)	27.3%(3/11)	10.0%(1/10)	8.3%(1/12)	3.8%(1/26)	0.0%(0/24)	0.0%(0/24)	0.0%(0/24)	0%(0/8)	0%(0/8)
NS with AC	49.8%(114/229)	9.1%(7/77)	2.7%(1/37)	9.3%(8/86)	4.5%(10/223)	4.8%(10/207)	5.2%(11/210)	1.9%(4/210)	0.0%(0/71)	0.0%(0/70)
S with AC	22.0%(26/118)	2.6%(1/38)	19.0%(4/21)	4.5%(2/44)	12.0%(14/117)	4.0%(4/101)	2.1%(2/97)	3.1%(3/97)	0.0%(0/26)	0.0%(0/26)
NS with SCC	8.0%(4/50)	0.0%(0/32)	0.0%(0/9)	0.0%(0/35)	0.0%(0/44)	2.8%(1/36)	2.6%(1/38)	0.0%(0/38)	0.0%(0/16)	0.0%(0/16)
S with SCC	2.1%(2/94)	16.1%(10/62)	8.3%(2/24)	6.5%(4/62)	2.3%(2/88)	6.3%(5/80)	7.2%(6/83)	0%(0/94)	4.4%(2/45)	2.2%(1/45)

Tabella 1. Frequenza delle alterazioni genetiche nei differenti sottogruppi di NSCLC; NS con AC pazienti con adenocarcinoma nei non fumatori; S con AC: pazienti con adenocarcinoma nei fumatori; NS con SCC: pazienti con carcinoma a cellule squamose nei non fumatori; S con SCC: pazienti con carcinoma a cellule squamose nei fumatori (She-Juan An et al, J P One2012).

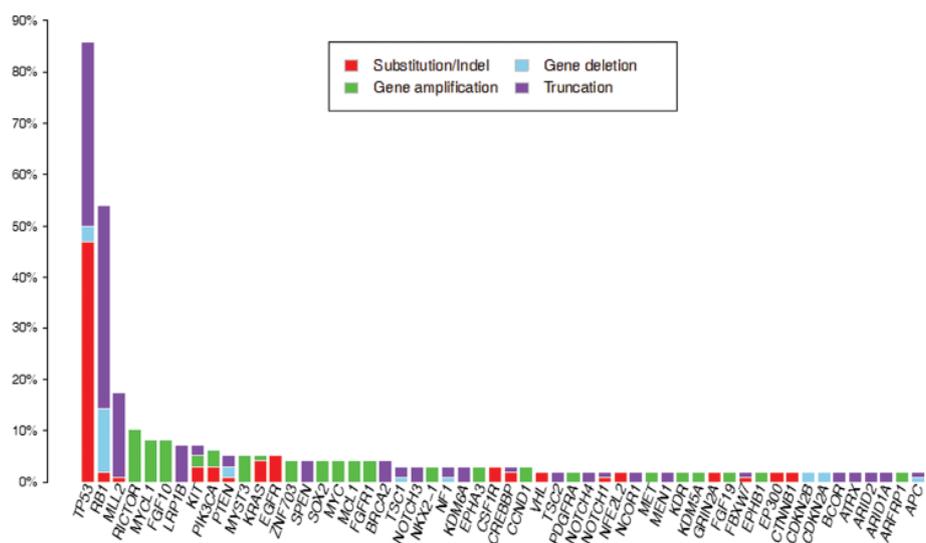


Figura 6. Frequenze relative e assolute delle varie alterazioni genomiche nei SCLC (Ross JS et al, J Clin Pathol 2014).

CAPITOLO 2

I MODELLI MURINI NEL TUMORE AL POLMONE

2.1 Modelli murini per lo studio del cancro

La generazione di modelli murini per lo studio del cancro comincia quasi un secolo fa quando William Castle e Clarence Cook Little svilupparono il concetto di *ceppi murini isogenici o inbred*. Le strategie del *breeding* necessitano di un minimo di 20 generazioni consecutive derivate dall'accoppiamento tra fratello e sorella al fine di produrre ceppi murini *inbred* con un'aumentata suscettibilità allo sviluppo di cancro spontaneo o indotto da carcinogeni. Oltre a questi ceppi *inbred* "classici" propensi allo sviluppo del tumore, esistono mutanti murini che sono stati generati attraverso mutagenesi *random* che va ad interessare la linea germinale; in seguito a tale mutagenesi si effettua una selezione dello specifico fenotipo tumorale. Nei due secoli precedenti, la genetica inerente ai mammiferi è stata rivoluzionata dallo sviluppo di metodologie che vanno a modificare la linea germinale del topo. La prima applicazione si è avuta nel 1984, quando è stato possibile la produzione di topi predisposti allo sviluppo di tumore tramite l'iniezione di oncogeni in oociti. Solo pochi anni più tardi è stato riportato un importante sviluppo nell'ingegneria murina, dando la possibilità di introdurre una specifica mutazione in un gene endogeno e la sua trasmissione attraverso la linea germinale. Questa tecnologia è anche conosciuta come *gene targeting* e si serve

dell'iniezione in blastocisti di specifiche mutazioni generate attraverso la ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali le quali contribuiscono a tutte le linee cellulari. Usando differenti strategie di *gene targeting* è possibile introdurre in modelli murini mutazioni specifiche o riarrangiamenti cromosomici complessi come delezioni, traslocazioni o inversioni che colpiscono i geni coinvolti nel cancro. I modelli tumorali che usano topi *knock-out* o transgenici convenzionali non seguono il modello del cancro sporadico, in quanto la mutazione "iniziale" è presente in tutte le cellule. Topi transgenici convenzionali o *knock-out* per un oncosoppressore hanno permesso di generare ceppi murini propensi allo sviluppo del cancro e hanno fornito importanti conoscenze riguardo il ruolo di particolari geni o di loro mutazioni nella tumorigenesi, oltre che alla conoscenza del ruolo delle singole mutazioni o della loro cooperazione nello sviluppo multi *step* del tumore. Un limite dei transgeni convenzionali è la letalità embrionale che si può verificare nel momento in cui alcuni geni coinvolti nel cancro sono mutati nella linea germinale o sono costitutivamente overespressi in uno specifico tessuto, rendendo in tal modo impossibile lo studio degli effetti di mutazioni che agiscono sullo sviluppo del tumore sui murini adulti. Al fine di risolvere tale limite sono state adottate strategie per *l'espressione condizionale di un gene* attraverso l'utilizzo dei sistemi di ricombinazione sito specifica *Cre/LoxP* o *Flp/Frt*. Le strategie condizionali, usate per l'attivazione di un oncogene o per mutare un oncosoppressore seguono fedelmente l'inizio e lo sviluppo di un tumore sporadico e consentono di esprimere o meno un gene di interesse. Questi modelli murini di seconda generazione permettono di seguire mutazioni somatiche indotte in uno specifico tessuto e in una determinata fascia temporale mimando fedelmente l'insorgenza di un tumore sporadico e la sua progressione [19].

2.2 L'evoluzione nell'utilizzo di modelli murini nel cancro polmonare

La facilità di manipolazione del genoma murino insieme alle sue similarità fisiologiche e anatomiche con l'uomo fanno del topo un sistema modello ideale per le malattie umane. Ci sono diverse strategie innovative che utilizzano i modelli murini per studiare il cancro al polmone. Possiamo dire che nel processo evolutivo dell'utilizzo dei modelli per lo studio del cancro polmonare sono stati adoperati diversi sistemi murini.

I primi ceppi sono stati i *modelli transgenici classici per l'espressione*, basati sull'introduzione di un transgene posto sotto il controllo di un promotore eterologo; i promotori utilizzati sono espressi costitutivamente. Questi modelli sono utili in particolare per l'espressione di oncogeni. Poi si è passati all'utilizzo dei ceppi *knock-out*

e *knock-in*. Dato che nello sviluppo del cancro al polmone la maggior parte delle mutazioni che attivano gli oncogeni sono somatiche è necessaria un'espressione somatica tessuto specifica. Questo è reso possibile dall'uso di promotori tessuto specifici che fanno esprimere il gene solo nel tessuto desiderato, è su tale principio che sono stati sviluppati i *modelli murini condizionali*. In tali modelli un approccio alternativo alla ricombinazione mediata da ceppi esprimenti la *Cre* ricombinasi è l'utilizzo di virus ingegnerizzati (come gli adenovirus) somministrati per via nasale, che permettono di mimare gli eventi del cancro al polmone attraverso regolazione spaziotemporale dell'espressione del gene *target* in un numero di cellule relativamente ridotto. È possibile combinare in modello condizionale con quello *knock-out* in modo da avere contemporaneamente l'espressione di un oncogene e la perdita di un oncosoppressore. I modelli condizionali di sviluppo del cancro polmonare mimano la controparte umana nello sviluppo di cancro sporadico. Ciò consente non solo di arricchire le conoscenze che riguardano lo sviluppo molecolare della tumorigenesi polmonare ma anche per l'identificazione di nuovi *target* terapeutici [20].

2.4 Modelli murini disponibili per i NSCLC

Un certo numero di mutazioni trovate nei NSCLC nell'uomo sono state introdotte nel topo, in particolare mutazioni riscontrate nei geni KRAS, BRAF, EGFR, LKB1, NFkB e p53. Per i NSCLC la maggior parte degli studi sono stati svolti utilizzando un modello condizionale di KRAS *lox-stop-lox* (LSL), recante la mutazione G12D nel *locus* endogeno di Kras. L'introduzione nelle cellule murine LSL-KRAS-G12D, di una ricombinasi *Cre* determina l'espressione dell'allele mutato, mimando in tal modo le condizioni degli *step* iniziali della tumorigenesi umana. Lo sviluppo della malattia avviene in un breve periodo di latenza in seguito all'esposizione dei topi ad un Adeno-*Cre* o Lenti-*Cre*, ottenendo così un'attivazione sporadica dell'oncogene in un microambiente costituito ancora in gran parte da cellule normali.

Un altro allele condizionale (KRAS G12V) è stato costruito in modo tale che il mutante di KRAS si co-esprima con la galattosidasi. Il modello così generato ha dimostrato che la maggior parte dei tumori origina dallo spazio alveolare, si sviluppano piccole lesioni iperplastiche che progrediscono verso adenomi e adenocarcinomi.

Uno dei modelli favoriti *lox-stop-lox* per il cancro polmonare è quello $Lkb1^{lox/lox};LSL\text{KRAS}^{G12D}$ in cui l'attivazione del mutante KRAS è accompagnata dall'inattivazione di *Lkb1* (per mezzo di Adeno-*Cre*): il modello murino indicato sviluppa adenocarcinomi e

carcinomi squamosi, con la generazione di metastasi che ben riflettono la controparte umana [18].

Tutti i modelli esprimenti la mutazione attivante di KRAS generano iperplasia, adenomi e adenocarcinomi (Tabella 1) e hanno consentito di identificare una *gene signature* nei NSCLC umani [18].

Anche per l'oncogene BRAFV600E è stato generato il modello^{lox}BRAF^{wt} Neo^{lox}-BRAF^{V600E}. Il modello esprime dapprima la forma wt e poi la forma mutata in seguito all'azione della *Cre*. L'induzione del *signalling* di BRAF^{V600E} porta allo sviluppo di adenomi che raramente progrediscono verso adenocarcinomi [18].

Sono stati generati modelli murini condizionali anche per EGFR, sia condizionale (*Cre*) che inducibili con il sistema Tet. L'espressione della mutazione EGFR L858R determina un cancro polmonare diffuso, simile al carcinoma bronchio-alveolare umano. L'espressione di EGFR recante la delezione dell'esone19 è causa di adenocarcinomi multifocali, mentre l'espressione di EGFR recante la mutazione T790M provoca lo sviluppo ritardato del tumore rispetto al mutante L858R; anche il doppio mutante L858R_T790M, spesso trovato nelle recidive di tumore polmonare umano, presenta un periodo di latenza prolungata rispetto alla singola L858R. Il valore di questi modelli murini lo troviamo nella stretta somiglianza fenotipica tra tumori umani e di topo oltre che nella possibilità di poter studiare i meccanismi di resistenza, come nel sottoinsieme di tumori umani recanti la mutazione aggiuntiva T790M e per valutare nuove strategie di intervento [18].

In una percentuale di pazienti affetti da NSCLC si riscontra la proteina di fusione ALK-EML4. Topi transgenici che esprimono la fusione ALK-EMLK4 sviluppano adenocarcinomi polmonari multipli poco dopo la nascita [18].

Table 1 – Mouse models for NSCLC.			
Mouse mutant	Tumor induction	Phenotype	Reference
LSL-KrasG12D endogenous control	Sporadic infection of lung cells with Adeno-Cre virus	Adenomas & adenocarcinomas Long latency	(Jackson et al., 2001)
KrasG12D LA1 and LA2 in wt or p53 deficiency	Spontaneous lung tumor development due to sporadic switching of LA allele	Adenomas & adenocarcinomas A variety of tumor types	(Johnson et al., 2001)
Tet-op-KrasG12D in wt or p53 and P19Arf deficiency	CCSP-rtTA transgene, treatment with doxycyclin. Transgene directs rtTA expression in alveolar type II cells	Fast tumor growth, accelerated in p53 and Ink4A/Arf def. background.	(Fisher et al., 2001)
LSL-KrasG12D	Tamoxifen Cre-ERT2 knockins in SPC and CC10 (AT2 and Clara cells)	Adenomas & adenocarcinomas with SPC-Cre.	(Xu et al., 2012)
Beta-Actin loxGFPlox -Kras	Ad5-CMV-Cre	Adenomas & adenocarcinomas Short latency	(Meuwissen et al., 2001)
LSL-KrasG12D; p53lox/lox	Sporadic switching of lung cells with Lenti Cre virus	Accelerated tumor development. Metastasis. Role for Nkx2-1 and Hmga2	(Winslow et al., 2011)
PTENlox/lox	Clara cell specific CCSP-Cre.	No tumors	(Iwanaga et al., 2008)
LSL-KrasG12D; PTENlox/lox	Clara cell specific CCSP-Cre.	Accelerated tumor development. Metastasis	(Li et al., 2008)
LSL-KrasG12D; Lkb1lox/lox	Ad5-CMV-Cre	Strongly augmented tumor growth and metastasis both Adenocarcinomas and Squamous cell carcinomas	(Ji et al., 2007)
LSL-KrasG12Vgeo	Cre-ERT2 (RERT-ert) + Tamoxifen	Adenomas & adenocarcinomas. Not all KrasV12 expressing cells proliferate	(Guerra et al., 2003)
LL-BrafV600E	Ad5-CMV-Cre	Adenomas & rarely progress to adenocarcinoma	(Dankort et al., 2007)
Inducible-cRaf mutant	Clara and Alveolar type II cell specific expression	Only expression in alveolar type II cells gives rise to macroscopic tumors. De-induction causes reversion	(Ceteci et al., 2011)
TRE-Egfr L858R/T790M/Del exon 19 mutants	CCSP-rtTA doxycyclin inducible	Adenocarcinomas. T790M and L858R/T790M double mutant show less aggressive growth	(Politi et al., 2006; Regales et al., 2007)
Tet-op-PIK3CA H1047R; CCSP-rtTA	CCSP-rtTA doxycyclin inducible	Adenocarcinoma with bronchioalveolar features	(Engelman et al. 2008)

Tabella 1. Principali modelli murini per i tumori polmonari appartenenti alla classe dei NSCLC (Min-chul Kwon et al, Mol Oncology 2013).

In aggiunta ai modelli murini descritti sopra l'espressione di gene può essere controllata da promotori che siano attivi in determinati compartimenti del parenchima polmonare. In particolare l'espressione sotto il controllo del promotore SP-C (*Surfactant Protein C*) è rivolta principalmente alle cellule alveolari di tipo II. In particolare i topi in cui l'espressione costitutiva di c-Myc è guidata da tale promotore si sviluppano adenomi bronchio alveolari multi focali e adenocarcinomi, con penetranza incompleta e assenza di metastasi [18]. Lo stesso studio è stato condotto per la forma secreta di EGFR (IgEGFR). Il modello genera iperplasia polmonare con penetranza incompleta, mentre topi doppi transgenici c-Myc/IgEGFR sviluppano adenocarcinoma bronchio alveolare, con un periodo di latenza ridotto, suggerendo una cooperazione dei due oncogeni nella progressione tumorale. Nel caso in cui c-Myc è sotto il controllo del promotore CC10 o CCSP (*Clara Cell Secretory Protein*), promotore attivo nelle cellule non secernenti Clara, i topi sviluppano iperplasia bronchio-alveolare [38]. Altri modelli simili sono stati sviluppati per RON, potenziale oncogene e membro della famiglia MET e cRaf-1 trovato frequentemente amplificato in diverse linee di tumore polmonare. Si tratta di modelli murini in cui i due geni umani *wilde type* RON e cRaf-1 sono espressi sotto il controllo del promotore SP-C umano. I topi transgenici così generati sviluppano adenocarcinomi bronchio alveolari. Infine abbiamo il modello SP-C_EML4-ALK in cui i due geni fusi sono espressi a valle del promotore SP-C con un rapido sviluppo di adenocarcinomi. I modelli murini esprimenti EML4-ALK sviluppano adenocarcinomi

polmonari multipli subito dopo la nascita indicando l'oncogenicità della fusione [20, 41].

La seconda generazione di transgenici è basata sul modello condizionale: modelli bi-transgenici condizionali inducibili dalla tetraciclina/doxicielina. L'espressione del gene target è regolata dalla somministrazione di tetraciclina o doxicielina. I modelli rtTA hanno consentito l'espressione dei transgeni KRAS, EGFR e FGF7: precisamente CCSP-rtTA, TetO-Kras^{G12D}; CCSP-rtTA, TetO-EGFR^{L858R}; CCSP-rtTA, TetOEGFR^{DL747-S752}; CC10-rtTA;Tet-07-CMV-FGF7; CCSP-rtTa,TetO-PI3K^{H1047R}. I modelli di EGFR sviluppano carcinoma bronchio alveolare; i topi KrasG12D sviluppano adenocarcinoma e i mutanti FGF7 iperplasia cellulare epiteliale e iperplasia adenomatosa. Il modello CCSP-rtTa,TetO-PI3K^{H1047R} sviluppa adenocarcinomi con caratteristiche bronchio alveolare. Questi modelli consentendo l'espressione dell'oncogene in sottopopolazioni specifiche e non in tutto il tessuto epiteliale polmonare, mostrano l'importanza dell'oncogene nell'iniziazione e mantenimento della crescita tumorale [38,40].

Tipo di modello: Transgenico	Fenotipo
SP-C cMyc	Adenoma bronchio-alveolare; adenocarcinoma
SP-C IgEGF	Iperplasia
SP-C IgEGF_cMyc	Adenocarcinoma bronchio-alveolare
CC10 cMyc	Iperplasia bronchio-alveolare
SP-C: e- RAF; RON	Adenocarcinoma bronchio-alveolare
SP-C EML4_ALK	Adenocarcinoma
Ricombinazione spontanea Kras ^{G12D}	Adenocarcinoma
Tipo di modello: Bi-Transgenico condizionale	Fenotipo
CCSP-rtTA, TetO-Kras ^{G12D}	Carcinoma bronchio-alveolare
CCSP-rtTA, TetO-EGFR ^{L858R} ; CCSP-rtTA, TetO EGFR ^{DL747-S752}	Adenocarcinoma
CC10-rtTA;Tet-07-CMV-FGF7	Iperplasia cellulare epiteliale e iperplasia adenomatosa
CCSP-rtTa ,TetO-PI3K ^{H1047R}	Adenocarcinomi con caratteristiche bronchio-alveolari
Tipo di modello: Knock-In condizionale	Fenotipo
Lox-stop-Lox KRAS ^{G12D}	Adenoma e Adenocarcinoma
Lox-stop-Lox KRAS ^{G12V} geo	Adenoma e Adenocarcinoma
loxBRAFWT Neo ^{lox} -BRAFF ^{V600E}	Adenoma, raramente Adenocarcinoma
Lkb1 ^{lox/lox} -LSL KRAS ^{G12D}	Adenocarcinoma, Carcinoma squamoso

Tabella 3. Modelli murini di oncogeni coinvolti nella tumorigenesi polmonare: principali modelli murini utilizzati per la riproduzione in vivo del tumore al polmone

2.5 Modelli murini per i SCLC

L'elevato numero di lesioni trovate in questo tumore rende necessaria la possibilità di sviluppare dei modelli in cui le lesioni individuali possano essere valutate nel contesto di varie combinazioni di mutazioni oncogeniche concorrenti. È necessario incentivare il *set-up* di modelli murini tumorali attraverso cui diverse combinazioni di lesioni possano essere valutate rapidamente.

