

vitro anche in assenza dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto è possibile ottenere concentrazioni assolute di MMP-2 attiva e pre-MMP-2 in grado di fare procedere la reazione con cinetiche misurabili (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993). Per chiarire se indinavir e saquinavir interferiscano con lo step di attivazione autoproteolitica di MMP-2, l'enzima purificato o presente nei supernatanti di cellule HT1080 (Toschi et al., Mol Biol Cell 2001) è stato incubato con il dominio catalitico di MT1-MMP o con p-APMA, una molecola che, come MT1-MMP, è in grado di convertire pro-MMP-2 nella forma pre-attiva (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993; Atkinson SJ et al., J Biol Chem 1995; Will H et al., J Biol Chem 1996). La pre-MMP-2 così generata viene convertita nella forma completamente attiva da molecole di MMP-2 attiva presenti nelle preparazioni enzimatiche purificate o nei supernatanti (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993; Atkinson SJ et al., J Biol Chem 1995; Will H et al., J Biol Chem 1996). I risultati di questi esperimenti hanno indicato che MMP-2 latente viene convertita nella forma attiva nell'arco di 15 ore. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno determinato alcuna alterazione nella reazione di attivazione di MMP-2. Questi dati indicano che indinavir e saquinavir non intervengono direttamente nel processo di attivazione proteolitica di MMP-2, ed hanno perciò suggerito che indinavir e saquinavir interferiscano con il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$. Allo scopo di verificare questa ipotesi, è stato studiato l'effetto di preparazioni purificate di $\alpha_v\beta_3$ sull'attivazione autoproteolitica di MMP-2. Questi esperimenti hanno mostrato che $\alpha_v\beta_3$ inibisce la reazione di attivazione di MMP-2, poiché il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ in vitro crea un impedimento sterico che protegge pre-MMP-2 dall'azione di MMP-2. Quando indinavir o saquinavir sono stati aggiunti alle miscele di reazione non è stato evidenziato alcun effetto sulla cinetica di attivazione, indicando che gli HIV-PI non interferiscono direttamente con il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$. Sono attualmente in corso esperimenti volti a validare questi risultati in un sistema sperimentale in cui l'integrina $\alpha_v\beta_3$ viene adsorbita a supporti solidi per valutare gli effetti degli HIV-PI sul legame tra pre-MMP-2 e l'integrina immobilizzata (Deryugina et al., Exp Cell Res, 2001).

Le prime fasi della neoangiogenesi sono mediate dalla degradazione della membrana basale, e dalla sua sostituzione con una "matrice provvisoria" a cui aderiscono le cellule endoteliali che sono divenute polarizzate e che cominciano a migrare. Abbiamo perciò studiato gli effetti di indinavir e saquinavir sull'adesione di cellule HUVEC seminate su substrati della lamina basale e della matrice provvisoria. Questi esperimenti hanno indicato che l'adesione di cellule HUVE a laminina e perlecano, due substrati della membrana basale che agiscono da ligandi di $\alpha_v\beta_3$, è fortemente inibita in presenza di saquinavir, mentre questo effetto è abolito se le cellule sono mantenute in presenza di ioni manganese, un forte attivatore delle integrine di membrana. Al contrario, indinavir aumenta significativamente l'adesione al perlecano ed al fibrinogeno e alla protrombina, due componenti fondamentali della matrice provvisoria che agiscono da ligandi di $\alpha_v\beta_3$, ed anche questo effetto è abolito in presenza di ioni manganese. Questi esperimenti hanno dimostrato che indinavir e saquinavir agiscono interferendo con il legame delle integrine a molecole della matrice extracellulare. Ulteriori studi sono stati effettuati per valutare gli effetti degli HIV-PI sullo "spreading" delle cellule piastrate su substrati della matrice extracellulare, un processo tramite il quale le cellule creano progressivi contatti con la matrice. Questo processo è dipendente dalla rilocalizzazione di integrine ad alta affinità e di MMPs nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi esperimenti hanno mostrato che saquinavir inibisce significativamente lo spreading di cellule endoteliali su tutti i substrati, mentre indinavir inibisce lo spreading su protrombina, fibrinogeno e laminina. Perciò i dati ottenuti fino ad ora indicano che gli HIV-PI esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame di integrine ai substrati, particolarmente ai ligandi di $\alpha_v\beta_3$, e con l'attivazione e/o rilocalizzazione di integrine nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi processi mediano non solo la migrazione cellulare ma anche l'attivazione autoproteolitica di MMP-2.

Per chiarire se gli HIV-PI agiscano interferendo con la rilocalizzazione di integrine nei lamellipodi, effettueremo studi per valutare l'effetto di indinavir e saquinavir sui processi di "recycling" e "trafficking" di queste integrine.

