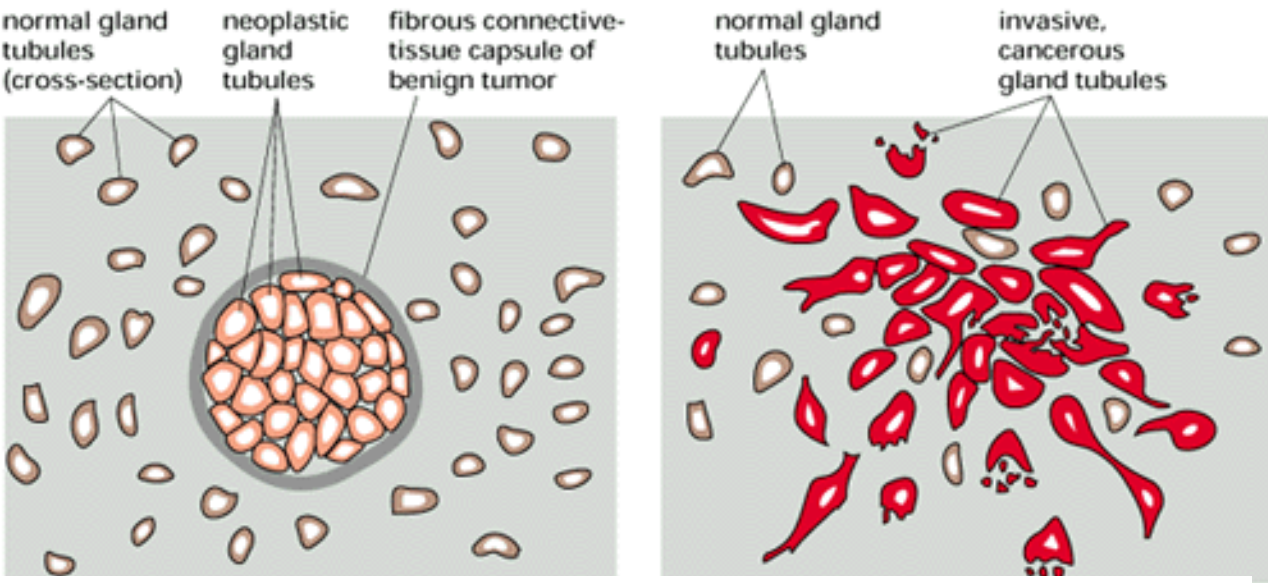


BIOLOGIA DELLA CELLULA TRASFORMATA

Tumori benigni e maligni

Le cellule tumorali vengono definite sulla base di due caratteristiche:

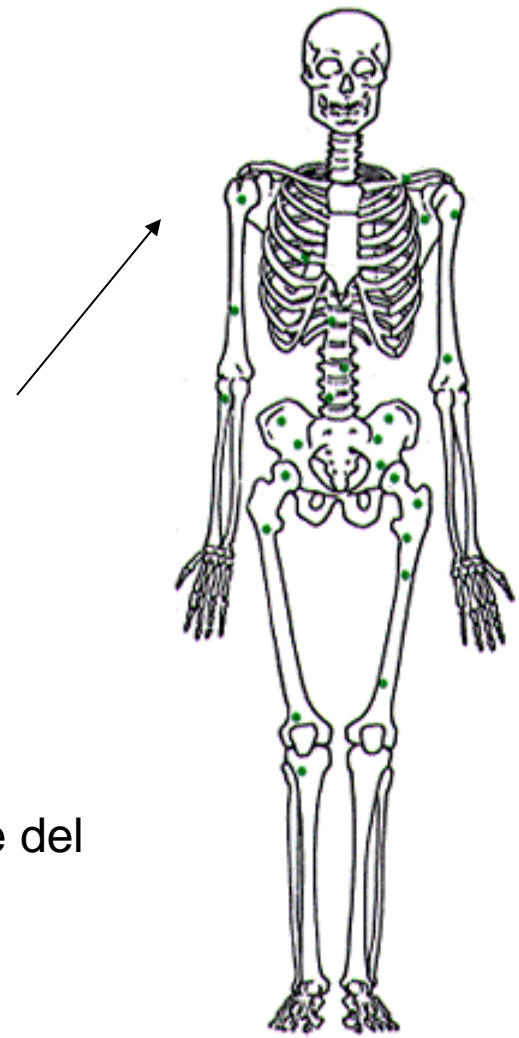
1. Si riproducono senza tenere conto dei limiti che solitamente controllano la crescita.
2. Invadono e colonizzano territori che normalmente sono riservati ad altre cellule.



