

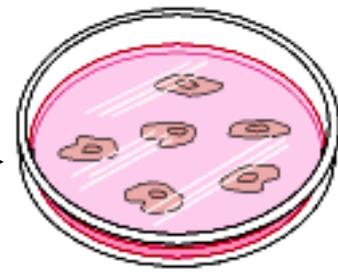
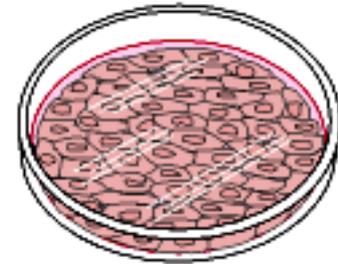
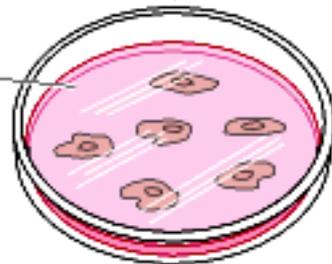
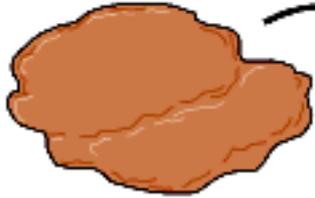
6. Biologia della cellula trasformata

Definizione di cellula trasformata

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

Studio delle cellule trasformate: Colture cellulari da biopsie o cellule normali trasformate con agenti mutageni.

Tessuto (biopsia)



Un frammento di tessuto viene disperso in una sospensione di singole cellule.

Le cellule sono piastrate in una piastra di coltura in un mezzo nutriente

Sospensione cellulare

Mezzo di coltura

Le cellule di questa coltura primaria si attaccano alla piastra e crescono fino a coprirne la superficie.

Coltura primaria

Coltura secondaria

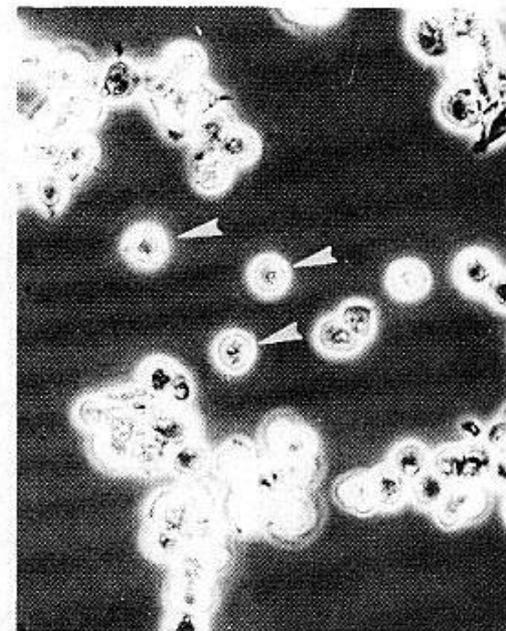
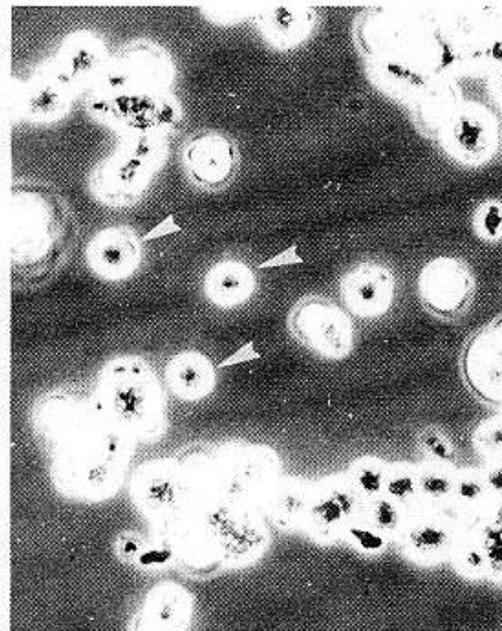
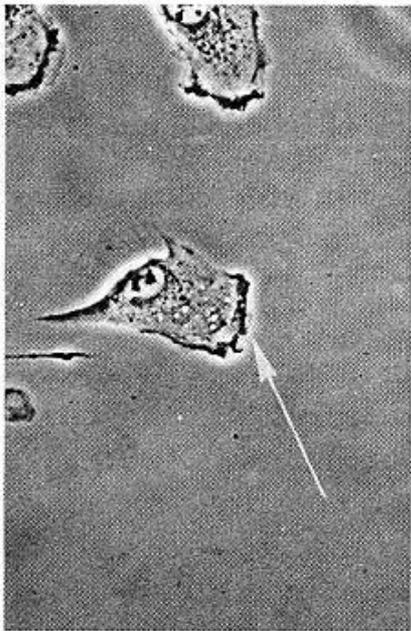
Le cellule possono quindi essere rimosse dalla piastra di coltura e ripiastrate a densità minore per formare una coltura secondaria.

1) 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).



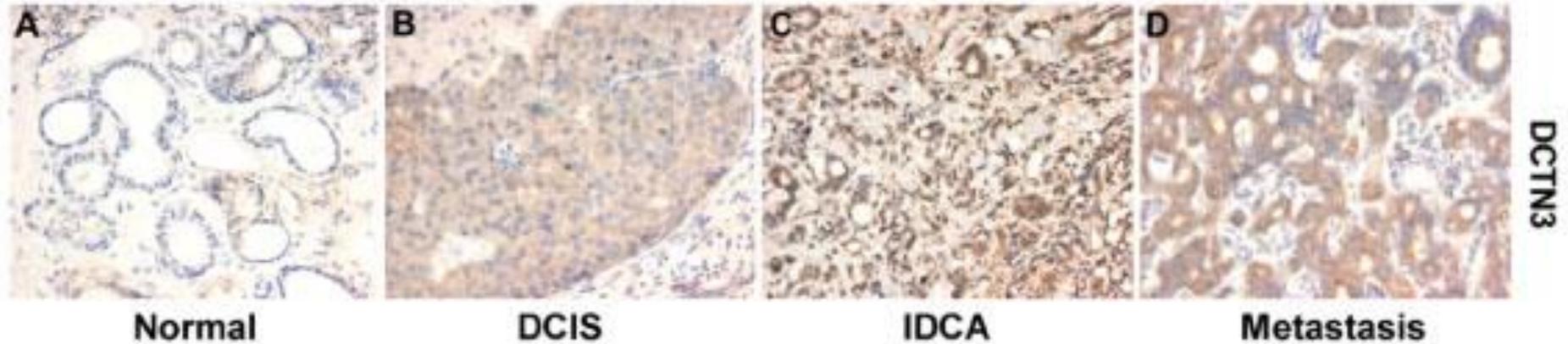
(a)

(b)

(c)

(d)

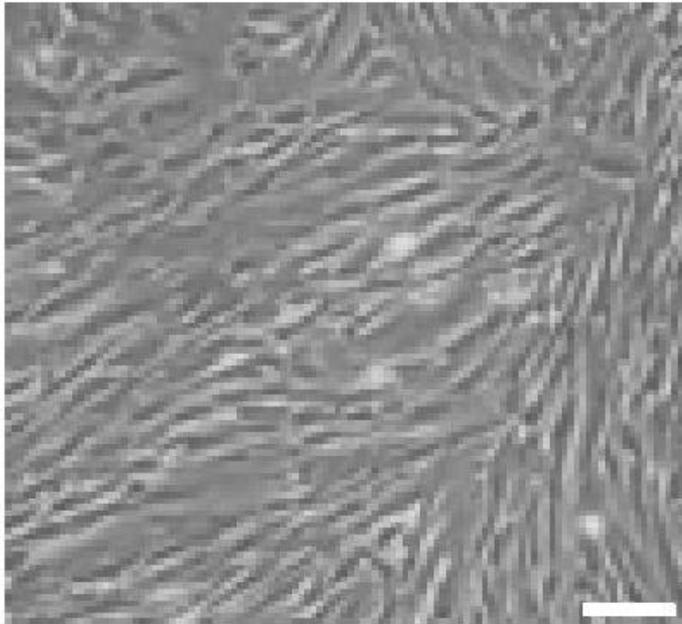
Morfologia: Biopsie di tessuto normale e tumore della mammella



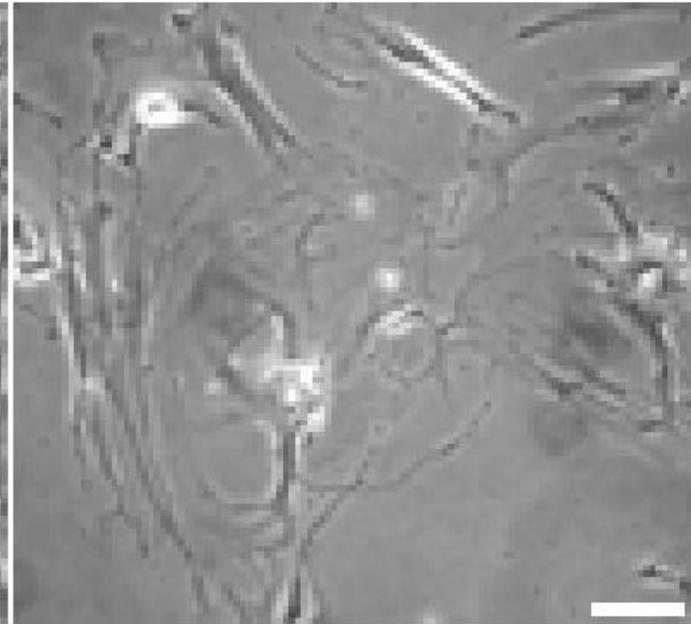
Ductal Carcinoma in Situ
Infiltrating Ductal Carcinoma
Metastatic carcinoma

