

6. Biologia della cellula trasformata

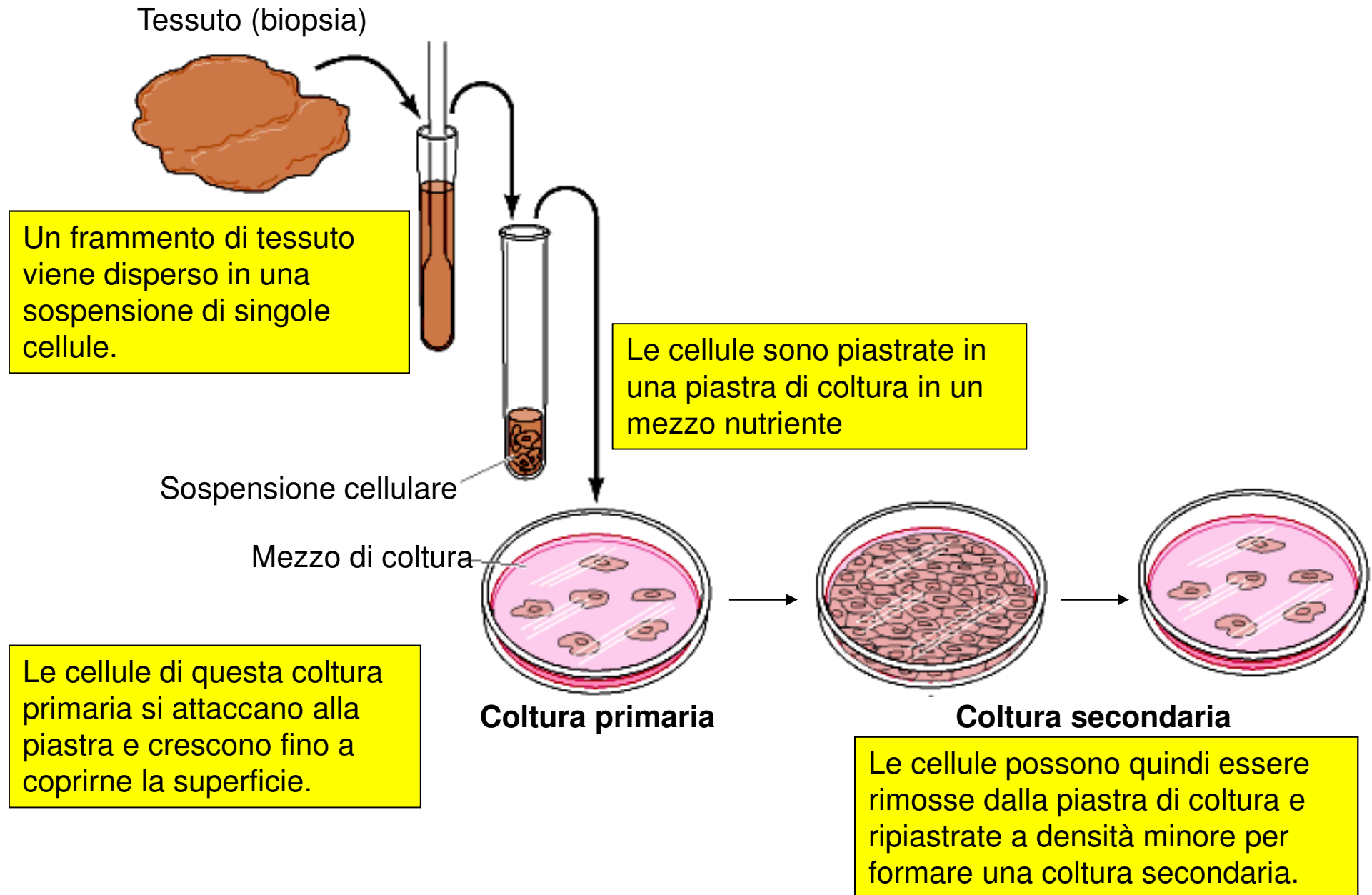
Definizione di cellula trasformata

Si definisce trasformata una cellula che ha acquisito permanentemente caratteristiche di crescita non esibite dalla cellula parentale.

Caratteristiche della cellula trasformata

- *Morfologia alterata*
- *Numero illimitato di divisioni (immortalità) e mancata espressione di markers di senescenza*
- *Assenza di inibizione da contatto*
- *Crescita in assenza di fattori di crescita e di ancoraggio*
- *Può dare origine a tumori quando iniettata in modelli animali*

Studio delle cellule trasformate: Colture cellulari

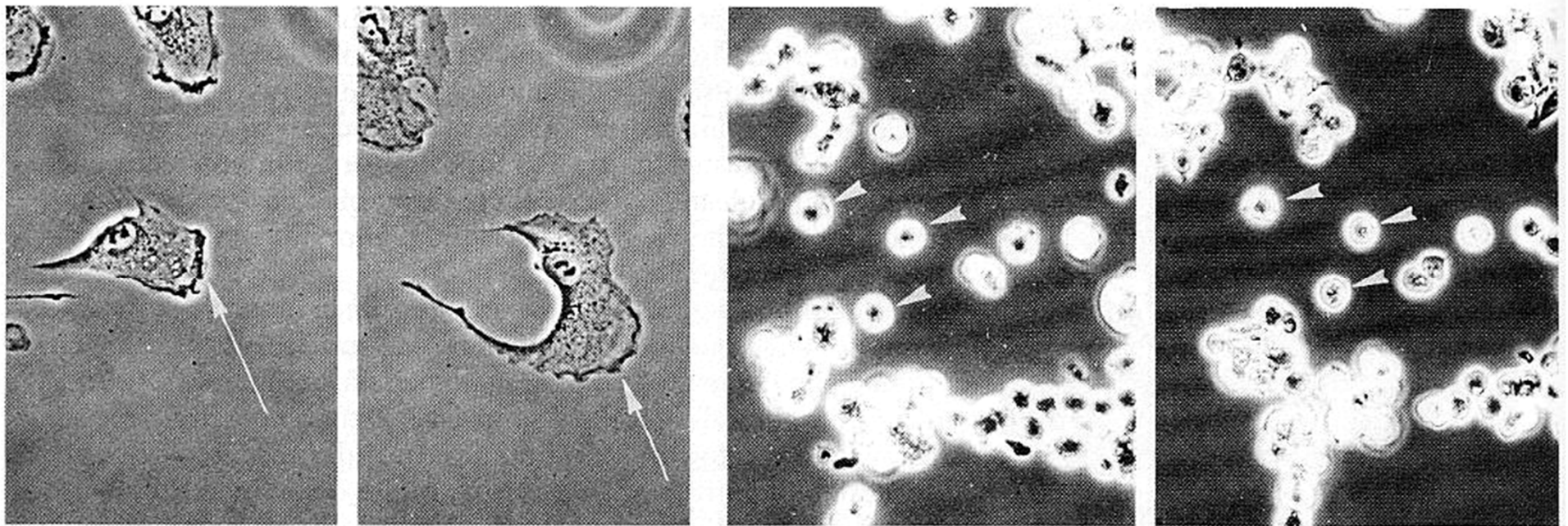


Morfologia

Cellule embrionali di criceto normali (a, b) paragonate a quella di cellule trasformate (c, d).

(a e b) Le prime due microfotografie mostrano il **carattere appiattito ed espanso delle cellule normali di criceto**, in crescita su una superficie piana.

(c e d) Immagini corrispondenti mostrano l'aspetto di cellule cancerose di criceto dopo **trasformazione da parte di adenovirus ceppo 2**. Le cellule hanno un aspetto molto più tondeggiante).



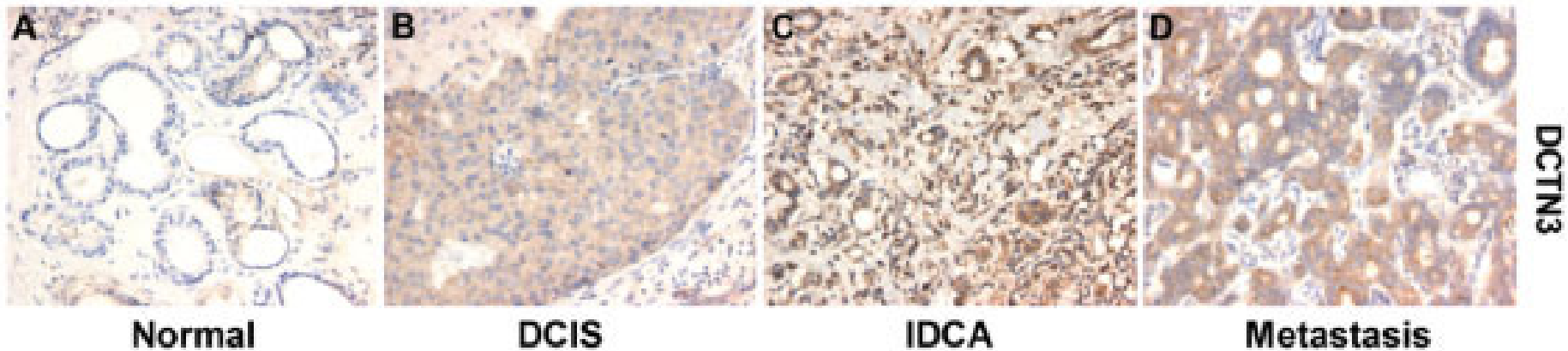
(a)

(b)

(c)

(d)

Morfologia: Biopsie di tessuto normale e tumore della mammella

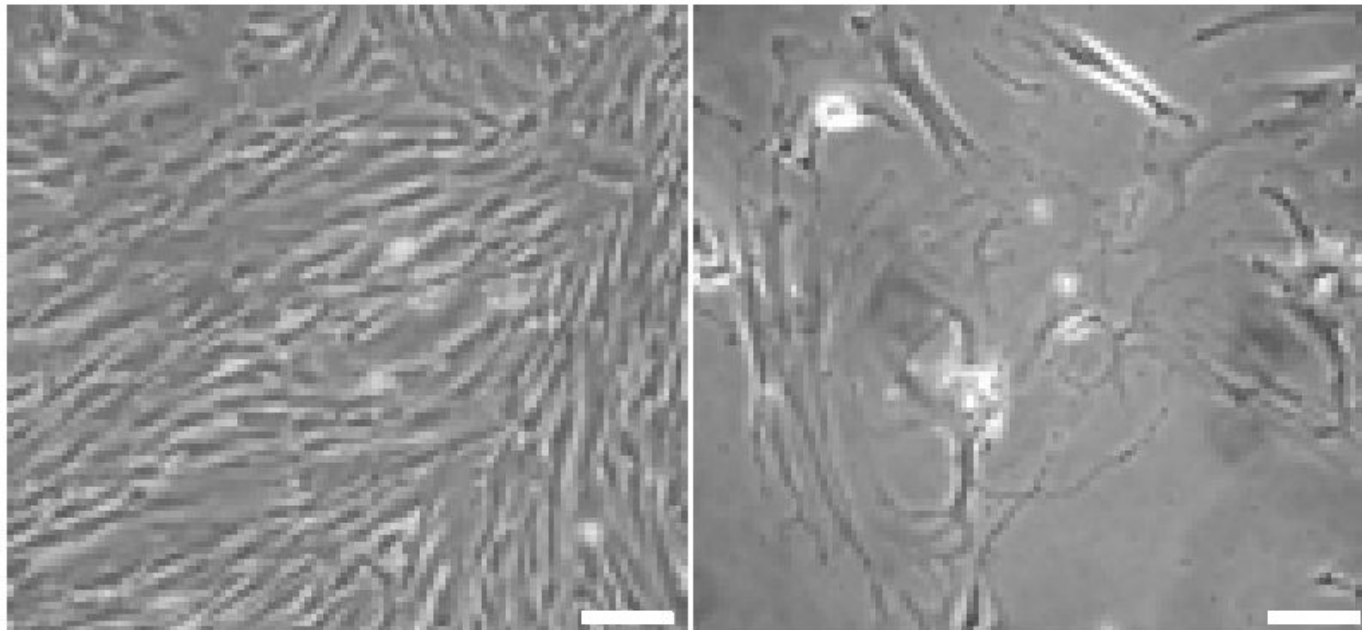


Ductal Carcinoma in Situ
Infiltrating Ductal Carcinoma
Metastatic carcinoma

Immortalizzate: Numero illimitato di divisioni

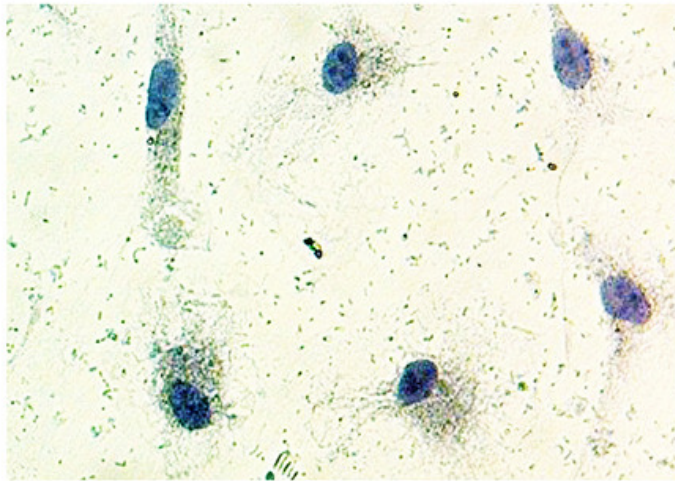
proliferating

senescent

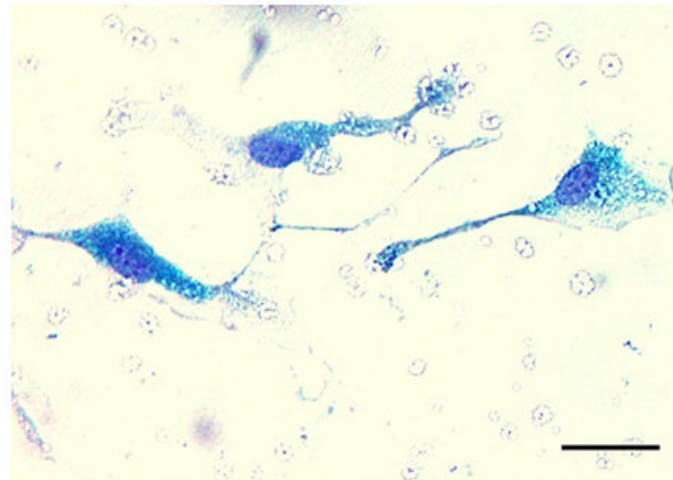


Cellule trasformate non esprimono markers di senescenza

A



2 Days in vitro



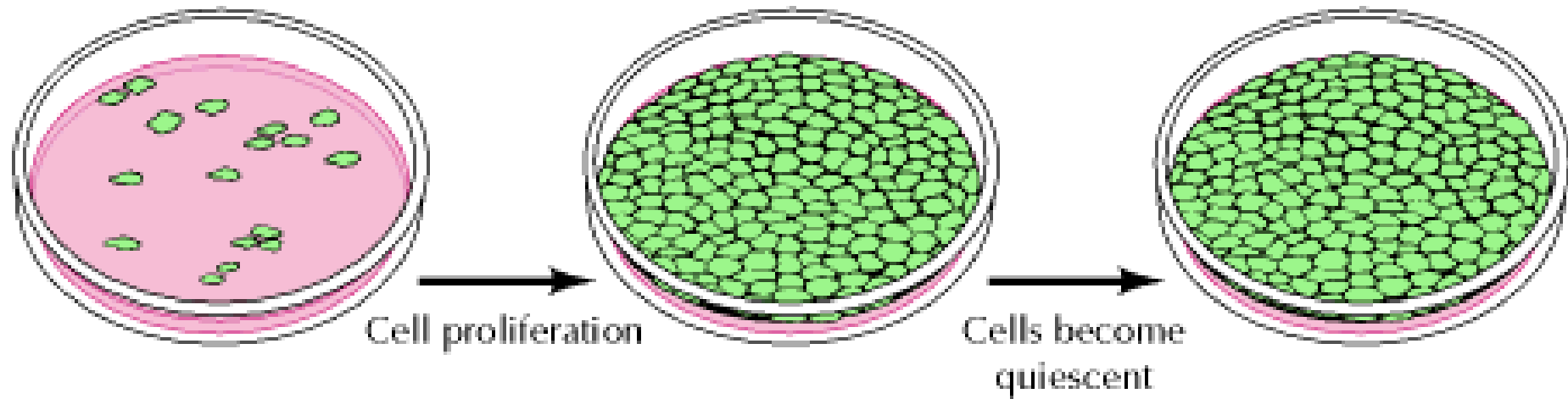
16 Days in vitro

La β -galactosidase è un enzima associato al metabolismo degli zuccheri ed è presente all'interno dei lisosomi a pH acido.