Studi recenti hanno indicato che il ritonavir ed il saquinavir utilizzati a dosi elevate, simili o superiori ai livelli plasmatici di picco misurabili nei pazienti trattati con questi farmaci ("livelli terapeutici di picco"),

sono in grado di modulare l'attività del proteasoma (Andrè et al Proc Natl Acad Sci 1998; Tovo AIDS 2000; Piccinini et al AIDS 2001; Pati et al., Blood 2002, Gaedicke et al. Cancer Res 2002). Il proteasoma controlla molteplici pathway cellulari, tra i quali il turnover delle proteine, l'eliminazione di proteine aberranti, l'apoptosi, la degradazione dei prodotti di geni oncosoppressori, l'emivita e l'attività di proteine che regolano il ciclo cellulare, e la maturazione proteolitica e l'attivazione di NF- κ B. Al fine di indagare anche questo meccanismo d'azione, abbiamo analizzato gli effetti di concentrazioni di farmaco simili o superiori ai livelli terapeutiche di picco, sulla crescita, la sopravvivenza e la capacità invasiva in linee cellulari umane derivate da carcinomi del polmone, della mammella, del colon e del fegato, tumori che hanno elevata incidenza e prevalenza nella popolazione umana. I risultati ottenuti negli esperimenti di crescita hanno dimostrato che l'indinavir, qualsiasi fosse la dose utilizzata, non ha indotto alcun effetto sulla crescita basale delle linee testate; al contrario, alte dosi di saquinavir promuovono un blocco della crescita e della sopravvivenza cellulare di tutte le linee tumorali. Nei saggi di invasione, effettuati utilizzando le camere di Boyden, abbiamo rilevato che entrambi i farmaci, già a dosi simili alle concentrazioni di valle rilevate nei pazienti trattati, sono in grado di bloccare l'invasione di tutte le linee neoplastiche. Al fine di analizzare più approfonditamente gli effetti delle dei farmaci sull'attività del proteasoma abbiamo quindi studiato se il trattamento con indinavir e saquinavir sia in grado di indurre l'accumulo di I κ B α e di p21, la cui degradazione è noto essere mediata dal proteasoma. I risultati ottenuti hanno dimostrato che elevate concentrazioni di saquinavir, ma non di indinavir, bloccano la degradazione di I κ B α indotta da TNF α ed inducono un accumulo di p21 nelle cellule tumorali di mammella, fegato e polmone, in modo simile all'epoxomicina, noto inibitore dell'attività proteasomica (Toschi et al, submitted). Questi risultati indicano che concentrazioni di indinavir e saquinavir simili a quelle presenti nel plasma di pazienti possono indurre inibizione della crescita tumorale grazie alla loro capacità di bloccare l'angiogenesi e l'attività delle metalloproteasi della matrice, come dimostrato anche dai dati ottenuti negli esperimenti in vivo (vedi Progetto 5). Inoltre, questi dati indicano che concentrazioni di saquinavir simili o superiori ai livelli plasmatici di picco possono interferire con l'attività del proteasoma. Questi dati suggeriscono il testing di analoghi del saquinavir in modelli preclinici per identificare farmaci dotati di migliore indice terapeutico e sviluppare terapie più efficaci in grado di combinare le azioni anti-angiogeniche e anti-proliferative degli HIV-PI.

Dati recenti hanno indicato che il rischio di ricorrenza dopo ablazione chirurgica per la neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) in pazienti donne HIV-infette è consistentemente diminuito in seguito all'introduzione della terapia antiretrovirale combinata (HAART). Il rischio di progressione del CIN a carcinoma invasivo della cervice è altamente accresciuto dall'infezione della mucosa genitale da parte di human papilloma virus (HPV) di tipologie oncogene. Questi virus sono in grado di alterare il ciclo cellulare delle cellule epiteliali e la loro differenziazione inibendo o attivando l'espressione di p53, Rb o p21 ed il loro turn-over mediante il proteasoma. Studi recenti hanno inoltre indicato che inibitori dell'angiogenesi e delle MMP sono in grado di bloccare o ridurre la progressione di CIN in modelli murini transgenici di CIN in cui le lesioni vengono indotte, tramite somministrazione di estrogeni, grazie all'espressione delle proteine E6 ed E7 (topi CIN K14-HPV16/E2) (Girando et al JCI 2004). Alla luce di questi dati si è deciso di ampliare l'analisi degli effetti di indinavir e saquinavir verificando la loro attività anti-tumorale e antiangiogenica tramite studi volti a valutare il loro effetto a) sulla proliferazione, invasione ed espressione di MMPs in linee cellulari derivate da tumori della cervice contenenti il virus (HPV-16, -18) in forma integrata (Progetto 3); b) sul mantenimento e l'espressione del genoma di HPV in linee cellulari contenenti il menoma virale in forma epitomale (HPV-16, HPV-18, HPV-31) (Progetto 3); e c) sullo sviluppo, la regressione e la progressione del CIN nel modello murino transgenico (Progetto 5).