2. Immortalizzate: Numero illimitato di divisioni

proliferating

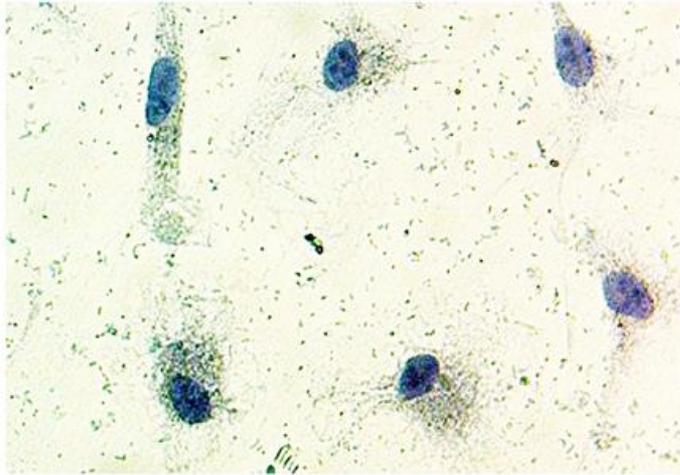


senescent

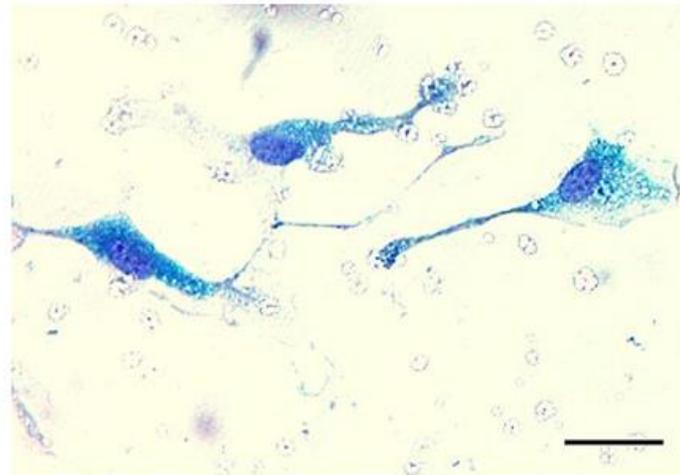


Cellule trasformate non esprimono markers di senescenza

A



2 Days in vitro



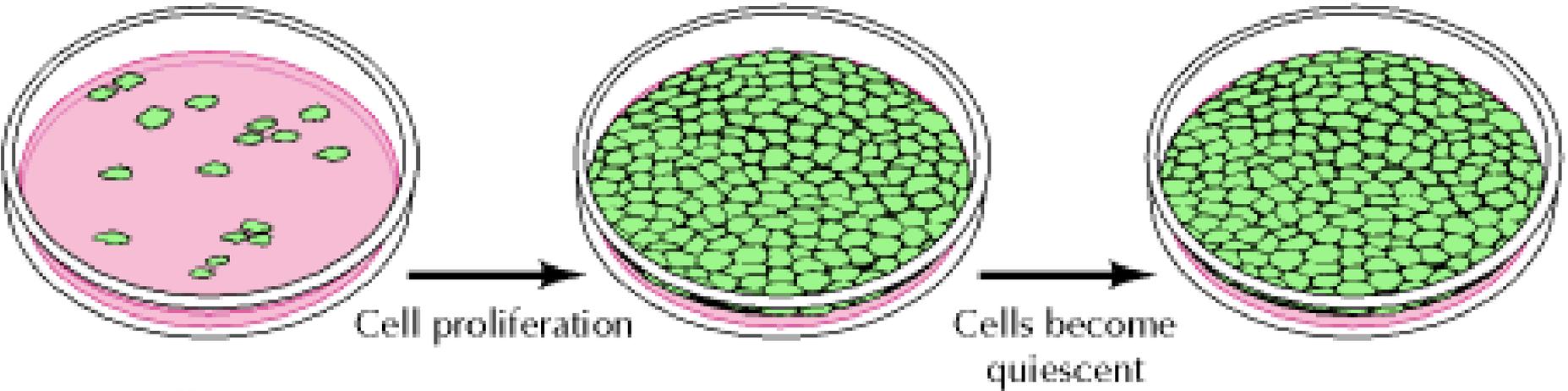
16 Days in vitro

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

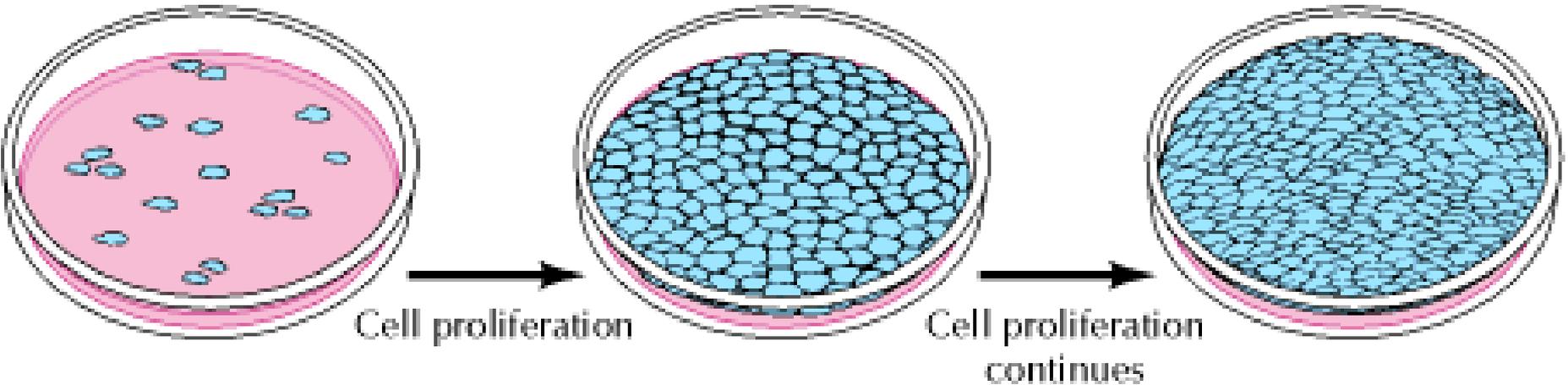
In cellule senescenti *in vitro* si ha un aumento dell'attività lisosomiale residua e la b-Gal viene identificata anche a pH acidi prossimi alla neutralità

Manca inibizione dipendente dalla densità (o da contatto)

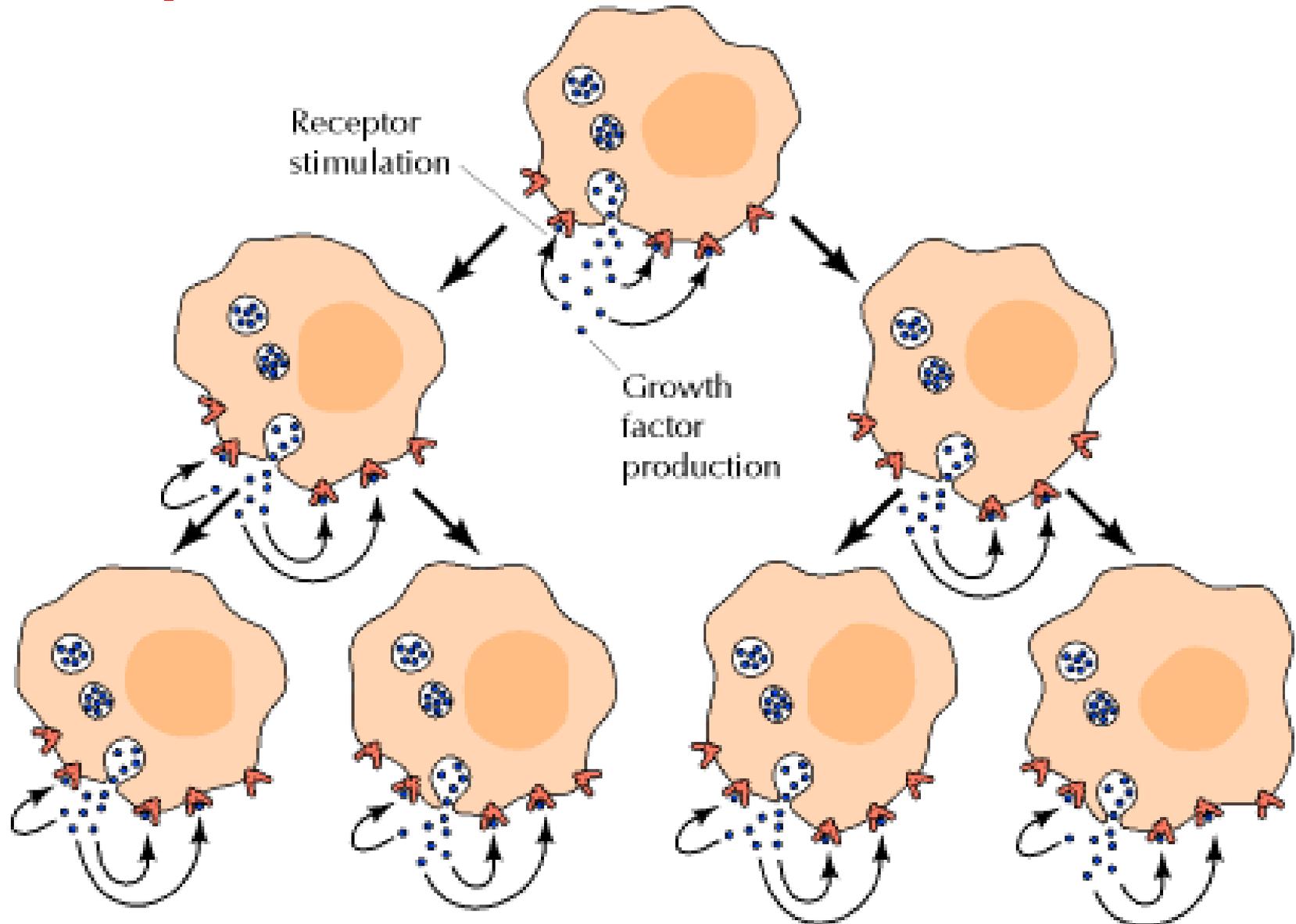
Normal cells



Tumor cells



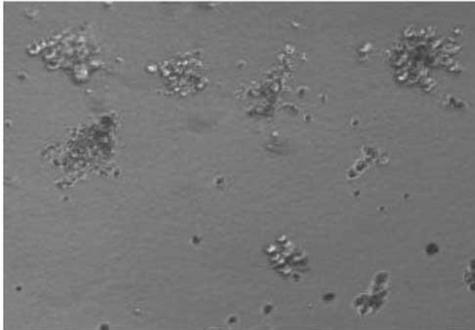
Stimolazione autocrina della crescita: produzione di fattori di crescita



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

SNU-16

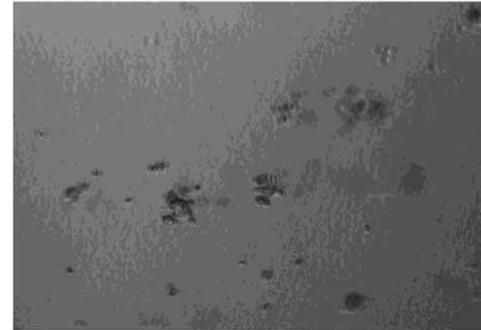
si-NC



si-2270

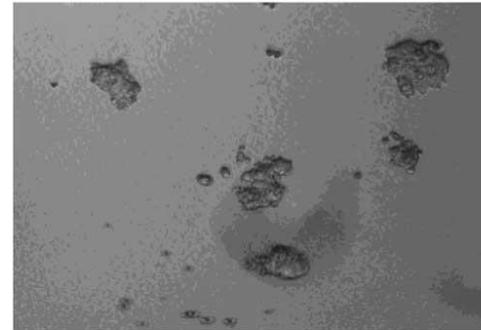
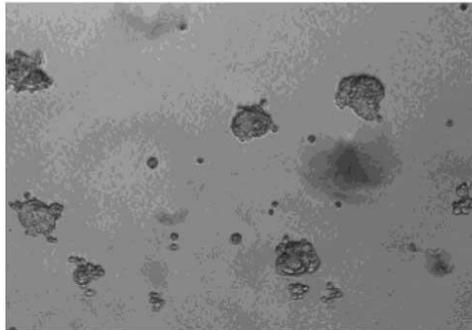
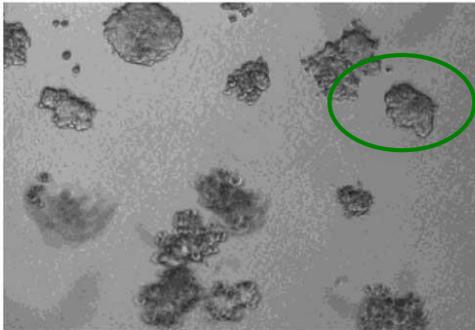