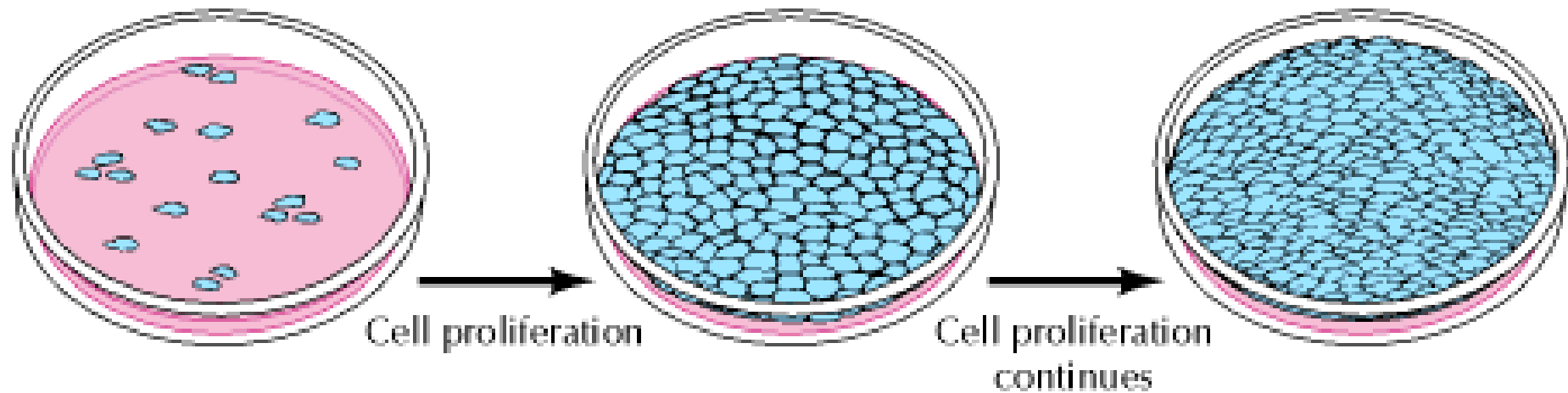
In cellule senescenti *in vitro* si ha un aumento dell'attività lisosomiale residua e la b-Gal viene identificata anche a pH acidi prossimi alla neutralità

Manca inibizione dipendente dalla densità (o da contatto)

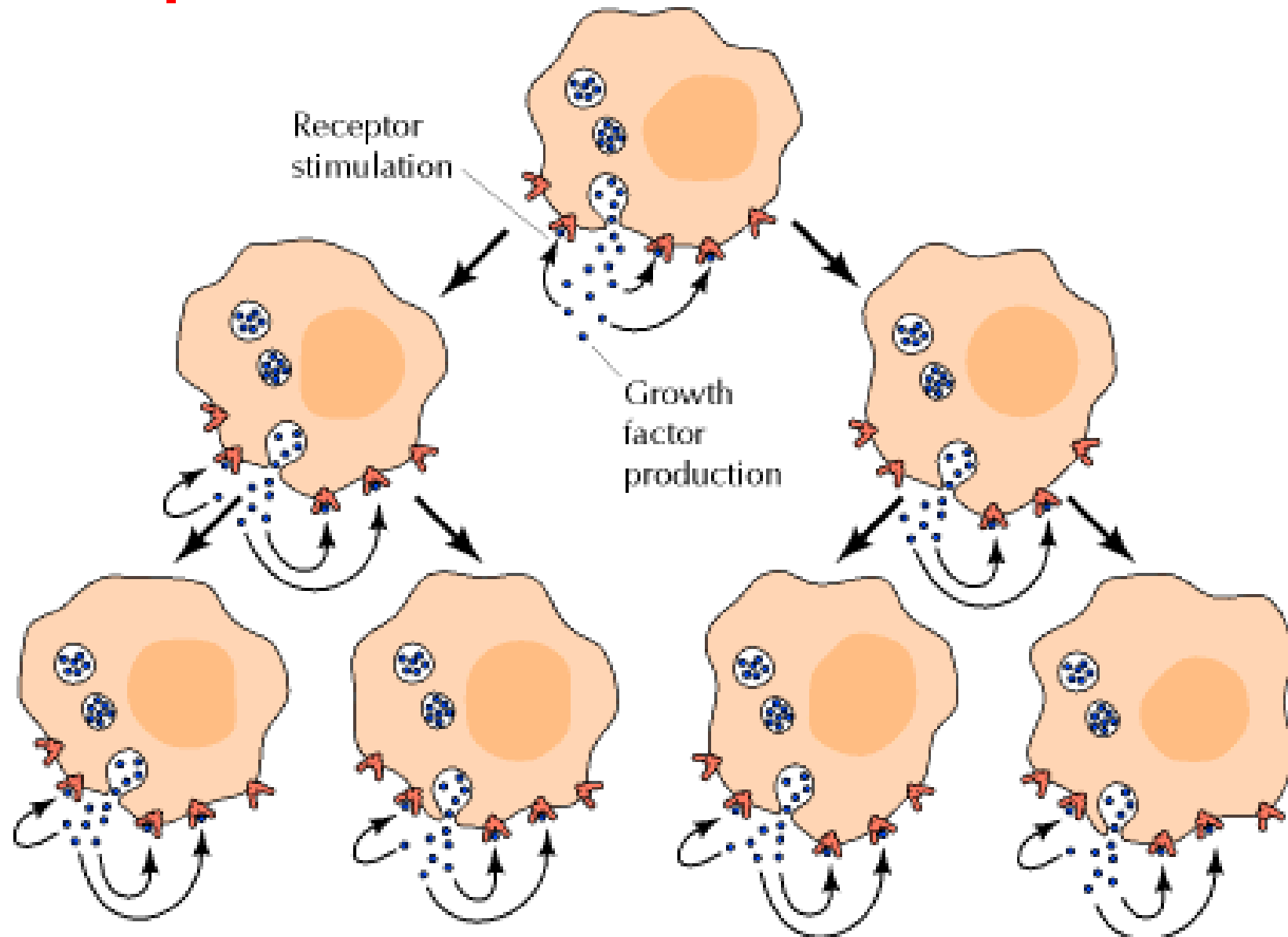
Normal cells



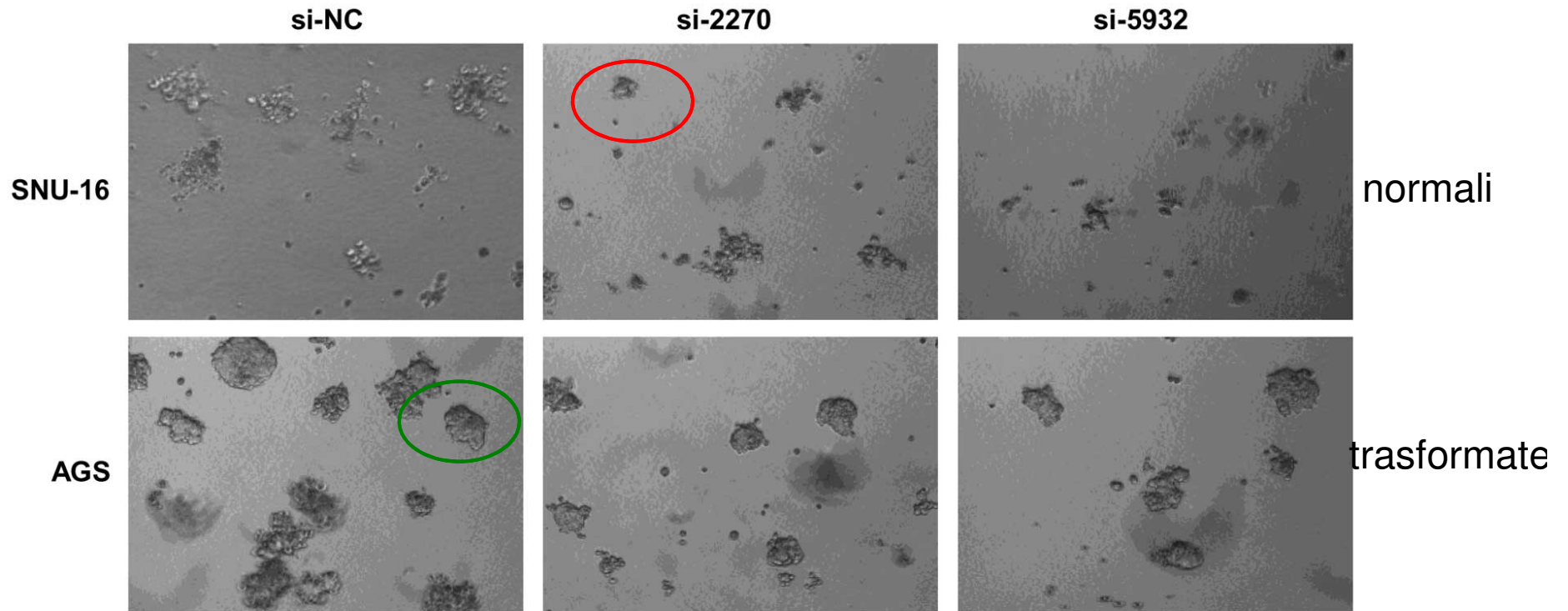
Tumor cells



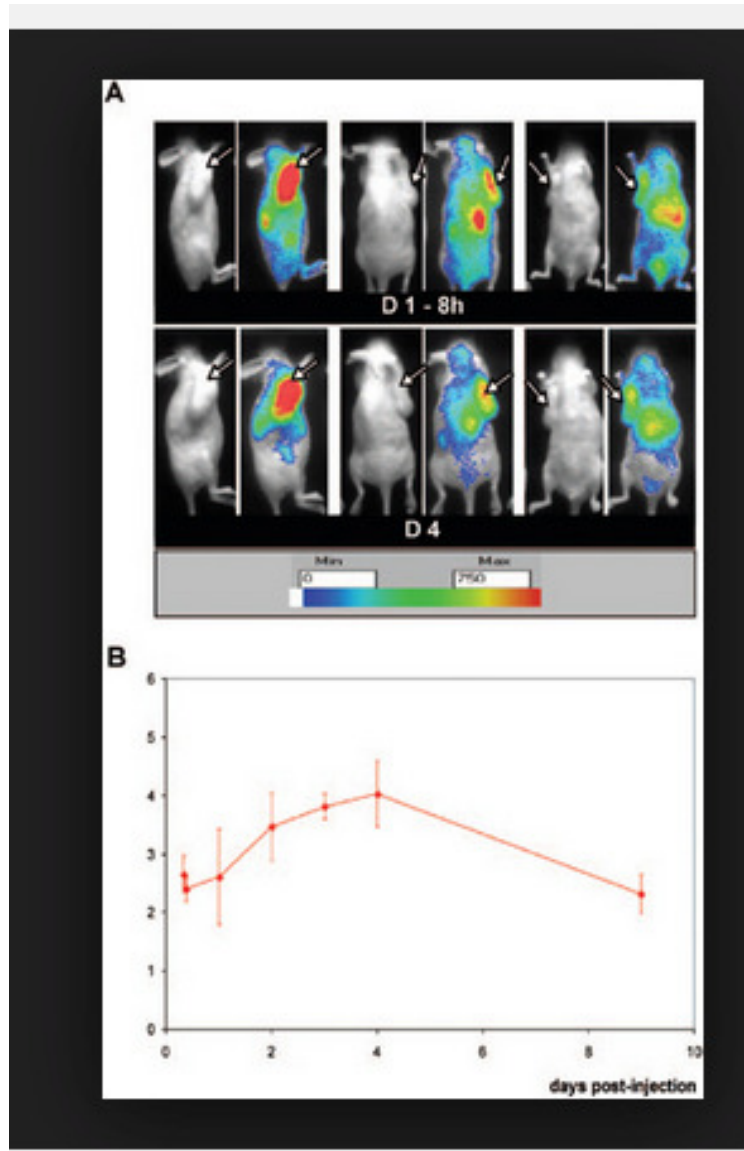
Stimolazione autocrina della crescita: produzione di fattori di crescita



Crescita in soft agar (cellule normali in assenza di substrato vanno in apoptosi)



Cellula tumorale dà origine a tumori quando iniettata in animali



- Una cellula è definita tumorale (fully transformed) quando dà origine a tumori in modelli animali.

- Modelli **xenograft** vengono utilizzati per l'impianto di tumori umani. A questo scopo vengono utilizzati topi "nudi", privi di sistema immunitario (privi di timo) e pertanto incapaci di distruggere le cellule tumorali umane.

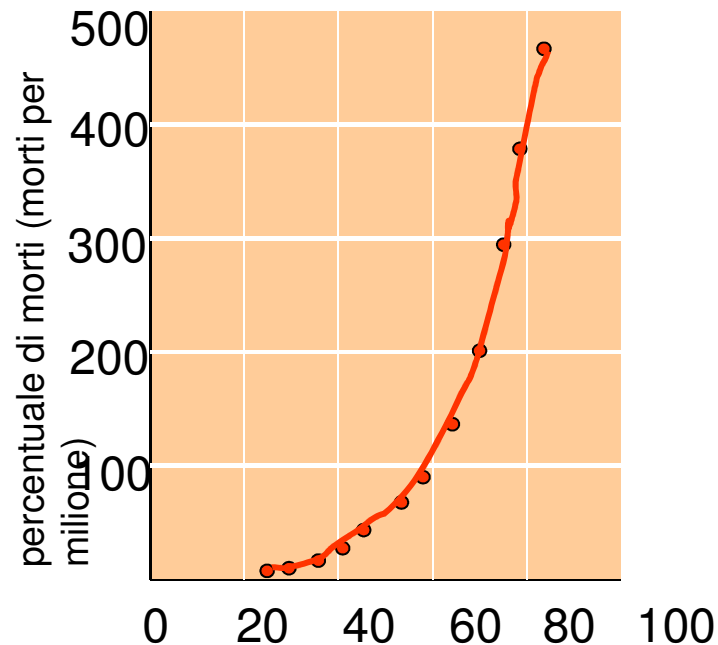
- Ad esempio la linea cellulare MCF7 ottenuta da biopsia di tumore della mammella viene utilizzata per studiare il tumore della mammella in vivo.