Vista l'elevata frequenza della inattivazione dei geni oncosoppressori p53 e del retinoblastoma, questi sono stati il *background* per la generazione di *knock-out* condizionali di p53 e Rb. I modelli SCLC sono stati avviati infettando i topi condizionali Rb *lox/lox_p53 lox/lox* con vettori adenovirali e lentivirali che esprimono la *Cre* ricombinasi. Inattivando Rb e p53 inevitabilmente si va verso lo sviluppo di un SCLC, anche se spesso sono necessari anche più di 9 mesi affinché i tumori diventino visibili; I tumori così generati sono simili ai tumori umani e generano metastasi nei medesimi organi, oltre ad acquisire mutazioni della controparte umana come l'amplificazione di uno dei geni Myc (L Myc) e del gene Nfib.

CAPITOLO 3

PI3K_AKT_mTOR

3.1 Signalling pathway

Il *pathway* di PI3K opera nei meccanismi di controllo del metabolismo cellulare, in particolare nel metabolismo del glucosio, nella regolazione della crescita cellulare, nella biosintesi delle proteine e nell'apoptosi.

La fosfatidil-inositolo-3-chinasi(PI3K)è l'enzima che fosforila i fosfatidil-inositoli di membrana (Pi), Pi (4) P, e Pi (4,5) P per produrre PI3P, Pi (3,4) P, e Pi (3,4,5) P, rispettivamente. In pratica, si tratta di una famiglia di proteine in grado di catalizzare il trasferimento del fosfato in γ dell'ATP alla posizione D3 dei fosfoinositidi. Esistono tre membri appartenenti a questa famiglia di proteine. La PI3K di classe I è una proteina eterodimerica costituita da due subunità; una subunità catalitica di 110 KDa ed una regolatoria di 85 KDa, i cui substrati principali in vitro risultano essere i fosfoinositidi-(4-5) difosfato. La PI3K di classe II è un peptide di 200 KDa con un dominio C2 C-terminale necessaria per il legame ai fosfolipidi e per la sua attività chinasi (318-319), mentre la PI3K di classe III è una proteina omologa ad alcune proteine vacuolari di

Saccharomyces Cerevisiae. Di queste forme la più importante e quella più studiata è la PI3K di classe I, che risulta essere coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro, nell'inibizione dell'apoptosi, nella divisione cellulare e nell'assorbimento del glucosio. La subunità p85 è costituita da un dominio SH3 all'N-ter, da un dominio BCR, da una regione ricca di prolina e da due domini SH2, di cui uno al C-ter ed uno nella porzione interna (iSH2). La modalità più classica di attivazione di PI3K coinvolge il suo legame con i residui di tirosina fosforilata dei RTKs inclusi PDGFR, EGFR, bFGFR e TRKA attraverso i due domini SH2 di p85. Ciò risulta in un cambio conformazionale che facilita l'attività catalitica di p110. Lo stesso effetto può essere ottenuto dopo l'interazione diretta con RAS-GTP. La fosforilazione lipidica genera PI(3,4,5)P (PIP3) nella porzione citosolica della membrana plasmatica partendo da PIP2 che vengono fosforilati in posizione 3'-OH. Ciò crea siti di legame per le proteine che presentano un dominio di omologia alla Plecstrina (*Plecstrin Homology*), che in questo modo si rilocalizzano nella membrana. I fosfatidil inositoli trifosfato generati da PI3K reclutano molti effettori a valle necessari per la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, tra cui il più rilevante è la serin-treonin chinasi AKT/PKB. Mediante il dominio PH, AKT trasloca in membrana dove interagisce con i prodotti di fosforilazione della PI3K; ciò determina un cambiamento conformazionale della chinasi, rendendo accessibili i siti di attivazione (Thr308 e Ser473). AKT viene fosforilata sulla Thr308, appartenente al dominio catalitico, da un membro delle PDKs (chinasi dipendenti dai 3-fosfoinositidi), PDK1. PDK1 è un enzima costitutivamente attivo e non sembra cambiare localizzazione cellulare in risposta a stimoli extracellulari. PDK1 fosforila la Thr308 che regola l'accesso al sito catalitico della proteina, ma non sembra capace di agire sulla Ser473, localizzata nella regione C-terminale di AKT. La piena attivazione di AKT è dovuta alla sua fosforilazione sulla Ser473 nel motivo idrofobico attraverso l'azione di mTORC2, un complesso insensibile alla rapamicina costituito da mTOR, nLST8, SIN1 e *Rictor* [21-25].

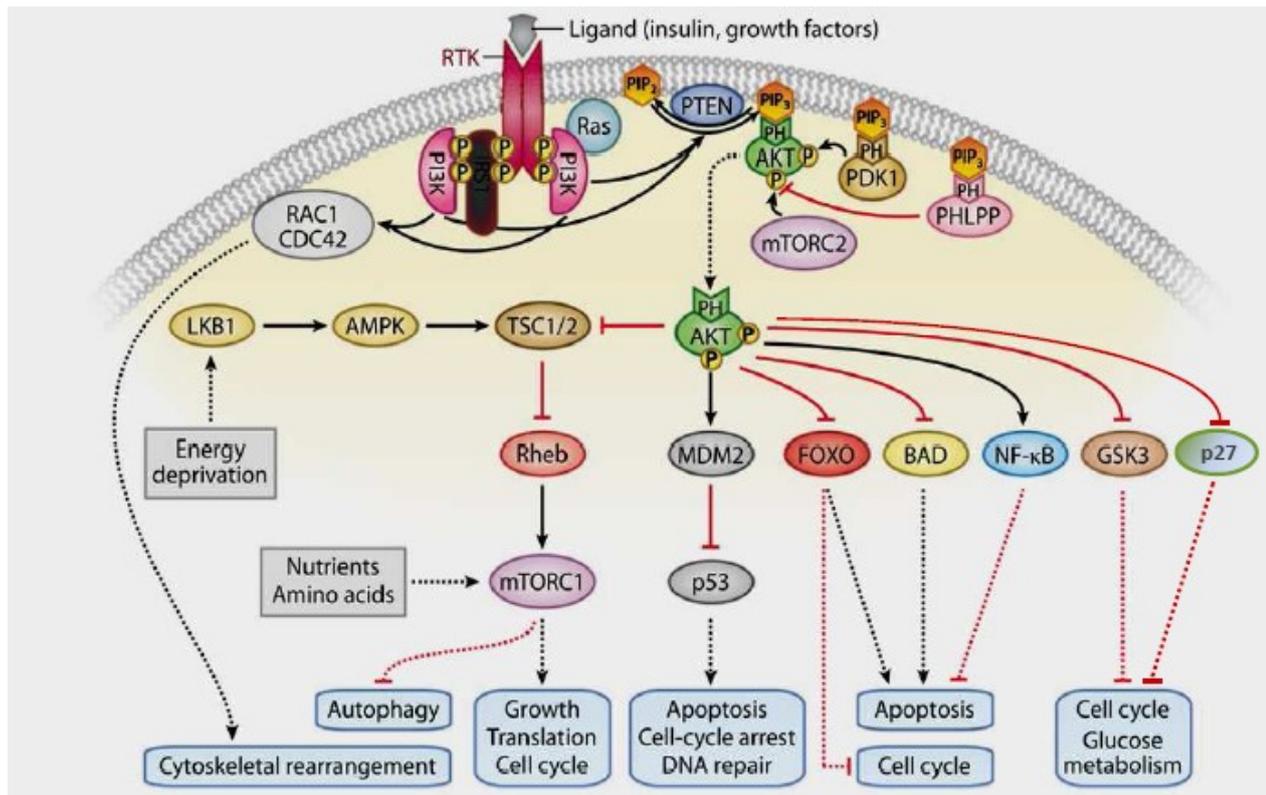


Figura 8. PI3K_AKT_mTOR *signalling pathway* (Nader Chalhoub et al, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2009).

3.2 AKT origine e caratteristiche strutturali

Lo studio su PKB/AKT è iniziato dopo aver isolato due geni detti AKT1 e AKT2, identificati come omologhi umani dell'oncogene virale v-AKT, conosciuto come causa di leucemia nei topi [26]. Successivamente 3 studi indipendenti hanno rilevato che v-AKT e il suo omologo nei mammiferi, codificavano per una proteina chinasi con alcune somiglianze con la Proteina Chinasi C (PKC) e la Proteina Chinasi A (PKA) [27]. La sua relazione con PKA e PKC ha portato a denominarla PKB da parte degli autori di uno di questi studi.

I tre membri della famiglia AKT appartenenti alla famiglia delle chinasi AGC sono stati identificati e sono attualmente definiti PKB- α , PKB- β e PKB- γ (Fig. 8).

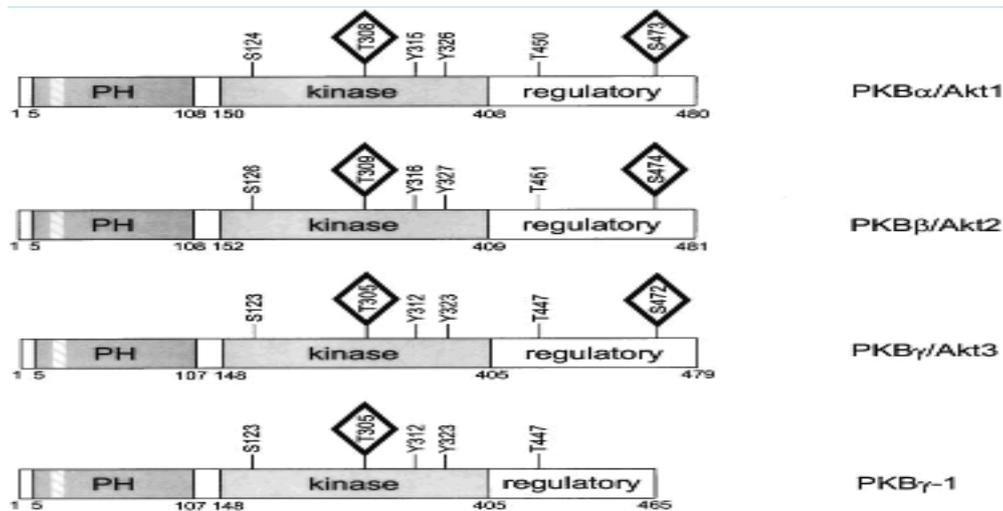


Figura 8. Struttura delle tre isoforme PKB/AKT umane e della variante di splicing PKB γ /AKT3. Ogni isoforma è costituita da un dominio PH all’N-ter, contenente una regione per il legame dei fosfoinositoli, un dominio chinasi e un dominio di regolazione al C-ter. I rombi contengono residui di Ser e Thr fosforilati in risposta a differenti stimoli cellulari. Altri residui in PKB α /AKT1 noti per essere fosforilati costitutivamente, ma non per regolare l’attività catalitica, sono evidenziati allo stesso modo. I residui di Tyr, Y315 e Y326, sono stati recentemente descritti per la loro potenziale capacità di regolare l’attività di PKB α /AKT1 (Nicholson M. K. and Anderson G.N.; 2001).

Questi tre membri sono i prodotti di geni distinti, ma sono altamente correlati mostrando più dell’80% di omologia di sequenza. I tre geni sono espressi in modo differenziale: AKT1/2 mostrano una distribuzione tissutale meno specifica rispetto ad AKT3.

AKT1 è stato mappato sul cromosoma 14q32, una regione frequentemente coinvolta in traslocazioni, causa di leucemie e linfomi [28]. AKT2 è stato mappato in 19q13.1-q13.2, una regione cromosomica nota per le sue alterazioni nei tumori ovarici, mammari e pancreatici [29]. AKT1 e AKT2 sono espressi in tutti i tessuti, ma risultano particolarmente espressi in: cervello, cuore, timo e polmone [30]. AKT3 invece risulta essere maggiormente espresso nel cervello e nel testicolo.

Ogni isoforma possiede un dominio PH all’N-terminale di circa 100 amminoacidi. Recenti ricerche strutturali sul dominio PH di AKT hanno rivelato una forte similarità con domini PH in altre molecole segnale che legano i 3-fosfoinositidi, indicando che il dominio PH media il legame di AKT ai 3-fosfoinositidi [31]. Il dominio PH è seguito da un dominio catalitico di tipo chinasi che mostra un alto grado di similarità con quello scoperto in PKA e PKC [32]. In questa regione è stato anche trovato un residuo di treonina (Thr308 in PKB α /AKT1), la cui fosforilazione è necessaria per l’attivazione della proteina. Il dominio chinasi è seguito poi da un secondo sito di fosforilazione (Ser473 in PKB α /AKT1) presente a livello della coda C-terminale coinvolto nella

risposta ai segnali di crescita e ad altri stimoli extracellulari. La proteina AKT, inoltre, può anche essere fosforilata sui residui di Ser124 e Thr450, ma entrambi questi siti non sembrano regolarne la sua attività [33].

3.3 I substrati di PKB/AKT

L'attivazione della proteina AKT induce la fosforilazione di una serie di proteine *targets* a valle (Tabella 2), regolando in questo modo una serie di processi cellulari quali la sopravvivenza, la crescita, la proliferazione, l'*uptake* del glucosio, il metabolismo e l'angiogenesi (Figura 9) [34].

Target	Human Site(s) ^b	In Vitro ^c	In Vivo ^d			Genetic Evidence ^e	Regulatory Effect? ^f
			W/L	LOF	GOF		
FOXO1	T24, S256, S319	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
FOXO3A	T32, S253, S315	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
FOXO4	T32, S197, S262	+	+	+	+	M, F, W	Inhibit
TSC2	S939, T1462	+	+	+	+	M, F	Inhibit
GSK3 α/β	S21/S9	+	+	+	+	M	Inhibit
RAF1	S259	+	+	+	+	-	Inhibit
PRAS40	T246	+	+	-	+	M	Inhibit
AS160	S588, T642	+	+	-	-	-	Inhibit
BAD	S99	+	+	+	+	-	Inhibit
WNK1	T60	+	+	+	-	M	?
MDM2	S166, S186	+	+	+	+	-	Activate
Chk1	S280	+	+	+	+	M	Inhibit
eNOS	S1177	+	+	+	+	M	Activate
ASK1	S83	+	+	+	+	-	Inhibit
IKK α	T23	+	-	-	-	-	Activate
p21CIP1	T145	+	+	+	+	-	Inhibit
p27KIP1	T157	+	+	+	+	-	Inhibit
Casp9	S196	+	-	+	+	-	Inhibit

Tabella 2. Caratteristiche ed evidenze sperimentali per un subset di substrati di AKT (Manning D. et al, Cell 2007).

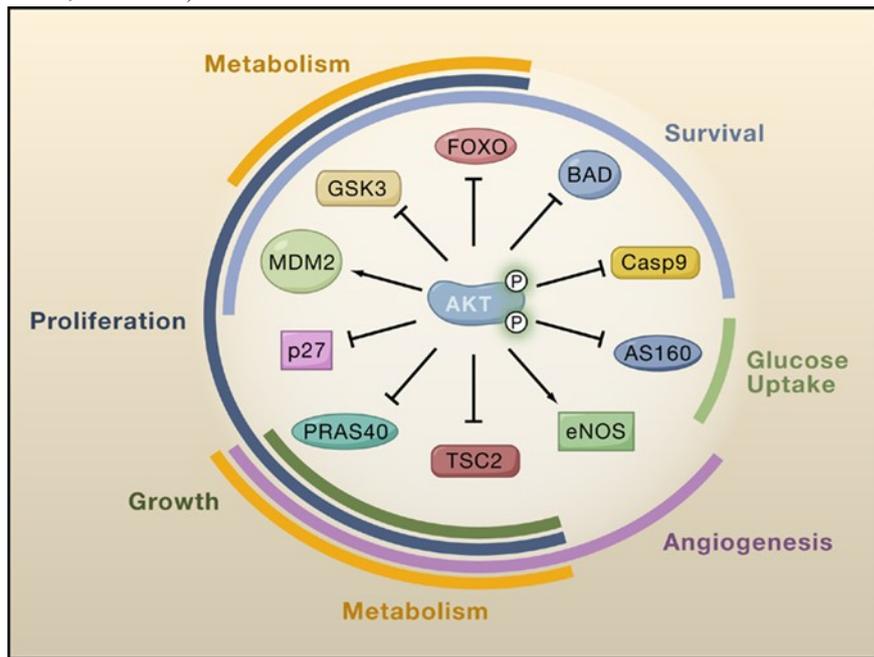


Figura 9. Le funzioni cellulari di alcuni substrati di AKT: La fosforilazione mediata da AKT di queste proteine porta alla loro attivazione (freccie) o inibizione (freccie a T). La regolazione di tali substrati contribuisce all'attivazione dei vari processi cellulari mostrati (sopravvivenza, crescita, proliferazione, assorbimento del glucosio, metabolismo e angiogenesi). È facilmente intuibile che esiste un alto grado di versatilità funzionale e di *overlap* tra i differenti substrati di AKT (Manning D. et al, Cell 2007).

Obiettivo

Studi recenti dimostrano che mutazioni attivanti nella subunità catalitica di PI3K e in AKT1 sono riscontrate in pazienti affetti da SCC [82-84, 45, 78]. AKT1 e AKT2 sono frequentemente attivati nei tumori umani [85-87], in seguito a perdita di PTEN, mutazioni o *copy number variation* a carico di RTK, mutazioni attivanti di KRAS e, in PI3KCA o in AKT1 stesso [39, 42, 49].

Recentemente, è stata identificata una mutazione attivante di AKT1 in diversi tumori. La mutazione è causata dalla transizione G>A del nucleotide 49 esone 4. Tale mutazione comporta la sostituzione amminoacidica di un acido glutammico (E, residuo acido) con una lisina (K, residuo basico) in posizione 17 (E17K). La forma AKT1^{E17K} determina un cambio conformazionale del dominio PH favorendo così la traslocazione di AKT1 in membrana e, di conseguenza, un incremento dell'attività chinasi. In particolare la mutazione è stata identificata nel cancro alla mammella (8%), colon retto (6 %) e ovaio (2%) [48, 49]. Nel cancro polmonare questa mutazione è stata riportata con una frequenza compresa tra 0.6-2% [43, 45, 78-81].