ADENOMA (benigno)

ADENOCARCINOMA (maligno)

metastasi

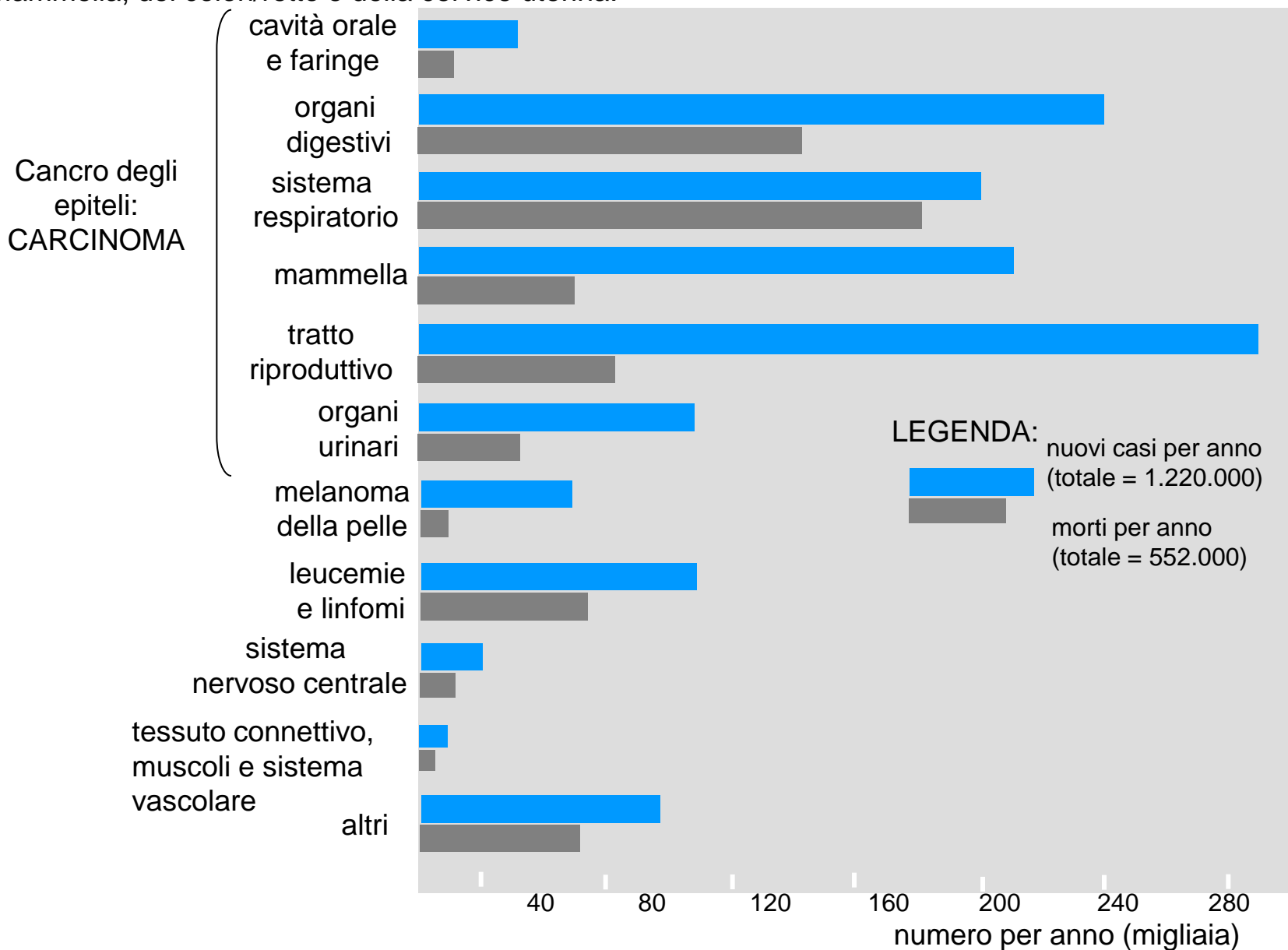


Le forme di cancro sono classificate a seconda del tessuto e del tipo cellulare da cui esse derivano:

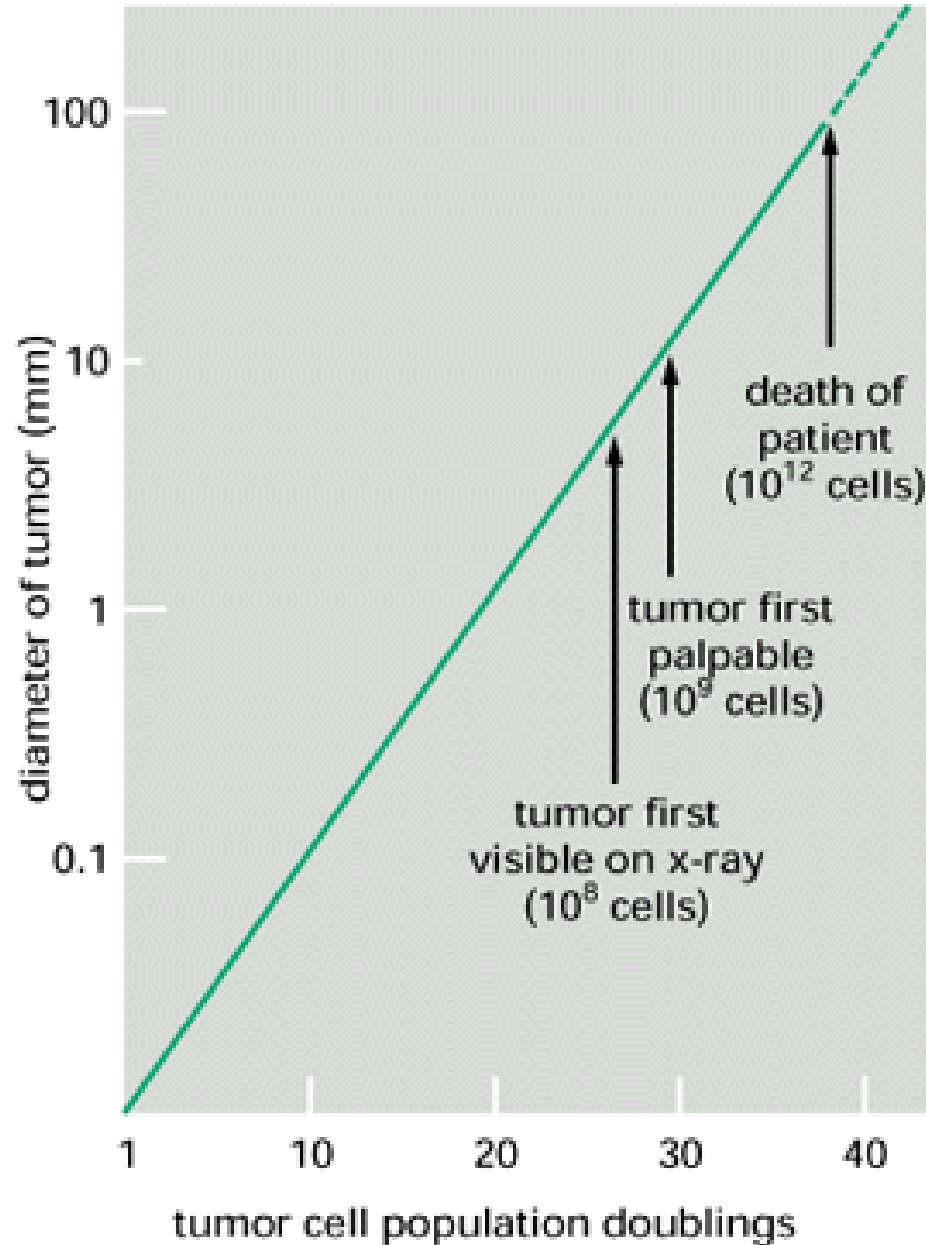
1. **Carcinomi**: da cellule epiteliali
2. **Sarcomi**: da tessuti connettivali o muscolari
3. **Leucemie**: da cellule ematopoietiche e da cellule del sistema nervoso