Lo sviluppo del cancro

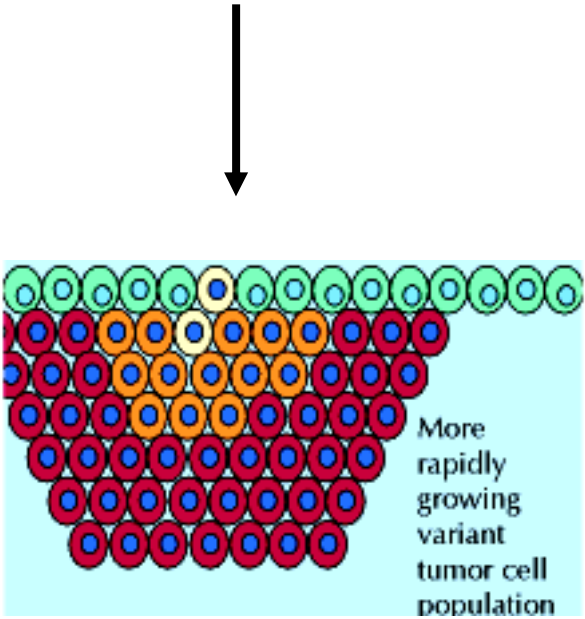
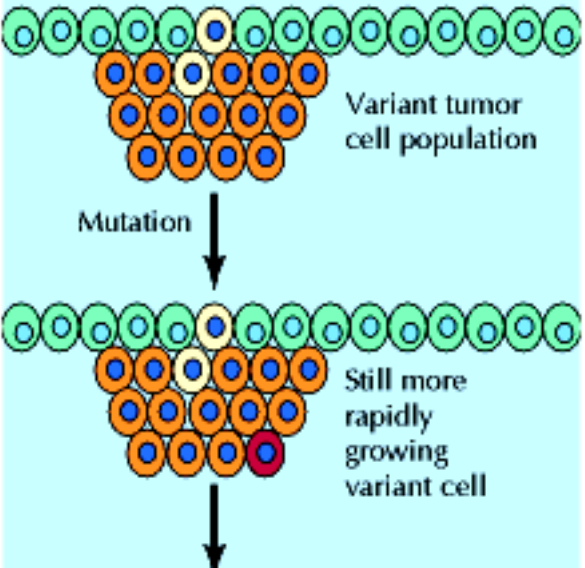
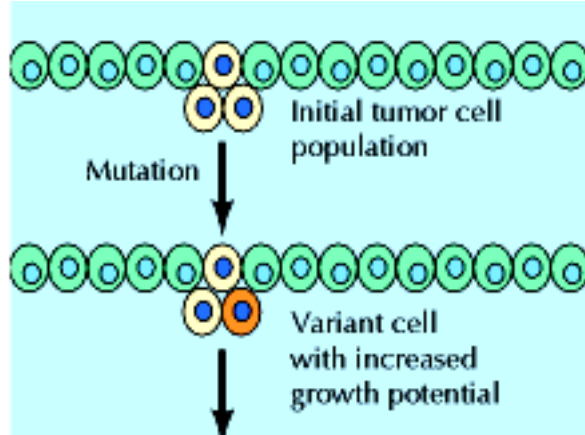
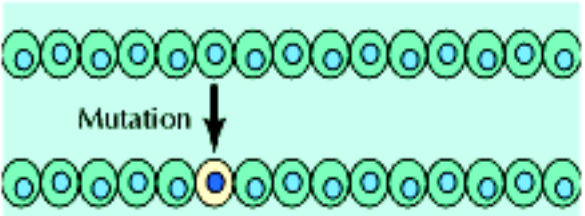
•L'origine clonale dei tumori non implica tuttavia che la cellula progenitrice originale che da' origine ad un tumore abbia acquisito all'inizio tutte le caratteristiche di una cellula cancerosa.

•**Lo sviluppo del cancro è un processo a stadi multipli in cui le cellule gradualmente diventano maligne, attraverso l'acquisizione di una serie progressiva di alterazioni.**

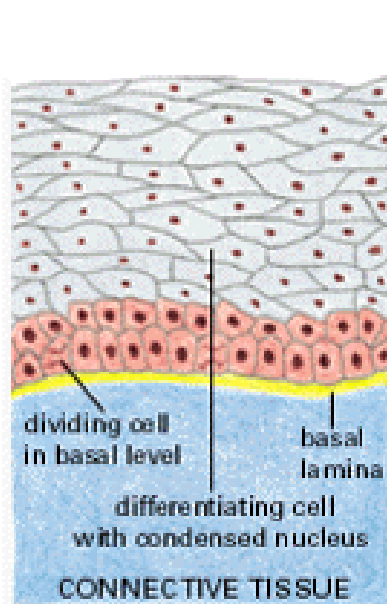
• Una indicazione dello sviluppo in stadi multipli del cancro è data dal fatto che la maggior parte dei cancri si sviluppa tardivamente. L'incidenza del cancro del colon, per esempio, aumenta più di 10 volte fra i 30 e i 50 anni e di altre 10 volte fra i 50 e i 70 anni. Un aumento così drammatico dell'incidenza del cancro con l'età suggerisce che la maggior parte dei cancri si sviluppino come conseguenza di anomalie multiple che si accumulano nel corso di molti anni.



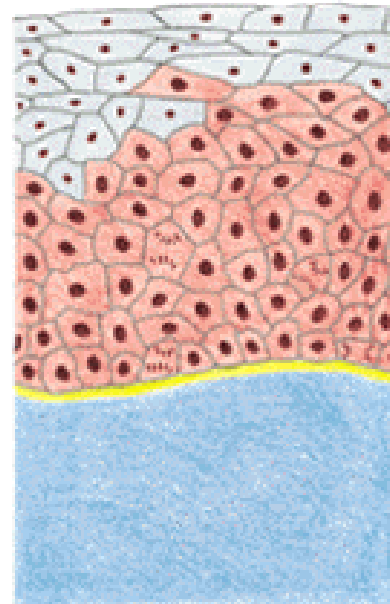
Stadi dello sviluppo del tumore



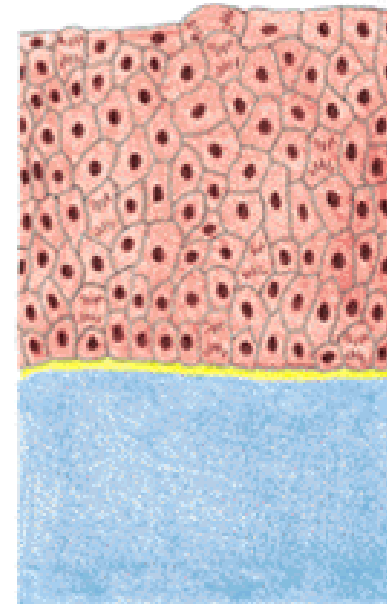
Stadi di progressione nello sviluppo del cancro dell'epitelio della cervice uterina



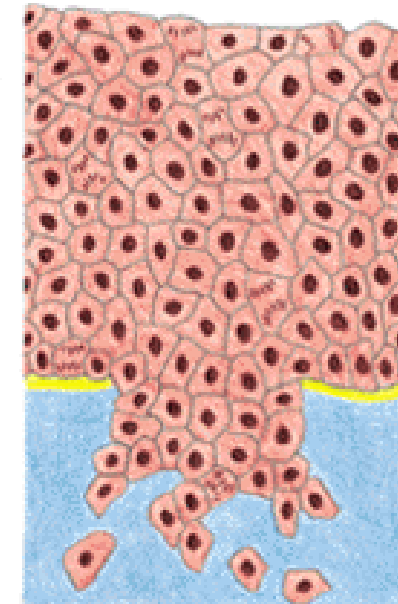
(A) normal



(B) dysplasia

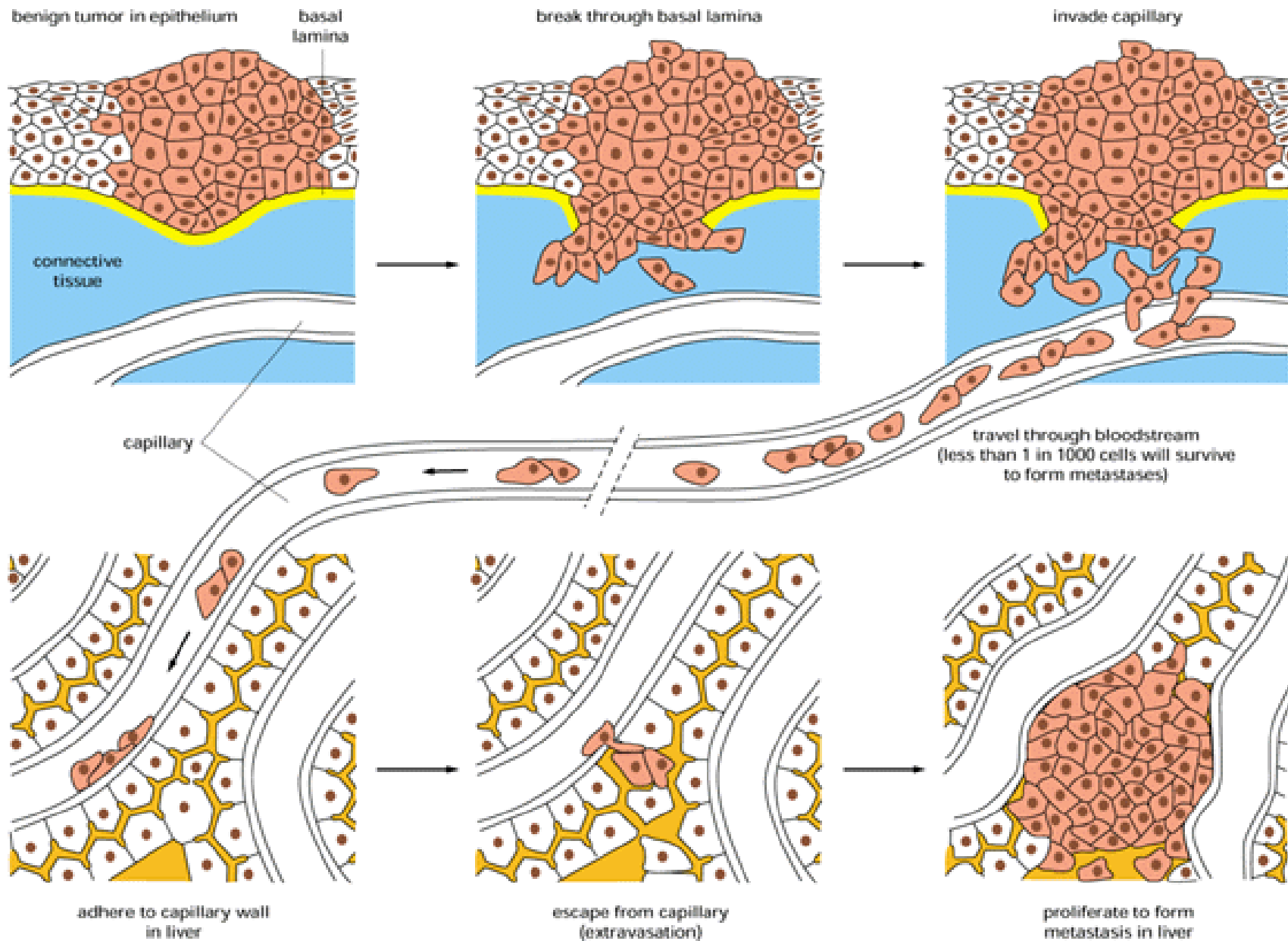


(C) carcinoma *in situ*

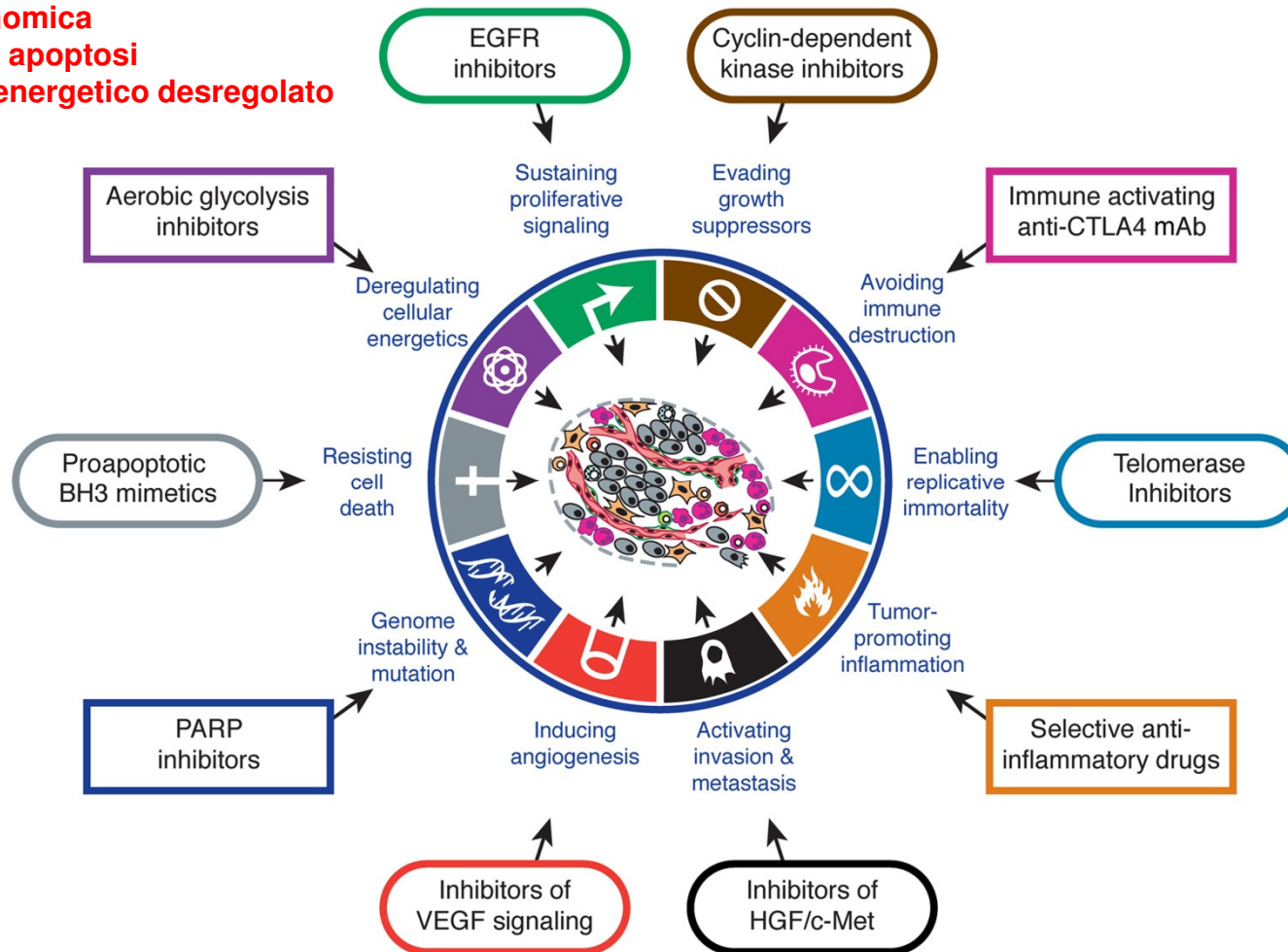


(D) malignant carcinoma

Tappe del processo di metastatizzazione



1. Crescita sostenuta
2. Inibitori della crescita bloccati
3. Capacità di evadere il sistema immunitario
4. Immortalità
5. Capacità di invadere tessuti
6. Induzione di angiogenesi
7. Instabilità genomica
8. Resistenza ad apoptosi
9. Metabolismo energetico disregolato