La proteina mutata risulta avere un'aumentata localizzazione in membrana e una maggiore attività chinasi, con conseguente aumento della fosforilazione dei principali substrati a valle (GSK3b, FOXO1), tuttavia la caratterizzazione della capacità trasformante della mutazione Akt1^{E17K} risulta ancora controversa. Sebbene la forma mutata è in grado di trasformare fibroblasti embrionali murini e determinare lo sviluppo della leucemia nei topi [47], se e come Akt1^{E17K} sia in grado di trasformare le cellule epiteliali non è ancora stato chiarito [48]. Il *knock-in* somatico della mutazione E17K in cellule epiteliali mammarie immortalizzate ha conseguenze fenotipiche minime [13]. Al contrario, studi condotti *in vitro*, nel nostro laboratorio, indicano in maniera chiara che il guadagno di funzione di Akt1^{E17K} ha proprietà oncogenica in quanto è in grado di trasformare cellule epiteliali polmonari umane e di promuovere crescita tumorale *in vivo*. Queste considerazioni preliminari ci hanno spinto a valutare il ruolo di Akt1^{E17K} nella cancerogenesi attraverso la generazione di un modello murino condizionale esprime la forma Akt1^{E17K} umana.

Nel mio progetto di dottorato ci siamo proposti quindi di:

- 1) verificare se Akt1^{E17K} è in grado di generare tumori *in vivo* quando espressa nel tessuto polmonare;
- 2) caratterizzare le basi molecolari attraverso cui Akt1^{E17K} induce trasformazione neoplastica.

A tale scopo per il fenotipo polmonare abbiamo generato i seguenti modelli:

- a) induzione dell'espressione del transgene Akt1^{E17K} attraverso l'instillazione nasale di AdenoVirus esprime la *Cre* ricombinasi;
- b) utilizzo di topi transgenici esprimenti la *Cre* ricombinasi sotto il controllo di promotore polmone specifici (*Ttf1-Cre*) per la generazione del modello R26-Akt1^{E17K}; *Ttf1-Cre*.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 Mutagenesi sito-specifica

Questo esperimento è stato eseguito utilizzando il Kit di Mutagenesi Stratagene Quik Change. Gli oligonucleotidi specifici sono stati disegnati appositamente e le sequenze sono riportate di seguito:

-Mut hAKT1 Fow TGCACAAACGAGGGAAGTACATCAAGACCTG

-Mut hAKT1 Rev CAGGTCTTGATGTACTTCCCTCGTTTGTGCA

4.2 Mini prep

E' stato utilizzato QIAprep Miniprep Kits:

- Risospendere il pellet di batteri in 250 µl di soluzione P1 e vortexare;
- Aggiungere 250 µl di buffer P2 e agitare invertendo il tubo;
- Aggiungere 350 µl di buffer N3 e invertire il tubo 4-5 volte;
- Centrifugare per 10 minuti a 13.000 RPM;
- Prelevare il surnatante e metterlo nella colonna;
- Centrifugare per 1 minuto a 13.000 RPM e buttare il flow-through;
- Aggiungere 750 µl di buffer PE, centrifugare 1 minuto a 13.000 RPM, buttare il flow-through e centrifugare 1 minuto, 13.000 RPM a vuoto per eliminare l'eccesso di etanolo;
- Per eluire il DNA, trasferire le colonne in nuove eppendorf;

- Aggiungere 50 µl di H₂O sterile, lasciare riposare per un minuto e centrifugare per 1 minuto a 13.000 RPM;
- Conservare il plasmide che è in soluzione.

4.3 Maxi prep

E' stato utilizzato QIAGEN Maxiprep Kits.

- Raffreddare la centrifuga (Beckman Coulter Avanti J25) 5 minuti a 6.000 giri (rotore JA 14);
- Centrifugare 15 minuti a 6.000 giri;
- Aggiungere 10 ml di buffer P1;
- Aggiungere 10 ml di buffer P2, agitare e lasciare 5 minuti a temperatura ambiente;
- Aggiungere 10 ml di buffer P3, agitare e incubare in ghiaccio per 20 minuti;
- Centrifugare per 30 minuti a 20.000 giri;
- Filtrare il surnatante e contemporaneamente raffreddare la centrifuga con rotore JA 20, 5 minuti a 6.000 giri;
- Equilibrare la colonna con 10 ml di buffer QBT;
- Aggiungere il surnatante e lavare 2 volte la colonna con 30 ml di buffer QF;
- Aggiungere 10,5 ml di isopropanolo e centrifugare per 30 minuti a 15.000 g;
- Aggiungere al pellet 5 ml di Etanolo al 70%;
- Centrifugare 10 minuti a 15.000 g;
- Eliminare il surnatante e risospendere il DNA in TE 1x.

4.4 Digestione di DNA plasmidico con enzima di restrizione

La digestione di DNA plasmidico è stata effettuata utilizzando differenti enzimi NEB. È preferibile digerire 0.2-1.5 mg DNA, con una quantità di enzima in eccesso (da 2 a 10 volte) in un volume totale di 20 microlitri. Nel caso in cui si faccia una doppia digestione utilizzare i buffer più compatibili con tutti gli enzimi, ed è importante che il volume totale di enzimi aggiunti alla reazione non sia superiore a 1/10 del volume totale. Un tipico protocollo con un enzima di digestione:

In un tubo 1,5 ml preparare la seguente mix:

- DNA;
- Enzima/i di restrizione;
- Buffer 10X;

- 10X BSA (se richiesta);
- dH₂O fino a volume totale (20 µl);
- Mescolare delicatamente e spinnare brevemente;
- Incubare alla temperatura di reazione ottimale (normalmente 37 ° C) per 2 ore.

Quindi i campioni sono stati corsi in un gel di agarosio all'1% con bromuro di etidio, utilizzando il plasmide non digerito come controllo negativo.

4.5 Estrazione di DNA da gel di agarosio

Nel nostro caso, a questo scopo, abbiamo utilizzato il QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit, utilizzando il protocollo standard fornito dal kit.

4.6 Ligasi per DNA

Questo esperimento è stato effettuato utilizzando la DNA ligasi NEB T4 (M0202).

Prima di avviare la reazione di ligasi, è importante determinare le quantità dell'inserto e del vettore da utilizzare. In genere, per un clonaggio standard (dove l'inserto è minore del vettore) il rapporto inserto/vettore è di 3:1.

Impostare la reazione di ligasi come segue:

- Buffer per la DNA ligasi T4 10X;
- DNA vettore;
- DNA inserto;
- dH₂O fino a volume totale (20 microlitri);
- Mixare delicatamente la reazione pipettando;
- Incubare a 16 ° C per tutta la notte;
- Raffreddare su ghiaccio e trasformare 1-5 ml di reazione in 50 microlitri di cellule competenti.

4.7 Trasformazione di cellule batteriche elettrocompetenti

Il protocollo richiede diversi passaggi:

- Scongelare le cellule competenti sul ghiaccio e mixare da 1 a 5 μl di DNA (in genere da 10 a 100 ng) con 50 μl di cellule competenti;
- Trasferire la sospensione cellule/DNA nella cuvetta per l'elettroporazione;
- Inserire la cuvetta nell'elettroporatore e far partire l'impulso elettrico di 2500V;
- Rimuovere la cuvetta e aggiungere immediatamente il SOC (SOB+glucosio 2M), tale step deve essere rapido per evitare che le cellule muoiano;
- Trasferire la sospensione cellule-SOC in un tubo eppendorf e incubare a 37 °C per almeno un'ora in agitazione, al fine di consentire l'espressione dei geni di resistenza agli antibiotici;
- Centrifugare a 4500 rpm, eliminare il soprannatante e risospendere il pellet batterico in 100 μl di LB;
- Piastrare il preparato in una piastra contenente LB-agar contenete l'antibiotico appropriato e incubare *over night* a 37 °C.

4.8 Southern blot

Il protocollo è il seguente:

- Digerire *over night* 30 μg di DNA genomico con l'enzima specifico;
- Corsa elettroforetica *over night* con voltaggio costante compreso tra 20 e 50 V con gel di agarosio allo 0,7% contenente 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di etidio bromuro, usando un dye per il southern;
- Fare una foto con il gel affiancato dal righello, quindi tagliare il marker;
- Segue la depurinazione con 0,2 N HCl che terminerà quando il dye del gel virerà dal blu al giallo;
- Lavare in acqua per un'ora;
- Ripetere il passaggio precedente;
- Tagliare il dye e prendere le misure del gel;

- Lavare in buffer di trasferimento (0,4 M NaOH e 1M NaCl) per 15 minuti;
- Ripetere il passaggio precedente;
- Per il trasferimento over night utilizzare una membrana di nitrocellulosa carica positivamente, un' apparato elettroforetico, carta 3 MM, una lastra di vetro, un peso e il buffer di trasferimento (SSC 10X NaOH 0,1M); posizionare dal basso verso l'alto: supporto, gel, membrana, carta 3MM, porre una lastra di vetro e un peso sopra in modo tale che la struttura non risulti sbilanciata, e permettere un passaggio omogeneo del liquido;
- Disassemblare il blot e delimitare i pozzetti con matita;
- Lavare con buffer di neutralizzazione 0,5M Tris-HCl pH7,5; 1M NaCl;
- Asciugare la membrana con carta 3 MM;
- Pre-ibridare usando il kit Dig Easy Hyb Granules Roche Cat.No.11796895001, per mezz'ora a una temperatura di 55°C, calcolata sulla base del contenuto in GC e la lunghezza della sequenza da rilevare;
- Ibridazione over night in agitazione a 55 °C con sonda marcata e denaturata;
- Seguono due lavaggi da cinque minuti ciascuno in 2X SSC e 0,1% SDS a temperatura ambiente in agitazione;
- Si procede con altri due lavaggi da 15 minuti ciascuno in 0,5 X SSC e 0,1% SDS a 65 °C in agitazione;
- Si passa quindi al blocking che ha durata di trenta minuti (Blocking Reagent Roche Cat. No. 11096176001), blocking del kit da diluire in acido maleico 1X;
- Ibridazione con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina per trenta minuti;
- Due lavaggi, ognuno di quindici minuti in washing buffer (1X di acido maleico e triton);
- Equilibrare con detection buffer (0,1M Tris-HCl; 0,1 M NaCl pH 9,5);
- Rilevazione dell'ibridazione tramite chemiluminescenza con kit CDP-Star, Roche.

Marcatura e denaturazione della sonda: per la marcatura viene utilizzato il kit: PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche, Cat.No. 11636090910. La marcatura avviene attraverso l'utilizzo di di-deossinucleotidi coniugati con digossigenina (Dig-ddUTP) tramite reazione classica di PCR e la denaturazione della sonda viene effettuata al momento del suo utilizzo ad una temperatura di 100°C per 5 minuti.

4.9 Estrazione di DNA da tessuto

- Alla sezione di tessuto aggiungere 750 µl di buffer di lisi costituito da 0,05M Tris pH 8.8; 0,1M NaCl; 1% SDS e 40 µl di Proteinasi K 10mg/ml;
- Incubare over night a 60°C;
- Se non si ottiene la completa digestione effettuare una ulteriore lisi meccanica con Tissue Laser: frequenza 25 Hz per 2 minuti;
- Porre sul termo mixer in agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Aggiungere 250 µl di NaCl 6M saturo;
- Porre 10 minuti sul termo mixer in agitazione a temperatura ambiente;
- Centrifugare alla massima velocità a 4 °C per 10 minuti;
- Porre il sovrnatante in nuove eppendorf e eliminare il pellet;
- Aggiungere 500 µl di isopropanolo;
- Agitare capovolgendo a mano, il flocculo di DNA dovrebbe essere visibile;
- Centrifugare alla massima velocità a 4°C per 10 minuti;
- Eliminare il sovrnatante e lavare il pellet con 1 ml di etanolo al 70% freddo;
- Centrifugare alla massima velocità a 4° per 5 minuti;
- Eliminare il sovrnatante;
- Far asciugare il pellet sotto lampada;
- Aggiungere 150 µl di acqua bi-distillata sterile;
- Dissolvere bene il pellet sullo shaker per 2 ore a temperatura ambiente, lasciando in agitazione.

4.10 Genotipizzazione Akt1^{E17K} e Ttf1-Cre

Per quanto riguarda la determinazione dei genotipi Akt1^{E17K}, su DNA estratto da biopsie di coda è stata effettuata una PCR con tre primers (SIGMA):

- mE17K 5' Fow 5'-AACTGCAGACTTGTGGGATAC-3';
- mE17K 3' Rev 5'-ATATTAGTCCACCTCACTCCT-3';
- mE17K 3' Rev New 5'-GCCAACCCTCCTTCACAATA-3'.

La Master Mix della PCR e il programma del termociclatore sono i seguenti:

MASTER MIX Volume finale 25 µL

2 µl DNA diluito 1:10

2,5 µl Buffer (1X)

5 µl DMSO (2%)

0,75 µl dNTP EUROCLONE (0,3 mM)

1,25 µl mE17K 5' Fow 0,5 µM

2,5 µl mE17K 3' Rev New 1 µM

1 µl mE17K 3' Rev 0,4 µM

1 µl TAQ (0,2 U/ µl)

H₂O distillata fino al raggiungimento del volume finale

PROGRAMMA TERMOCICLATORE

- 1) 95°C per 5 minuti
- 2) 95°C per 30 secondi
- 3) 60°C per 30 secondi
- 4) 72°C per 1,30 minuti
- 5) Ripetizione dallo step 2 al 4 per 35 cicli
- 6) 72°C per 7 minuti
- 7) 4°C for ever

I prodotti di PCR sono stati visualizzati con Etidio Bromuro 2,5 µl/50 ml mediante elettroforesi sul gel di agarosio all'1,5%.

Invece per la genotipizzazione di Ttf1-Cre su DNA estratto da biopsie di coda è stata effettuata una PCR con due primers (SIGMA):

- NKX 2.1 Rev GCCAGATCTCCTGTGCAGCATGT
- NKX 2.1 Fow CCTGATGGACATGTTTCAGGGACA

La Master Mix della PCR e il programma del Termociclatore sono i seguenti:

MASTER MIX Volume finale 25 µL

1 µl DNA non diluito

2,5 µl Buffer (1X)
2,5 µl DMSO (2%)
0,75 µl dNTP EUROCLONE (0,3 mM)
1,25 µl NKX 2.1 Fow 0,5 µM
1,25 µl NKX 2.1 Rev 0,5 µM
1 µl TAQ (0,2 U/ µl)
H₂O distillata fino al raggiungimento del volume finale
PROGRAMMA TERMOCICLATORE

- 1) 95°C 5 minuti
- 2) 95 °C 30 secondi
- 3) 62 °C 1 minuto
- 4) 72 °C 1minuto
- 5) Go to step 2- 35 cicli
- 6) 72 °C- 7 minuti
- 7) 4 °C- for ever

I prodotti di PCR sono stati visualizzati con Etidio Bromuro 2,5 µl/50 ml mediante elettroforesi sul gel di agarosio all'1,5%.

4.11 Estrazione di RNA da tessuto

Per estrarre l'RNA è stato usato il protocollo del kit invitrogen:

- Ad ogni sezione di tessuto aggiungere 1ml di Trizol;
- Lisare con Tissue Lyser con frequenza 25 Hz per 2 minuti;
- Aggiungere anche la lisi meccanica con l'ago di una siringa;
- Incubare il campione per 5 minuti tra 15° C e 30° C per consentire la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine;
- Aggiungere 200 µl di cloroformio e agitare vigorosamente;
- Incubare il campione per 2-3 minuti tra 15° C e 30° C;
- Centrifugare il campione per 15 minuti tra 2° C e 8° C a 12000 RCF;
- Ora il campione sarà separato in una fase inferiore rossa di fenolo-cloroformio, una interfase bianca che contiene DNA e proteine, e una fase superiore acquosa che contiene RNA: prelevare solo la fase superiore e trasferire in una nuova eppendorf;
- Precipitare l'RNA aggiungendo 500 µl di isopropanolo e agitare il campione;
- Incubare il campione per 10 minuti tra 15° C e 30° C;

- Centrifugare per 10 minuti tra 2° C e 8° C a 12000 RCF;
- Aspirare il surnatante e lavare il pellet aggiungendo 1 ml di etanolo 75%;
- Vortexare e centrifugare per 5 minuti tra 2° C e 8° C a 7500 RCF;
- Aspirare il surnatante e lasciare evaporare l'etanolo residuo;
- Risospende il pellet in acqua DEPC per poi incubare il campione per 10 minuti a 60° C;
- Leggere la concentrazione dell'RNA estratto allo Spettrofotometro Nanodrop® ND-1000.

4.12 Estrazione proteica da tessuto

Viene utilizzato il Buffer di lisi con inibitori di proteasi.

Buffer di lisi costituito da: 0,5% NP 40; 50 mM HEPES pH7; 3M NaCl.

Inibitori di proteasi: 1X SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets; inibitori di fosfatasi (Na3Vo4 1mM, NaF 1mM, Ac. Okadaico 1µM) l'inibitore generale di serin-proteasi PMSF 1mM e con l'agente riducente DTT.

- Aggiungere alla sezione di tessuto 150/200 µl di buffer di lisi con inibitori;
- Lisare meccanicamente con Tissue Lyser con frequenza 25Hz per 3 minuti;
- Spinnare;
- Aspirare il surnatante e porre in nuova eppendorf;
- Incubare in ghiaccio per trenta minuti;
- Porre a +4 °C sulla ruota ad agitazione costante per due ore;
- Centrifugare a +4°C alla massima velocità per mezz'ora;
- Trasferire il sovrinatante, contenente le proteine, in nuove eppendorf;

A questo punto è stata effettuata la quantizzazione delle proteine seguendo il saggio Bradford (Biorad) con spettrofotometro Beckman DU 530, utilizzando l'albumina bovina serica concentrata 1mg/ml per la costruzione della curva di taratura.

4.13 Retrotrascrizione da RNA a cDNA

Per la retrotrascrizione viene seguito il protocollo del kit Invitrogen SuperScript III Fistr-Strand Synthesis System for RT-PCR:

A 1 µg di RNA aggiungere 1mM di dNTP mix, 5 ng/µl Random Examer;

- Incubare per 5 minuti a 65 °C in termociclatore;
- Spinnare e porre i tubini in ghiaccio per un minuto;

- Aggiungere la mix per la sintesi del cDNA: 2X RT Buffer; 10mM MgCl₂; 0,02 M DTT; 4 U/μl RNase OUT e 20 U/ μl di Super Sript III RT;
- Incubazione a 25 °C per 10 minuti;
- Sintesi del cDNA per 50 minuti a 50 °C;
- Reazione finale a 85 °C per 5 minuti di inattivazione enzimatica.

4.14 Real Time PCR

La reazione viene allestita in 25 μl, come descritto nella tabella 7.

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume
Sybr Green PCR Master mix (Applied Biosystems)	2x	1x	12,5 μl
Oligo 5' Forward	10 μM	0,2 μM	0,5 μl
Oligo 3' Reverse	10 μM	0,2 μM	0,5 μl
cDNA	5 ng/μl	25 ng in totale	5 μl
H ₂ O	-	-	6,5 μl

Tabella7: Componenti della reazione di Real Time PCR.

Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando lo strumento *Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System* ed il software *SDS Enterprise Database*.

Il programma di amplificazione prevede 3 cicli:

1. 50° C per 2 minuti;
2. 95° C per 10 minuti;
3. 95° C per 15 secondi seguito da 60° C per 1 minuto, ripetuto per 40 volte.

Le sequenze dei *primers* utilizzati sono le seguenti:

- AKT1R26 *forward* 5-CACACCACCTGACCAAGATG-3;
- AKT1R26 *reverse* 5-AATCAAGGGTCCCCAAACTC-3;
- mGAPDH *forward* 5-CCGGGTTCTATAAATACGGACTGC-3;
- mGAPDH *reverse* 5-CGGCCAAATCCGTTTCACACCGA-3'.