si-5932



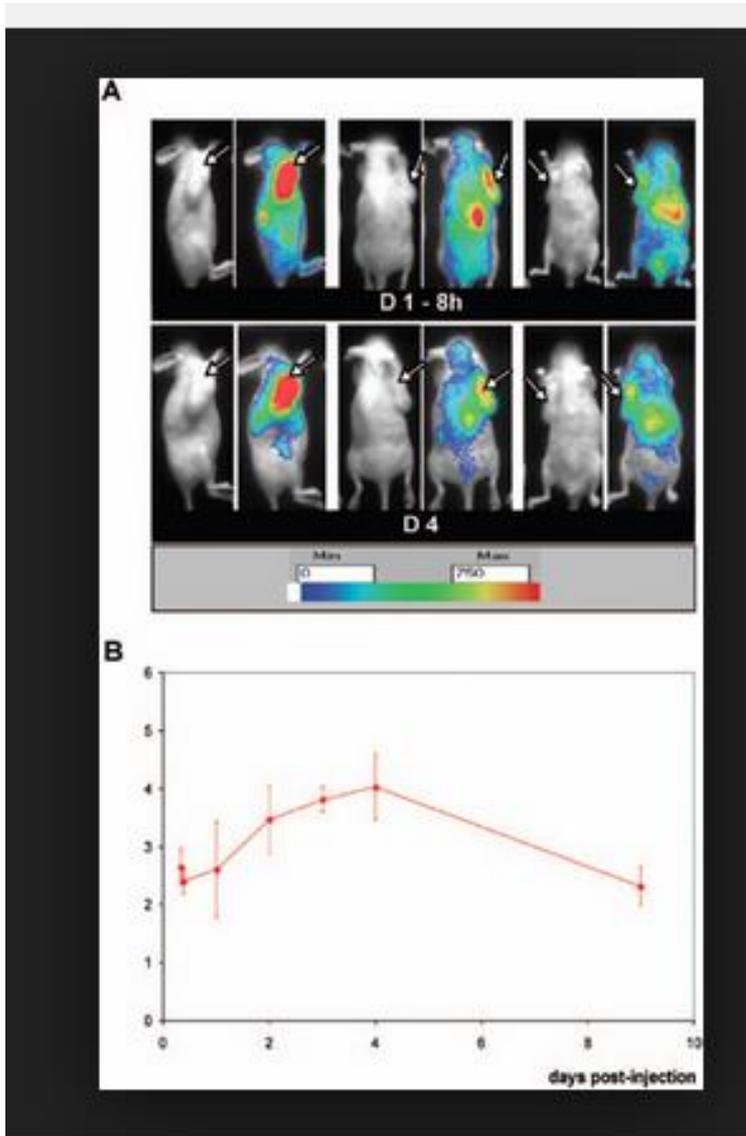
normali

AGS



trasformate

Cellula trasformata si definisce 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.

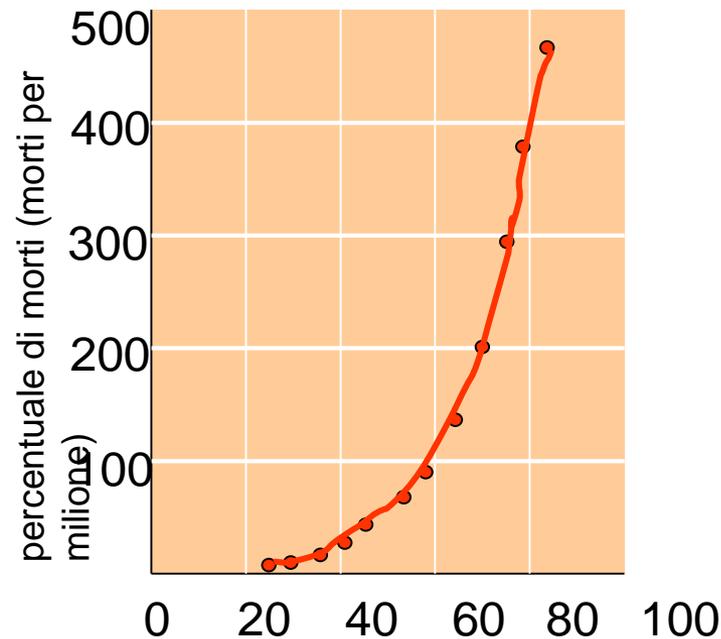
Caratteristiche della cellula trasformata

- *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*

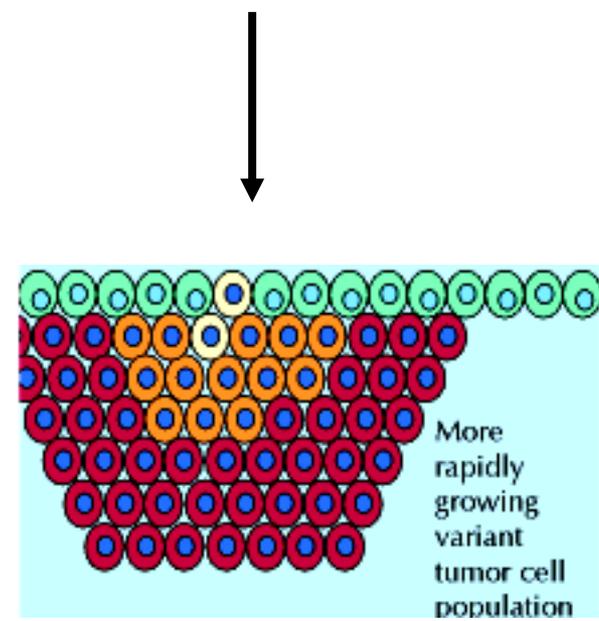
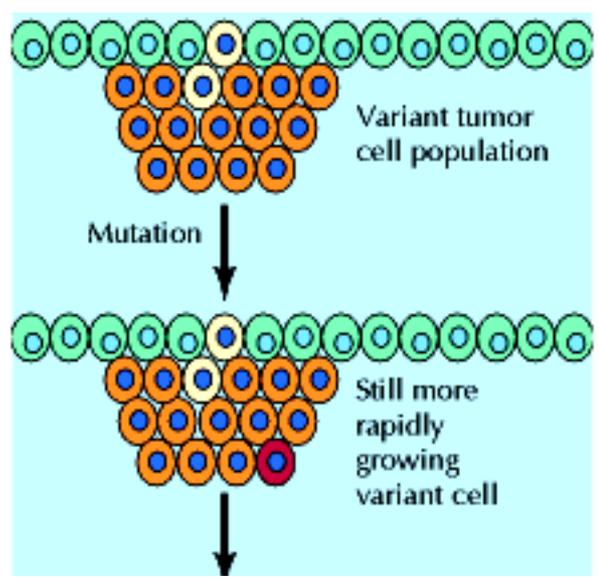
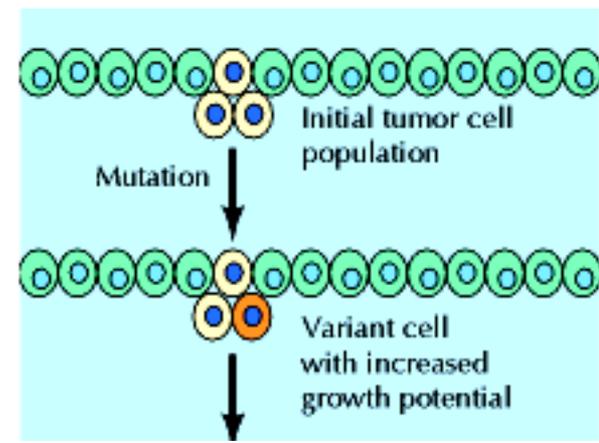
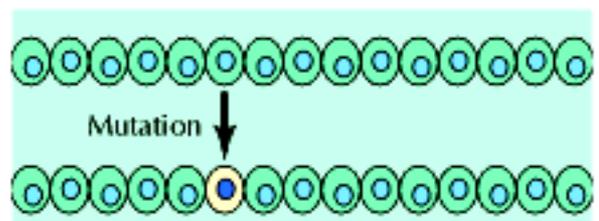
Lo sviluppo del cancro

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.

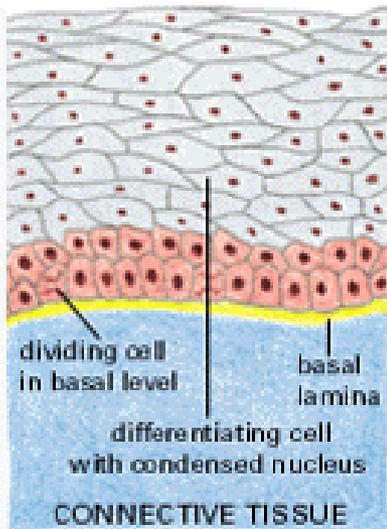
- Una indicazione dello sviluppo in stadi multipli del cancro è data dal fatto che la maggior parte dei cancri si sviluppa tardivamente. L'incidenza del cancro del colon, per esempio, aumenta più di 10 volte fra i 30 e i 50 anni e di altre 10 volte fra i 50 e i 70 anni. Un aumento così drammatico dell'incidenza 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.



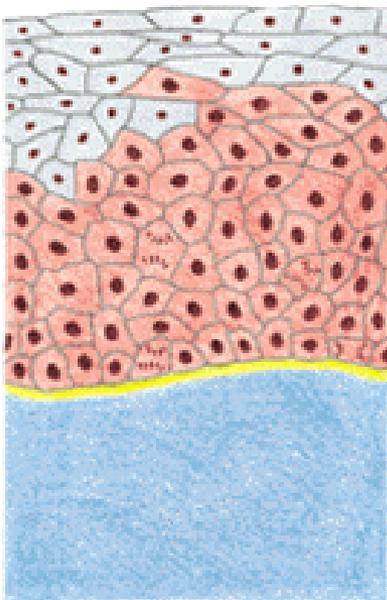
Stadi dello sviluppo del tumore



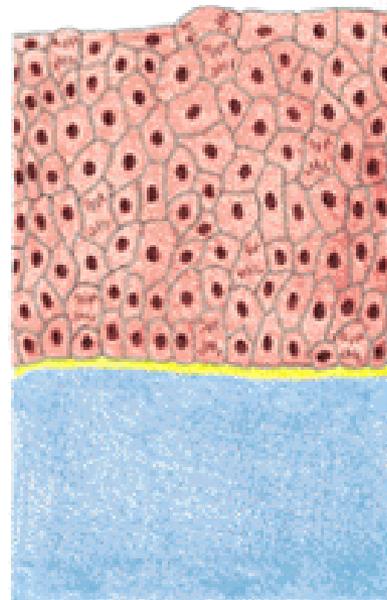
Stadi di progressione nello sviluppo del cancro dell'epitelio della cervice uterina