Incidenza del cancro e mortalità negli Stati Uniti

I dati sono riferiti all'anno 2000. Si noti che soltanto la metà circa delle persone che sviluppano cancro muore per questa malattia. A livello mondiale i cinque cancro più comuni sono quelli del polmone, dello stomaco, della mammella, del colon/retto e della cervice uterina.

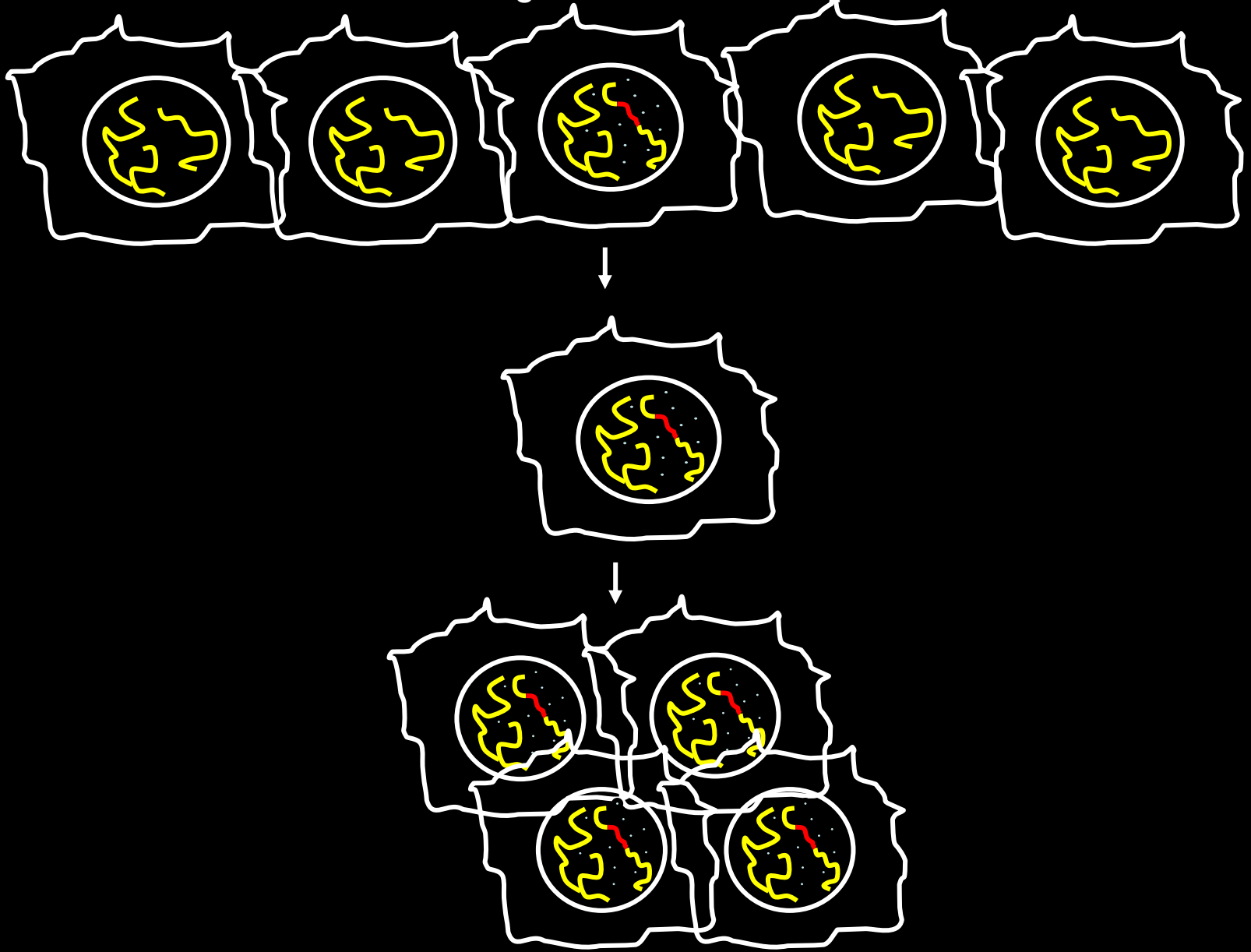


La maggior parte dei cancri deriva da singole cellule anomale.



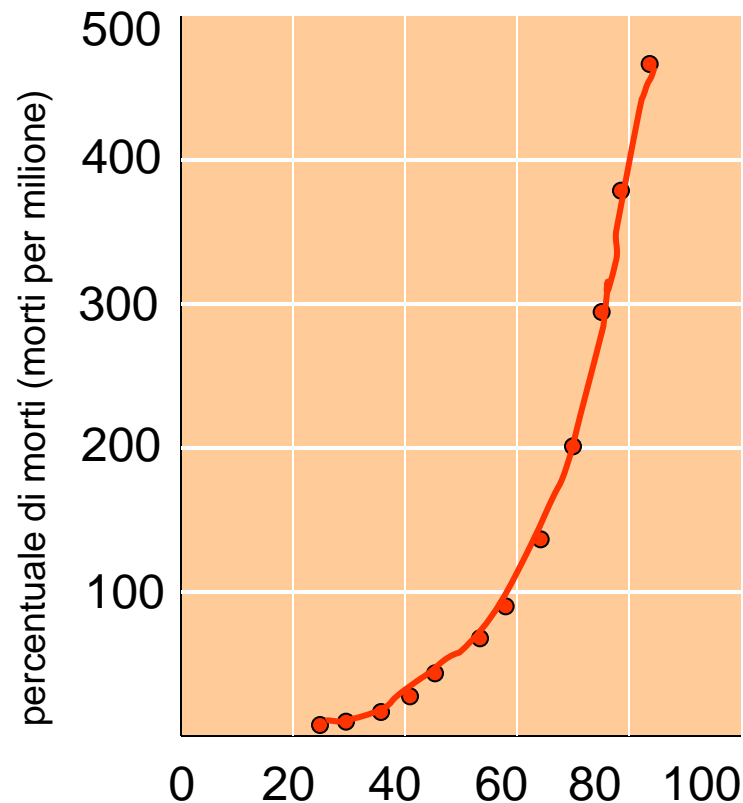
Lo sviluppo del cancro

Una delle caratteristiche fondamentali del cancro è la **clonalità del tumore**, lo sviluppo cioè dei tumori da cellule singole che iniziano a proliferare anormalmente.