4.15 Western blot e anticorpi utilizzati

Da cinquanta a settanta μg di proteine sono state separate su di un gel di poliacrilammide (PAA) al 10%, sottoposto ad un campo elettrico in un tampone di corsa contenente 25 mM TRIS, 250 mM Glicina pH 8.3 e 0.1% SDS. Le proteine frazionate sono state trasferite, in tampone contenente 25 mM TRIS, 250 mM Glicina e Metanolo (CH_3OH) al 20% su di una membrana di nitrocellulosa (Protran, Nitrocellulose Transfer Membrane, Schlicher & Schuell, Germany). Il trasferimento è stato effettuato per sette minuti a 25 V costanti con Trans-blot Biorad Turbo V1.02. Dopo il trasferimento i filtri sono stati colorati con Rosso Ponceau 1x (ATX Ponceau S Red staining solution, FLUKA) per 5 minuti a temperatura ambiente. Le membrane, lavate in acqua bidistillata e in TTBS (TBS-Tween 0.1%), sono state bloccate in una soluzione di TTBS al 5% latte delipidato e 3% BSA o solo BSA al 5%. Successivamente i filtri sono stati incubati con gli anticorpi primari, diluiti in TBS 1x, 3% BSA, 0.02% Sodio Azide e 100mg di Rosso Fenolo, over night a 4°C. Dopo tre lavaggi da 5-10 minuti in TTBS le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari rivolti contro la porzione costante delle immunoglobuline di coniglio o di topo diluiti 1:2500 in una soluzione di TTBS al 5% latte delipidato.

La colorazione specifica è stata identificata utilizzando il Kit di chemiluminescenza amplificata ECL (Amersham Inc.). L'anticorpo secondario è legato covalentemente ad una perossidasi, enzima che reagisce con il suo substrato, il luminolo, sviluppando la chemiluminescenza visibile su lastra.

Gli anticorpi utilizzati per effettuare gli esperimenti di Western Blot descritti in questo lavoro sono i seguenti:

- Anticorpo anti fosfo-AKT1 S473 (Rabbit), diluito 1:1000, Cell Signalign Technology;
- Anticorpo anti-AKT1 (Rabbit), diluito 1:1000, Cell Signaling Technology;
- Anticorpo anti-MAPK p44/42 (Mouse), diluito 1:1000, Cell Signalign Technology;
- Anticorpo anti-fosfo FoxO1 (Ser256) (#9461), diluito 1:1000, Cell Signalign Technology;
- Anticorpo anti-FoxO1 (#2880), anti-phospho-GSK3- α/β (Ser21/9) (#9331), diluito 1:1000, Cell Signalign Technology;

- Anticorpo anti-GSK3- α (#9338), anti-GSK3- β (#9332), diluito 1:1000, Cell Signalign Technology.

4.16 Fissazione e inclusione in paraffina di tessuti

L'osservazione di un tessuto al microscopio ottico e anche quella al microscopio elettronico richiede una serie di procedure che comprendono vari passaggi: fissazione, disidratazione e inclusione. Le diverse fasi:

- Dopo prelievo viene effettuato un lavaggio del tessuto in PBS 1X filtrato;
- Il tessuto viene coperto di Formalina al 10% e fatto basculare *over night* a +4°C;
- Si prosegue con due lavaggi sulla basculante a temperatura ambiente in NaCl 1X da un'ora;
- Si procede con un lavaggio in cui viene utilizzato un ugual volume di NaCl 1X ed etanolo al 95%;
- Lavaggio basculante in etanolo al 70% per un'ora;
- Incubazione basculante a +4°C *over night* in etanolo al 70%;
- Si procede con due lavaggi da un'ora e trenta con etanolo all'85% e 95% rispettivamente e un ultimo da un'ora in etanolo al 100%;
- Fase iniziale di inclusione in xilene/paraffina per un'ora e trenta;

Segue la fase finale di inclusione in paraffina per diversi *step* temporali: trenta; quarantacinque e cinquanta minuti.

4.17 Colorazione ematossilina-eosina

Per lo studio microscopico istopatologico dei tessuti murini

- Deparaffinare in xilene I e II per 10 minuti;
- Reidratare:
- EtOH 100% (5 minuti);
- EtOH 100% (2 minuti);
- EtOH 95% (2 minuti);

- EtOH 95% (2 minuti);
- EtOH 70% (2 minuti);
- Risciacquare in acqua distillata per 5 minuti;
- Colorare in ematossilina Harris per 30 secondi;
- Decolorare in acqua corrente per 10 minuti;
- EtOH 70% per 3 minuti;
- EtOH 95% per 10 minuti;
- Contrastare in eosina alcolica per 30 secondi;
- Disidratare;
- EtOH 95% (5 minuti);
- EtOH 100% (10 minuti);
- Xilene I e II per 10 minuti;
- Montare con Eukitt BIO-OPTICA.

4.18 Staining immunoistochimica su sezioni paraffinate

Procedere come segue:

- Incubare i vetrini a 60 °C *over night*;
- Deparaffinare in xilene I e II per 10 minuti;
- Reidratare:
- EtOH 100% (5 minuti);
- EtOH 100% (2 minuti);
- EtOH 95% (2 minuti);
- EtOH 95% (2 minuti);
- EtOH 70% (2 minuti);

- PBS 5 minuti;
- PBS + Tween20 5 minuti;
- PBS 5 minuti.

Eeguire lo smascheramento antigenico, utilizzando il tampone citrato 1X pH 6 Novocastra Leica e incubare i vetrini, immersi in questo buffer, in pentola a pressione per due minuti;

- Raffreddare a 4 ° C per 30 minuti;
- Asciugare i vetrini all'aria e delimitare i contorni della sezione con la pap-pen;
- Lavare in bond wash solution 1X (Leica AR 9590), per 5 minuti;
- Incubare le sezioni in Novocastra peroxidase block, per il blocco della perossidasi endogena, per 10 minuti;
- Lavare in bond wash solution 1X (Leica AR 9590), per 5 minuti;
- Incubare le sezioni in Novocastra protein block (Leica RE7102), per 5 minuti;
- Lavare in bond wash solution 1X (Leica AR 9590), per 5 minuti;
- Incubare i vetrini con l'anticorpo primario pAkt-S473 CST#3787, diluito 1:50 in Bond Primary Antibody Diluent (Leica AR9352), *over night* in camera umida a 4°C;
- Lavare in bond wash solution 1X (Leica AR 9590), per 5 minuti;
- Continuare con il kit Novocastra Novolink Polymer Detection Systems (RE7140-K) come segue:
 - Novocastra Post Primary Block (RE7111) per 30 minuti;
 - Lavare in bond wash solution 1X (Leica AR 9590), per 5 minuti;
 - Novolink Polymer (RE7112) per 30 minuti;
 - Lavare in bond wash solution 1X (Leica AR 9590), per 5 minuti;

- Sviluppare l'attività perossidasi con DAB (rapporto 1:20 DAB/Chromogen: RE7105/ DAB Substrate Buffer RE7106) massimo per 5 minuti;
- Bloccare la reazione con acqua distillata;
- Contrastare con ematossilina (RE7107) per 10 minuti;
- Lavare i vetrini in acqua per 5 minuti;
- Disidratare (EtOH 70%, 80%, 90%, 100%, da 5 minuti ciascuna);
- Immergere i vetrini in xilene per 10 minuti, 2 volte;
- Montare le sezioni con il Mount Eukitt BIO-OPTICA.

4.19 PCR Screening di verifica dell'eliminazione della cassetta di stop

Per essere sicuri dell'espressione tessuto specifica di Akt1^{E17K}, è stata effettuata una PCR di *screening* per valutare se la ricombinasi *Cre* avesse eliminato la cassetta di STOP presente a monte del transgene. La PCR ha previsto l'utilizzo di un *primer LONG 2 NEW REVERSE* 5'-GCCAATGAAGGTGCCATCATTCTTGA-3' e di un *primer TRANS LONG R5* 5'-GGATGGACGGTATCGTAGAGTCGAG-3'.

La *Master Mix* della PCR e il programma del Termociclatore sono i seguenti:

*MASTER MIX*_Volume finale 25 µl

1 µl DNA non diluito

2,5 µl *Buffer* 1x

1,25 µl LONG 2 *LONG 2 NEW REV* 0,5 µM

1,25 µl *primer TRANS LONG R5* 0,5 µM

0,75 µl dNTP 0,3 mM

1 µl TAQ 0,1 U/µl

H₂O fino al raggiungimento del volume finale.

PROGRAMMA TERMOCICLATORE

1) 95°C per 30 secondi

2) 95°C per 30 secondi

3) 60°C per 30 secondi

4) 72°C per 20 secondi

5) Ripetizione dallo step 2 al 4 per 35 cicli

6) 72°C per 42 secondi

7) 4°C for ever

I prodotti di PCR sono stati visualizzati con Etidio Bromuro mediante elettroforesi sul gel di agarosio all'1,5%.

4.20 Infezione con Adenovirus

L'attivazione del gene *Akt1*^{E17K} è regolata nello spazio e nel tempo grazie all'instillazione nasale di un Adenovirus (Ad5 CMV *Cre* acquistato dal *Gene Transfer Vector* dell'Università dell'Iowa USA) esprime il gene della ricombinasi *Cre*. L'*Adenovirus* è stato somministrato a topi tra le 6-8 settimane di vita. In particolare sono stati instillati per via intranasale 10⁶-10⁷ PFU (*Plaque-Forming Unit*) di *Adenovirus* per topo, in un volume finale di 60 µl in PBS.

4.21 Trattamento con uretano

I topi R26 o R26 *Akt1*^{E17K} sono stati sottoposti a una somministrazione intraperitoneale di una singola dose di uretano: 40 mg di uretano per kg di peso corporeo del topo disciolto in fisiologica sterile allo 0,9%. Dopo 6, 9 e 18 mesi i topi sono stati sacrificati per valutare la presenza di lesioni polmonari.

CAPITOLO 5

RISULTATI

5.1 Strategia di *gene targeting* per la generazione del modello murino *knock-in*

R26-Akt1^{E17K}

Nel lavoro sperimentale in oggetto abbiamo generato un modello condizionale *Cre/loxP* hAkt1^{E17K} che esprime la forma mutata di Akt1 nel *locus* murino Rosa26. Il *locus* di Rosa26 è stato individuato originariamente in un *trap-screening* effettuato su cellule ES murine. Successivamente è stato osservato che la sua espressione è ubiquitaria non solo durante lo sviluppo embrionale ma anche nel topo adulto. Il *targeting* del *locus* di Rosa26 attraverso l'utilizzo di vettori specifici avviene con una elevata efficienza (~25%), per cui il *locus* in oggetto viene preferenzialmente scelto nelle strategie di *knock-in*, per la generazione di modelli murini geneticamente modificati. Il vettore per il *gene targeting* R26-Akt1^{E17K} riprende il costrutto originale usato da Phil Soriano per la

generazione di topo *reporter* R26 *Cre* [49]. Il *backbone* di partenza è mostrata in figura 10.

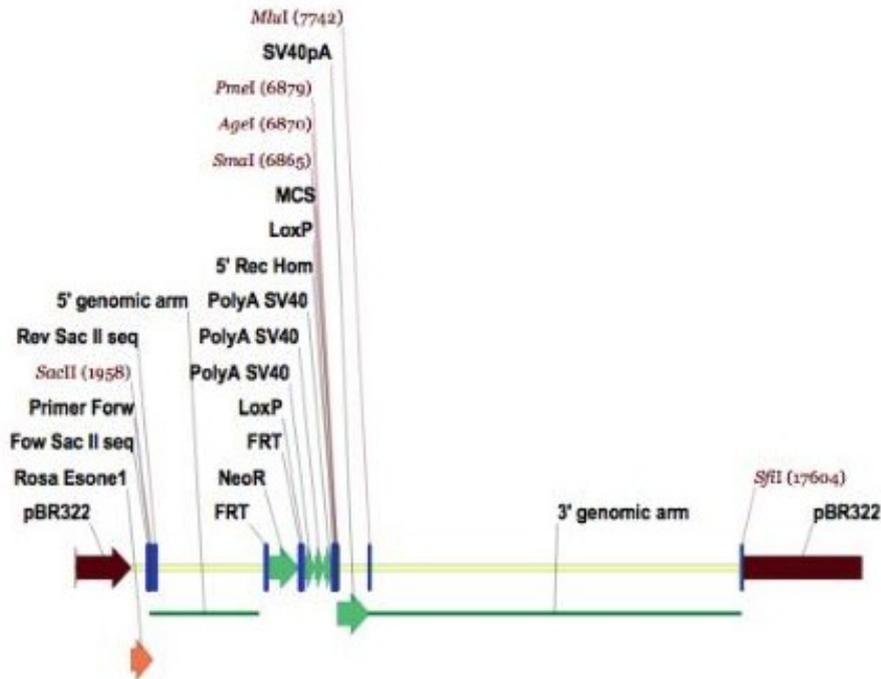


Figura 10. Mappa del plasmide pRosa26.

Abbiamo quindi a disposizione il vettore pRosa26 costruito sul *backbone* di pBR322, che fornisce gli elementi per la propagazione in procarioti. A questo vettore sono stati aggiunti i seguenti elementi: una sequenza di circa 2800 bp corrispondente al braccio di omologia al 5' del *locus* murino; immediatamente a valle un sito accettore di *splicing* (SA), a cui segue la cassetta contenente il gene per la resistenza alla neomicina (Neo^R cassetta) fiancheggiata da due siti *Frt*. Al 3' della cassetta Neo^R è stata inserita una tripla sequenza di poli-adenilazione di SV40, fiancheggiata da due siti *lox*, che ha la funzione di prevenire la trascrizione del *locus* fino a che non venga eliminata la sequenza da parte della *Cre* ricombinasi. Infine al 3' è stata inserita la regione corrispondente al braccio di omologia al 3' del *locus*, di circa 9800bp. Per potere utilizzare questo vettore per il *gene targeting* di Akt1^{E17K} lo abbiamo ulteriormente modificato. In particolare, non essendoci siti unici di restrizione che permettessero l'inserzione di un cDNA a valle del triplo *polyA* e a monte del braccio di omologia al 3', abbiamo inserito una sequenza di multiclonaggio seguita dalla sequenza dell'introne

della β -globina e della sequenza di poli-adenilazione di SV40. Questi ultimi elementi andranno a stabilizzare il messaggero per Akt1^{E17K}, una volta trascritto.

A tale scopo abbiamo utilizzato il vettore *pBS-KS* per eseguire tutte le modifiche necessarie. Tra i siti NotI e MluI abbiamo inserito la sequenza di multi-clonaggio contenente i siti di restrizione unici indicati in figura 11.

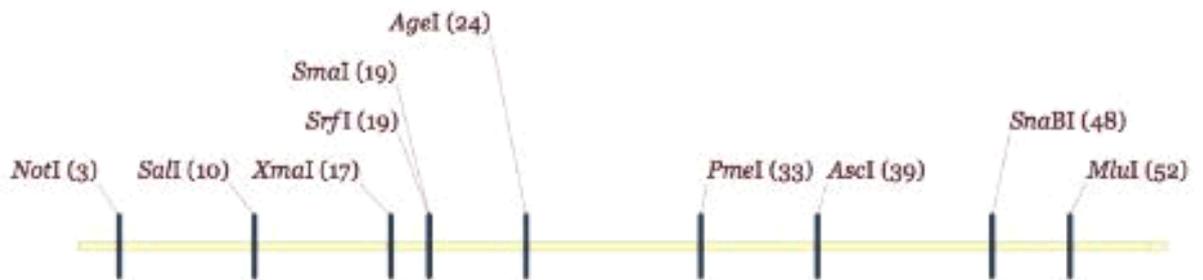


Figura 11. Siti di restrizione unici inseriti nella sequenza di multi clonaggio

In particolare è stata sintetizzata la sequenza nucleotidica di interesse e dopo un *annealing* in vitro, inserito il doppio filamento in *pBS* attraverso tecniche di clonaggio tradizionali. Ottenuto il clone batterico positivo indicato come *pBS-MCS Rosa26*, abbiamo inserito la sequenza dell'introne della β -globina e di poli-adenilazione di SV40 recante a monte il sito di restrizione AscI e a valle il sito MluI. Il sito AscI ha le estremità compatibili con quelle di MluI, quindi è stato inserito in *pBS-MCSRosa26* sfruttando il sito MluI. Dallo *screening* dei cloni positivi abbiamo ottenuto quindi il vettore finale *pBS-MCS SV40 polyA Rosa26* (Figura 12).

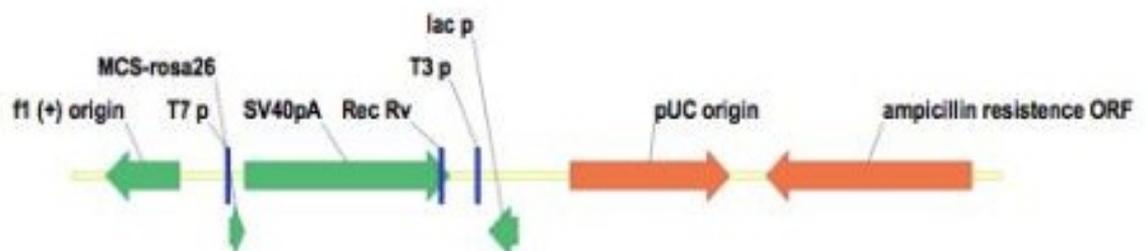


Figura 12. Mappa del vettore pBS-MCS-SV40 polyA Rosa26.

Prima di ottenere il costrutto finale, abbiamo compiuto un ulteriore passaggio intermedio: a monte del sito di multi-clonaggio, in particolare tra i siti Sac II e NotI abbiamo clonato tutta la regione di pRosa26 contenuta tra gli stessi siti (Figura 13).

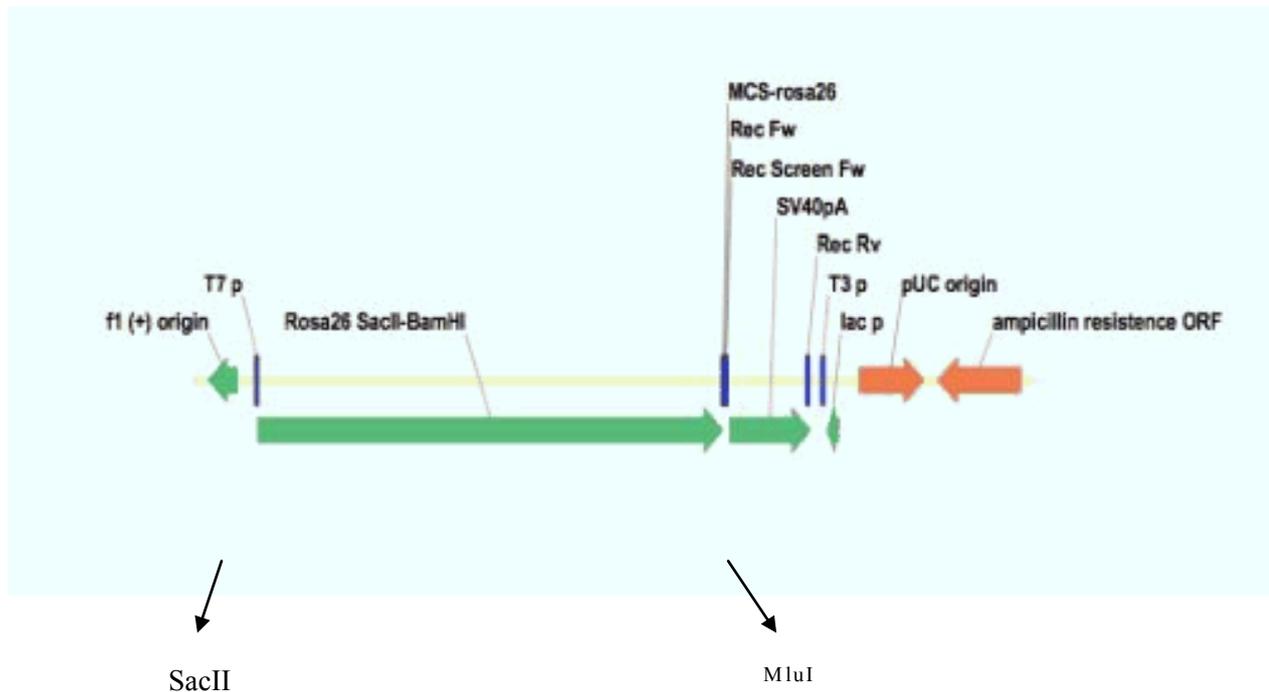


Figura 13. Mappa del vettore pBS-MCS-SV40 polyA Rosa26 con aggiunto il frammento SacII-NotI contenente gli elementi da inserire in pRosa26.