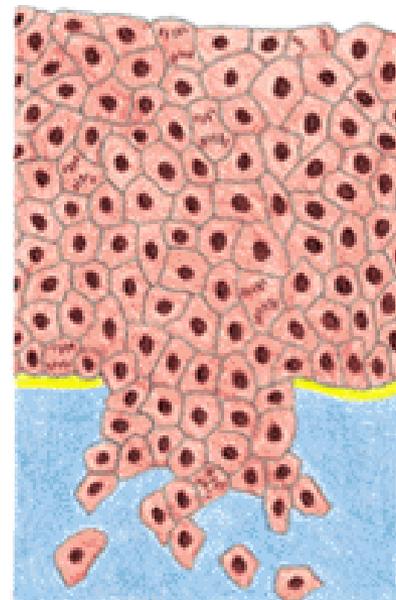
(A) normal



(B) dysplasia

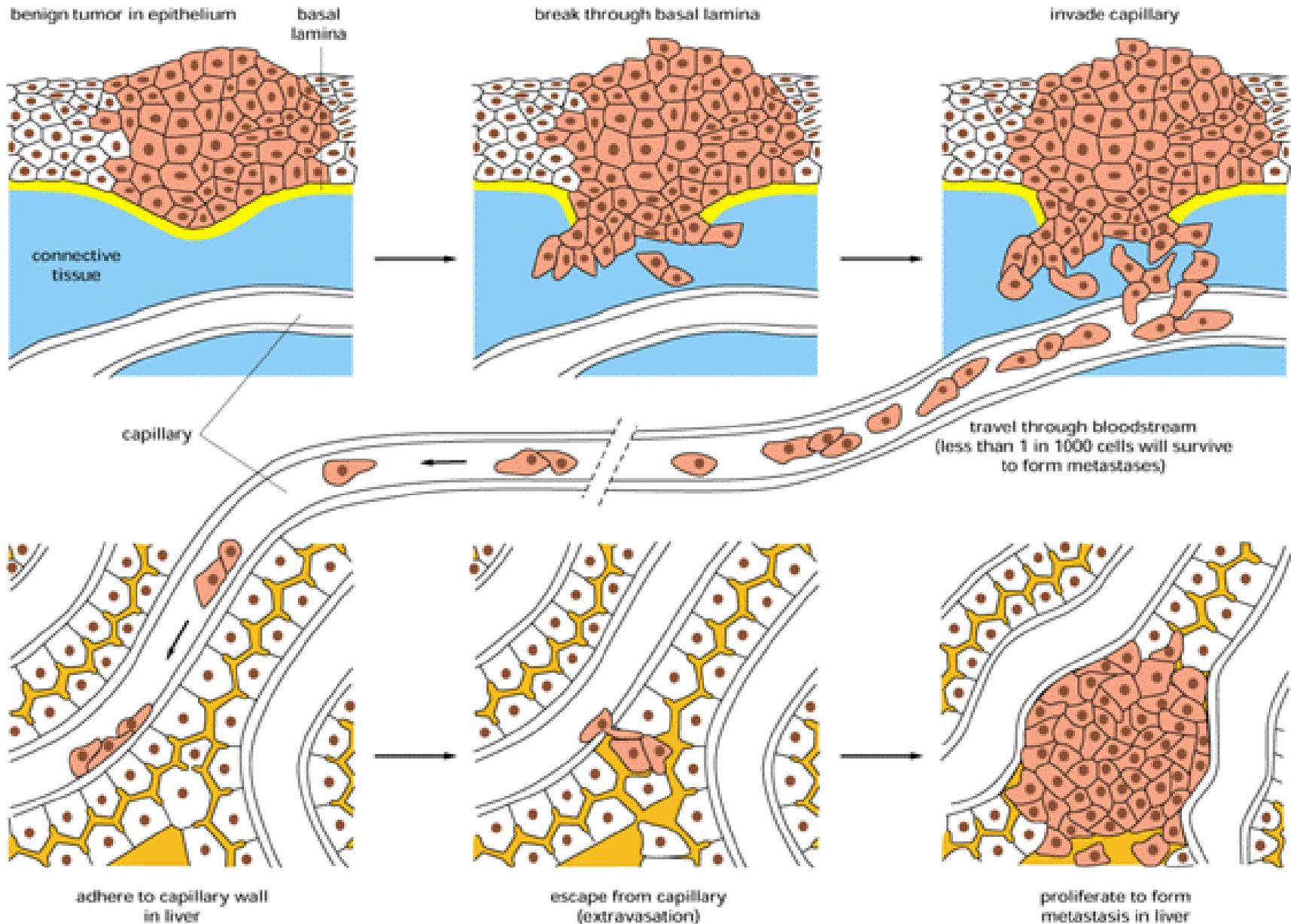


(C) carcinoma *in situ*



(D) malignant carcinoma

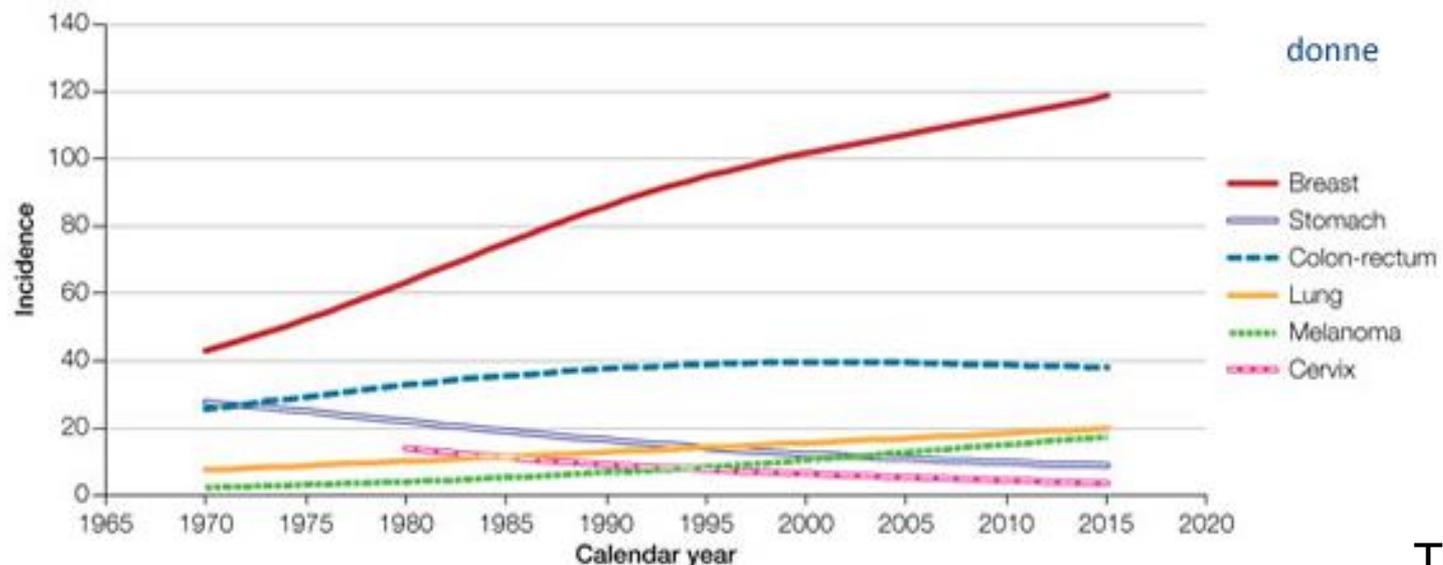
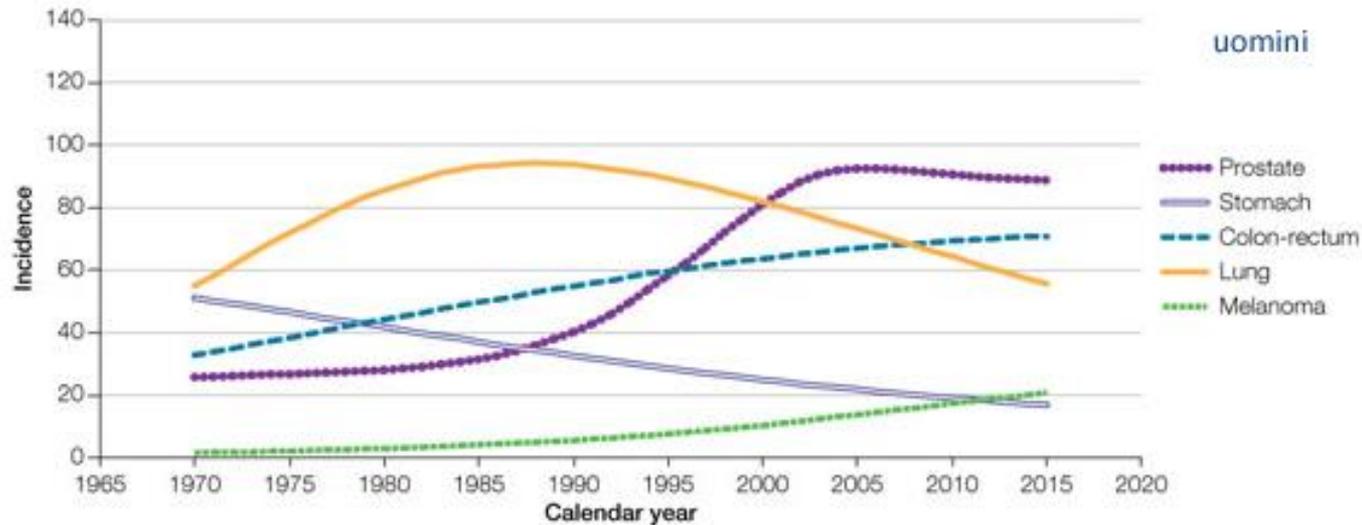
Tappe del processo di metastatizzazione



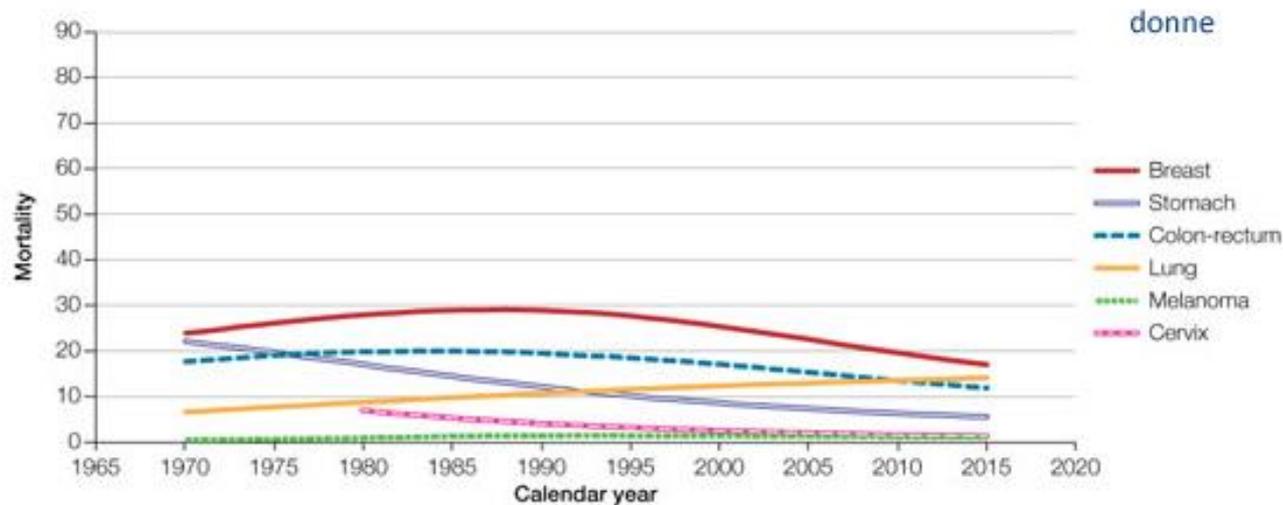
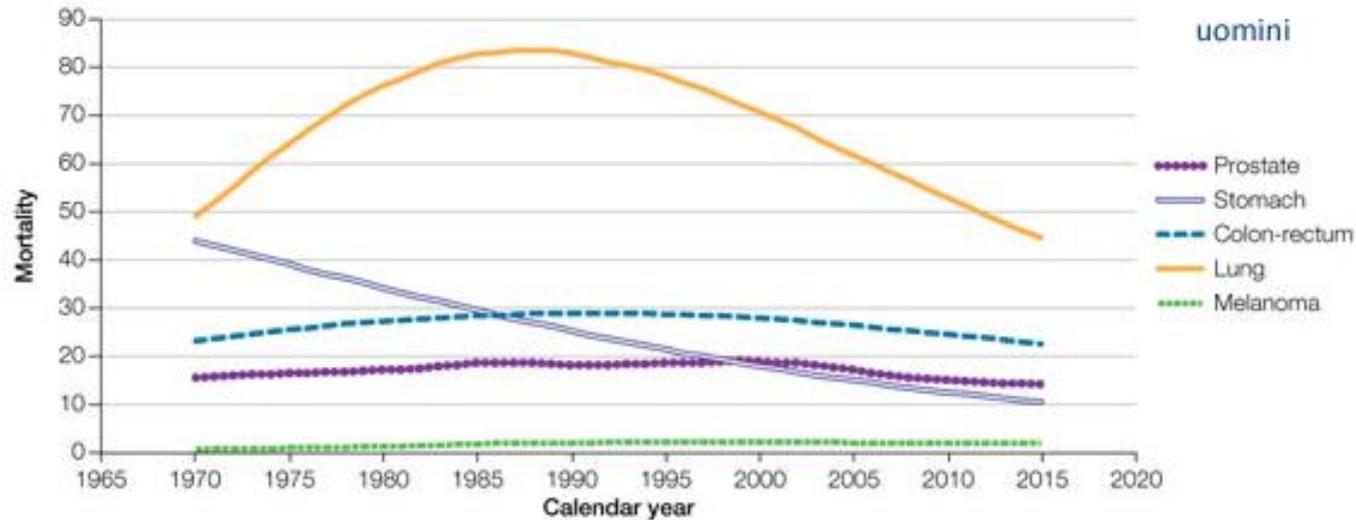
Fattori di rischio