Le forme di cancro sono classificate a seconda del tessuto e del tipo cellulare da cui esse derivano:

- 1. Carcinomi: da cellule epiteliali**
- 2. Sarcomi: da tessuti connettivali o muscolari**
- 3. Leucemie: da cellule ematopoietiche e da cellule del sistema nervoso**

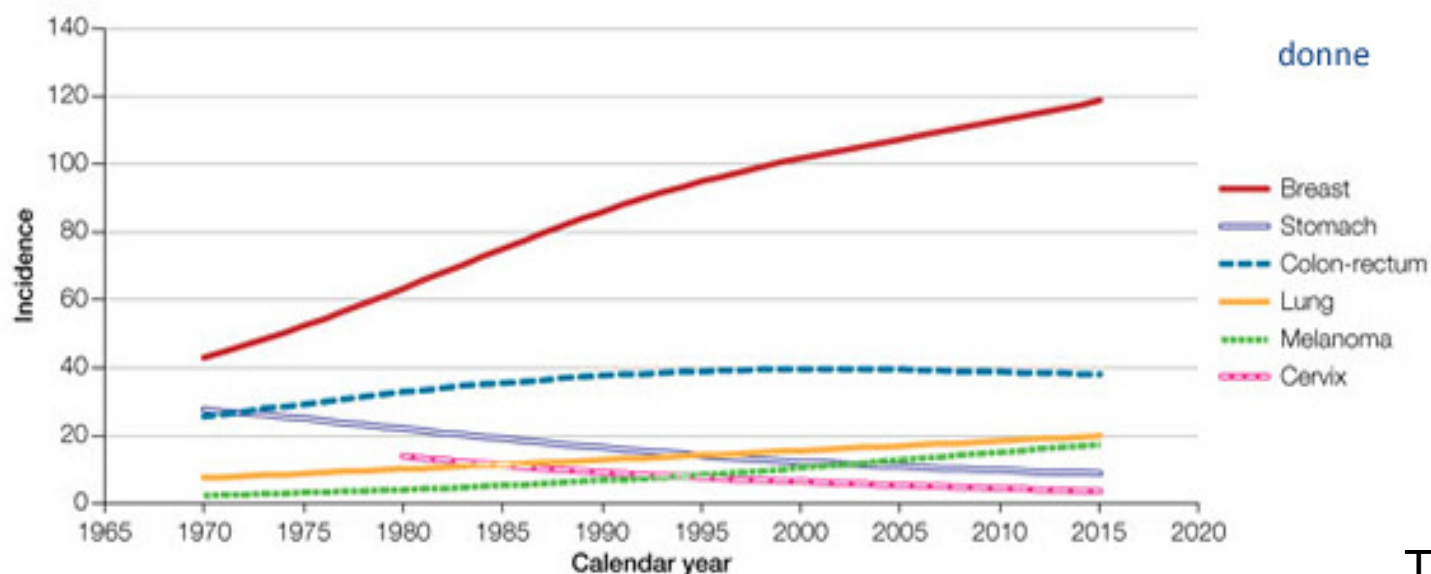
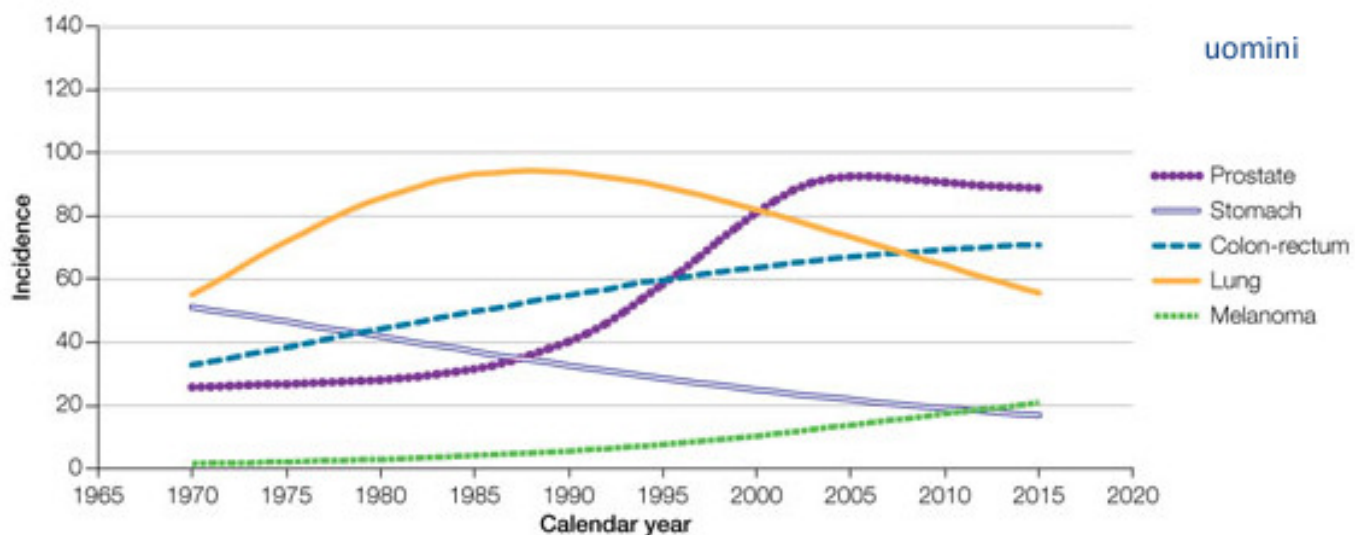
Stadi e gradi di un tumore

Stadio: indica quanto è grande un tumore e quanto si è diffuso nell'organismo (T; N; M; tumor, node, metastasis)

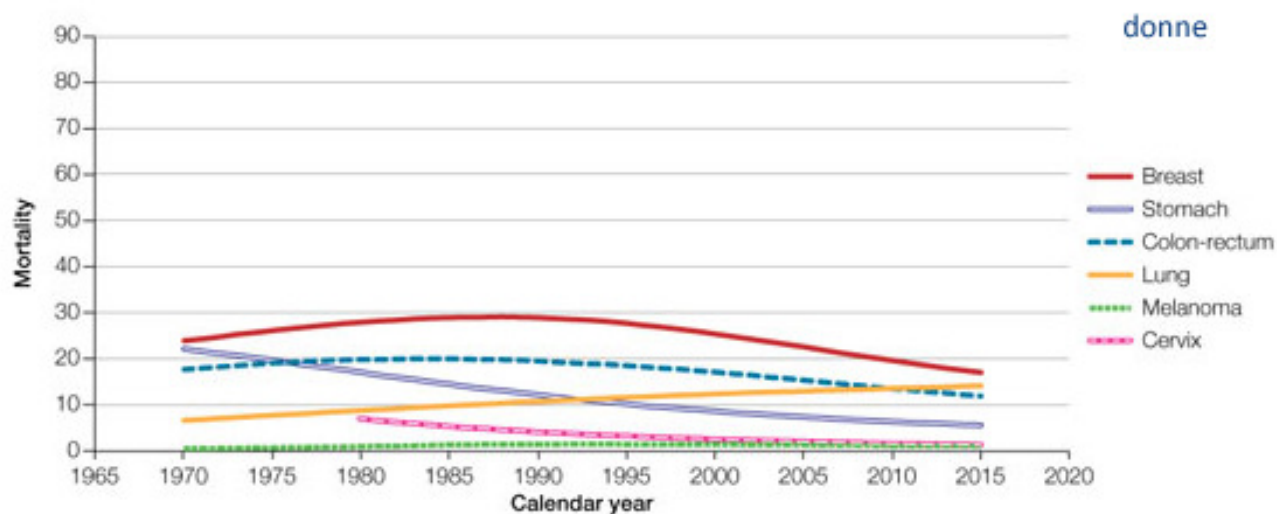
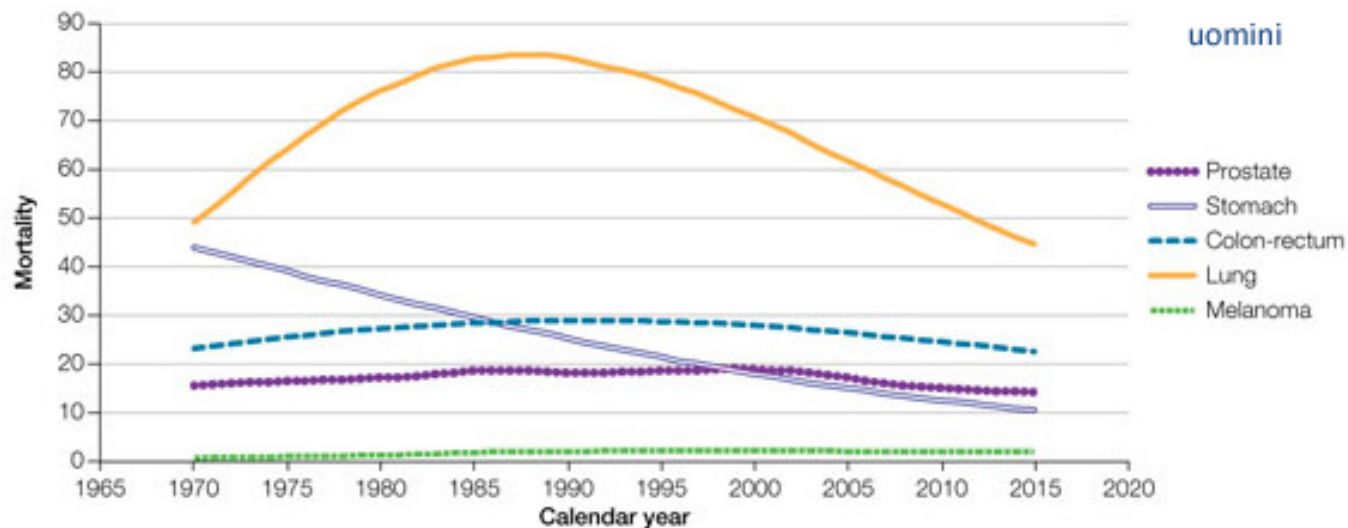
Grado: descrive quanto le cellule tumorali sono diverse dalle cellule sane. I tumori di grado 1 hanno cellule molto simili a quelle sane e tendono a crescere lentamente.

Quelli di grado 3 si discostano molto per caratteristiche morfologiche da quelle dei tessuti normali e tendono a crescere e a diffondersi rapidamente.

Italia: incidenza (numero di nuovi casi di tumore che si verificano in una data popolazione in un dato periodo)



Italia: Mortalità (il numero di decessi di tumore che sopravvivono in una data popolazione in un dato periodo)



Fattori di rischio

- Raggi ultravioletti: basalioma (tumore dello strato basale dell'epidermide)
- Fumo
- Dieta: Evitare sostanze potenzialmente cancerogene, come quelle prodotte dalla carne abbrustolita sulla griglia
- Human Papilloma Virus : tumore della cervice uterina
- Obesità
- Geni (gene BRCA 1 e BRCA2 predispongono all'insorgenza del tumore della mammella e ovarico)

Geni coinvolti nello sviluppo dei tumori

Un **oncogene** è un gene che codifica una proteina che **potenzialmente** indirizza la cellula verso lo sviluppo di un fenotipo neoplastico

Un **proto-oncogene** è un gene normale che può diventare oncogenetico a causa di mutazioni o di un aumento dell'espressione.

I proto-oncogeni codificano proteine che regolano il ciclo cellulare e il differenziamento. Possono anche essere coinvolti nella trasduzione del segnale di avvio della mitosi.

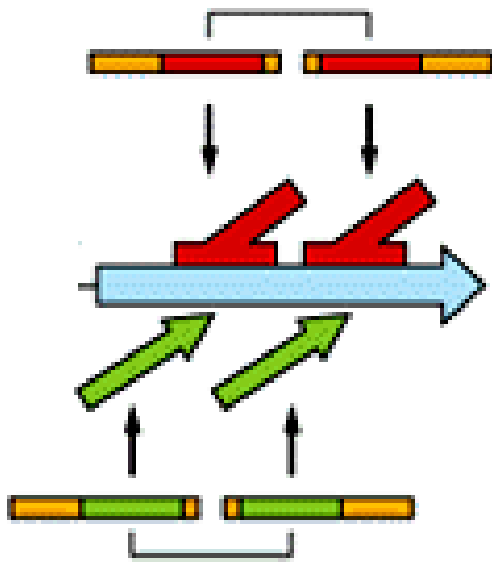
La mutazione di una singola copia di un protooncogene può avere un effetto dominante che promuove la crescita di una cellula

Un **gene oncosoppressore** (o semplicemente oncosoppressore) è un gene che codifica per prodotti che agiscono negativamente sulla progressione del ciclo cellulare proteggendo in tal modo la cellula dall'accumulo di mutazioni potenzialmente tumorali.

Nel caso di un gene oncosoppressore, le mutazioni devono ricadere in entrambi gli alleli per promuovere un effetto la crescita cellulare.