In collaborazione con il Prof. Giovanni Barillari (Università "Tor Vergata") sono stati condotti esperimenti di proliferazione ed invasione su linee cellulari di carcinoma della cervice (CaSki ed HeLa, contenenti rispettivamente sequenze di HPV-16 e HPV-18) coltivate in presenza di indinavir e saquinavir fino a 96 ore alle dosi di 10 μ M. I risultati ottenuti sulle cellule HeLa hanno indicato che sia indinavir che saquinavir non hanno effetti sulla proliferazione delle cellule tumorali, mentre inibiscono in modo tempo-dipendente la loro capacità invasiva. Per quanto riguarda le cellule CaSki, nessuno dei 2 farmaci ha

effetti sulla proliferazione cellulare, mentre il solo saquinavir ha una debole attività anti invasiva. Al fine di studiare il meccanismo dell'attività anti-invasiva di questi HIV-PI è stata analizzata l'espressione di MMP-2 ed MMP-9 mediante RT-PCR in cellule CaSki ed HeLa trattate con indinavir o saquinavir (10 μ M). I risultati ottenuti indicano che indinavir e saquinavir sono in grado di ridurre l'espressione di MMP-2 rispettivamente del 25% e del 50% in cellule HeLa, mentre nelle cellule CaSki si è rilevata una riduzione di MMP-2 (25%) solo in seguito al trattamento con saquinavir. Ulteriori esperimenti sono attualmente in corso con un clone cellulare ottenuto da una lesione umana di CIN2 in cui il ceppo oncogeno HPV-31 è in forma episomale.

Al fine di comprendere gli effetti degli HIV-PI sul mantenimento delle forme episomali del virus, le cellule CIN 2 contenenti HPV-31 sono state inizialmente coltivate in un terreno commerciale (KG-media – Lonza, Walkersville, MD, USA), ed in parallelo, in presenza di fibroblasti "feeder" con un terreno precedentemente messo a punto e ricco di fattori di crescita (E-media). Le cellule coltivate con il medium commerciale sono andate in maggioranza incontro a morte portando però alla selezione di una sotto-popolazione di cellule caratterizzate da integrazione di DNA virale. Questi dati confermano la selezione/espansione di cloni con integrazioni virali preesistenti ed escludono il verificarsi di successive integrazioni random come descritto per HPV-16 (Pett MR et al PNAS, 2006). Questi dati indicano che questo modello può essere utilizzato per studiare gli effetti degli HIV-PI sul mantenimento delle forme virali episomali, l'integrazione del DNA e la trasformazione cellulare virus-mediata.

Attualmente sono in allestimento esperimenti su cellule CIN2 coltivate con i due tipi di terreno in presenza o meno di fibroblasti "feeder" e di HIV-PI. Si stanno inoltre predisponendo culture organotipiche di cellule CIN sulle quali verificare l'efficacia degli HIV-PI.

Validazione degli effetti anti-angiogenici ed anti-tumorali degli HIV-PI in modelli animali

L'angiogenesi, l'invasione delle cellule tumorali e l'attivazione di MMP-2 sono necessarie per la crescita di tutti i tumori. I dati ottenuti recentemente dal nostro laboratorio sull'attività anti-angiogenica ed anti-tumorale degli HIV-PI indicano che questi farmaci potrebbero essere usati per la terapia di tumori con elevata incidenza e prevalenza nella popolazione umana.

Abbiamo perciò valutato l'azione degli HIV-PI sulla crescita di tumori indotti in topi nudi inoculando linee cellulari umane derivate da carcinoma del polmone, della mammella, del colon e del fegato. La somministrazione mediante gavage intragastrico di indinavir o saquinavir, a dosi paragonabili a quelle utilizzate in pazienti infettati da HIV (Deeks et al JAMA 1997; Sgadari et al Nat Med. 2002), ha inibito significativamente la crescita di questi tumori ($p < 0.01$). Abbiamo quindi studiato il meccanismo di inibizione della crescita tumorale mediante valutazione della densità microvascolare, di marcatori della proliferazione cellulare e del ciclo cellulare, e dell'attività metalloproteasica nei tumori indotti sperimentalmente nei topi inoculati con le linee tumorali. Il trattamento con entrambi gli HIV-PI ha significativamente inibito l'angiogenesi tumorale, come dimostrato da una significativa riduzione della densità microvascolare osservata in tutti i tumori analizzati. Mediante esperimenti di zimografia in situ effettuati in parallelo ad analisi immunostochimiche, abbiamo inoltre dimostrato che sia indinavir che saquinavir inibiscono fortemente l'attività enzimatica di MMP-2. D'altra parte non abbiamo rilevato alcun effetto significativo sulla crescita tumorale o sull'apoptosi (Toschi et al, *submitted*). Questi esperimenti indicano che concentrazioni di indinavir e saquinavir simili a quelle presenti stabilmente nel plasma di pazienti inducono inibizione della crescita tumorale in vivo grazie alla loro capacità di bloccare l'angiogenesi e l'attività metalloproteasica.