- Fumo
- Raggi ultravioletti: basalioma (tumore dello strato basale dell'epidermide) o melanoma
- 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): solo il 5% dei tumori è causato da mutazioni ereditarie

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



Geni coinvolti nello sviluppo dei tumori

Un **proto-oncogene** è un gene normale che può diventare oncogene a causa di mutazioni. I proto-oncogeni codificano proteine che regolano il ciclo cellulare e il differenziamento.

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.

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

I mitogeni (stimolano la proliferazione cellulare) si legano ai recettori presenti sulla membrana della cellula

Figura 5.57 Coinvolgimento della proteina Ras. Una volta che il recettore è stato attivato dal legame con il ligando, la proteina Ras, inattiva, viene attivata da Grb-2, che lega il recettore, grazie ad una fosfotirosina e da un attivatore di Ras, la proteina SOS. Quest'ultimo stimola Ras a scambiare GDP con GTP. Così attivata, Ras può, a sua volta, attivare numerose vie di trasduzione del segnale.

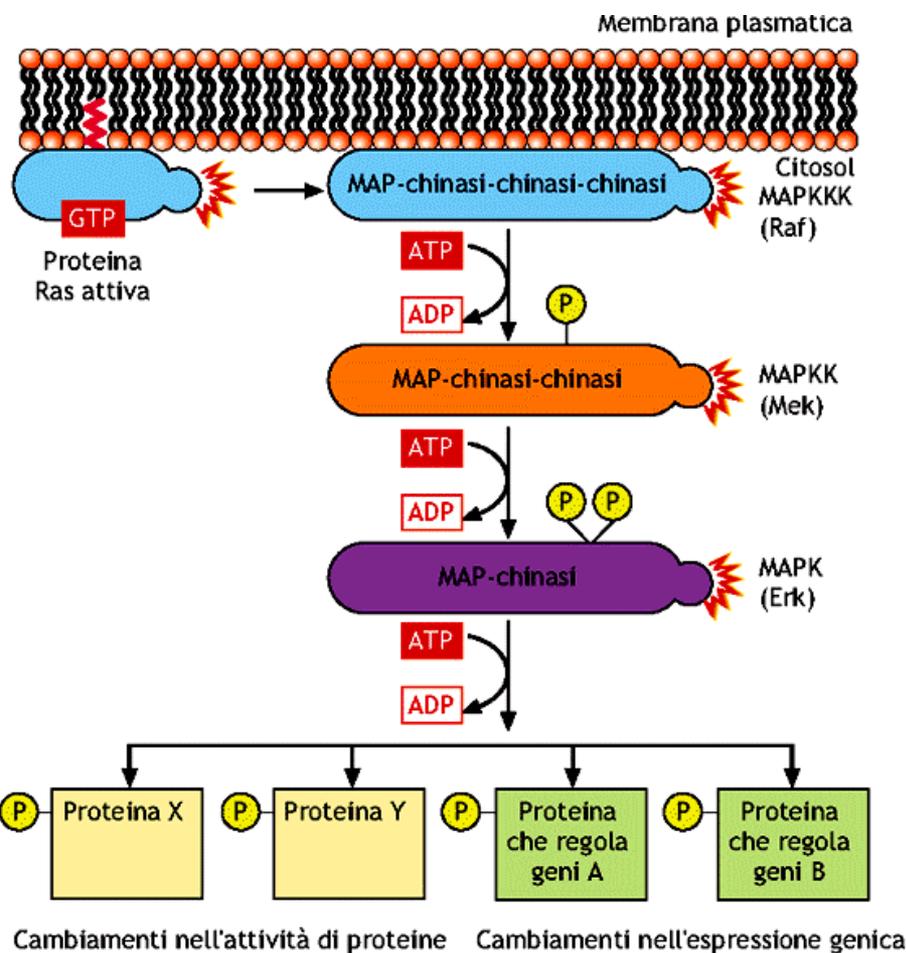
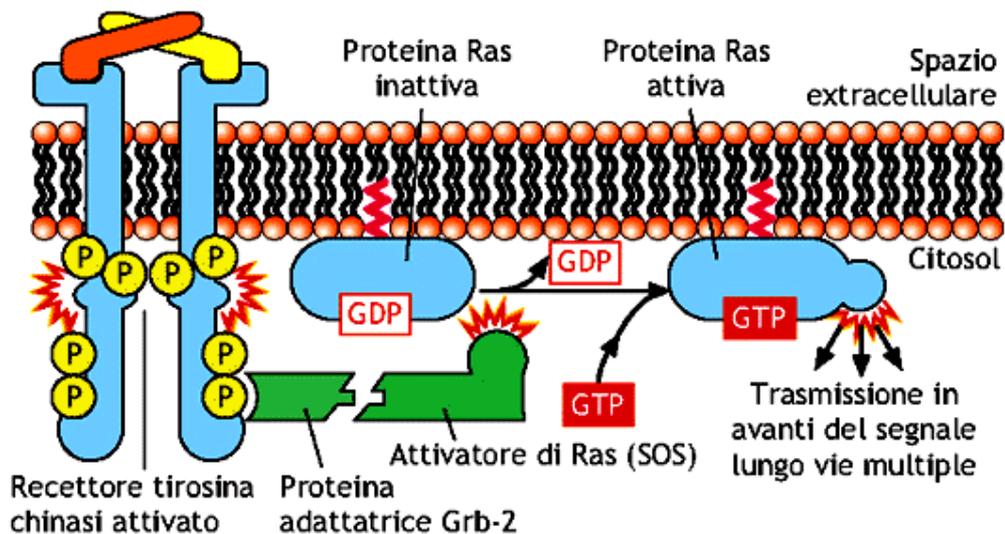
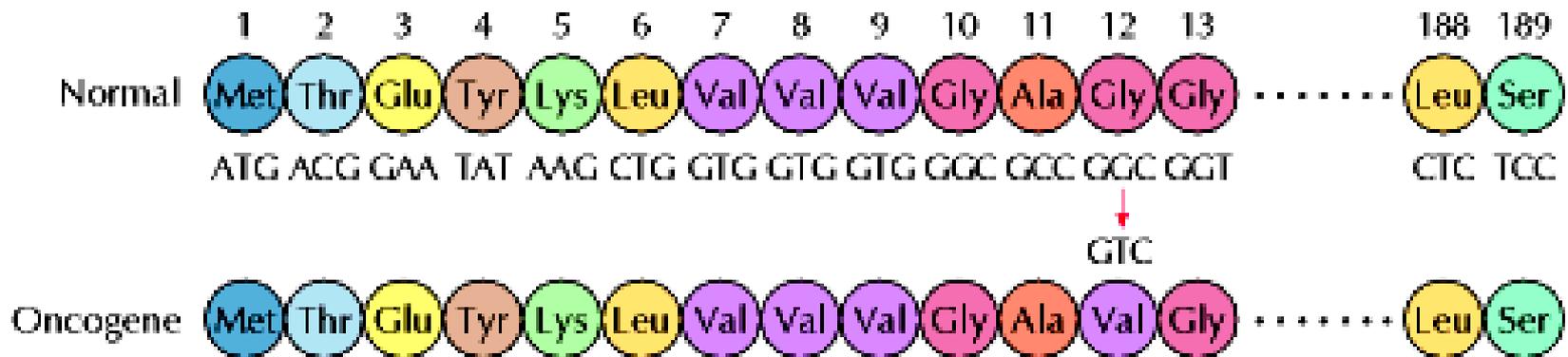


Figura 5.58 Via di attivazione innescata da Ras mediata da MAP chinasi. La cascata inizia con una MAP-chinasi-chinasi-chinasi (Raf) che attiva una MAP-chinasi-chinasi (Mek) che a sua volta attiva una MAP-chinasi (Erk). Erk è in grado di fosforilare numerose proteine che vanno a modulare l'espressione genica.

Oncogeni nel cancro umano: RAS

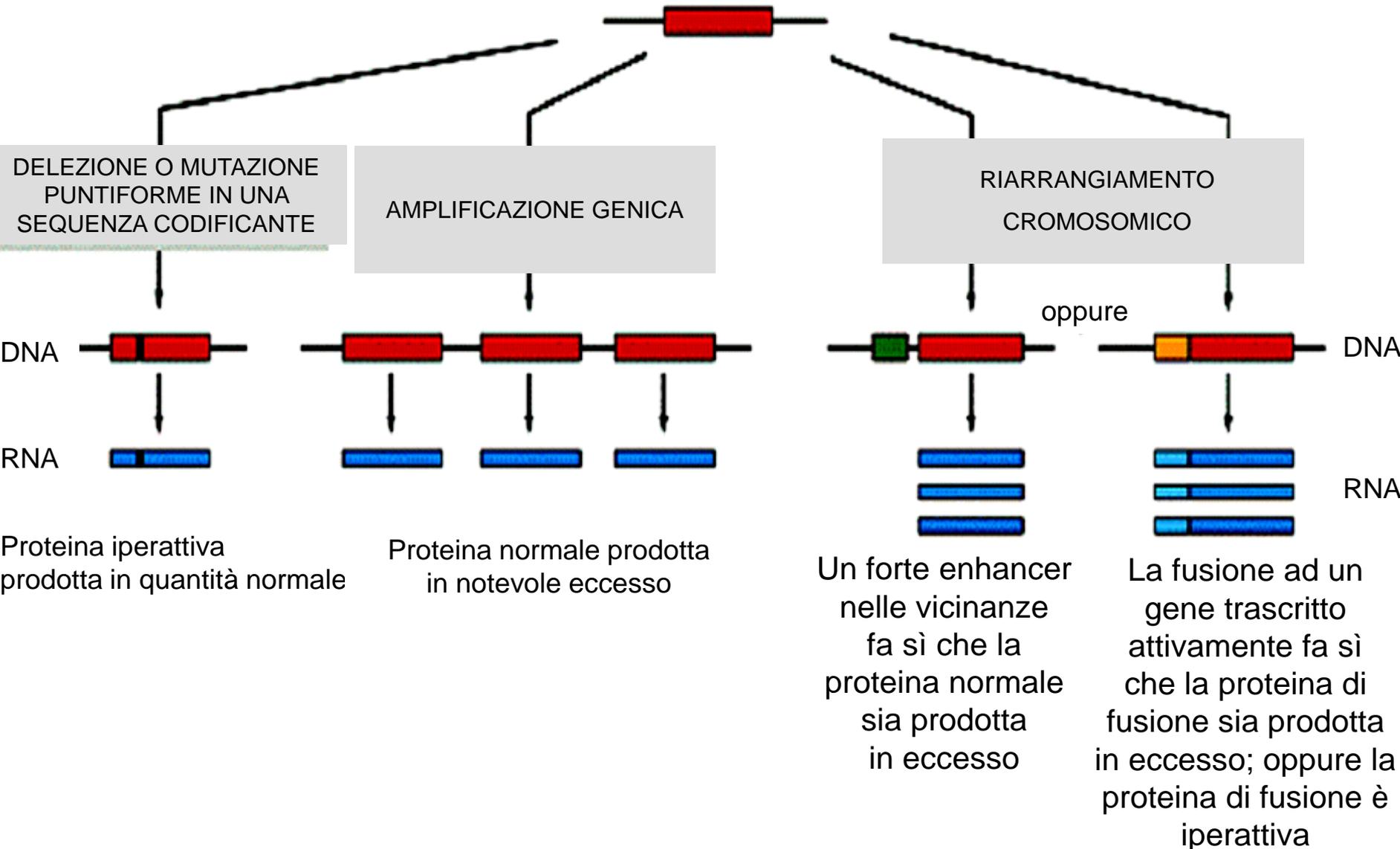
Gli oncogeni ras non sono presenti nelle cellule normali ma si generano nelle cellule tumorali come conseguenza di mutazioni puntiformi (che portano a sostituzioni aminoacidiche critiche) che avvengono durante lo sviluppo del tumore. Le tre mutazioni ricadono nei codoni 12, 13 e 61 (Gln).