GENI ONCOSOPPRESSORI E PROTOONCOGENI

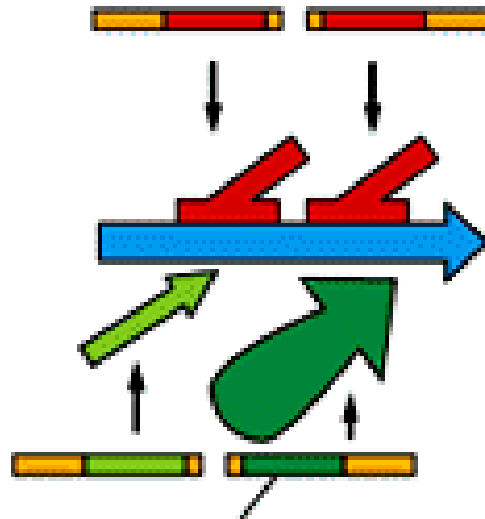
due copie del gene oncosoppressore



due copie del protooncogene

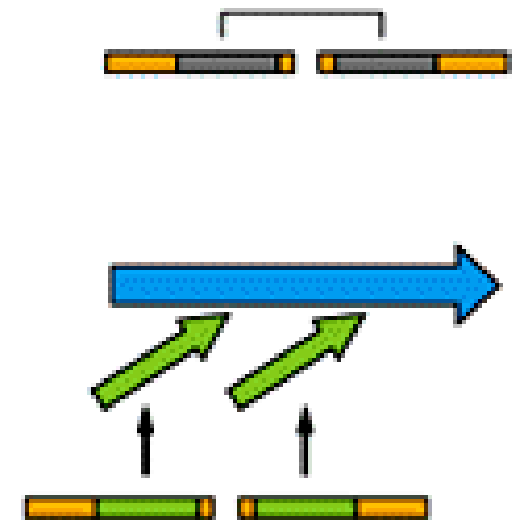
PROLIFERAZIONE CELLULARE **NORMALE**

una mutazione rende un singolo protooncogene iperattivo



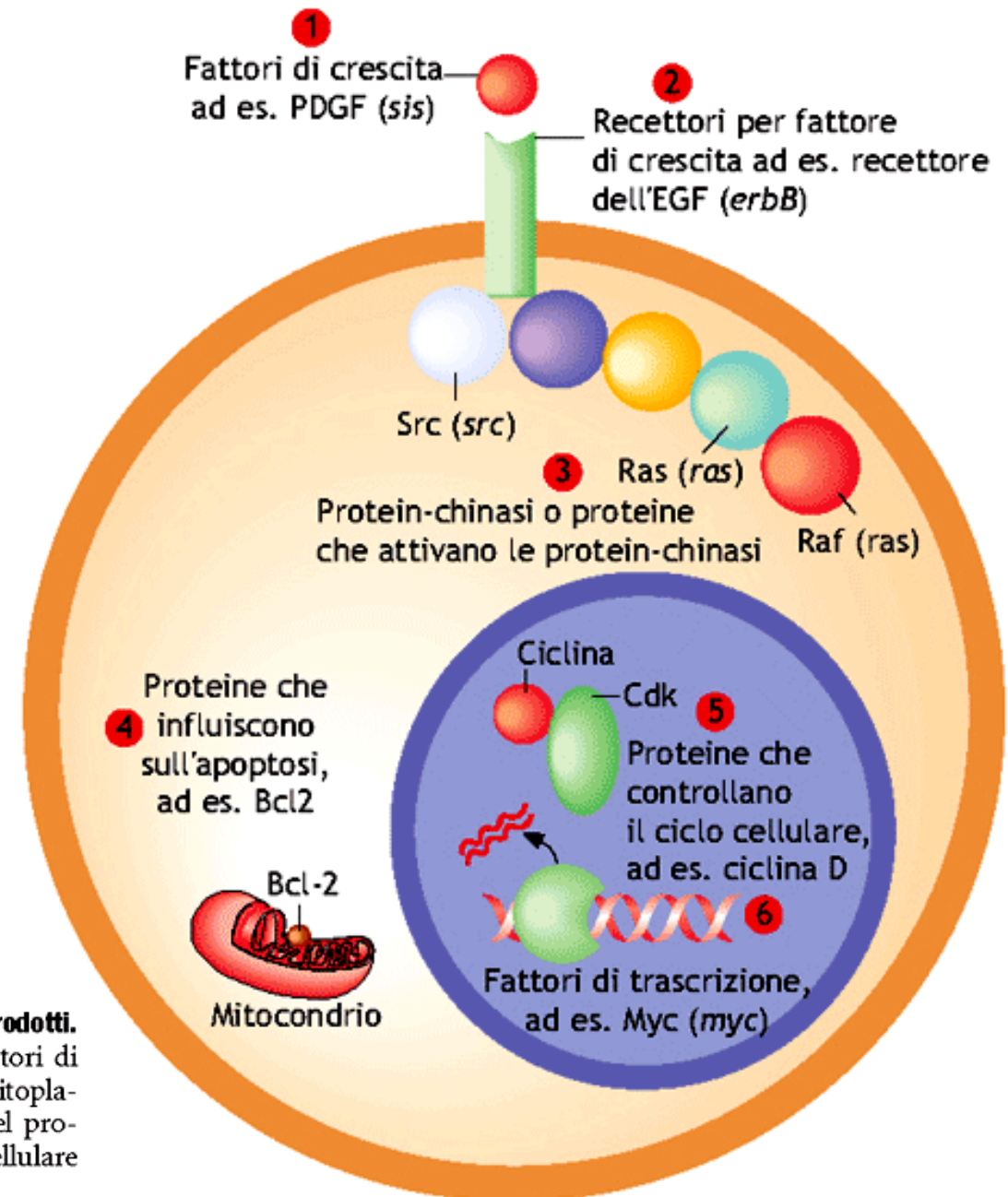
PROLIFERAZIONE CELLULARE **ECESSIVA**

entrambi gli alleli oncosoppressori sono inattivati. Es:p53



PROLIFERAZIONE CELLULARE **ECESSIVA**

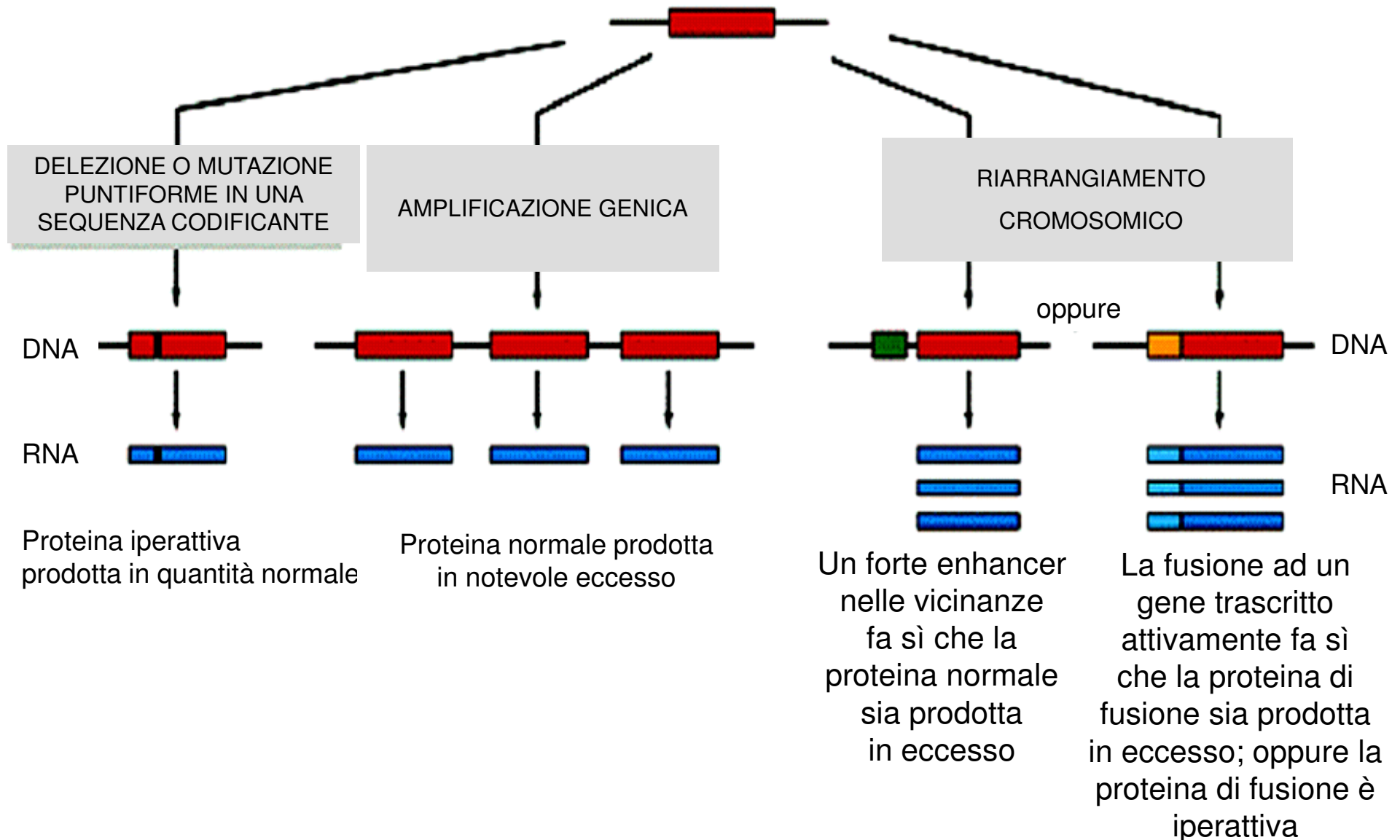
Chi sono i protooncogeni-oncogeni



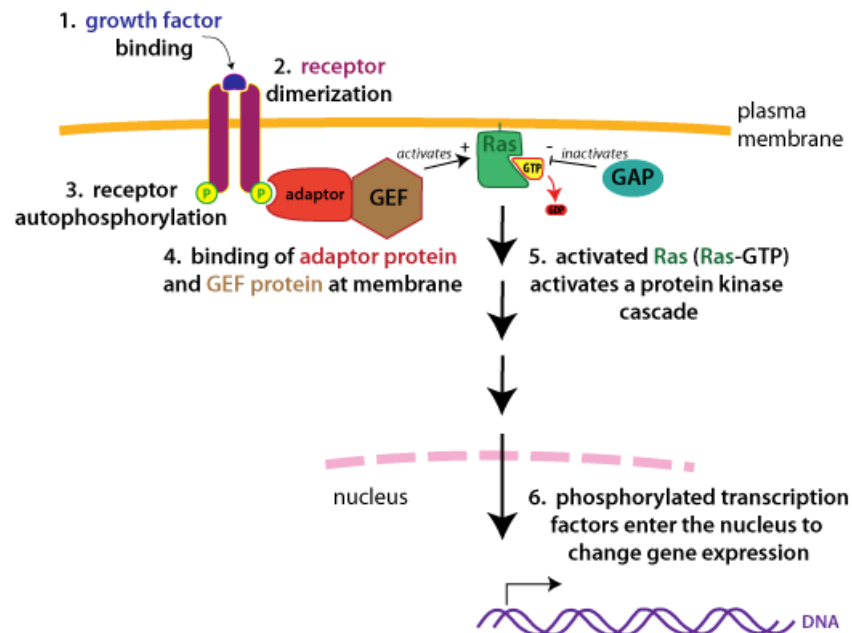
■ **Figura 12.7** Oncogeni e localizzazione cellulare dei loro prodotti. Le proteine codificate dagli oncogeni possono essere dei fattori di crescita (1), recettori per i fattori di crescita (2), molecole citoplasmatiche per la trasduzione del segnale (3), componenti del processo apoptotico (4), proteine nucleari che regolano il ciclo cellulare (5) e fattori di trascrizione (6).

Oncogeni nel cancro umano: Attivazione di un protooncogene

Un meccanismo distinto per cui gli oncogeni sono attivati nei tumori umani è l'**amplificazione genica**, che porta all'elevata espressione del gene. L'amplificazione genica è comune nelle cellule tumorali e avviene con una frequenza mille volte maggiore rispetto alle cellule normali e l'amplificazione degli oncogeni potrebbe avere un ruolo nella progressione di molti tumori verso una crescita più rapida e una maggiore malignità



La proteins ras

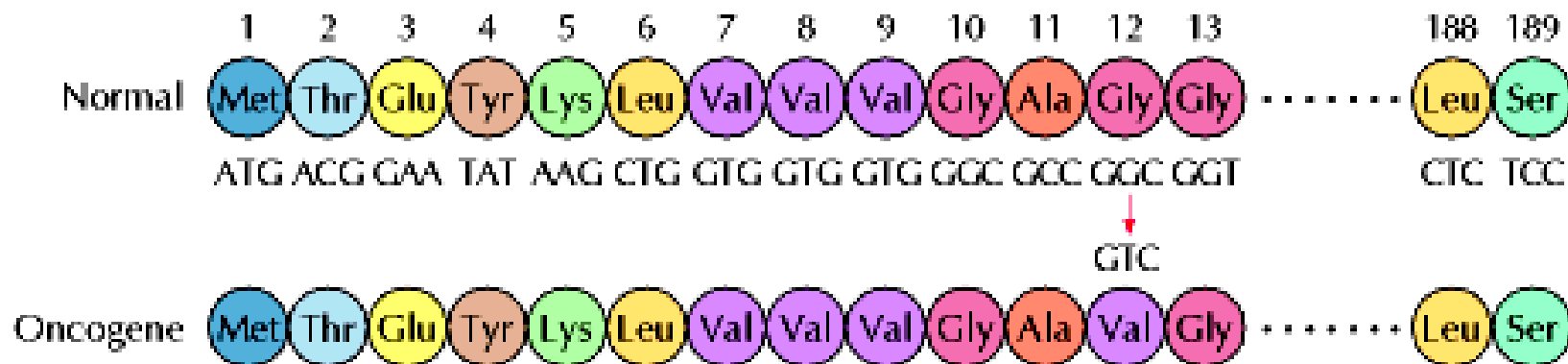


Oncogeni nel cancro umano: RAS

Gli oncogeni ras non sono presenti nelle cellule normali ma si generano nelle cellule tumorali come conseguenza di mutazioni puntiformi (che portano a sostituzioni aminoacidiche critiche) che avvengono durante lo sviluppo del tumore. Le tre mutazioni ricadono nei codoni 12, 13 e 61 (Gln). Le mutazioni sono indotte da carcinogeni chimici e hanno l'effetto di mantenere la proteina costitutivamente attiva.

Alcuni degli oncogeni identificati nei tumori umani sono omologhi cellulari degli oncogeni retrovirali mentre altri sono nuovi oncogeni scoperti per la prima volta in cancri umani. Il primo oncogene umano identificato fu il *rasH*, omologo al *rasH* del virus del sarcoma di Harvey del topo.

Tre membri strettamente correlati della famiglia di geni *ras* (*rasH*, *rask*, *Kirsten-derivato sarcoma murino* e *rasM*) sono gli oncogeni che si incontrano più di frequente nei tumori umani. Questi geni sono coinvolti approssimativamente nel 15% di tutte le neoplasie maligne umane, fra cui circa il 50% dei carcinomi del colon e il 25% di quelli del polmone.