Per verificare il potenziale anti-tumorale ed anti-angiogenico degli HIV-PI nel bloccare la progressione di lesioni CIN-2/3 o la loro insorgenza sono stati condotti esperimenti nel modello murino di CIN K14-HPV16/E2 in collaborazione con il Dr Enrico Giraudo (Università di Torino). Gli animali (12 per gruppo) sono stati trattati con dosi di saquinavir o indinavir simili (1X) o superiori (3X) a quelle utilizzate in soggetti HIV⁺ (35mg/Kg/day per indinavir, e 25.5 mg/Kg/day per il saquinavir). Entrambi i farmaci sono stati somministrati tramite gavage intragastrico una volta al giorno per 6 settimane. I trattamenti con indinavir 1X e 3X sono stati ben tollerati dagli animali, mentre il saquinavir 3X ha dato evidenti segni di tossicità. I risultati ottenuti indicano che sia il saquinavir che l'indinavir sono in grado di ridurre sia lo

sviluppo che la progressione tumorale. L'analisi in immunofluorescenza effettuata con un marcatore selettivo per le cellule endoteliali (Meca32) dei tessuti provenienti dagli animali trattati ha evidenziato che sia indinavir che saquinavir sono in grado di ridurre la densità vascolare e l'angiogenesi tumorale. In particolare, indinavir, alle dosi 1X e 3X, hanno ridotto la densità vascolare rispettivamente del 35% e del 53%, mentre saquinavir (dose 1X) ha indotto una riduzione del 44%. L'analisi degli effetti pro-apoptotici degli HIV-PI è stata fatta sui tessuti murini utilizzando un anticorpo capace di riconoscere specificamente la forma attivata della caspasi-3. I risultati ottenuti hanno evidenziato che indinavir alla dose 1X aumenta di 1.7 volte l'indice apoptotico, mentre alla dose 3X determina un aumento di 2.9 volte rispetto al controllo. Il trattamento con saquinavir 1X induce un aumento dell'indice apoptotico di 2.2 volte. In parallelo, le indagini sulla proliferazione cellulare, effettuate utilizzando un anticorpo anti-Ki-67, hanno mostrato che i farmaci mantengono pressoché invariati gli indici tumorali di proliferazione. Questi dati, nel loro insieme, indicano che gli HIV-PI hanno un'attività antitumorale e pro-apoptotica nel modello murino di CIN indotto da HPV. Successive indagini accerteranno se gli HIV-PI possano interferire anche con l'espressione di p16 e l'espressione e l'attivazione di MMPs e VEGF. Accanto al trattamento con indinavir e saquinavir, verrà utilizzato anche ritonavir quale booster.

I dati ottenuti nell'ambito di questi studi forniranno, attraverso la dimostrazione dell'efficacia in appropriati studi clinici, l'opportunità di sviluppare nuove strategie terapeutiche per la cura di forme tumorali frequenti in pazienti infettati o meno da HIV-1. L'utilizzo di questi farmaci caratterizzati da bassa tossicità e costo moderato, da soli od in combinazione con chemioterapici, potrebbe significativamente migliorare il trattamento dei pazienti e la loro qualità di vita.

Publicazioni

- 1) Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. *Nat. Rev. Cancer*, 4:861-875, 2004.
- 2) Monini P, Toschi E, Sgadari C, Bacigalupo I, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. The use of HAART for biological tumour therapy. *J. HIV Ther*, 11:53-56, 2006.
- 3) Monini P, Sgadari C, Grosso MG, Bellino S, Di Biagio A, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Cencioni G, Salvi E, Leone P, Barillari G, Gatti G, Caratelli L, Ensoli B. and the Concerted Action on Kaposi's Sarcoma. Clinical course of classic Kaposi's sarcoma in HIV-negative patients treated with the HIV protease inhibitor indinavir. *AIDS*, 2009 Feb 20;23(4):534-8.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Malavasi L, Bacigalupo I, Chiozzini C, Carnei D, Compagnoni D, Bellino S, Falchi M, Palladino C, Leone P, Barillari G, Ensoli B, Monini P. Human immunodeficiency virus protease inhibitors are effective against highly prevalent human tumors via a proteasome-independent block of angiogenesis and matrix metalloproteases. (sottomesso per la pubblicazione a *Int J Cancer*).