Le mutazioni sono indotte da carcinogeni chimici e hanno l'effetto di mantenere la proteina costitutivamente attiva.

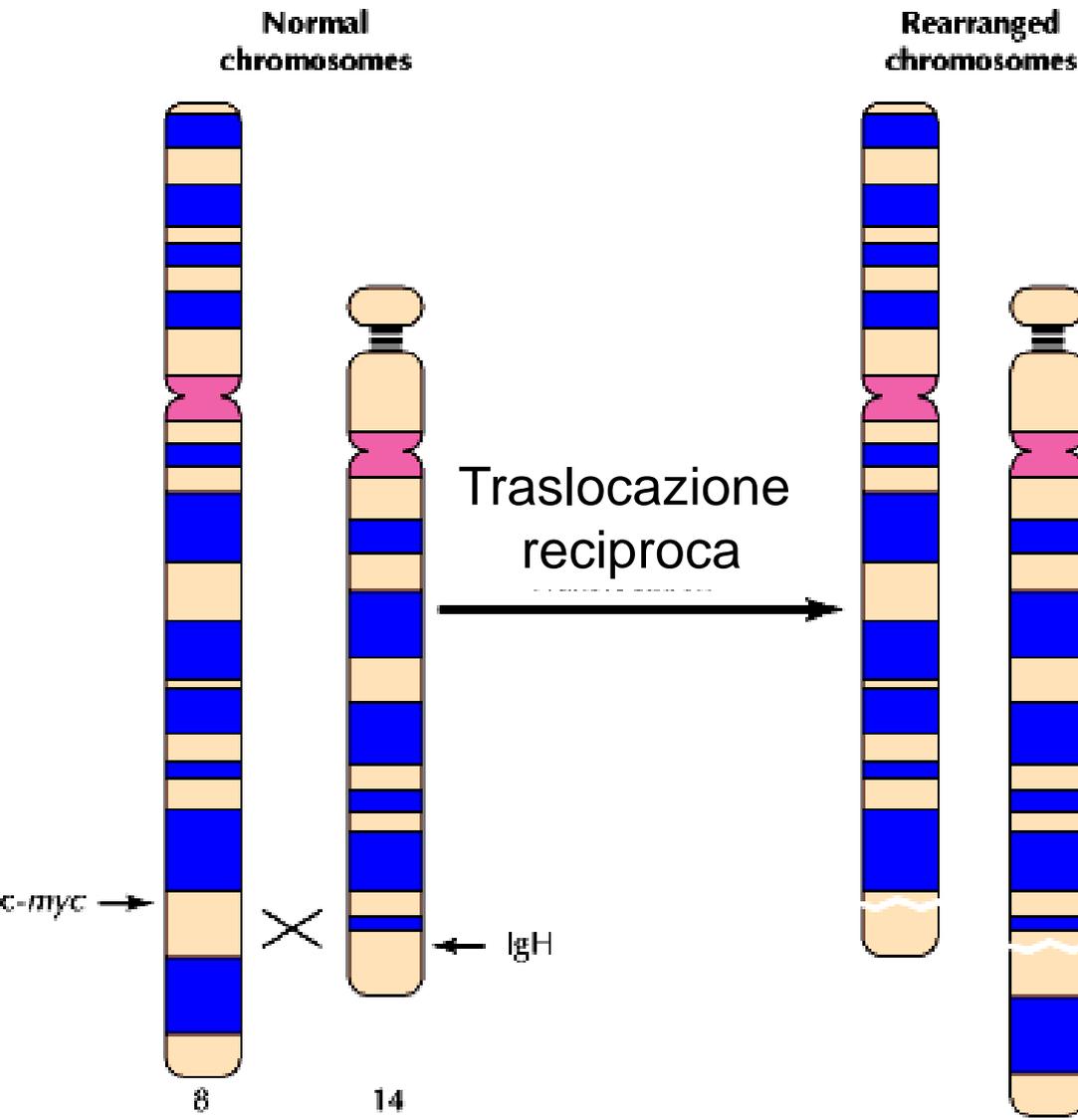


Oncogeni nel cancro umano:Attivazione di un protooncogene

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



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 coinvolti nello sviluppo dei tumori

Un **proto-oncogene** è un gene normale che può diventare oncogene a causa di mutazioni. I proto-oncogeni codificano proteine che regolano il ciclo cellulare e il differenziamento.

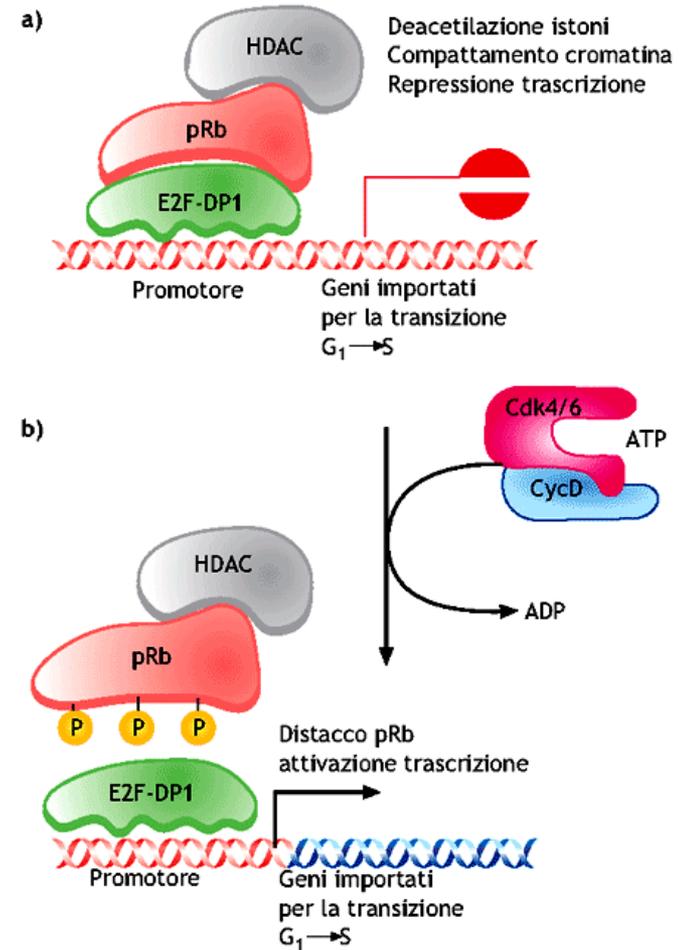
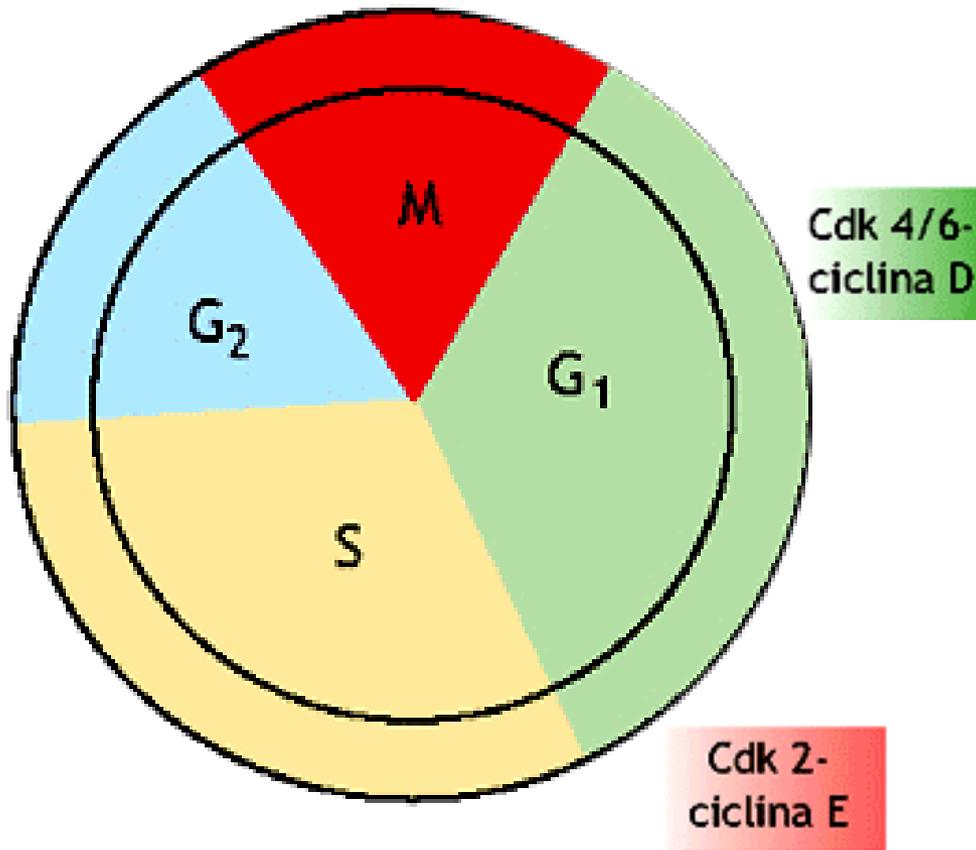
La mutazione di una singola copia di un protooncogene può avere un effetto dominante che promuove la crescita di una cellula

Un gene oncosoppressore (o semplicemente oncosoppressore) è un gene che codifica per prodotti che agiscono negativamente sulla progressione del ciclo cellulare.