Solo a questo punto abbiamo effettuato il passaggio finale, vale a dire quello di sostituire in pRosa26 tutta la regione compresa tra SacII e MluI con quella costruita in pBS tra gli stessi siti ottenendo il costrutto finale che abbiamo indicato come pRosa26 *Shuttle* (Figura 14).

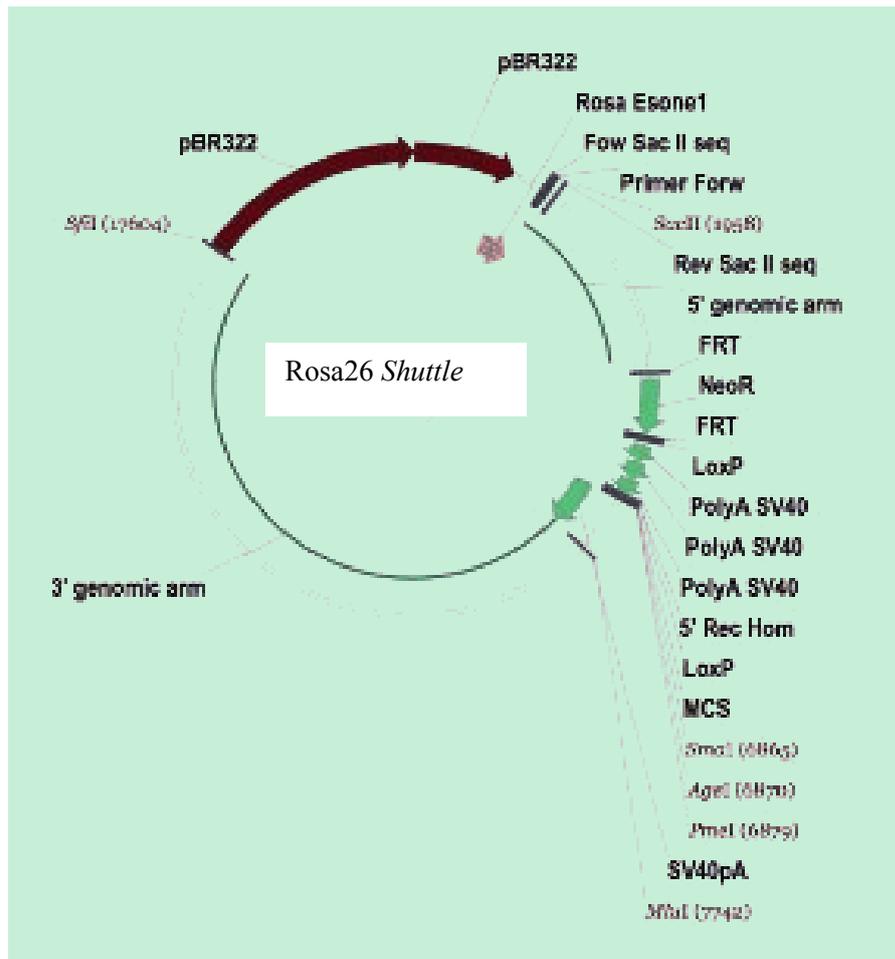


Figura 14. Mappa del vettore Rosa26 Shuttle.

Allo scopo di generare il modello murino recante la mutazione E17K nel gene Akt1 umano, è stato amplificato il cDNA codificante per Akt1 utilizzando oligo contenenti specifici siti di restrizione per il successivo clonaggio in *pBluScript-KS*. Il prodotto di PCR così ottenuto della lunghezza di circa 1,4 Kb è stato digerito con gli enzimi di restrizione EcoRV e MluI inseriti durante la PCR, rispettivamente al 5' e al 3', e clonato nel vettore *pBluScript-KS*. Attraverso mutagenesi sito specifica abbiamo ottenuto la sostituzione del nucleotide 49 G>A ottenendo così la mutazione attivante E17K. Il cDNA hAkt1^{E17K} è stato poi inserito attraverso una reazione di ligasi nel MCS di *pRosa26 shuttle* generando il costrutto finale *pRosa26hAkt1^{E17K}* (Figura 15).

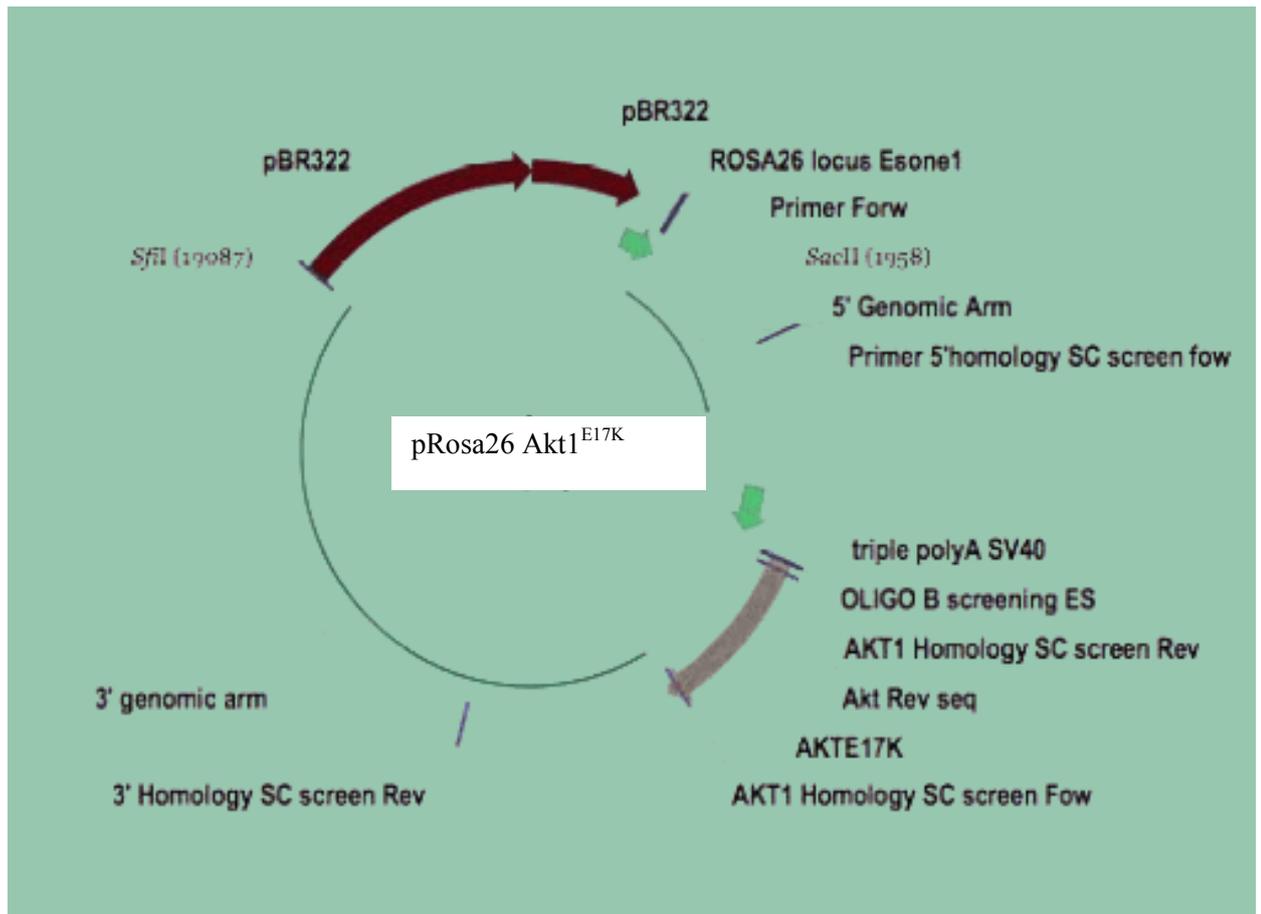
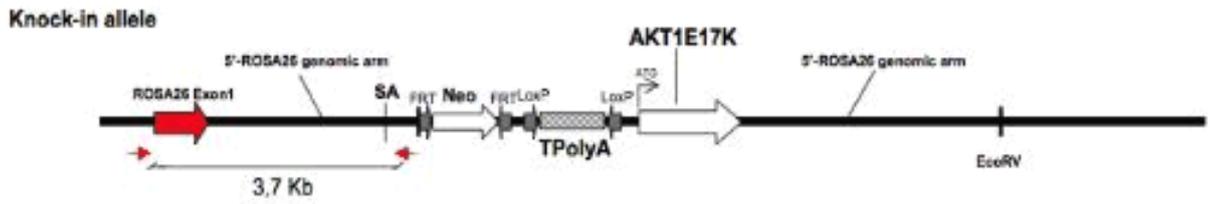


Figura 15. Mappa del vettore R26-Akt1^{E17K}.

Una volta ottenuto, il vettore è stato linearizzato con l'enzima di restrizione SfiI e elettroporato nelle cellule staminali murine R1/129/Sv. A 48h dall'elettroporazione le cellule sono state coltivate in un mezzo selettivo contenente G418, che ha selezionato le cellule che hanno ricombinato da quelle che non hanno incorporato il costrutto. Sono stati isolati circa 300 cloni di cellule staminali resistenti al G418. Dai cloni recipienti si è proceduto ad estrarre il DNA genomico su cui è stato effettuato uno *screening* di PCR, allo scopo di individuare i cloni ricombinanti nel *locus* di Rosa 26. Per ottenere questo risultato abbiamo amplificato un frammento di DNA che comprendesse una regione a partire da un punto immediatamente a monte del braccio di omologia al 5' e un punto interno al costrutto generato. In figura 16 viene mostrato il *locus* ricombinante con indicati gli oligo senso e antisense utilizzati nello *screening* di PCR.

a



b

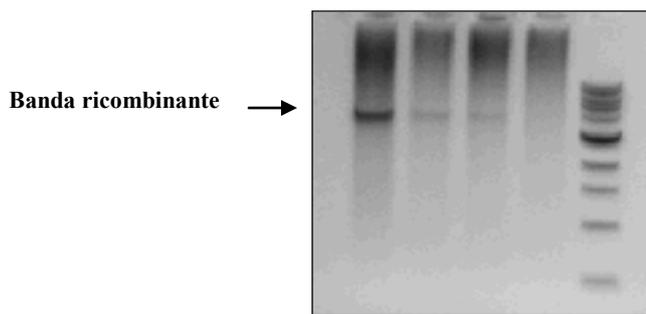


Figura 16. PCR screening delle cellule ES: a) Mappa dell'allele ricombinante con indicati gli elementi inseriti. Con le frecce rosse vengono indicate le posizioni degli oligo utilizzati per lo *screening* delle cellule ES. b) Gel elettroforesi del prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione del DNA genomico con gli oligo indicati.

Dallo *screening* sono risultati positivi il 25% dei cloni analizzati. Di tutti i positivi sono stati scelti 6 cloni, amplificati e sottoposti ad un secondo screening per *Souther Blot* per verificare l'assenza di integrazioni *random*. I frammenti di ibridazione attesi sono di 11.5Kb per la banda wt mentre la banda ricombinante è di 4.3Kb. Il corretto *gene targeting* è stato confermato per 5 dei 6 cloni analizzati e il clone che presentava integrazioni *random* non è stato considerato. In figura 17 pannello a è mostrato graficamente la posizione del *probe* utilizzato per l'ibridazione del DNA genomico. Nel pannello b le bande di ibridazione corrispondenti all'allele wt e a quello ricombinante.

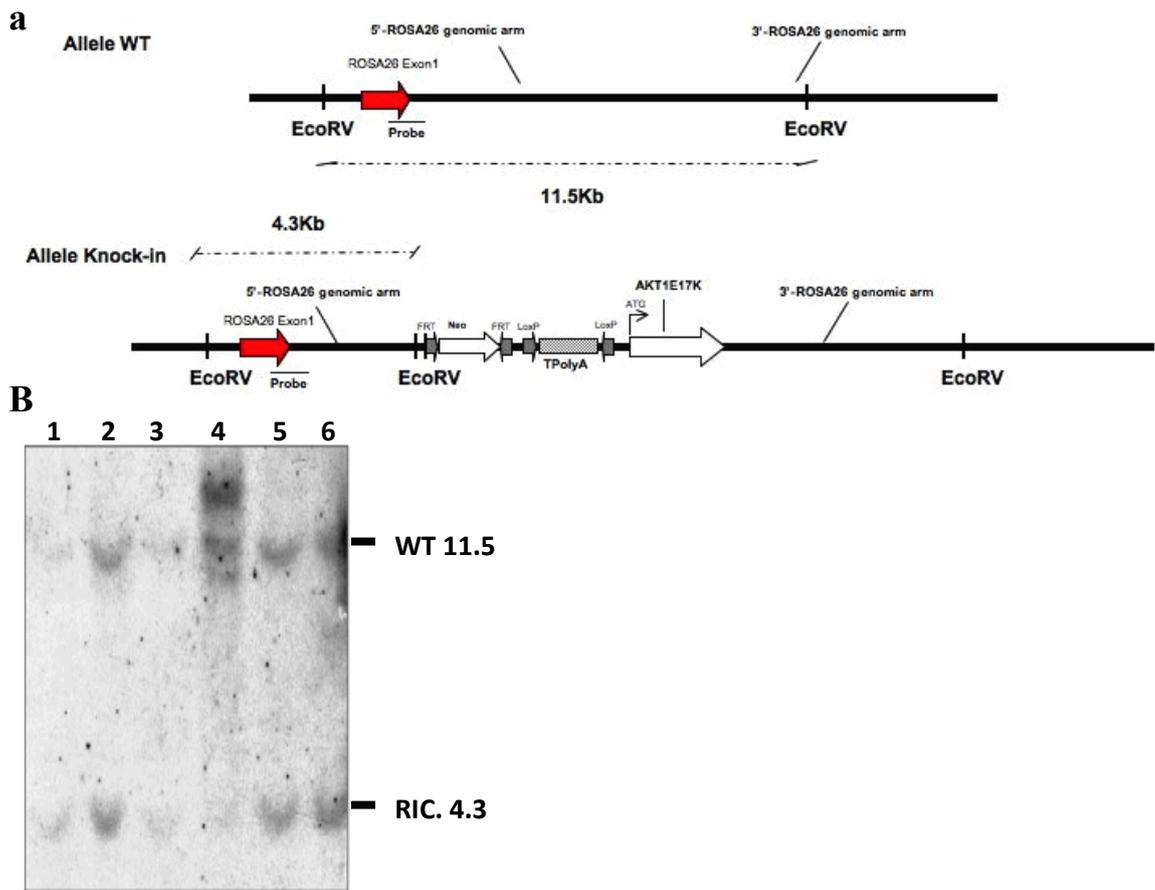
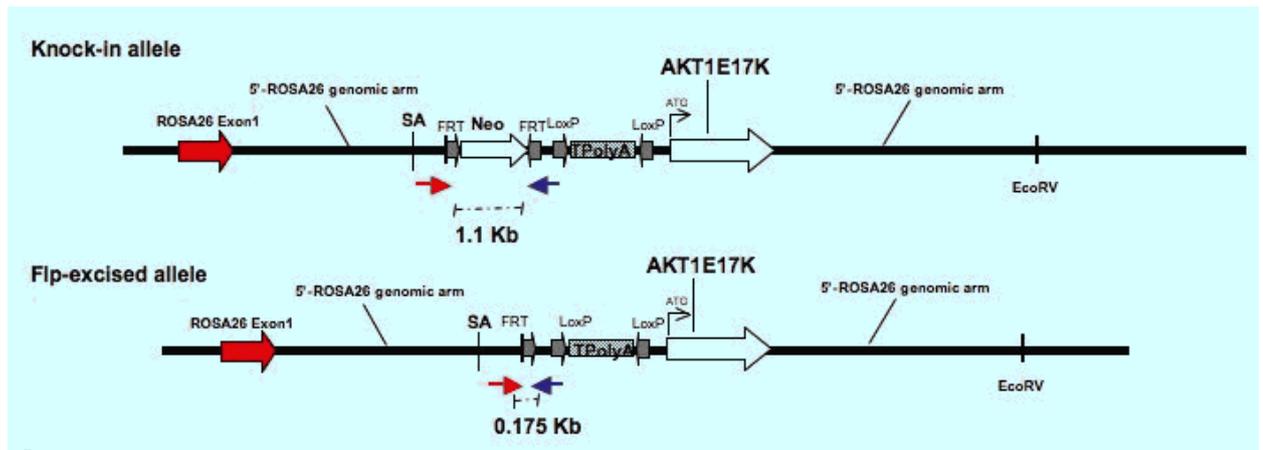


Figura 17. Southern Blot delle cellule ES: a) Mappa dell'allele ricombinante e dell'allele *wt* con indicata la posizione del *probe* e i frammenti di restrizione attesi dalla digestione con *EcoRV*. b) Risultato del *Southern Blot* effettuato su 6 cloni, con indicate le bande ricombinanti (*ric*) e *wt* attese.

Per permettere l'espressione del gene d'interesse il passaggio successivo è quello di eliminare la cassetta *neo* attraverso l'azione della ricombinasi *Flp* derivata da *Saccharomyces Cerevisiae*. Il clone scelto dall'analisi per *Southern Blot* è stato transfettato con un vettore codificante per la ricombinasi *Flp* che porterà all'escissione della cassetta Neo^R .

Le cellule che hanno ricombinato vengono mantenute in coltura in presenza di puomicina che seleziona le cellule contenenti il plasmide per la ricombinasi *Flp*. Una volta selezionate, le cellule sono state sottoposte ad un secondo *screening* di PCR, utilizzando oligo specifici che discriminano tra le cellule che contengono ancora la cassetta Neo^R e le cellule in cui tale elemento è stato escisso.

a



b

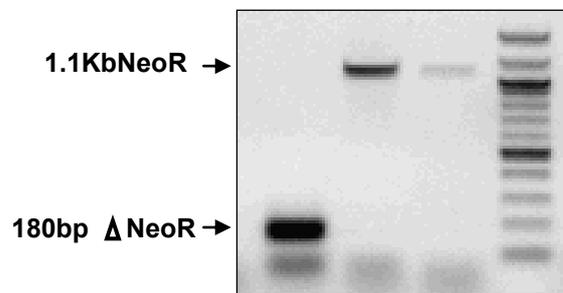


Figura 17. PCR screening delle cellule ES *Flp*: a) Mappa dell'allele ricombinante con indicati gli elementi inseriti. Con le frecce rosse e blu vengono indicate le posizioni degli oligo *Forward* e *Reverse* rispettivamente utilizzati per lo *screening* delle cellule ES in seguito ad escissione della cassetta Neo. b) Gel elettroforesi del prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione del DNA genomico con gli oligo indicati.