Publicazioni correlate all'argomento

- 1) Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi's sarcoma. *Nat. Med.*, 8:225-232, 2002.
- 2) Ensoli B. HIV protease inhibitors have specific anti-cancer effects. *Biomed. & Pharmacother.*, Vol. 56, No. 8, 2002.
- 3) Sirianni MC, Vincenti L, Topino S, Giovanetti A, Mazzetta F, Libi F, Scaramuzzi D, Andreoni M, Pinter E, Baccarini S, Rezza R, Monini P, Ensoli B. NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon HAART in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Immunol.*, 32:2711-2720, 2002.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Monini P, Barillari G, Bacigalupo I, Palladino C, Baccarini S, Carlei D, Grosso G, Sirianni MC, Ensoli B. Treatment of Kaposi's Sarcoma, an update. *Anti-Cancer Drugs*, 13:977-987, 2002.
- 5) Monini P, Sirianni MC, Ensoli B. Concomitant clearance of human herpesvirus 8 from blood and regression of leukopenia-associated aggressive classic Kaposi's sarcoma upon α -interferon

- therapy. *Oncol. Rev. J.*, issue 4, pp.18-20, 2002.
- 6) Sgadari C, Monini P, Toschi E, Baccarini S, Grosso MG, Moracci G, Malavasi L, Ensoli B. HIV Protease Inhibitors inhibit Kaposi's sarcoma by blocking angiogenesis and tumour cell invasion. *Haematologica*, (Meeting Supplement 1 to n. 11) 87:37-41, 2002.
 - 7) Monini P, Sgadari C, Barillari G, Ensoli B. The HIV protease inhibitors: anti-retroviral agents with anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-tumor activity. *J. Antimicrobial Chemother.*, 51:207-211, 2003.
 - 8) Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Monini P. The Fibroblast Growth Factors. In: *The Cytokine Handbook* (IV Edition, Chapter 31, Thomson A. and Lotze M. Eds.), Vol. II, pp.747-781, 2003.
 - 9) Barillari G, Sgadari C, Toschi E, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors as new treatment options for Kaposi's sarcoma. *Drug Res. Update*, 6:173-181, 2003.
 - 10) Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.*, 4:537-547, 2003.
 - 11) Alessandri G, Fiorentini S, Licenziati S, Bonafede M, Monini P, Ensoli B, Caruso A. CD8(+)CD28(-) T lymphocytes from HIV-1-infected patients secrete factors that induce endothelial cell proliferation and acquisition of Kaposi's sarcoma cell features. *J. Interferon Cytokine Res.*, 23:523-531, 2003.
 - 12) Sirianni MC, Libi F, Campagna M, Scaramuzzi D, Monini P, Ensoli B. Role of killer inhibitory receptors in human herpesvirus type 8 infection and KS development. In Monduzzi Eds., *International Proceedings Division, 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal (Canada), July 18 – July 23, 2004*, pp. 257-259.
 - 13) Sirianni M.C., Libi F., Campagna M., Rossi D., Capello D., Sciaranghella G., Carbone A., Simonelli C., Monini P., Gaidano G., and Ensoli B. Down-regulation of the major histocompatibility complex class I molecules by human herpesvirus type 8 and impaired natural killer cell activity in primary effusion lymphoma development. *Br. J. Haematol.*, 130:92-95, 2005.
 - 14) Garrafa E, Alessandri G, Benetti A, Turetta D, Corradi A, Cantoni AM, Cervi E, Bonardelli S, Parati E, Giulini SM, Ensoli B, Caruso A. Isolation and characterization of lymphatic microvascular endothelial cells from human tonsils. *J. Cell. Physiol.*, 207:107-113, 2006.
 - 15) Sgadari C, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. Patogenesi del Sarcoma di Kaposi. In: *Tumori ed Infezioni da HIV. Patogenesi e studi clinici del GICAT (Italian)*. Milano: Biomedica, pp. 15-26, 2006.
 - 16) Simonelli C, Talamini R, Bearz A, Berretta M, Spazzapan S, Monini P, Sgadari C, Sartor I, Ensoli B, Tirelli U. Interleukin-2 continuous infusion and angiogenesis surrogate markers in metastatic renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, 17:1335-1336, 2006.