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

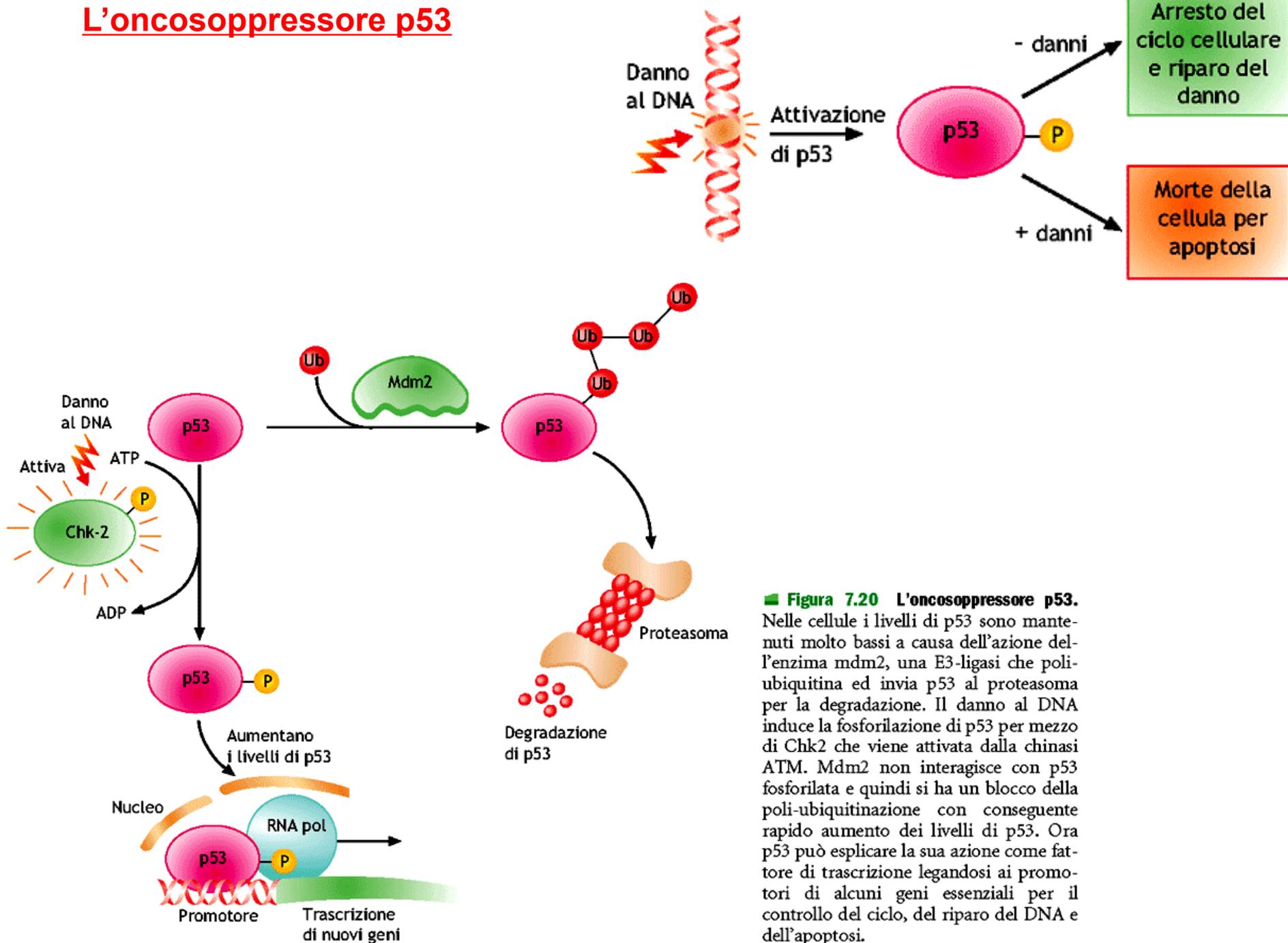
La proteina del retinoblastoma

Controllo della transizione $G_1 \rightarrow S$



■ **Figura 7.17** Fattore di trascrizione E2F e progressione $G_1 \rightarrow S$. 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 G_0 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

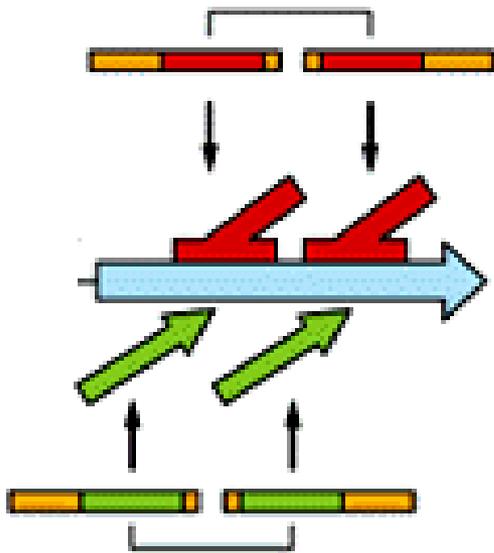


■ **Figura 7.20** L'oncosoppressore p53.

Nelle cellule i livelli di p53 sono mantenuti molto bassi a causa dell'azione dell'enzima mdm2, una E3-ligasi che poli-ubiquitina 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.

GENI ONCOSOPPRESSORI E PROTOONCOGENI

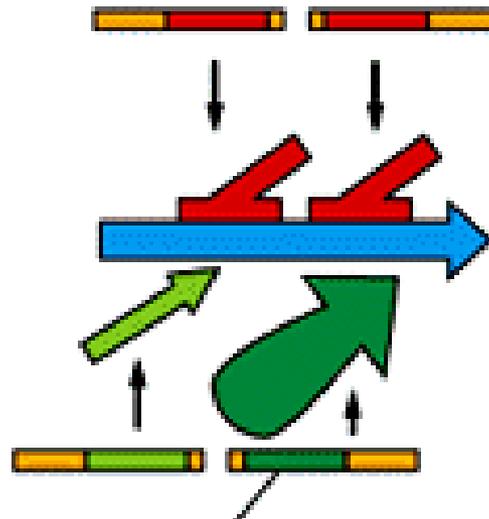
due copie del gene oncosoppressore



due copie del protooncogene

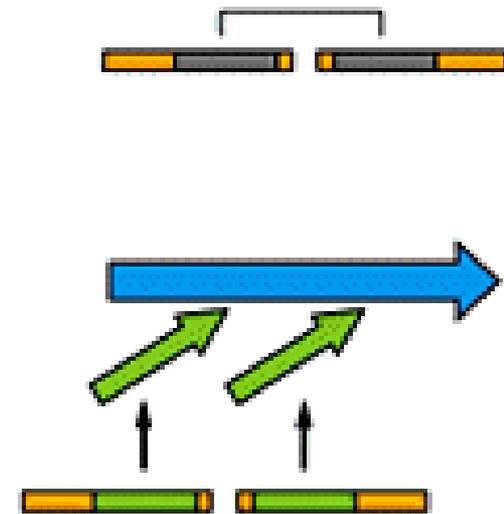
PROLIFERAZIONE CELLULARE **NORMALE**

entrambi gli alleli oncosoppressori sono inattivati. Es:p53



una mutazione rende un singolo protooncogene iperattivo

PROLIFERAZIONE CELLULARE **ECCESSIVA**



PROLIFERAZIONE CELLULARE **ECCESSIVA**

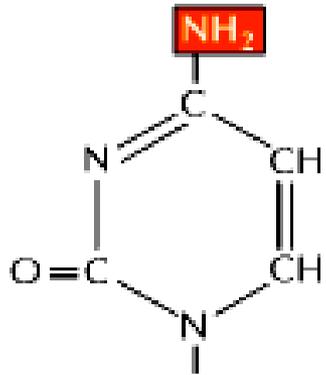
MUTAZIONI GENICHE

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.

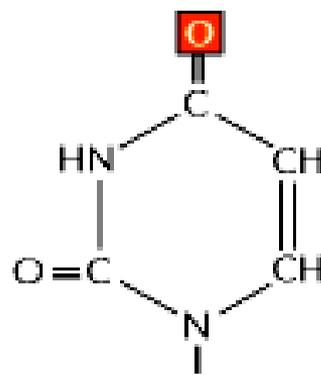
Il grande margine di fedeltà raggiunto dipende largamente dall'attività della DNA polimerasi (attività **esonucleasica** e **proofreading** = correttore di bozze).

CAUSE DI MUTAZIONI : REAZIONI CHIMICHE SPONTANEE

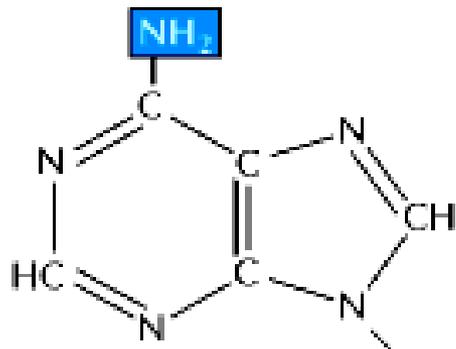
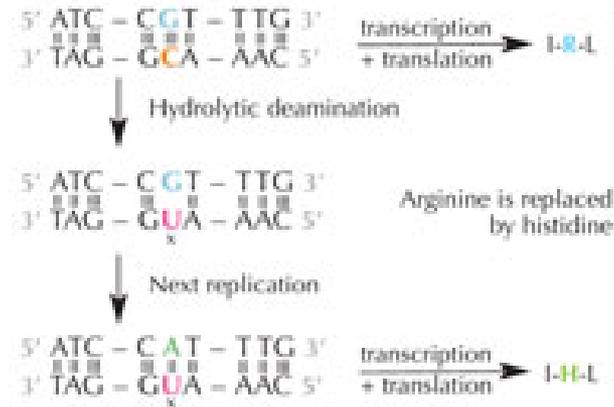
DEAMINAZIONE perdita di un gruppo amminico



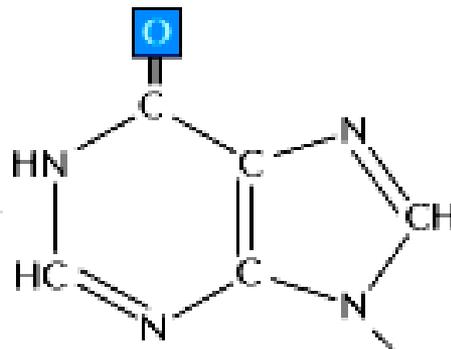
Citosina



Uracile



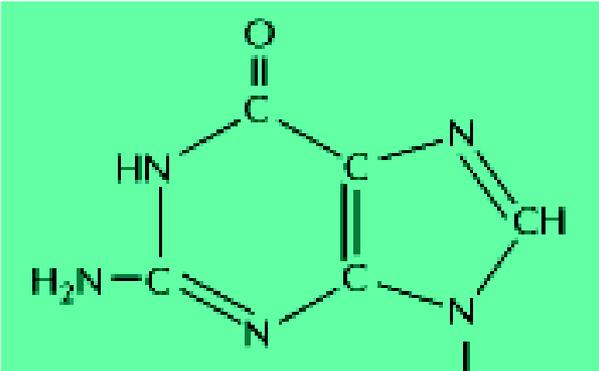
Adenina



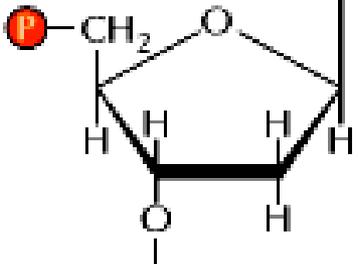
Ipoxantina
(che si appaia con citosina)