II RETROVIRUS

RNA Parentale

Trascrittasi Inversa

Ibrido RNA/DNA

Trascrittasi inversa

Duplex DNA/DNA Lineare

DNA Duplex Circolare

Integrasi

Integrazione

DNA polimerasi dell'ospite

Replicazione (genoma a DNA nella cellula)

RNA pol II dell'ospite

enzimi di splicing dell'ospite

Trascrizione

Genoma Virale a RNA

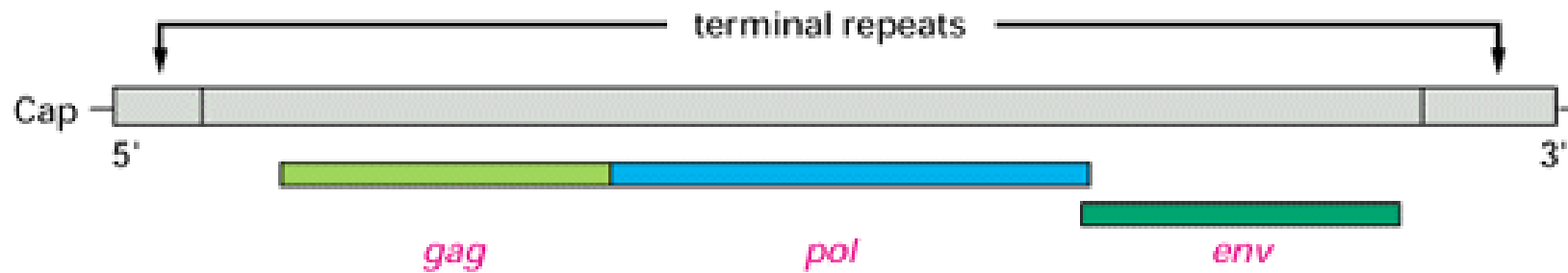
mRNA

proteine

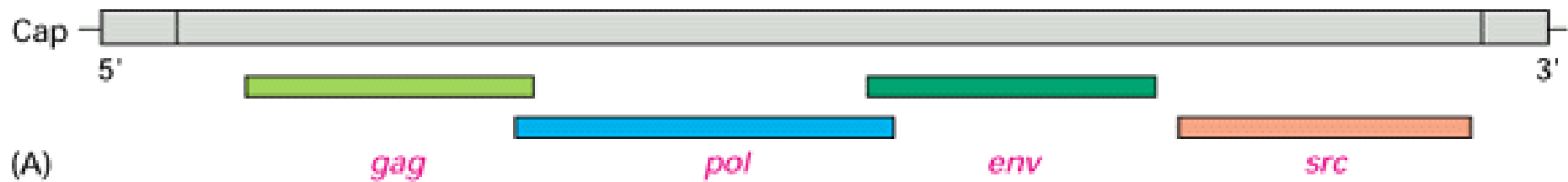


I retrovirus incorporano casualmente oncogeni

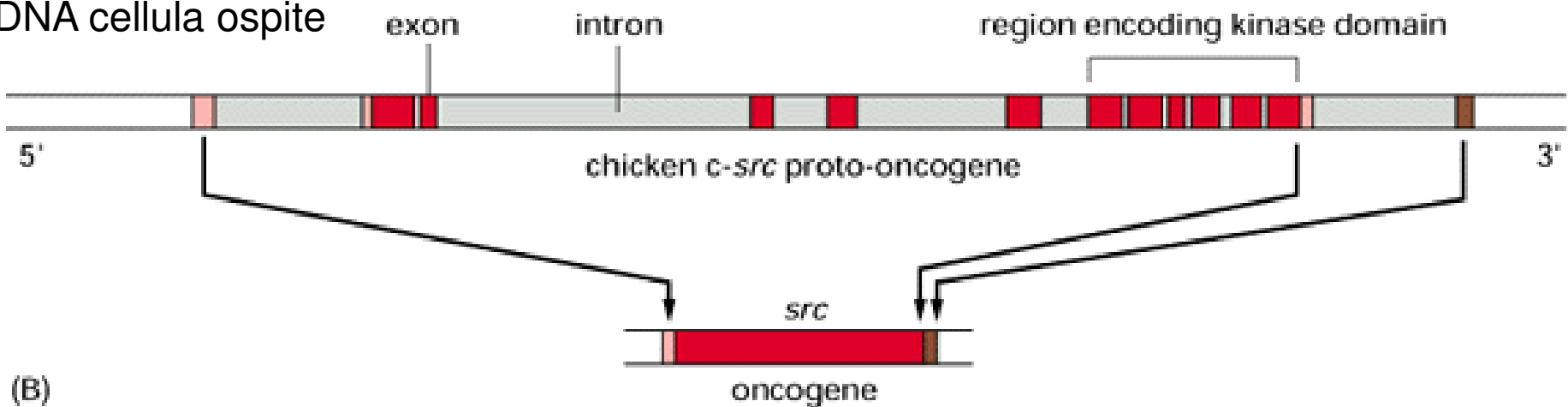
Virus leucemia murina



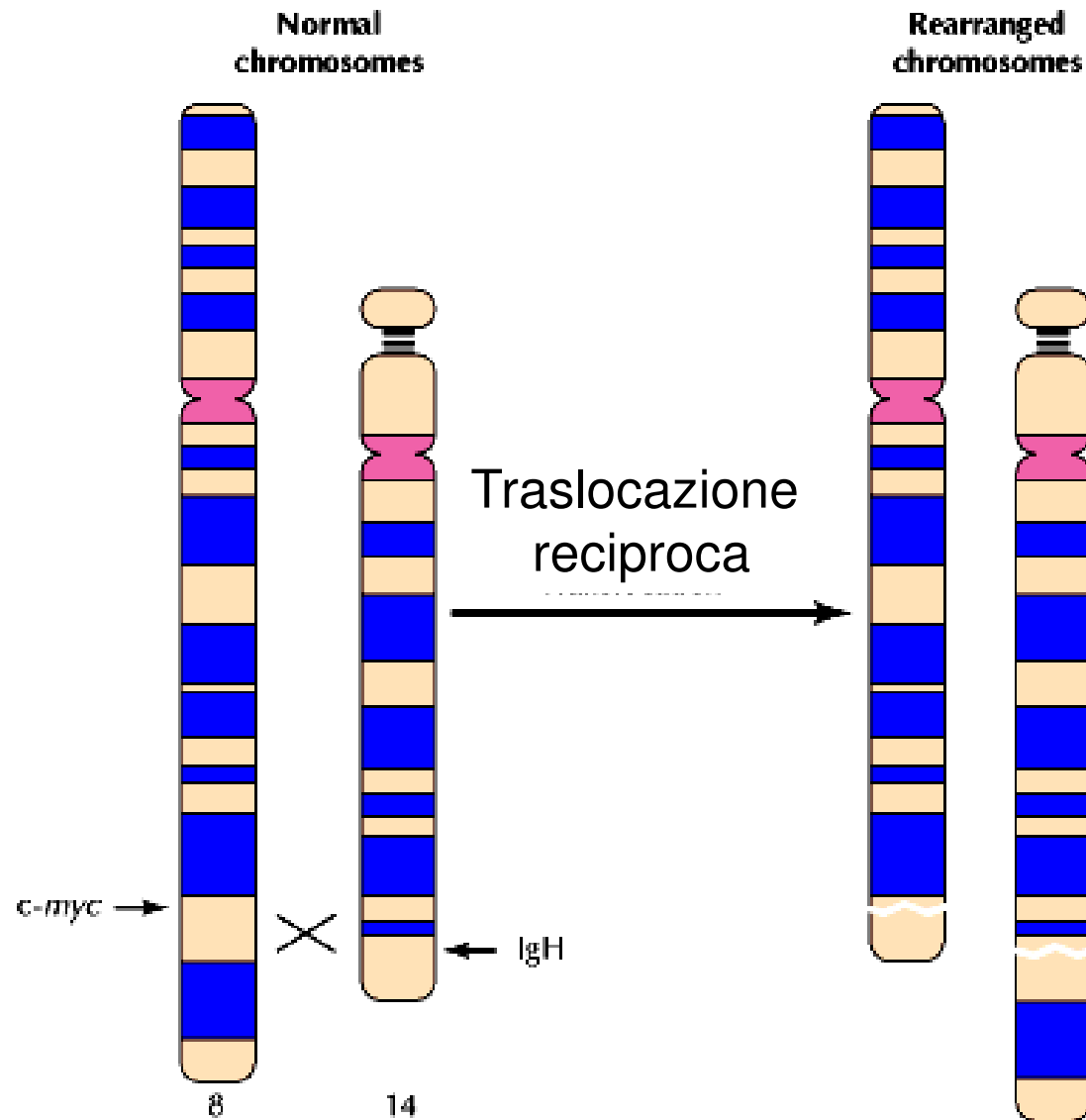
Virus sarcoma di Rous



DNA cellula ospite



Traslocazioni cromosomiche



Le mutazioni puntiformi non sono il solo modo in cui i protooncogeni sono convertiti in oncogeni nei tumori umani. Molte cellule cancerose mostrano anomalie nella struttura dei cromosomi, tra cui traslocazioni, duplicazioni e delezioni. I riarrangiamenti genici che derivano da traslocazioni cromosomiche portano spesso all'attivazione di oncogeni.

Il primo esempio caratterizzato di attivazione di un oncogene per traslocazione cromosomica è stato l'oncogene c-myc nei **linfomi di Burkitt** dell'uomo e nei plasmocitomi di topo, che sono neoplasie dei linfociti B che producono anticorpi.

Promotore dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline

IgH/c-myc

Geni oncosoppressori

Un **gene oncosoppressore** (o semplicemente oncosoppressore) è un gene che codifica per prodotti che agiscono negativamente sulla progressione del ciclo cellulare proteggendo in tal modo la cellula dall'accumulo di mutazioni potenzialmente tumorali.

Nel caso di un gene oncosoppressore, **le mutazioni devono ricadere in entrambi gli alleli** per promuovere un effetto la crescita cellulare.

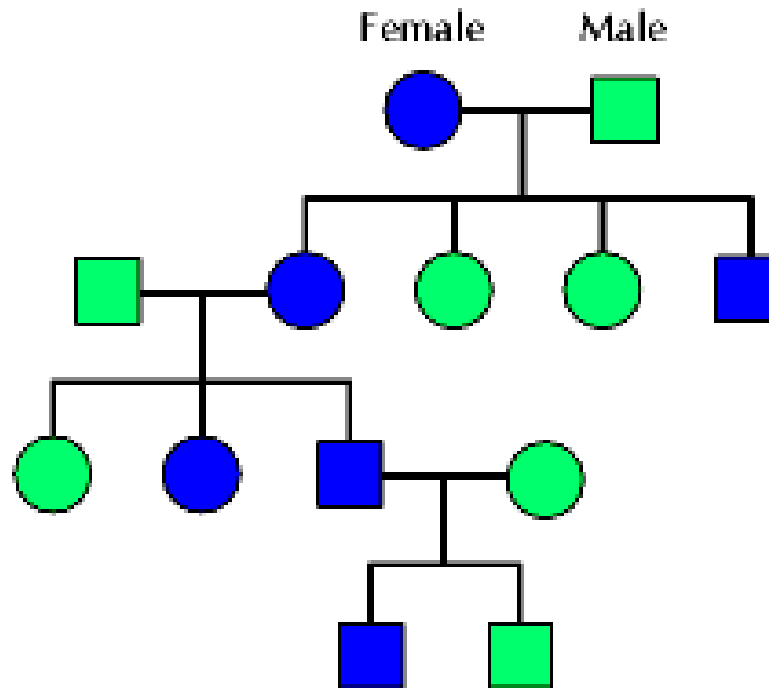
Chi sono geni oncosoppressori: Gene del retinoblastoma

Il primo gene oncosoppressore venne identificato da studi del retinoblastoma, un raro tumore (1 su 20000) oculare dei bambini che può colpire la retina di un solo occhio oppure di entrambi.

Purché rivelato precocemente, il retinoblastoma può essere trattato con successo e molti pazienti sopravvivono fino ad avere una famiglia. Di conseguenza ci si accorse che alcuni casi di retinoblastoma sono ereditari.

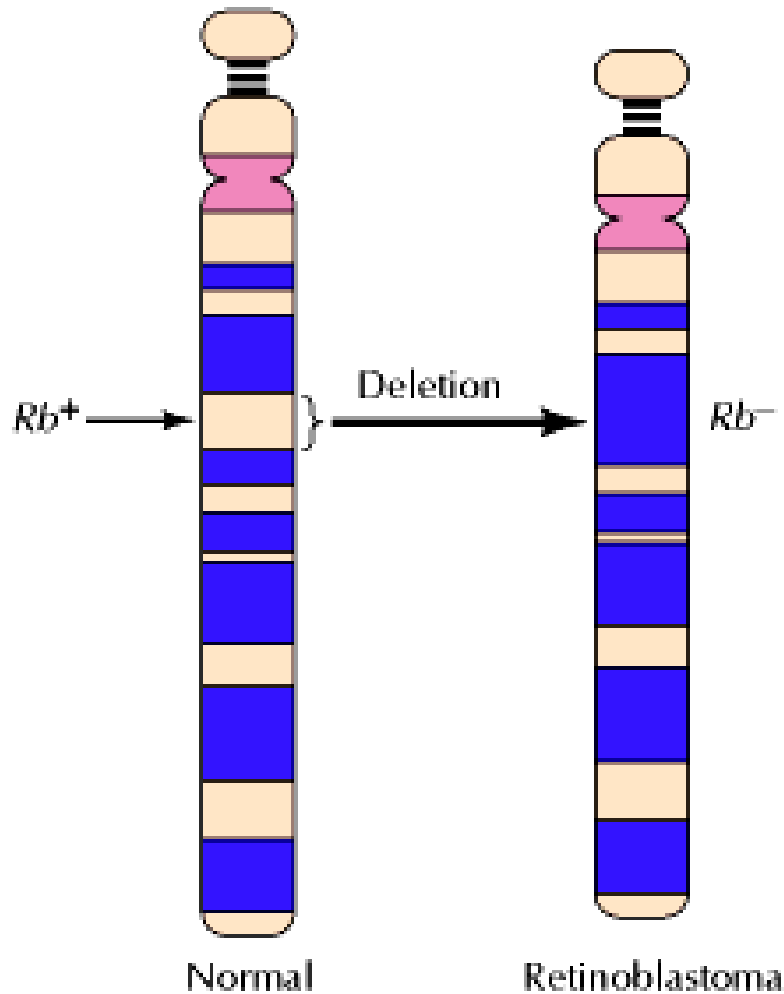
In questi casi circa il 50% dei bambini di un genitore colpito sviluppa il retinoblastoma, in accordo con la trasmissione mendeliana di un singolo gene dominante che conferisce suscettibilità allo sviluppo del tumore.

Ereditarietà del retinoblastoma



Il retinoblastoma si sviluppa quando entrambi gli alleli del gene RB1 (il gene che codifica la proteina Rb) sono inattivati da una mutazione.

Geni oncosoppressori: Rb



Molti retinoblastomi hanno delezioni del locus cromosomico (13q14) che contiene il gene Rb.

Esistono anche mutazioni puntiformi che causano la perdita di attività della proteina.

Il gene Rb è inattivato anche in molti carcinomi della vescica, della mammella e del polmone.