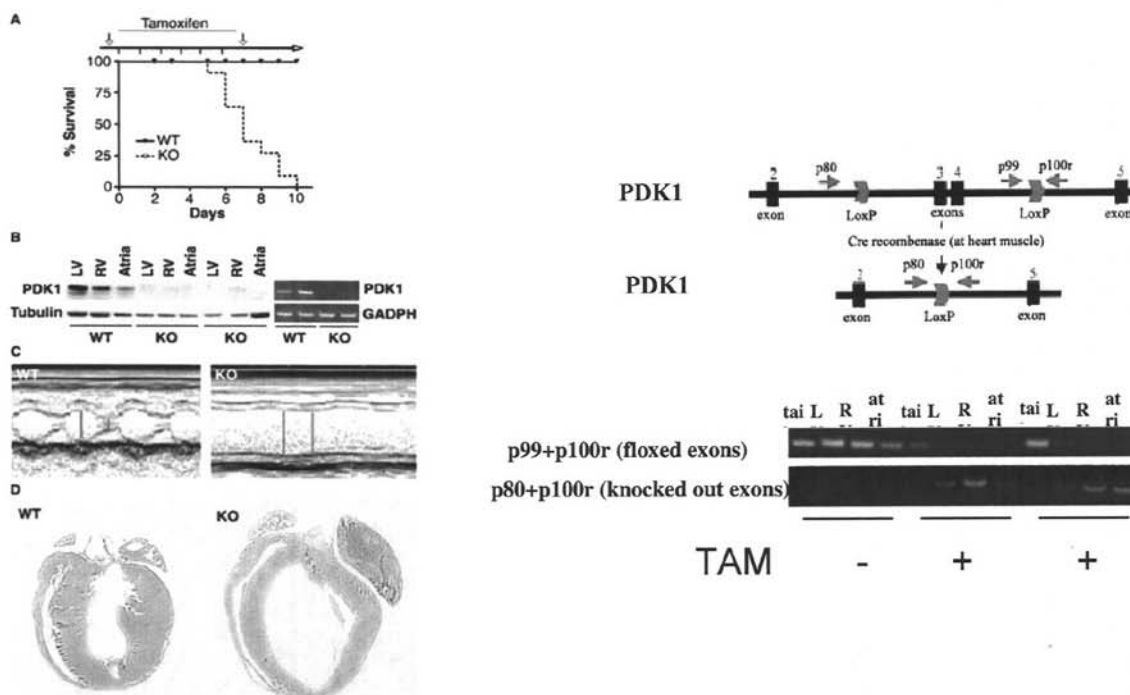
Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 09 – Prof. Gianluigi Condorelli, Parco Scientifico San Raffaele, Roma

Nei primi due anni di attività lo scopo delle nostre ricerche è stato quello di creare modelli di animali geneticamente modificati per il pathway a monte o valle di Akt. Per schematizzare i risultati sin qui ottenuti, presentiamo il seguente schema:

Gene	Costrutto	Cellule ES	Chimere	Topo	Ricombinazione cardiaca
PDK-1				si	Si
AKT-2	Si	si	si	no	
4E-BP1				si	No
CAMK 2delta	Si	si	si	si	Si
CAMK2delta nuc	Si	si	si	si	Si
mTOR	Si	si	si	si	No
mTOR KI-TAG	Si	si	si	si	In corso

Tabella 1: risultati dei transgenici nei primi due anni di attività.

I topi PDK-1 e 4E-BP1 sono stati ottenuti rispettivamente dai laboratori di Dario R. Alessi, University of Dundee, United Kingdom e Nahum Sonenberg, McGill University, Montreal, Canada. Il topo PDK-1 è stato modificato nel nostro laboratorio in modo da rendere tessuto-specifica ed inducibile la ricombinazione. Pertanto, un topo contenente un allele PDK-1 costitutivamente distrutto e l'altro "floxed" è stato incrociato con un topo in cui l'enzima CRE fuso ad un recettore degli estrogeni modificato (ER) in modo da renderlo sensibile ed attivabile al tamoxifene e sotto espressione guidata



dal promotore della miosina alfa cardiaca. Il risultato di queste ricombinazioni è riportato nella figura 1.

Figura 1. Scompenso cardiaco causato dall'assenza di PDK-1

Nella figura 1 si osserva come l'assenza di PDK-1 nel cuore determina uno scompenso cardiaco acuto in quanto nel corso di pochi giorni si registra una dilatazione cardiaca con riduzione marcatissima della contrattilità miocardica, a dimostrazione del ruolo fondamentale giocato dal pathway di Akt nel modulare la funzionalità cardiaca.

Per quanto concerne invece i topi Akt-2, l'interesse del nostro gruppo su questa molecola nasce dall'evidenza che v'è un'alta espressione di questo gene nell'endotelio. Questo progetto però è al momento fermo allo stadio di chimere, ovvero l'animale contenente chimere Akt-2 lox non ha prodotto eterozigoti con l'allele loxato. Speriamo che nei prossimi mesi ciò avvenga poiché il modello sarebbe estremamente importante per studi oncologici, oltre che cardiologici.