Il clone così ottenuto è stato microiniettato in blastocisti C57BL/6 per la generazione di topi chimerici. Successivamente la chimera è stata incrociata con C57BL/6 e la progenie derivata direttamente dalle cellule 129/Sv iniettate avrà il colore del pelo aguti. A questo punto la modificazione genetica è stata trasmessa con successo in linea germinale. I topi ottenuti verranno da qui indicato come R26-Akt1^{E17K}. La presenza dello specifico allele *knock-in* è stata valutata attraverso un'analisi del genotipo in una reazione di PCR a tre oligo, effettuata sul DNA estratto da biopsie di coda.

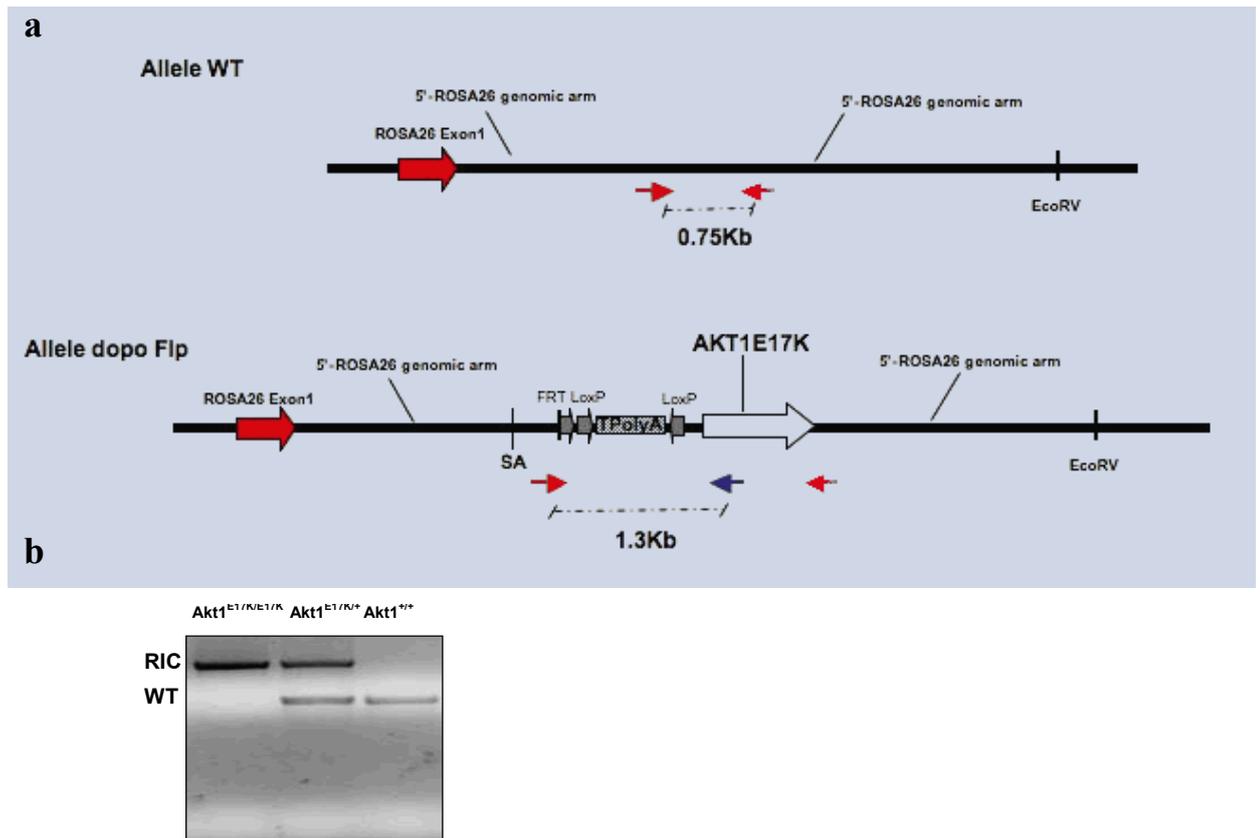


Figura 18. PCR screening del genotipo dei topi R26-Akt1^{E17K}: a)Mappa dell'allele *wt* e dell'allele ricombinante con indicati gli elementi inseriti. Con le frecce vengono indicate le posizioni degli oligo utilizzati per l'analisi del genotipo nella reazione di PCR effettuata su DNA genomico estratto da biopsie di coda. b) Gel elettroforesi di prodotti di PCR ottenuti per i topi omozigoti, eterozigoti e *wt*.

5.2 Analisi di espressione di Akt1^{E17K} nelle cellule ES R26-Akt1^{E17K} ricombinanti

L'espressione del gene hAkt1^{E17K} è sotto il controllo trascrizionale del *locus* di Rosa26. Il trascritto generato è bicistronico: Rosa26 esone1-cDNA Akt1^{E17K}, in quanto attraverso un sito accettore di *splicing* (SA) l'esone 1 viene fuso con hAkt1^{E17K}. Essendo un *targeting* di tipo condizionale soltanto in seguito all'escissione della cassetta *lox-STOP-lox*, che contiene un triplo segnale di poli-adenilazione si ottiene l'espressione del transgene. Per saggiare l'espressione dell'allele condizionale il clone di cellule ES ricombinate, utilizzato per la generazione del modello murino, è stato trasfettato con un plasmide codificante per la ricombinasi *Cre*. In figura 19 è indicata la struttura dell'allele condizionale e dopo l'escissione del triplo polyA.

a

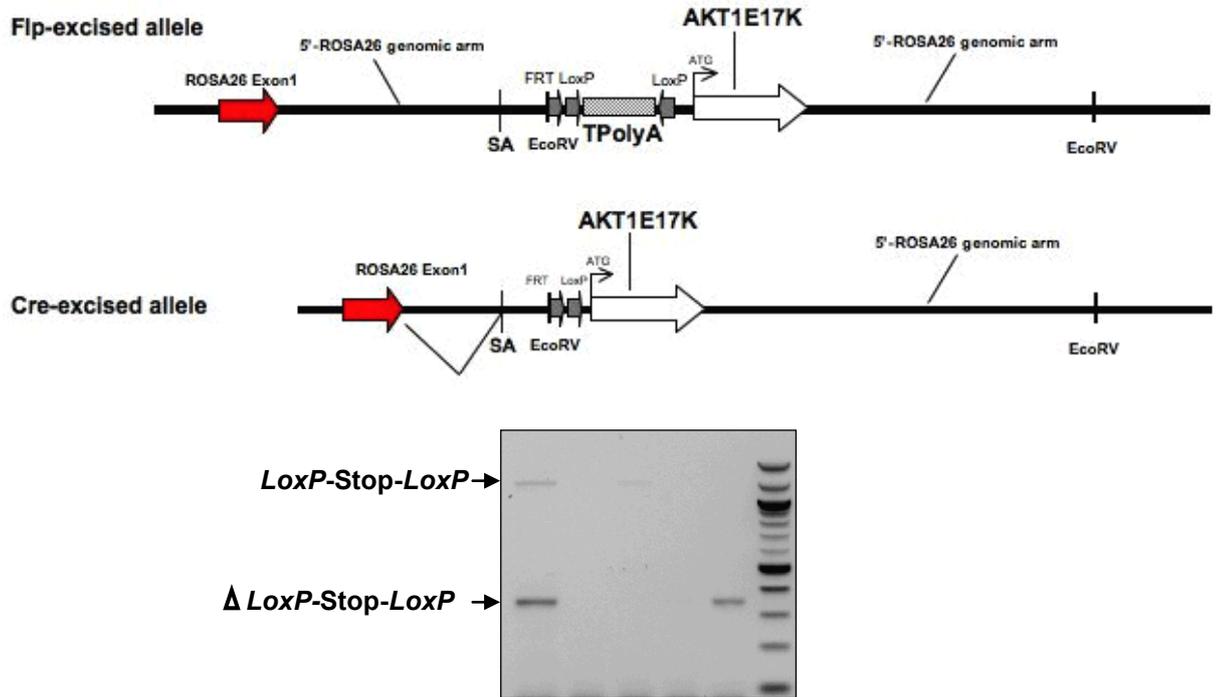


Figura19. PCR screening delle cellule ES *Cre*: a) Mappa dell'allele ricombinante con indicati gli elementi inseriti prima e dopo escissione della cassetta di STOP. b) Gel elettroforesi del prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione del DNA genomico delle cellule ES dopo delezione della cassetta di STOP.

Allo scopo di valutare in vitro l'espressione dell'allele transgenico hAkt1^{E17K} abbiamo effettuato un'analisi di Q-PCR sul messaggero estratto dal clone di cellule ES prima e dopo la trasfezione con il plasmide codificante per la ricombinasi *Cre*. In aggiunta l'analisi quantitativa è stata estesa anche allo RNA estratto da cellule ES *wt*. Lo RNA totale è stato purificato e trattato con DNasi per evitare eventuali contaminazioni da DNA genomico. In seguito a retrotrascrizione il cDNA ottenuto è stato utilizzato come template in una reazione di PCR quantitativa. In fig 19, pannello a, è mostrata l'analisi di espressione. La valutazione è di tipo relativo, imponendo il valore 1 all'espressione del trascritto delle cellule ricombinate o dopo *Flp*. Come si evince da grafico l'escissione della cassetta di STOP, dopo la ricombinasi *Cre*, induce un notevole incremento della quantità di trascritto specifico che sta ad indicare il corretto funzionamento del *gene targeting* condizionale.

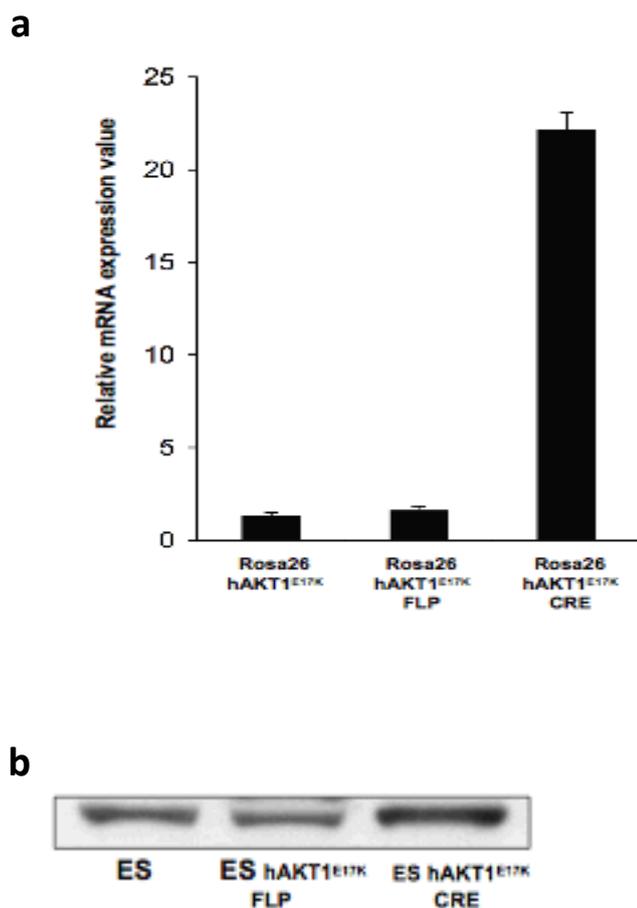


Figura 20. Analisi di espressione di hAkt1^{E17K} in ES: a) *Real Time* PCR su RNA estratto dalle cellule ES prima e dopo *Cre*. b) *Western Blot* condotto su estratti proteici ottenuti dalle cellule ES prima e dopo *Cre* con anticorpo specifico per Akt1.

In aggiunta abbiamo effettuato anche un'analisi di *Western Blot* (Figura 20 pannello b) che conferma il dato ottenuto sul messaggero specifico: l'espressione del transgene è indotta in maniera significativa in seguito all'escissione della cassetta di *loxP*-*Stop-loxP*, il transgene hAkt1^{E17K} si esprime come si evince dal *western blot* in cui è stato utilizzato un anticorpo specifico per Akt1.

5.3 Analisi di espressione di Akt1^{E17K} nel modello murino R26-Akt1^{E17K}

Allo scopo di valutare l'espressione del transgene inducibile hAkt1^{E17K} e studiarne la capacità oncogenica nel modello generato e descritto precedentemente abbiamo incrociato i topi R26-Akt1^{E17K} con un topo che esprime la ricombinasi *Cre* sotto il controllo del promotore di *Ttf1*. Abbiamo ottenuto topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K}; *Ttf1-Cre*. In questa linea murina la delezione della cassetta di STOP fiancheggiata da due siti *loxP* avviene quasi esclusivamente a livello polmonare.

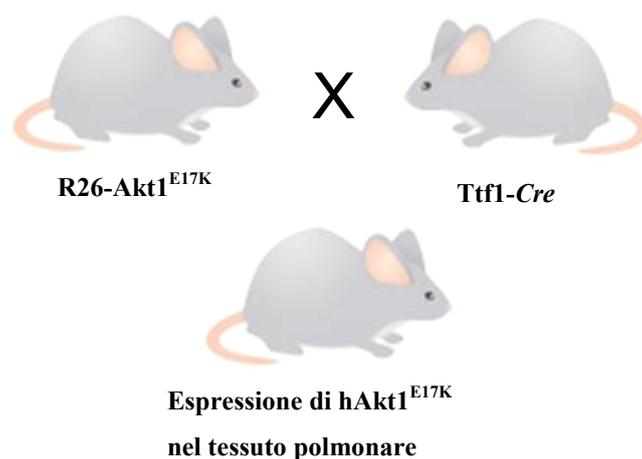


Figura 21. Schema dell'incrocio effettuato tra i topi Ttf1-Cre e R26-Akt1^{E17K} per la generazione del doppio transgenico R26-Akt1^{E17K} /Tt11-Cre.

Abbiamo inizialmente valutato l'efficienza di ricombinazione attraverso un'analisi di PCR sul DNA estratto dal tessuto polmonare. In figura 22 a è indicata la posizione degli oligo utilizzati nella reazione. In b sono indicati i prodotti di PCR attesi, vale a dire il prodotto corrispondente all'allele ricombinato e la banda corrispondente all'allele condizionale. Abbiamo effettuato questa analisi sia sui topi R26-Akt1^{E17K};Ttf1-Cre eterozigoti e omozigoti per il transgene in esame, sia sui topi fratelli R26-Akt1^{+/+} che R26-Akt1^{E17K}. Come da atteso i topi non transgenici per Akt1^{E17K} non mostrano né la banda corrispondente all'allele condizionale né quella recante la delezione della cassetta *loxP*-STOP-*loxP*. I topi invece con genotipo Akt1^{E17K}/Ttf1-Cre sia eterozigoti che omozigoti presentano entrambi i prodotti di PCR, indicando così che la ricombinazione è avvenuta, ma non in tutte le cellule, come da atteso, visto che l'espressione di Ttf1 è ristretta alle cellule epiteliali bronchiali e alveolari.

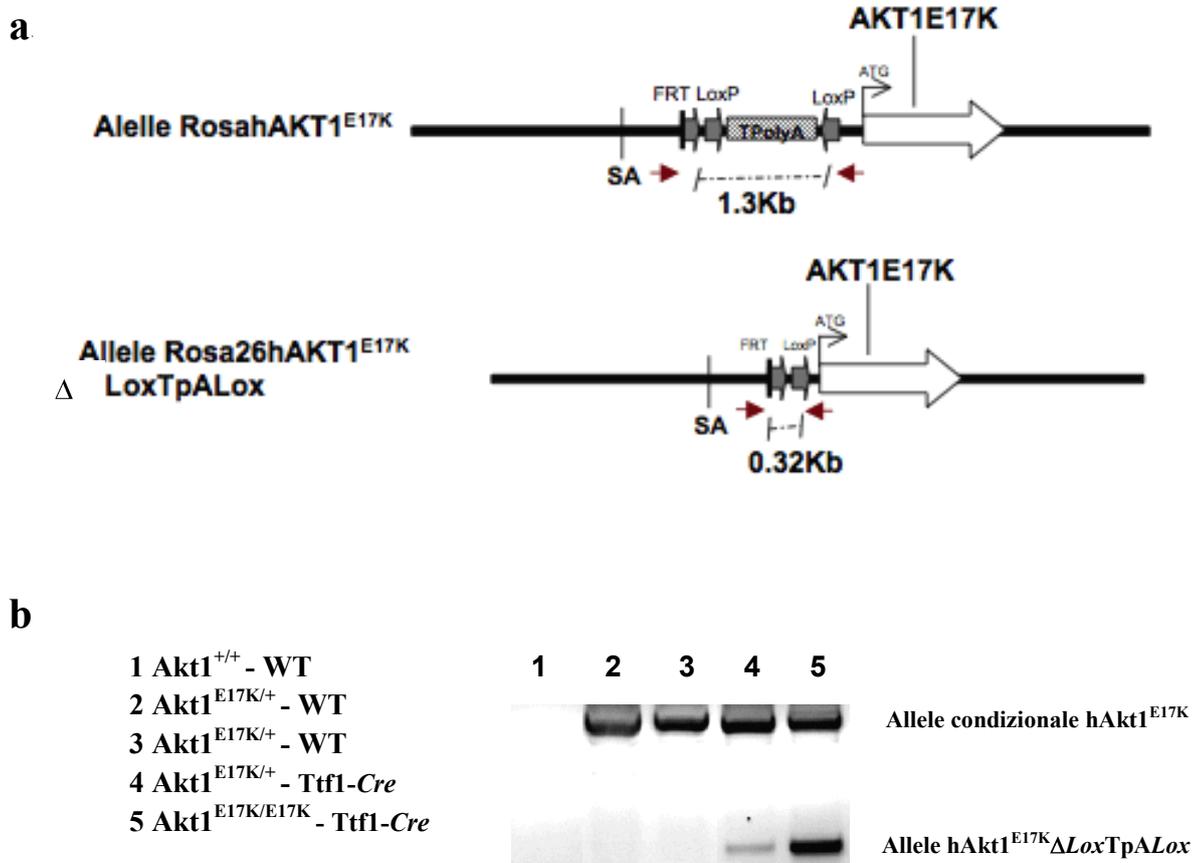


Figura 22. PCR screening dei topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K}-Ttf1-Cre

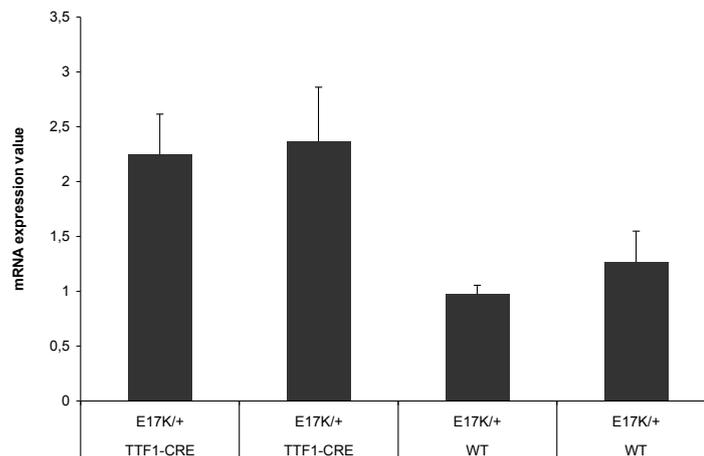
a) Mappa dell'allele ricombinante con indicati gli elementi inseriti. Con le frecce rosse vengono indicate le posizioni degli oligo Forward e Reverse rispettivamente utilizzati per lo *screening* dell'avvenuta ricombinazione in seguito all'escissione della cassetta di STOP. b) Gel elettroforesi dei prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA genomico con gli oligo indicati, corrispondenti all'allele R26-Akt1^{E17K} e all'allele deleto. In figura sono mostrati i risultati ottenuti dai topi con i genotipi indicati.