Ciclo cellulare

Regolazione nei mammiferi

Controllo della transizione G1 → S

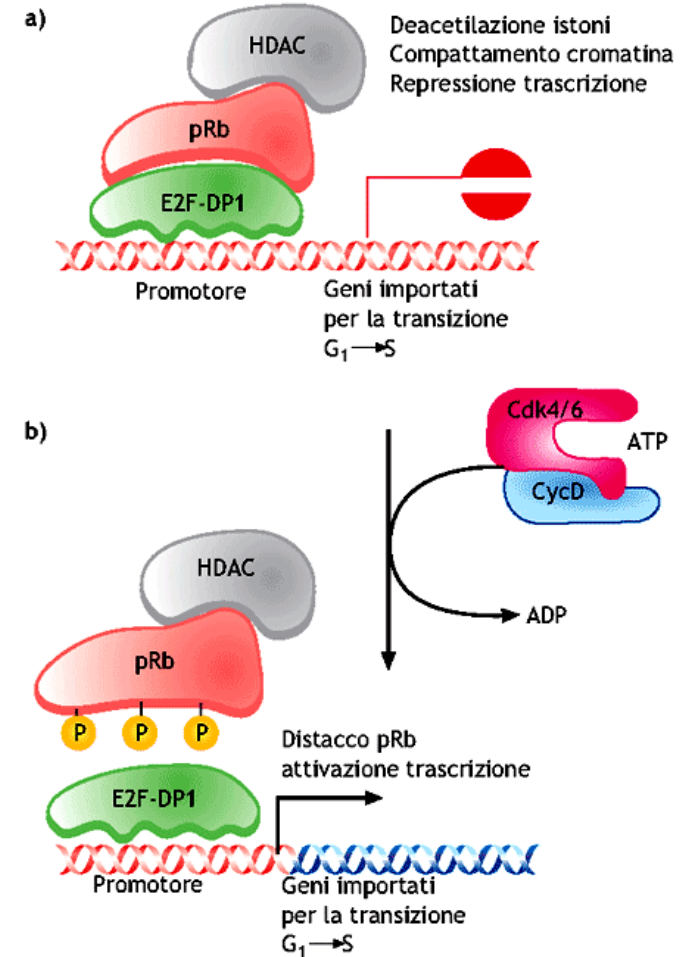
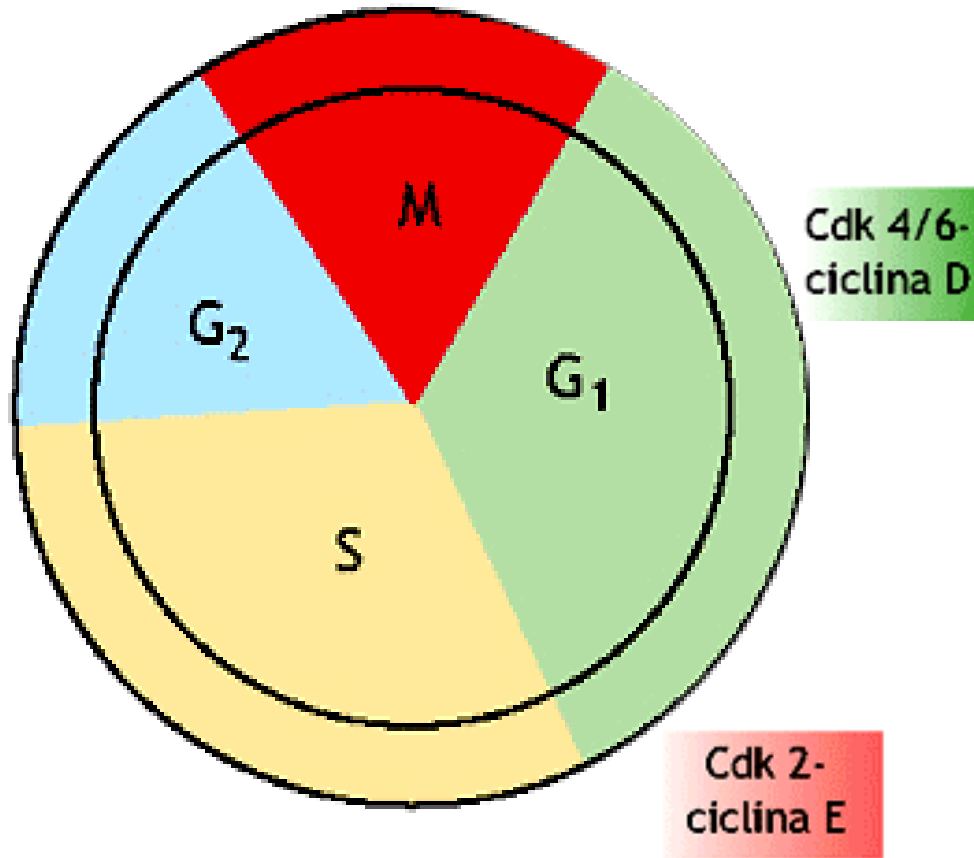
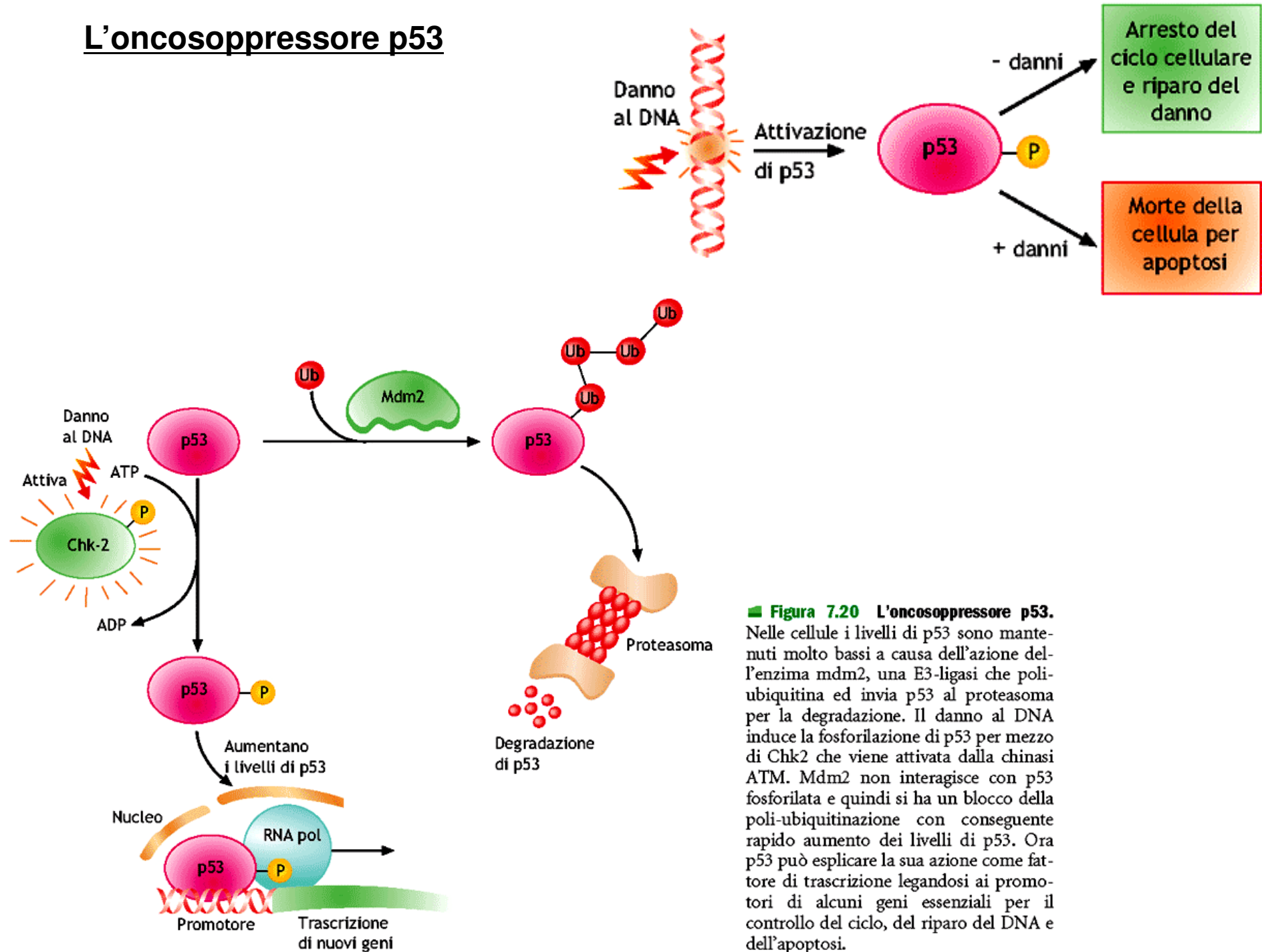


Figura 7.17 Fattore di trascrizione E2F e progressione G₁ → S. In assenza di segnali che promuovono la proliferazione cellulare, quali ad esempio fattori di crescita, pRb non è fosforilata dai complessi ciclina-cdk e può legare il fattore di trascrizione E2F-DP1. **(a)** In questo modo pRb posiziona sui promotori legati da E2F-DP1 enzimi modificatori della cromatina quali le HDAC che causano la repressione della trascrizione a causa del compattamento locale della cromatina. Questa condizione appena descritta è quella di una cellula nella fase G₀ del ciclo cellulare. **(b)** Segnali che portano all'attivazione del complesso Cdk-ciclina innescano la fosforilazione di pRb ed il suo distacco da E2F-DP1. In questo modo la cromatina è meno compatta e l'RNA polimerasi può iniziare a trascrivere i geni sotto il controllo di E2F.

L'oncosoppressore p53



■ **Figura 7.20 L'oncosoppressore p53.** Nelle cellule i livelli di p53 sono mantenuti molto bassi a causa dell'azione dell'enzima mdm2, una E3-ligasi che poliubiquitina ed invia p53 al proteasoma per la degradazione. Il danno al DNA induce la fosforilazione di p53 per mezzo di Chk2 che viene attivata dalla chinasi ATM. Mdm2 non interagisce con p53 fosforilata e quindi si ha un blocco della poli-ubiquitinazione con conseguente rapido aumento dei livelli di p53. Ora p53 può esplicare la sua azione come fattore di trascrizione legandosi ai promotori di alcuni geni essenziali per il controllo del ciclo, del riparo del DNA e dell'apoptosi.

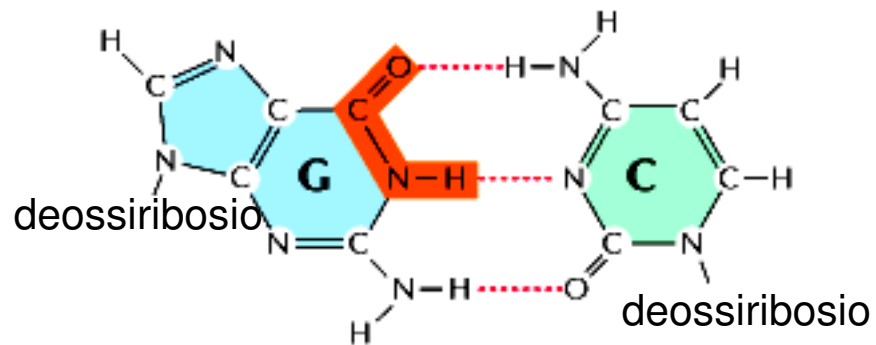
MUTAZIONI GENICHE

L'accuratezza della replicazione del DNA è critica per la riproduzione cellulare, e le stime del tasso di mutazione dei diversi geni indicano che la frequenza di errori durante la replicazione corrisponde solamente una base sbagliata ogni 10^9 - 10^{10} nucleotidi incorporati.

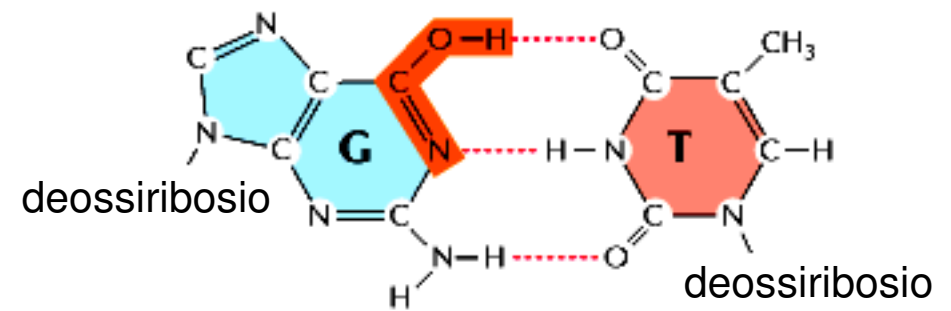
Il grande margine di fedeltà raggiunto dipende largamente dall'attività della DNA polimerasi (attività **esonucleasica** e **proofreading** = correttore di bozze).

CAUSE DI MUTAZIONI : REAZIONI CHIMICHE SPONTANEE

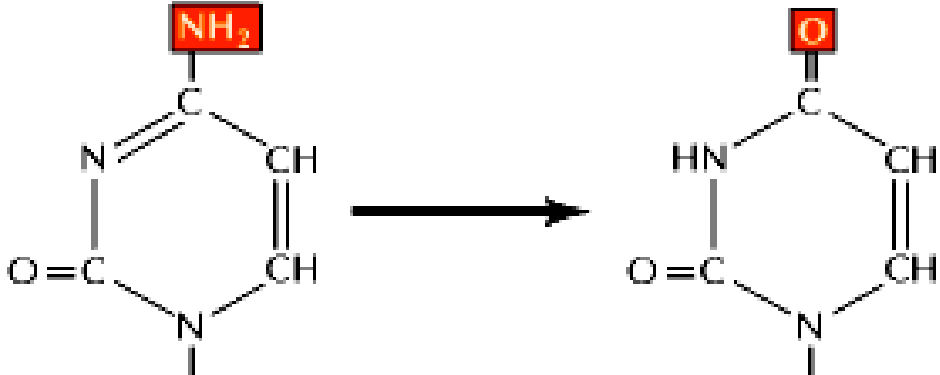
Appaiamento G-C normale



La forma tautomerica rara di G si accoppia con T

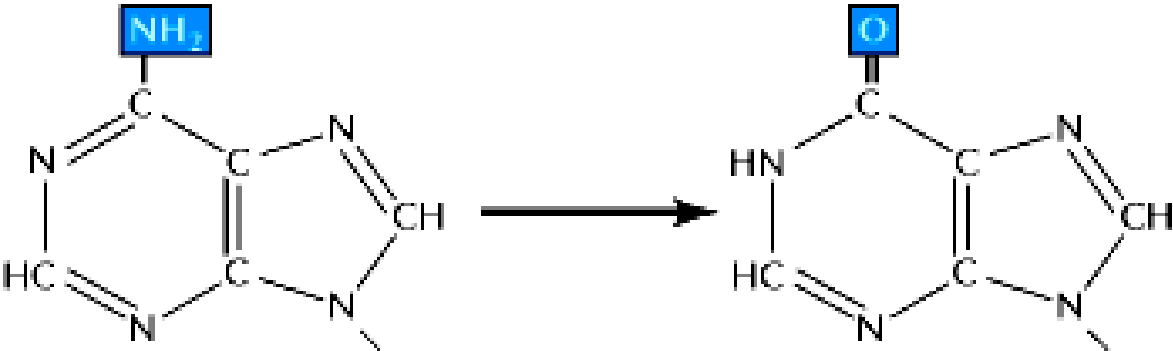
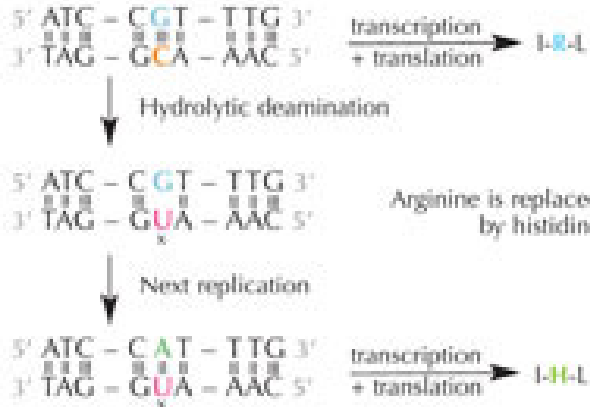


DEAMINAZIONE perdita di un gruppo amminico



Citosina

Uracile

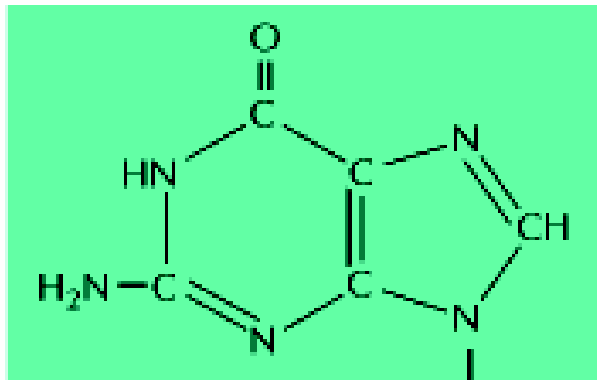


Adenina

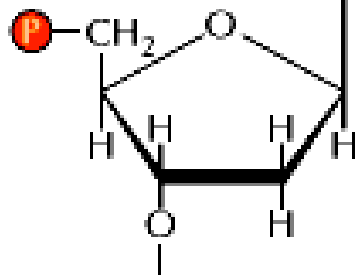
Ipoxantina
(che si appaia con citosina)

DEPURINAZIONE : perdita di basi puriniche dovuta al taglio del legame fra basi puriniche e il deossiribosio, che lascia un sito apurinico nel DNA.