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

Guanina

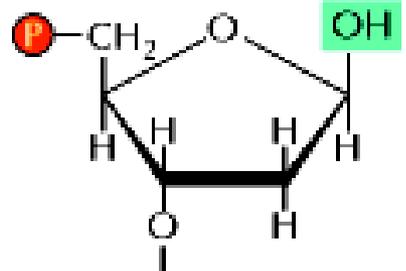


Catena di DNA



dGMP = deossiguanosina monofosfato

Catena di DNA



Sito AP

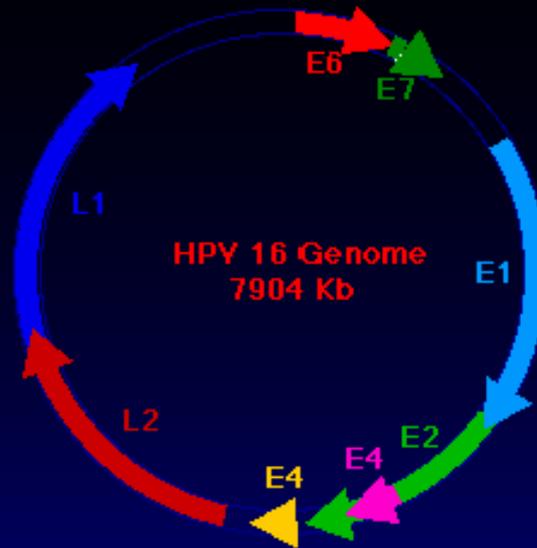
CAUSE DI MUTAZIONI : Mutazioni nel DNA indotte da agenti chimici, fisici e biologici

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**

CAUSE DI MUTAZIONI: 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)

DNA

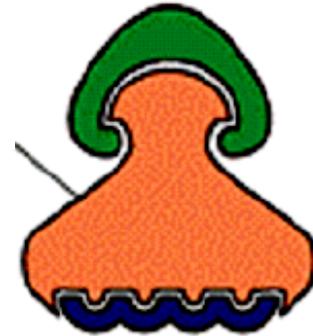
La proteina p53 attiva un freno di sicurezza della proliferazione cellulare

La proteina virale antigene T grande sequestra Rb e p53

Fattore di proliferazione cellulare attivo

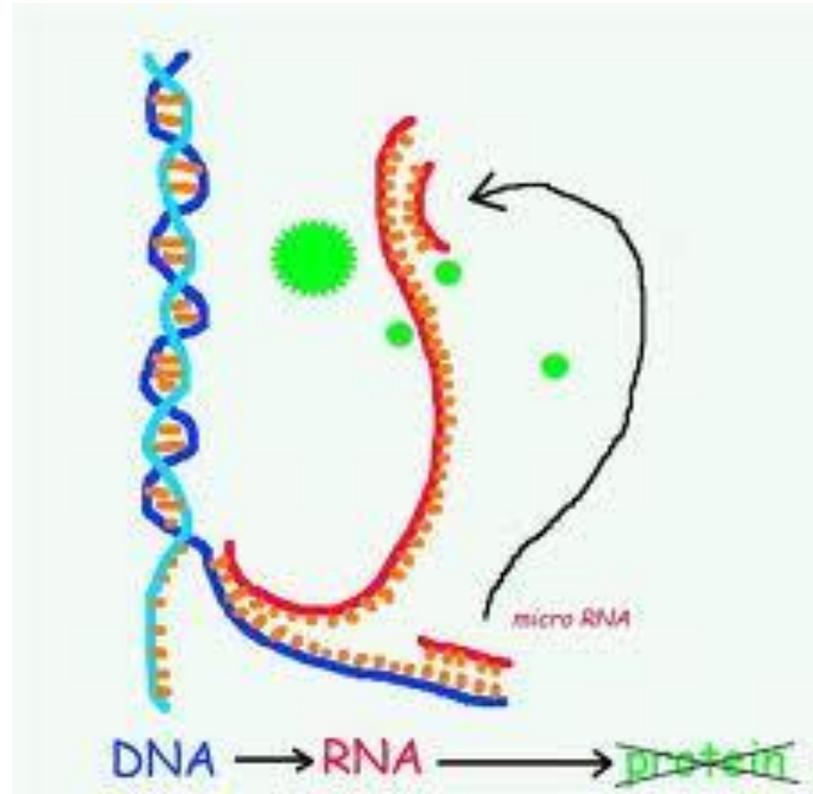


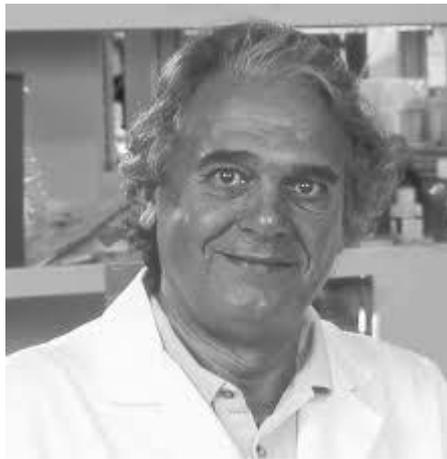
Trascrizione del gene



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 Klipps¶, 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

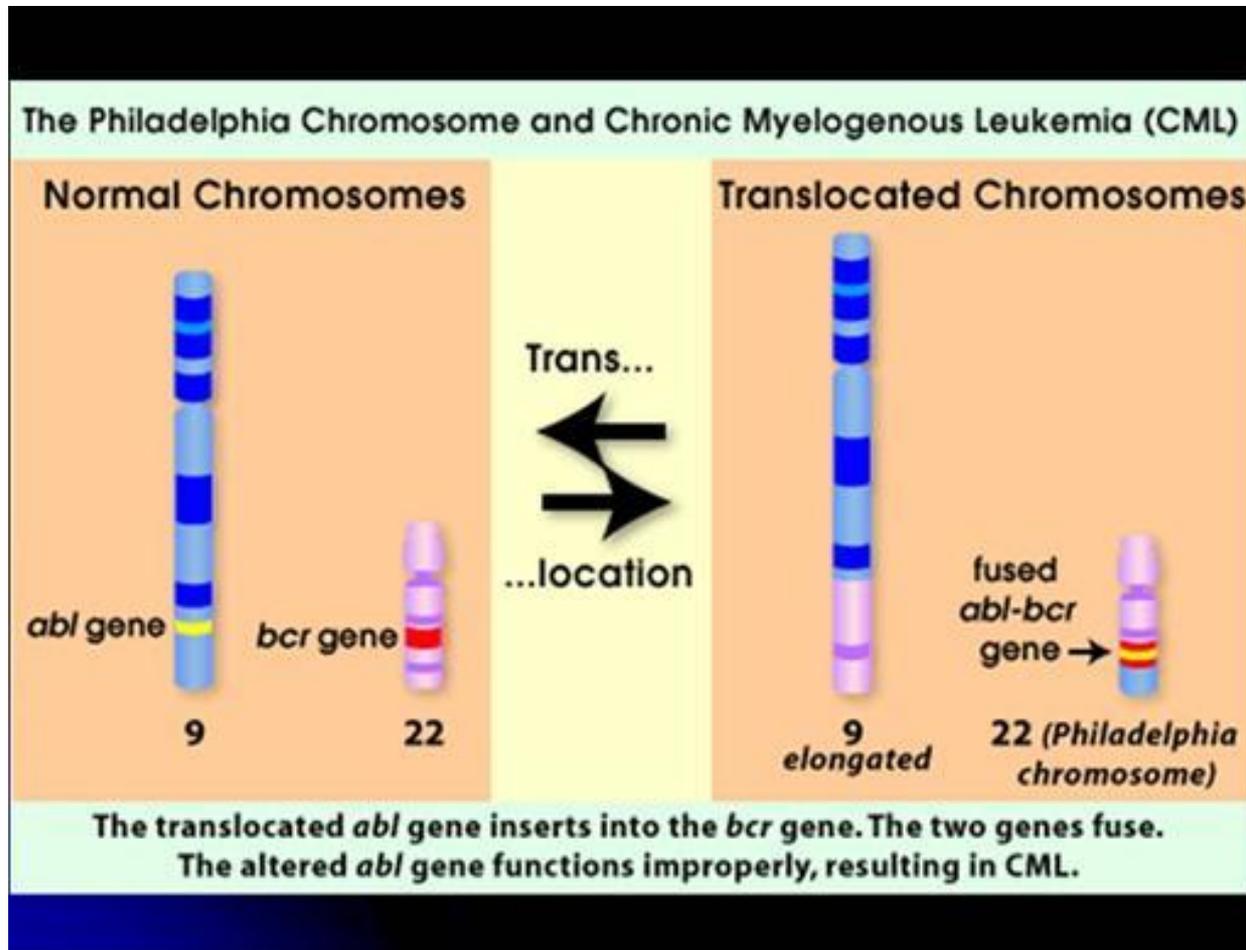
Chemioterapia

- **Tossica per le cellule tumorali ma anche per le cellule del nostro corpo che proliferano (cellule del sangue, dell'epitelio intestinale, bulbo pilifero)**

Terapia mirata

**Blocca le proteine responsabili della crescita di un tumore quindi
non è meno tossica per le cellule normali**

Trasclocazione nella leucemia mieloide cronica



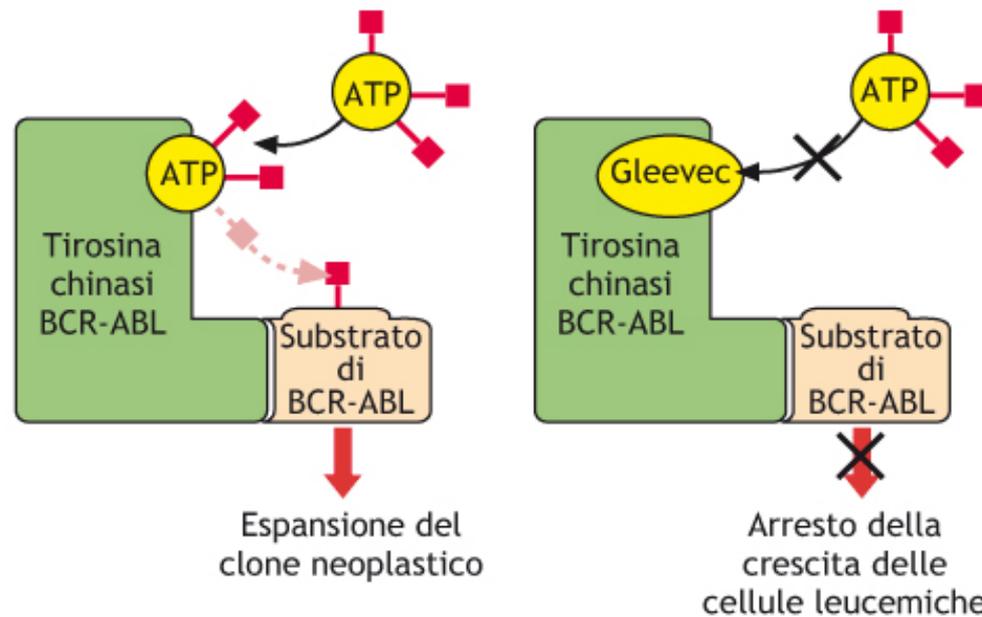


Figura 13.10 Modalità di azione del Gleevec. La proteina tirosina chinasi BCR-ABL è costitutivamente attiva nelle cellule di leucemia mieloide cronica e rappresenta l'evento molecolare patogenetico per questa neoplasia. Il Gleevec, legandosi alla tasca enzimatica dell'ATP, blocca la capacità di BCR-ABL di fosforilare i suoi substrati e determina l'arresto della crescita delle cellule leucemiche.

Nivolumab è un anticorpo che blocca PDL1, espressa da alcuni tumori, che interferisce con l'attività dei linfociti T