La prima analisi di espressione è stata condotta sullo RNA totale in una Q-PCR. I topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K}/Ttf1-Cre di 6-7 settimane sono stati sacrificati e sono state effettuate delle biopsie polmonari. È stato estratto lo RNA totale e il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato utilizzato come stampo in una reazione di Real Time allo scopo di valutare l'espressione del messaggero specifico. Nella reazione sono stati utilizzati anche dei controlli rappresentati dai topi della linea parentale R26-Akt1^{E17K}, non incrociata con il topo Ttf1-Cre.

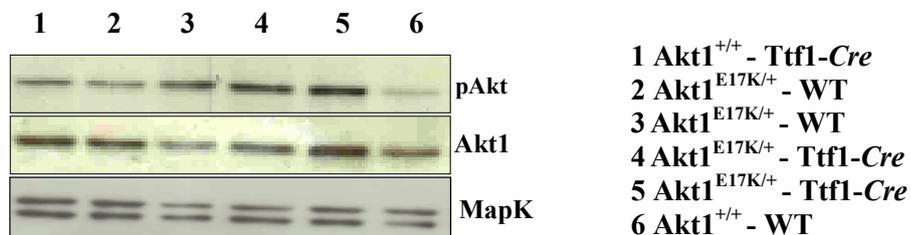
Come si evince dall'analisi quantitativa mostrata in figura 23, pannello a, nei topi doppi transgenici c'è un'induzione del trascritto umano specifico per Akt1^{E17K} di circa 2,5 volte rispetto ai topi di controllo il cui valore di espressione è stato fissato uguale a 1.

C'è una trascrizione basale del messaggero bicistronico, segno che l'attività del promotore del locus di Rosa26 è molto forte. Sulla base dei risultati ottenuti nell'analisi di *Real Time* abbiamo effettuato una valutazione dei livelli di Akt fosforilato. Gli estratti proteici ottenuti dalle biopsie polmonari dei topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K}/Ttf1-Cre e della linea parentale di controllo R26-Akt1^{E17K} sono stati analizzati in un esperimento di *Western Blot* utilizzando sia un anticorpo che valuti la quantità totale di Akt1 che la forma attiva, attraverso l'utilizzo di un anticorpo diretto contro la Ser473 come mostrato in figura 23 pannelo b e c. I topi esprimenti hAkt1^{E17K} indotta dalla ricombinasi Cre, mostrano un livello di attivazione della chinasi superiore rispetto ai topi in cui il trascritto non è espresso, come mostrato anche nel grafico in cui è riportata l'analisi densitometrica delle bande specifiche per pAkt e Akt1.

a.



b



c

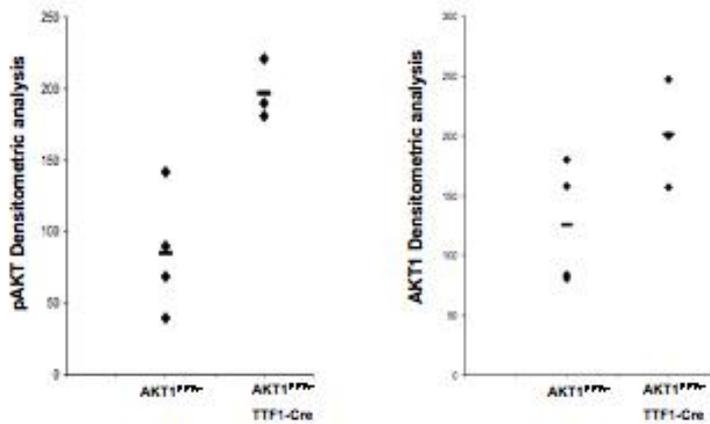


Figura 23. Analisi di espressione di hAkt1^{E17K} nei topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K}/Ttf1-Cre: a) Analisi di *Real Time* condotta su RNA estratto dai topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K}/Ttf1-Cre e sui topi fratelli R26-Akt1^{E17K} b) WB condotto su estratti proteici da polmone di topi con genotipo indicato in figura con anticorpo specifico per Akt1. c) Analisi densitometrica delle bande. In grafico sono riportate con il simbolo - le medie dei valori ottenuti dall'analisi quantitativa di ciascun topo considerato.

Successivamente abbiamo voluto valutare lo stato di attivazione dei diversi substrati a valle di Akt nel tessuto polmonare derivante dai topi R26-Akt1^{E17K}; Ttf1-Cre. Dall'analisi di *western blot* abbiamo potuto constatare che Akt risulta essere maggiormente fosforilato nei topi recanti la mutazione E17K. L'aumento di attivazione di Akt1 ha come risultato un maggiore livello di fosforilazione con un aumento della sua attività chinastica su di una serie di substrati a valle: GSK, FOXO1 e p27 (Fig. 24).

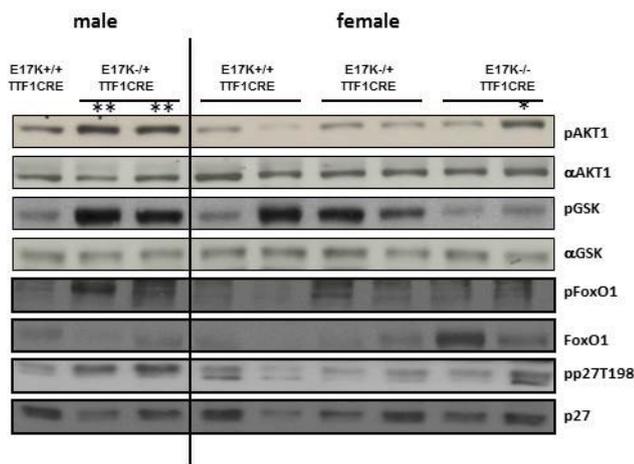


Figura 24. Analisi dei livelli di espressione proteica di Akt1 e di substrati a valle nei topi R26-Akt1^{E17K};Ttf1-Cre.: Analisi di *immunoblot* a partire da polmoni di topi maschi e femmine R26-Akt1^{+/+}, R26-Akt1^{E17K/+} e R26-Akt1^{E17K/E17K}. **/*: topi nei quali è avvenuta la delezione della cassetta di STOP.

Una volta confermata la corretta espressione nel polmone del transgene mutato Akt1^{E17K} attraverso analisi di *real time* PCR e la sua incrementata attività chinastica attraverso analisi di *western blot*, abbiamo proceduto all'analisi istologica al fine di valutare eventuali alterazioni morfologiche a carico dell'epitelio polmonare. A tale scopo sono stati sacrificati dei topi raggruppati per genotipo e per età a 2, 6 e 12 mesi. I topi sacrificati ed è stato effettuato un prelievo di tessuto polmonare. Tutti i polmoni prelevati sono stati processati in modo tale da poter essere sottoposti a colorazione con ematossilina/eosina.

In nessuno dei topi R26Akt1^{E17K/+};Ttf1-Cre di 2 o 6 mesi di età sono state riscontrate alterazioni a carico dell'epitelio polmonare. Al contrario, l'analisi istopatologica rivela la presenza di lesioni iperplastiche con grado da moderato a severo nei polmoni dei topi di un'età di 12 mesi corrispondenti ai topi doppi transgenici R26-Akt1^{E17K/+};Ttf1-Cre (Fig. 25 C-D). Nessuno dei topi di controllo R26-Akt1^{+/+};Ttf1-Cre ha mostrato alterazioni istologiche (Fig. 25 A-B).

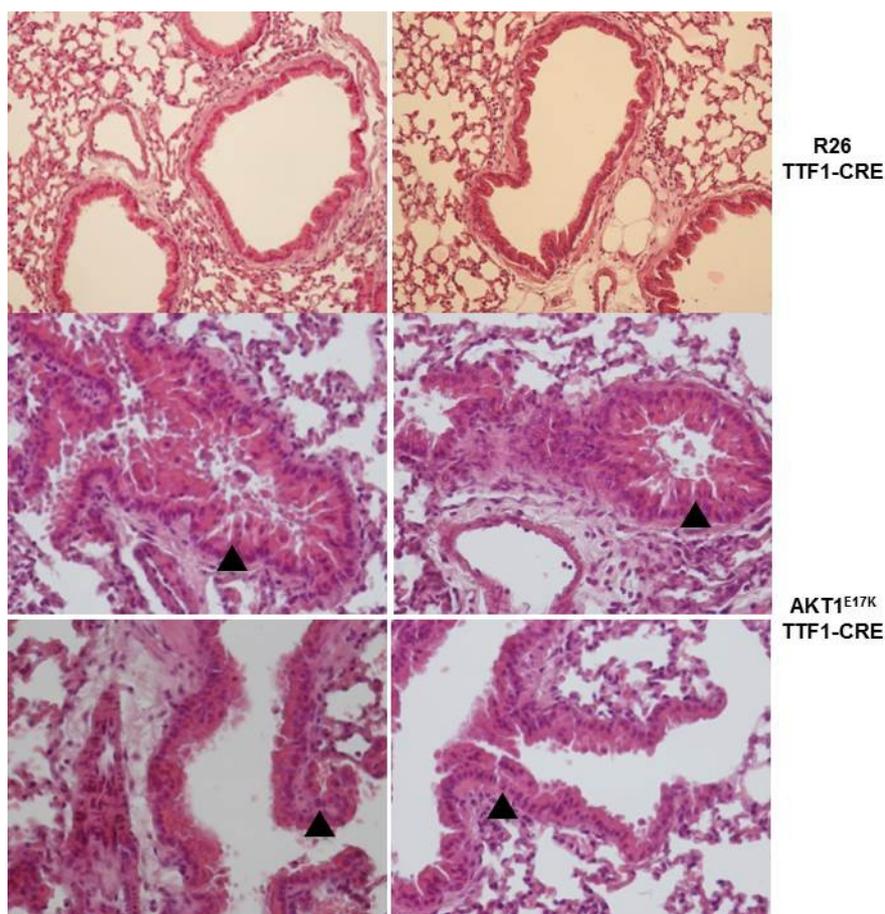


Figura 25. Immunofenotipo di tessuti polmonari: (A-B) Istologia di tessuti polmonari di topi R26-Akt1^{+/+};Ttf1-Cre. (C-F) Immunofenotipo di tessuti polmonari di topi R26-Akt1^{E17K/+};Ttf1-Cre all'età di 12 mesi.

Successivamente si è proceduto ad effettuare un'analisi di immunohistochimica sui polmoni dei topi di 12 mesi al fine di verificare i livelli di attivazione di Akt. A tale scopo le sezioni di tessuto polmonare sono state ibridate con un anticorpo anti-pAkt S473. Come si evince dall'immagine (fig. 26) i livelli di proteina attivata, pAkt S473, risultano incrementati nei punti di iperplasia dei topi R26-Akt1^{E17K/+};Ttf1-Cre rispetto ai topi di controllo R26-Akt1^{+/+};Ttf1-Cre.

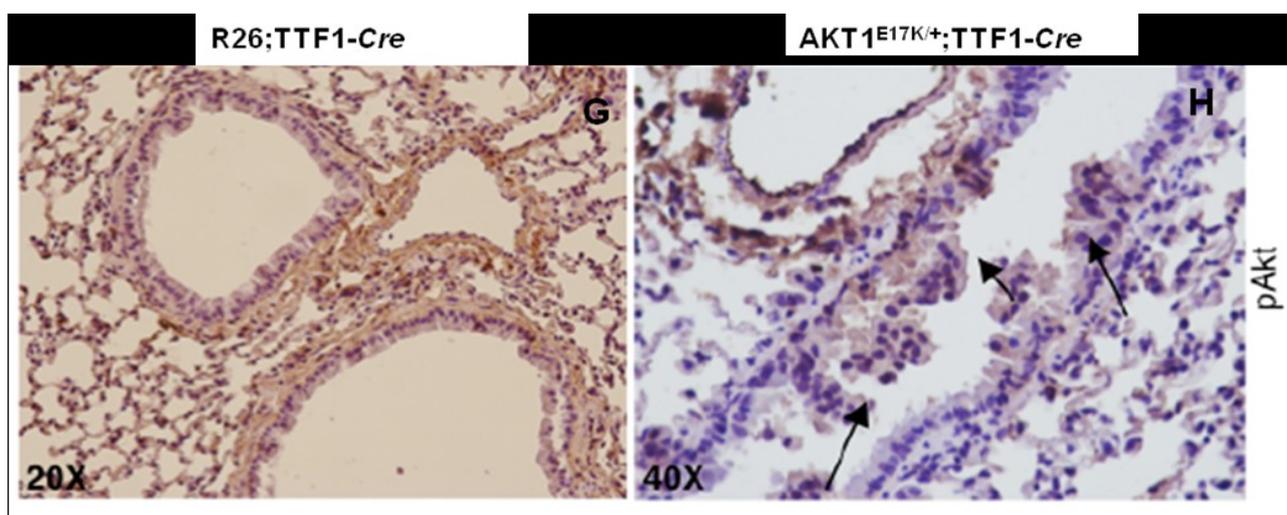


Figura 26. Analisi dei tessuti polmonari (G e H): Immunohistochimica rappresentativa per pAkt S473 di polmoni di topi R26-Akt1^{+/+};Ttf1-Cre (G) e R26-Akt1^{E17K/+};Ttf1-Cre (H) dell'età di 12 mesi.

Al fine di ricapitolare il processo di trasformazione neoplastica che avviene nell'uomo abbiamo condotto un esperimento in cui il mutante Akt1^{E17K} potesse essere attivato in maniera stocastica nell'epitelio polmonare murino. A tale proposito l'attivazione nell'epitelio polmonare è stata indotta attraverso l'instillazione intranasale di un adenovirus (Ad-Cre) codificante la ricombinasi Cre. L'instillazione intranasale di Ad-Cre consente l'attivazione somatica del transgene di interesse. In particolare sono state utilizzate dosi crescenti di Ad-Cre che sono state inoculate a topi di età compresa tra 6-12 settimane suddivisi in due gruppi, in base al genotipo corrispondente R26-Akt1^{E17K/+} e R26-Akt1^{+/+}. Uno stesso numero di topi è stato inoculato con il solo veicolo (PBS). Dopo 6, 9 e 18 mesi dalla somministrazione di Ad-Cre, i topi sono stati sacrificati e i polmoni sono stati sottoposti ad analisi istopatologica.

Nei topi R26-Akt1^{+/+} e R26-Akt1^{E17K/+} trattati solo con il veicolo non sono state riscontrate alterazioni dell'epitelio polmonare, mentre nei topi R26-Akt1^{E17K/+} di 9 mesi sono state riscontrate lesioni focali di iperplasia bronchiale e/o a carico dei bronchioli terminali, con grado da moderato a grave (fig 27 I-K). A 18 mesi dall'inoculo in 2 su 7 topi R26-Akt1^{E17K/+} hanno sviluppato un singolo nodulo polmonare classificato come

adenocarcinoma bronchio-alveolare con *pattern* papillare (fig 27 L). I tumori presentano bordi arrotondati relativamente ben definiti e in periferia comprimono il parenchima polmonare circostante.

Attraverso i modelli R26-Akt1^{E17K/+};Ttf1-Cre e R26-Akt1^{+/+};Ttf1-Cre abbiamo verificato che la forma mutata Akt1^{E17K} è in grado di indurre iperplasia in topi di 12 mesi dalla nascita.

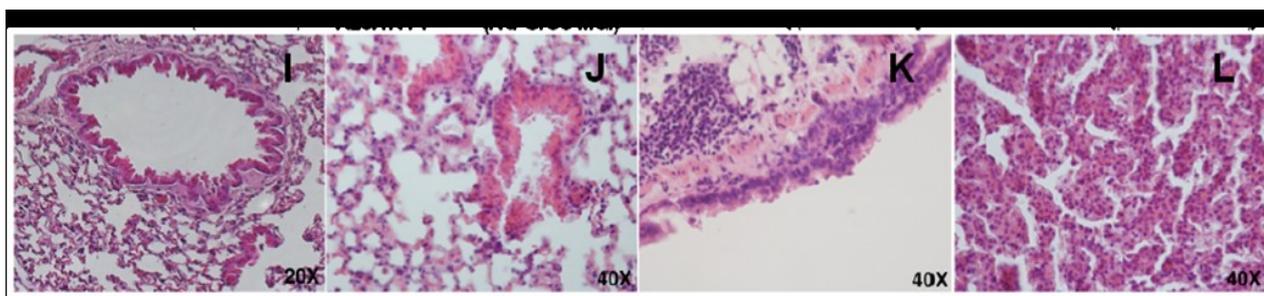


Figura 27. Akt1^{E17K} promuove lo sviluppo di iperplasia bronchiale e di tumore nei polmoni murini: colorazione rappresentativa di ematossilina/eosina dell'epitelio polmonare di topi R26AKT1^{E17K/+} trattati con il veicolo o infettati con Ad-Cre (9 e 18 mesi).

I risultati delle analisi di immunohistochemical mostrano elevati livelli di pAkt nei polmoni iperplastici e neoplastici dei topi R26-Akt1^{E17K/+} infettati con Ad-cre rispetto ai topi di controllo.

5.4 Il mutante Akt1^{E17K/+} accelera lo sviluppo tumorale aumentando numerosità e dimensioni tumorali indotte da uretano

A questo punto è stata valutata la possibilità di una cooperazione tra la mutazione di Akt1^{E17K} e altri eventi oncogenici nello sviluppo del cancro polmonare, attraverso l'utilizzo dell'*ethyl carbamate* (uretano), composto chimico ampiamente utilizzato per i modelli *multi-step* di carcinogenesi polmonare umana. A tal fine, i topi mutanti R26-Akt1^{E17K/+} e i topi di controllo sono stati infettati, attraverso instillazione nasale, con dosi crescenti di Ad-Cre (10^6 - 10^7) e in uno *step* successivo alla loro ripresa, i topi sono stati trattati con uretano o con solo il veicolo. A 6 e 9 mesi dal trattamento con l'uretano i polmoni sono stati espianati e sottoposti ad un'analisi istologica. Nei topi R26-Akt1^{E17K/+} è stato osservato un incremento della numerosità dei tumori polmonari significativamente più alta rispetto ai topi trattati con solo uretano. In media il numero di tumori sviluppati nei mutanti è di 4/polmone dopo sei mesi e di 8,4/polmone dopo nove mesi di trattamento (Ad-Cre+uretano) a differenza dei topi trattati solo con uretano che presentano >0,15 tumori/polmone dopo sei mesi e una media di 2,6

tumori/polmone dopo nove mesi. La somministrazione di uretano nei due gruppi sperimentali precedentemente non esposti ad Ad-Cre induce la formazione di noduli in 1 su 7 topi dopo sei mesi e in 3 su 6 topi dopo nove mesi. Le dimensioni dei tumori riscontrati nei topi mutati, sono proporzionali alla dose di virus somministrato. Non è stata riscontrata nessuna lesione nei topi trattati con il solo veicolo. I noduli sviluppati a 6 mesi sono stati diagnosticati come adenomi bronco-alveolari caratterizzati dalla presenza di nidi di cellule epiteliali circondate da uno stroma fibrovascolare scarso. I tumori di piccole dimensioni (massimo di 1 mm di diametro) erano generalmente localizzati in periferia immediatamente sotto la pleura viscerale. I bordi tumorali erano arrotondati e con poche infiltrazioni del tessuto circostante. Il pleomorfismo nucleare era per lo più basso con nucleoli poco appariscenti e figure mitotiche rare. All'osservazione dei nove mesi, i tumori indotti da uretano erano ancora arrotondati con margini relativamente ben definiti e tendono a comprimere il parenchima polmonare circostante. Complessivamente l'architettura tumorale variava da un *pattern* papillare a solido a un *pattern* misto papillare-solido. Invece i tumori generati dall'uretano nel *background* R26-Akt1^{E17K/+} dopo 6 e 9 mesi sono stati diagnosticati come adenomi/adenocarcinomi bronchioalveolari e presentano più frequentemente il *pattern* papillare. Un'ultima osservazione: a differenza dei tumori di controllo che hanno dimostrato una ridotta o moderata colorazione per pAkt, quelli generati nei topi R26-Akt1^{E17K/+} mostrano uno *staining* marcato di pAkt. In particolare i tumori generati da uretano nel modello R26-Akt1^{E17K/+} presentavano un'apparente invasione locale del parenchima polmonare rispetto a quelli generati nei topi di controllo.