Il topo 4E-BP1 invece è stato ottenuto dal laboratorio del Professor Nahum Sonenberg, un leader nel campo del controllo della translazione, ovvero della sintesi proteica a partire dall'mRNA. La proteina 4E-BP1 si lega ad un iniziatore della translazione e riduce l'efficienza di questo fenomeno. Questo topo non è stato fatto con la tecnologia CRE-LOX ma è costitutivo. Abbiamo ottenuto importanti dati preliminari con questo topo sia per quanto riguarda la proliferazione delle cellule delle arterie sia per quanto riguarda la comprensione del ruolo della traslazione nello scompenso cardiaco e sono oggetto di lavori sottomessi a giudizio editoriale in questo momento.

I topi CAMK2delta sono stati generati in quanto volevamo chiarire il ruolo di CAMK a seguito di effetti biologici che sono successivi all'attivazione di Akt non solo nei cardiomiociti ma anche in altri tipi cellulari. I risultati del KO purtroppo sono stati un po' deludenti in quanto eliminando il gene

CAMK2delta evidentemente aumentano altre isoforme di CAMK che riverberano l'effetto biologico di CAMK 2delta, come indicato nella figura 2.

In modo simile al topo CAMK2delta, abbiamo generato un topo in cui la localizzazione nucleare di CAMK2 avrebbe dovuto essere eliminata attraverso il knockout di un esone che specifica per il segnale di localizzazione nucleare. I dati che abbiamo ottenuto dimostrano che siamo riusciti a distruggere l'esone contenente il segnale di localizzazione nucleare, ma che vi sono altre forme di CAMK nucleari che by-passano questo effetto.

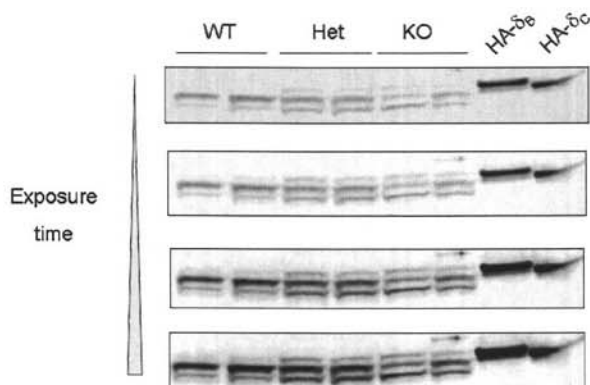


Figura 2. Creazione di topi KO per CAMK2Delta

Infine, abbiamo generato topi knockin e knockout per il gene mTOR. Nel primo caso, abbiamo modificato il gene in modo da rendere il suo prodotto fuso con il gene GFP e quindi da localizzarlo anche in microscopia vitale ed in vivo nell'animale in toto. Oltre al GFP, v'è un ulteriore peptide che serve ad identificare il gene modificato attraverso tecniche d'immunoprecipitazione e di Western blotting. Lo schema del costrutto utilizzato e l'espressione di questo transgene sono riportati nella figura 3. mTOR è un gene fondamentale per una serie di funzioni cellulari, tra cui la sintesi proteica, il metabolismo cellulare degli acidi grassi e delle proteine, l'angiogenesi, la crescita cellulare. Questa molecola però è difficilmente studiabile perché è grande circa 350.000 kd e forma complessi molecolari anche superiori al milione di kd. Pertanto, è necessario un approccio alternativo a quello classico che consenta di studiare le proteine che in differenti fasi della crescita cellulare si legano ad mTOR modificandone la funzione. Il knockin dovrebbe consentire di studiare questo prodotto genico in modo "naturale", non con modelli di overespressione, che spesso sono forieri di artefatti.

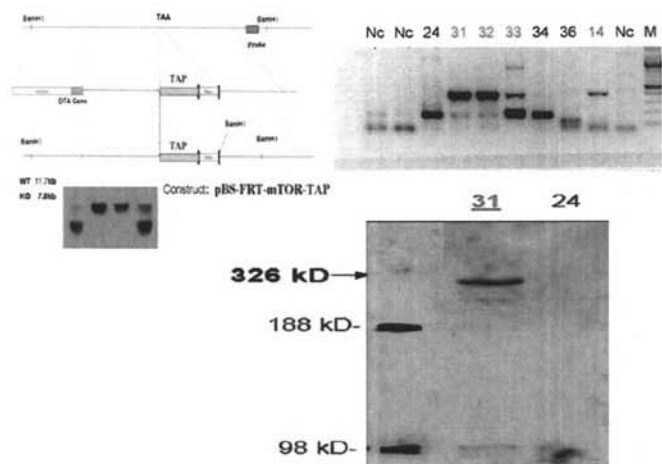


Figura 3. Generazione del topo knockin TAP-TAG mTOR.