Guanina

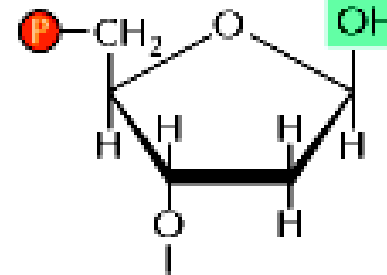


Catena di DNA



dGMP = deossiguanosina monofosfato

Catena di DNA



Sito AP

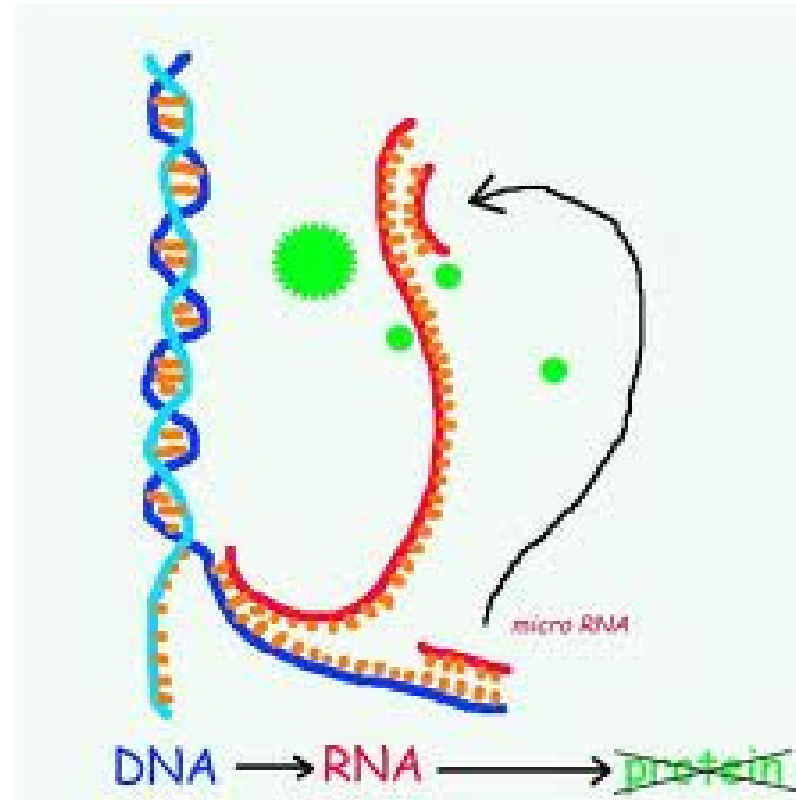
Mutazioni nel DNA indotte da agenti chimici, fisici e biologici

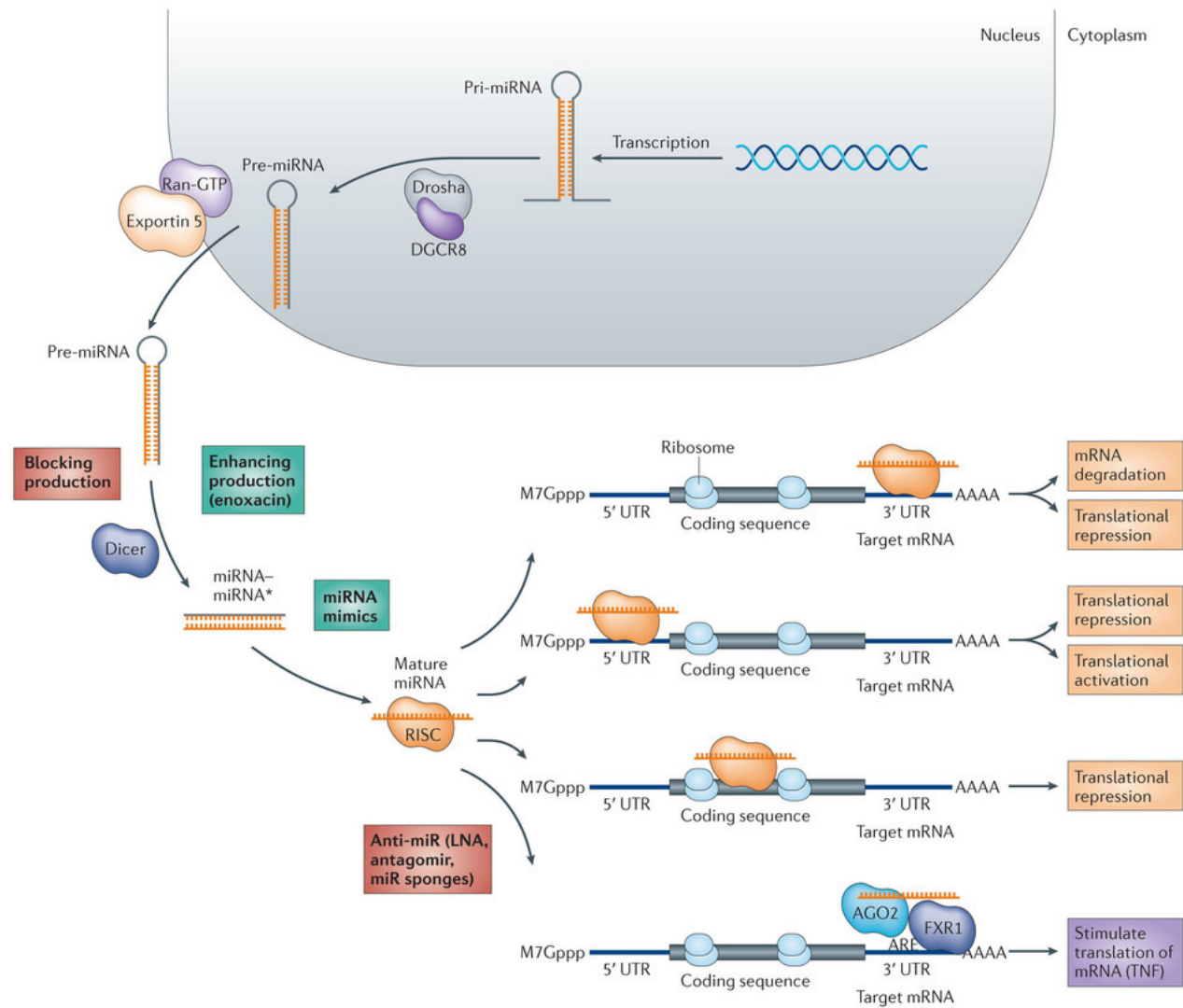
Una serie di agenti possono indurre alterazioni permanenti nella struttura nucleotidica: tra questi vengono generalmente riportati:

- a) Acido nitroso (HNO_2)
 - a) Idrossilamina (NH_2OH)
 - a) Agenti alchilanti
 - b) Analoghi delle basi
- } **CHIMICI**
-
- a) Radiazioni X, γ , U.V.
 - b) Calore
- } **FISICI**
-
- a) Virus oncogeni a DNA
 - b) Virus oncogeni a RNA
- } **BIOLOGICI**

Mutazioni di regolatori dell'espressione genica: microRNA (miRNA)

- 19-30 long single stranded RNAs
- Key regulators of gene expression, development, proliferation, differentiation and apoptosis
- May regulate up to 30% of human genes
- About 2000 miRNAs have been identified so far in human (2013)







Carlo M. Croce, M.D.

**The Ohio State University
Distinguished University Professor
The John W. Wolfe Chair in Human Cancer
Genetics
Director, Institute of Genetics
Director, Human Cancer Genetics Program**

***“microRNAs in the Genesis
of Human Cancers”***

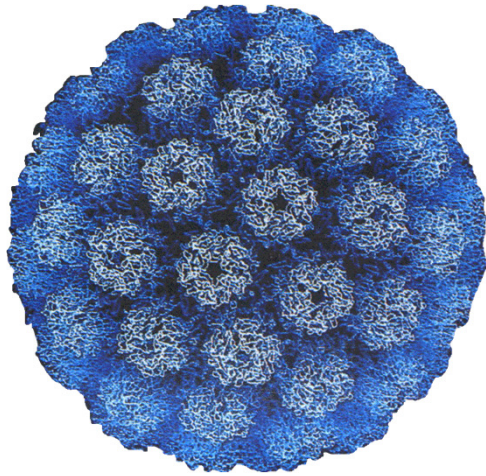
**Frequent deletions and down-regulation of micro-
RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in
chronic lymphocytic leukemia**

George Adrian Calin*, Calin Dan Dumitru*, Masayoshi Shimizu*, Roberta Bichi*, Simona Zupo†, Evan Noch*, Hansjuerg Aldler*, Sashi Rattan*, Michael Keating‡, Kanti Rai§, Laura Rassenti¶, Thomas Kipps¶, Massimo Negrini*, Florenca Bullrich*, and Carlo M. Croce*||

***Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA 19107; †Clinical Immunology, National Institute for Research on Cancer, 16132 Genoa, Italy; ‡Department of Leukemia, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030; §Long Island Jewish Medical Center, New Hyde Park, NY 11040; and ¶Department of Medicine, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093**

Contributed by Carlo M. Croce, October 7, 2002

Poliomavirus: virus tumorali a DNA



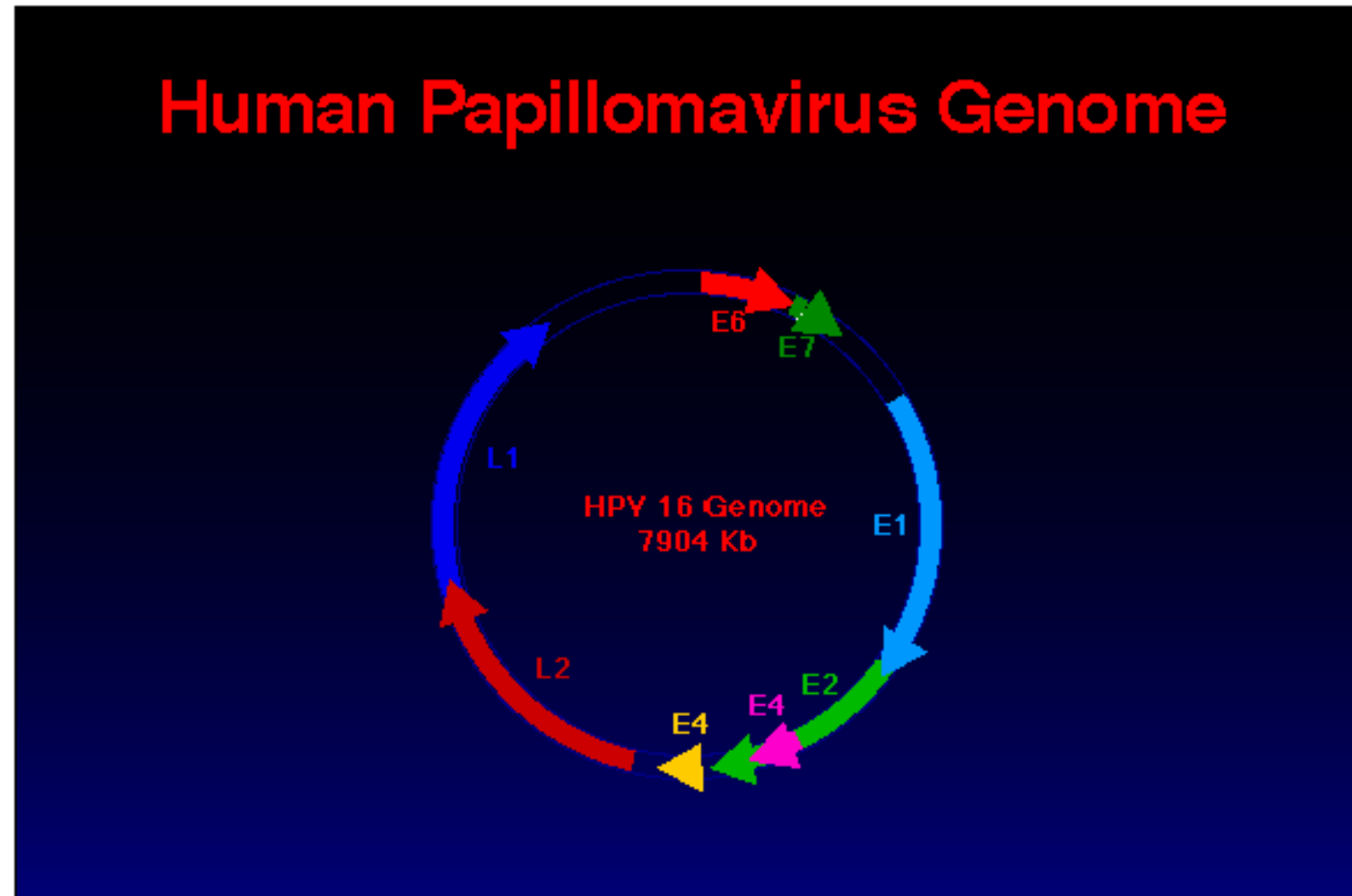
La trasformazione cellulare deriva dall'espressione di due geni della regione precoce, large e small T . Large T sequestra pRb e p53

SV40

Virus tumorali a DNA

Human Papillomavirus Genome

Inducono tumori benigni e maligni.



La trasformazione cellulare deriva dall'espressione di due geni della regione precoce, E6 e E7. E7 sequestra pRb mentre E6 degrada p53.

Attivazione della proliferazione cellulare da parte del virus tumorale a DNA SV40

La proteina Rb sequestra il fattore di proliferazione cellulare



Fattore di proliferazione cellulare inattivo (proteina che regola geni)



La proteina p53 attiva un freno di sicurezza della proliferazione cellulare

La proteina virale antigene T grande sequestra Rb e p53

Fattore di proliferazione cellulare attivo



Trascrizione del gene



Chemioterapia

- **Generalized toxicity (bone marrow, hair follicle, gastrointestinal toxicity)**
- **Mutation of normal cells (insorgence of a different cancer)**

Terapia mirata

Identify and target the key molecular aberration
that drives the malignant phenotype