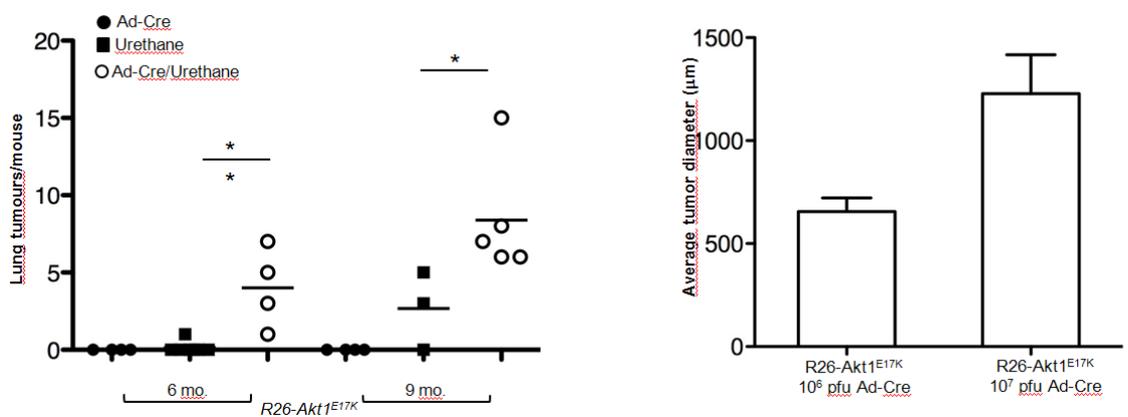


Figura 28. Esperimento Ad-Cre Uretano: I topi R26-Akt1^{E17K/+} e i topi di controllo sono infettati con dosi crescenti di Ad-Cre (10⁶-10⁷). A 6 e 9 mesi è stata valutata la presenza e la numerosità dei tumori.

Discussione

La mutazione *hotspot* E17K nel dominio PH di Akt1 si verifica in circa il 0,6-2% dei pazienti con NSCLC. Tuttavia, il suo ruolo nello sviluppo del cancro al polmone resta ancora controverso. Nello studio descritto sono state valutate le proprietà oncogeniche del mutante Akt1^{E17K} attraverso la generazione di un ceppo murino *knock-in* condizionale in cui il mutante Akt1^{E17K} è sotto il controllo del locus Rosa 26. Dati ottenuti *in vitro* (De Marco et al. in preparazione) dimostrano che la forma mutata di Akt1 è capace di trasformare cellule epiteliali polmonari umane *in vitro*. Le cellule epiteliali trasformate sono in grado, inoltre, di indurre tumore *in vivo* in esperimenti di *xenograft*. Nel modello murino generato (R26-Akt1^{E17K}), l'espressione del transgene nell'epitelio polmonare è stata indotta attraverso due modalità: i) somministrazione intra-tracheale di un adenovirus esprimente la *Cre*, ottenendo così uno *switching* sporadico di cellule in un microambiente ancora in gran parte composto di cellule normali; ii) induzione di espressione del mutante nell'epitelio polmonare attraverso l'incrocio del ceppo R26-Akt1^{E17K} con topi Ttf1-*Cre* [54,55]. I risultati ottenuti dimostrano che l'induzione di espressione del mutante di Akt1 nell'epitelio polmonare induce ad alta frequenza la presenza di iperplasia moderata o grave dei bronchi e/o dei bronchioli terminali. A lungo termine, sebbene a bassa frequenza, le lesioni iperplastiche progrediscono in carcinoma. Sebbene la presenza di un'attivazione di Akt1 indotta dalla mutazione fino ad ora non è mai stata riscontrata nelle lesioni polmonari pre-cancerose isolate da pazienti, un incremento di attività di Akt1 è spesso riscontrato nelle lesioni iperplastiche identificate nel modello murino generato. I risultati ottenuti dimostrano che l'attivazione del *pathway* di Akt può essere considerato un evento precoce che poi successivamente favorisce la progressione tumorale. Da considerare che i tumori polmonari nel modello generato si sviluppano con una maggiore latenza e a più bassa incidenza rispetto ad altri modelli murini di tumore polmonare, quali i mutanti dell'EGFR (3-4 settimane dalla attivazione dell'oncogene) [51,52], PI3K^{H1047R} (12-60 settimane) [41] o Kras^{G12D} [53,54,55]. Un'ulteriore considerazione deriva dall'esperimento di cooperazione in cui è stata valutata la cooperazione tra il mutante Akt1^{E17K} e altre alterazioni oncogeniche. In questi esperimenti si dimostra che il mutante è in grado di cooperare con mutazioni di Kras indotte da un carcinogeno chimico. Questa sinergia tra l'attivazione del *pathway* di PI3K e la mutazione di Kras è evidente anche in topi transgenici che recano la mutazione di PIK3CA [58,59] o nel modello *knock-out* per Pten [45,60]. Le conclusioni tratte da questo studio sono molteplici. In

primo luogo, Akt1^{E17K} è da considerarsi un oncogene che può trasformare le cellule epiteliali polmonari ed avviare processi di tumorigenesi nel polmone *in vivo*. La bassa frequenza di mutazioni Akt1 nei pazienti affetti da cancro al polmone (0,5-2%) potrebbe essere spiegata proprio dal fatto che la sua potenza oncogenica valutata nel ceppo R26 è apparentemente più debole di quella di altri oncogeni che agiscono nel polmone come i mutanti di EGFR, KRAS o PIK3CA. Gli effetti esercitati dal mutante Akt1^{E17K} sono più simili a quelli ottenuti in seguito alla perdita di PTEN. Infine la conclusione derivata da esperimenti condotti in topi transgenici è che Akt1^{E17K} è in grado di promuovere iperplasia in bronchi e alveoli-bronchiali. Akt1^{E17K}, può cooperare con mutazioni di KRAS indotte da uretano in cellule epiteliali di polmone, accelerando la progressione tumorale e la comparsa di tumori invasivi. Questa sinergia tra l'attivazione del *pathway* di PI3K e il mutante K-RAS indica che il *signalling* di entrambi i percorsi è importante per la piena azione oncogenica nelle cellule epiteliali polmonari.

BIBLIOGRAFIA

1. Jing Wen, Jianhua Fu, Wei Zhang and Ming Guo: “Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications”, *Modern Pathology* (2011), 24, 932–943;
2. Hanspeter Witschi: “A Short History of Lung Cancer”, *Toxicological Sciences* (2001), 64, 4–6;
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012”, *International Journal of Cancer* (2014), 136(5):E359–86;
4. J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray: “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012”, *European Journal of Cancer* (2013), 49, 1374–1403;
5. Web site: <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=380>;
6. Patricia de Groot, MD, Reginald F. Munden, MD, DMD, MBA: “Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention”, *Radiologic Clinics of North America* (2012), 863–876;
7. Ahmedin Jemal, Melissa M. Center, Carol DeSantis, and Elizabeth M. Ward : “Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends”, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2010), 19(8):1893-907;
8. Muhammad Furrakh :” Tobacco Smoking and Lung Cancer”, *Sultan Qaboos University Medical Sciences Journal*, August (2013), 13(3):345-58;
9. Charles S. Dela Cruz, MD, PhD, Lynn T. Tanoue, MD, and Richard A. Matthay, MD: “Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention”, *Clinics In Chest Medicine* (2011), 32(4);
10. Janakiraman Subramanian and Ramaswamy Govindan: “Lung Cancer in Never Smokers: A Review”, *Journal of Clinical Oncology* (2007), 25:561-570;
11. Sophie Sun, Joan H. Schiller and Adi F. Gazdar: “Lung cancer in never smokers-a different disease”, *Nature Reviews Cancer*, (2007), (10):778-90;
12. Dott. Ugo Pastorino, Prof.ssa Rossella Silvestrini :” Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per i Tumori del Polmone”, (2007);
13. Robert F. Todd, Teresa G. Hayes, MD, PhD, Kathleen A. Cooney, MD, Martha Pritchett Mims, MD, PhD, Francis P. Worden, MD : “Guideline and Case Reviews in Oncology”, *Tumor Board Review* (2012), 978-1-936287-17-8;

14. Morgan R. Davidson, Adi F. Gazdar, Belinda E. Clarke: "The pivotal role of pathology in the management of lung cancer", *Journal of Thoracic Disease* (2013), 5(S5):S463-S478;
15. William D. Travis, Elisabeth Brambilla, H. Konrad Müller-Hermelink, Curtis C. Harris: "World Health Organization, Classification of Tumours Pathology & Genetics: "Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart", IARC Press (2004);
16. Wendy A. Cooper, David C. L. Lam, Sandra A. O'Toole, John D. Minna: "Molecular biology of lung cancer", *Journal of Thoracic Disease* (2013), 5(S5):S479-S490;
17. Jackie L. Johnson, Smitha Pillai, and Srikumar P. Chellappan: "Genetic and Biochemical Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer", *Biochemistry Research International* (2012), 2012:940405;
18. Min-chul Kwon, Anton Berns: "Mouse models for lung cancer", *Molecular Oncology* (2013), 165-177;
19. Jos Jonkers and Anton Berns: "Conditional mouse models of sporadic cancer", *Nature Review* (2002), (4):251-65.;
20. Amit Dutt and Kwok-Kin Wong: "Mouse Models of Lung Cancer", *Clinical Cancer Research* (2006), 12:4396s-4402s.;
21. Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT.: "Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?", *Biochimica et Biophysica Acta* (1993), 1179(1):27-75;
22. MacDougall LK, Domin J, Waterfield MD.: "A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction", *Current Biology* (1995), (12):1404-15;
23. Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD: "Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting", *Science* (1993), 260(5104):88-91;
24. Hu P, Mondino A, Skolnik EY, Schlessinger J: "Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85", *Molecular Cell Biology* (1993), (12):7677-88;
25. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: "Cellular survival: a play in three Akts", *Genes & Development* (1999), 13(22):2905-27;
26. Staal SP.: "Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma", *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1987), 84(14):5034-7;

27. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN : “A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region”, *Science* (1991), 254(5029):274-7;
28. Karleen M. Nicholson, Neil G. Anderson: “The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy”, *Cellular Signalling* (2002), 381 – 395;
29. Bellacosa A, Franke TF, Gonzalez-Portal ME, Datta K, Taguchi T, Gardner J, Cheng JQ, Testa JR, Tsichlis PN: “Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications “, *Oncogene* (1993), (3):745-54;
30. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA: “Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1991), 15;88(10):4171-5;
31. Lemmon MA¹, Ferguson KM: “Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains”, *Biochemical Journal* (2000), 15;350 Pt 1:1-18;
32. Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA: “Molecular cloning of a second form of rac protein kinase”: *Cell Regulation* (1991), 2(12):1001-9;
33. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR: “Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation”, *Biochemical Journal* (1996), 1;315 (Pt 3):709-13;
34. Brendan D. Manning and Lewis C. Cantley: “AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream”, *Cell* (2007), 29;129(7):1261-74;
35. Eva Forgacs, Eric J Biesterveld, Yoshitaka Sekido, Kwun Fong, Sabeeha Muneer, Ignacio I Wistuba, Sara Milchgrub, Ruth Brezinschek, Arvind Virmani, Adi F Gazdar, and John D Minna: “Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer”, *Oncogene* (1998), 1557 ± 1565;
36. Guang Jina,b, Min Jung Kima, Hyo-Sung Jeona,c, Jin Eun Choi a, Dong Sun Kimd, Eung Bae Lee, Sung Ick Chaf, Ghil Sook Yoong, Chang Ho Kimf, Tae Hoon Jungf, Jae Yong Parka: “PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers”, *Lung Cancer* (2010), 279–283;
37. S Petersen, G Wolf, U Bockmuhl, K Gellert, M Dietel and I Petersen: “Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumour progression and metastatic phenotype”, *British Journal of Cancer* (1998), 270-276;

38. Meuwissen R, Berns A.: “Mouse models for human lung cancer”, *Genes Dev.* (2005) 643-64;
39. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* (2005); 7: 561-573;
40. S. de Seranno and R. Meuwissen: “Progress and applications of mouse models for human lung cancer”, *Eur Respir J* (2010), 35: 426–443;
41. Amelia Kellar, Cay Egan, and Don Morris: “Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications”, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* (2014), Article ID 621324;
42. Brugge J, Hung MC, Mills GB. A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* (2007); 12: 104-107;
43. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* (2012); 18: 1167-1176;
44. Malanga D, Scrima M, De Marco C, Fabiani F, De Rosa N, De Gisi S et al. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell cycle* (2008); 7: 665-669.
45. Malanga, D., Scrima, M., De Marco, C., Fabiani, F., De Rosa, N., De Gisi, S., Malara, N., Savino, R., Rocco, G., Chiappetta, G., et al.: “Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung”, *Cell Cycle*, (2008) 7:665-66;
46. Bleeker, F.E., Felicioni, L., Buttitta, F., Lamba, S., Cardone, L., Rodolfo, M., Scarpa, A., “Leenstra, S., Frattini, M., Barbareschi, M., et al.: “AKT1(E17K) in human solid tumours”, *Oncogene*, (2008) 27:5648-5650;
47. Ahmed, N.N., Franke, T.F., Bellacosa, A., Datta, K., Gonzalez-Portal, M.E., Taguchi, T., Testa, J.R., and Tsichlis, P.N.: “The proteins encoded by c-aKT and v-aKT differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential”, *Oncogene*, (1993) 8:1957-1963;
48. Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., et al.: “A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer”, *Nature*, (2007) 448:439 444;

49. Viglietto, G.. An interview with Dr. Giuseppe Viglietto on his highly cited paper published in Cell Cycle. Cell Cycle (2009) 8:2869-2870;
50. Philippe Soriano: “Generalized lacZ expression whit the Rosa 26 Cre reporter Strain”, Nature Genetics, (1999) 21, 70-71;
51. Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. Cancer Cell (2006); 9: 485-495;
52. Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. Genes Dev (2006); 20: 1496-1510;
53. Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. Genes Dev (2001); 15: 3243-3248;
54. Gerwin, B.I., Spillare, E., Forrester, K., Lehman, T.A., Kispert, J., Welsh, J.A., Pfeifer, A.M., Lechner, J.F., Baker, S.J., Vogelstein, B., et al.: “Mutant p53 can induce tumorigenic conversion of human bronchial epithelial cells and reduce their responsiveness to a negative growth factor, transforming growth factor beta 1”, Proc Natl Acad Sci USA, (1992) 89:2759-2763;
55. Comperat, E., Zhang, F., Perrotin, C., Molina, T., Magdeleinat, P., Marmey, B., Regnard, J.F., Audouin, J., and Camilleri-Broet, S.: “Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin”, Mod Pathol (2005) 18:1371-1376;
56. Meuwissen R, Linn SC, van der Valk M, Mooi WJ, Berns A. Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene. Oncogene (2001); 20: 6551-6558;
57. Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M et al. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. Cancer Cell (2003); 4: 111-120;
58. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. Nat Med (2008); 14: 1351-1356;

59. Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B et al. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* (2007); 129: 957-968;
60. Iwanaga K, Yang Y, Raso MG, Ma L, Hanna AE, Thilaganathan N et al. Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer. *Cancer Res* (2008); 68: 1119-1127;
61. Jackson, E.L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R.T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D.A.: "Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras", *Genes Dev* (2001) 15:3243-3248;
62. Meuwissen, R., Linn, S.C., van der Valk, M., Mooi, W.J., and Berns, A.: "Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene", *Oncogene* (2001) 20:6551-6558;
63. Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M.: "Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context", *Cancer Cell* (2003) 4:111-120;
64. Iwanaga, K., Yang, Y., Raso, M.G., Ma, L., Hanna, A.E., Thilaganathan, N., Moghaddam, S., Evans, C.M., Li, H., Cai, W.W., et al.: "Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer", *Cancer Res* (2008) 68:1119-1127;
65. Yanagi, S., Kishimoto, H., Kawahara, K., Sasaki, T., Sasaki, M., Nishio, M., Yajima, N., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, H., et al.: "Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice", *J Clin Invest* (2007) 117:2929-2940;
66. Freeman, D., Lesche, R., Kertesz, N., Wang, S., Li, G., Gao, J., Groszer, M., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Thomas, G., et al.: "Genetic background controls tumor development in PTEN-deficient mice", (2006) *Cancer Res* 66:6492-6496;
67. Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: "The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT pathway suppresses Bax translocation to mitochondria", (2002) *J Biol Chem* 277:14040-14047;
68. Yanagi, S., Kishimoto, H., Kawahara, K., Sasaki, T., Sasaki, M., Nishio, M., Yajima, N., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, H., et al.: "Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice", (2007) *J Clin Invest* 117:2929-2940;

69. Nuzum, E.O., Malkinson, A.M., and Beer, D.G.: “Specific Ki-ras codon 61 mutations may determine the development of urethane-induced mouse lung adenomas or adenocarcinomas” (1990) *Mol Carcinog* 3:287-295;
70. Kawano, R., Nishisaka, T., Takeshima, Y., Yonehara, S., and Inai, K.: “Role of point mutation of the K-ras gene in tumorigenesis of B6C3F1 mouse lung lesions induced by urethane”. (1995) *Jpn J Cancer Res* 86:802-810;
71. Hayashi, S., Hong, H.H., Toyoda, K., Ton, T.V., Devereux, T.R., Maronpot, R.R., Huff, J., and Sills, R.C.: “High frequency of ras mutations in forestomach and lung tumors of B6C3F1 mice exposed to 1-amino-2,4 dibromoanthraquinone for 2 years”, (2001) *Toxicol Pathol* 29:422-429;
72. Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., et al.: “Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers” (2008) *Nat Med* 14:1351-1356;
73. Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J.: “Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice”, (2007) *Cell* 129:957 -968;
74. Yanagi, S., Kishimoto, H., Kawahara, K., Sasaki, T., Sasaki, M., Nishio, M., Yajima, N., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, H., et al.: “Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice”, (2007) *J Clin Invest* 117:2929-2940;
75. Ambuj Kumar, Vidya Rajendran, Rao Sethumadhavan, and Rituraj Purohit: “AKT Kinase Pathway: A Leading Target in Cancer Research”, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International*, (2013), Article ID 756134;
76. Alfonso Bellacosa, C. Chandra Kumar, Antonio Di Cristofano, and Josep Rober Testa: “Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting”, *Advances in Cancer Research* (2005), 9(3):288-96;
77. Gaetano Romano: “The Role of the Dysfunctional Akt-Related Pathway in Cancer: Establishment and Maintenance of a Malignant Cell Phenotype, Resistance to Therapy, and Future Strategies for Drug Development” (2013), Article ID 317186;
78. Do H, Salemi R, Murone C, Mitchell PL, Dobrovic A. Rarity of AKT1 and AKT3 E17K mutations in squamous cell carcinoma of lung. *Cell Cycle* (2010); 9: 4411-4412;

79. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* (2008); 8: 142;
80. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M et al. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* (2008); 27: 5648-5650;
81. Kim MS, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer* (2008); 98: 1533-1535;
82. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res* (2008); 68: 6913-6921;
83. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res* (2008); 68: 6913-6921;
84. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* (2004); 304: 554;
85. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* (2005); 24: 7455-7464;
86. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling* (2002); 14: 381-395;
87. Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* (2005); 24: 7435-7442.