Un ultimo ulteriore modello è rappresentato dal topo knockout di mTOR. Per necessità, siamo stati costretti a disegnare un topo knockout con tecniche di ricombinazione omologa CRE-LOX in quanto mTOR è essenziale per la sopravvivenza cellulare e quindi la ricombinazione omologa classica darebbe fenotipi non compatibili con la sopravvivenza. Pertanto, stiamo seguendo lo stesso protocollo che abbiamo utilizzato per PDK-1.

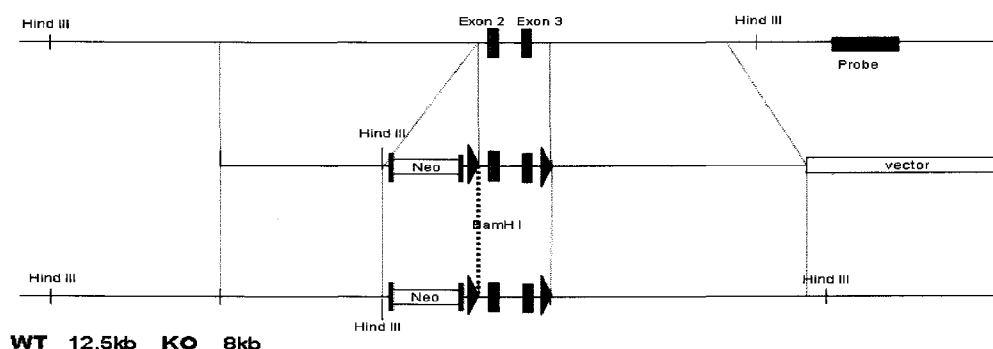


Figura 4. Mappa del targeting vector floxato per la generazione del topo mTOR knockout.

Nel corso del terzo anno abbiamo caratterizzato estensivamente tre modelli di animale transgenico, precedentemente descritti nel II anno: i topi PDK1 KO ed i topi mTOR KO, entrambi inducibili e tessuto specifico. Inoltre, in questi ed in altri modelli messi a punto negli scorsi anni, abbiamo eseguito una serie di esperimenti atti a determinare il ruolo dell'angiogenesi nelle patologie miocardiche.

TOPI PDK1 KO

I risultati di questa linea di ricerca, che è stata svolta con il modello descritto nella rendicontazione dell'anno precedente, hanno determinato la sorprendente scoperta che il signaling di AKT controlla la maturazione del canale tipo L del calcio (LTCC) sulla membrana cellulare attraverso la fosforilazione della subunità beta. L'assenza della molecola PDK1 nei cardiomiociti porta ad uno scompenso cardiaco nel giro di pochi giorni, con la morte che sovraggiunge nell'arco di una settimana. Il nostro studio si è concentrato però su un particolare fenomeno biologico, di seguito descritto.

Il pathway dell'insulina/IGF1/PDK1/AKT è stato suggerito migliorare l'inotropismo cardiaco ed aumentare l'handling del calcio attraverso gli effetti sulla proteina kinasi AKT. Nonostante ciò, il meccanismo molecolare è sconosciuto. Nel nostro studio abbiamo determinato che l'assenza di PDK1 porta ad una riduzione dell'attività di AKT, che a sua volta non fosforila più la subunità beta 2 dell'LTCC; questo comporta una dissociazione della b-2 dalla subunità alfa-1 (il canale vero e proprio), ed un'esposizione delle sequenze PEST (coinvolte nella degradazione delle proteine) dello stesso. Pertanto, la subunità a1 viene degradata dal sistema lisosomale cellulare. Quando invece PKD-1/AKT sono attivi, la fosforilazione della subunità b-2 fa sì che questa diventi una proteina "chaperona" per il canale alfa-1, che va a completa maturazione sulla membrana cellulare. Questa è una nuova funzione del pathway di AKT, che pertanto non è solo coinvolto in effetti anti-apoptotici o angiogenetici ma anche di regolazione del calcio, elemento essenziale per l'accoppiamento eccitazione-contrazione e per la proliferazione cellulare.

TOPI mTOR KO

La nostra ricerca si è concentrata su questa molecola in quanto mTOR è una proteina d'interesse per il ruolo che gioca nella patogenesi dei tumori e per il possibile ruolo che la stessa gioca nella regolazione dell'omeostasi del cardiomiocita. Abbiamo studiato pertanto il ruolo di mTOR e del suo substrato 4E-BP1 generando topo knockout inducibili per mTOR e studiando topi 4E-BP1 knockout costitutivi; questi