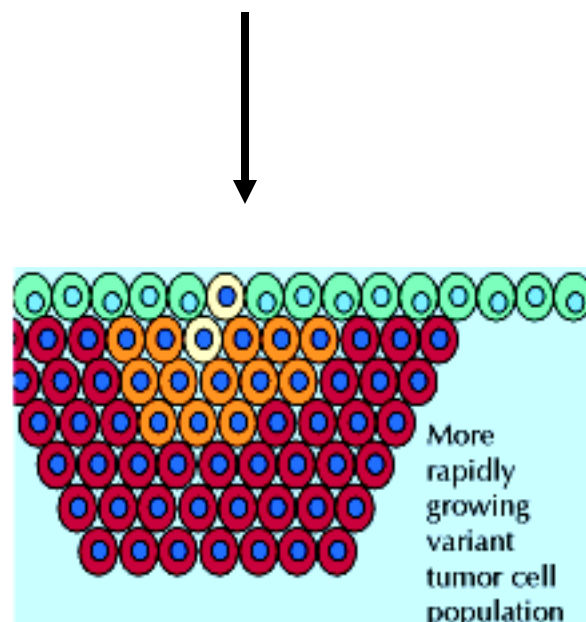
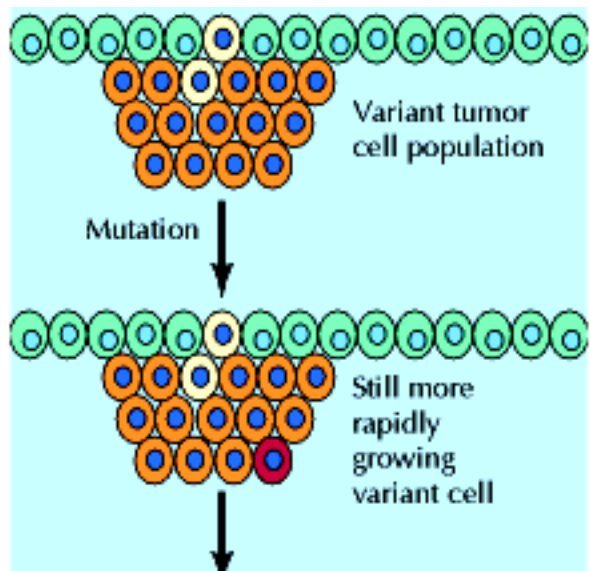
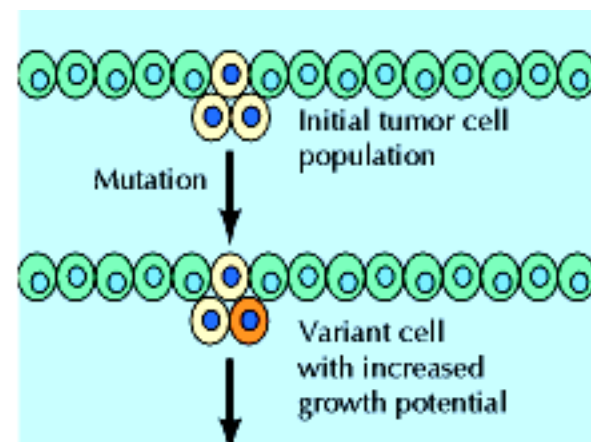
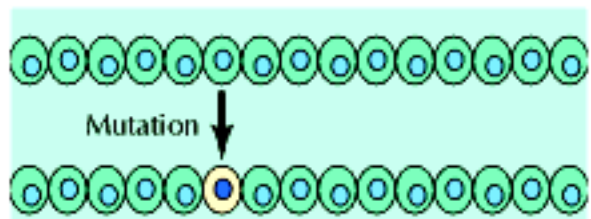


Lo sviluppo del cancro

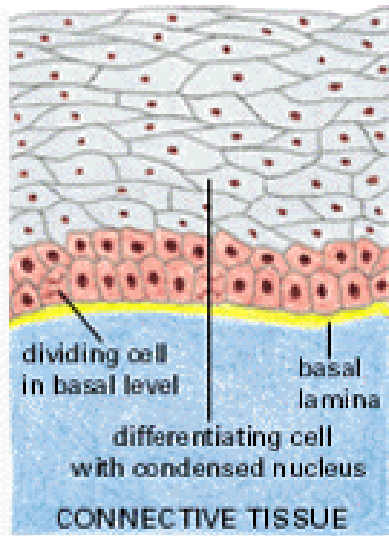
L'origine clonale dei tumori non implica tuttavia che la cellula progenitrice originale che da' origine ad un tumore abbia acquisito all'inizio tutte le caratteristiche di una cellula cancerosa. Al contrario, lo sviluppo del cancro è un processo a stadi multipli in cui le cellule gradualmente diventano maligne attraverso una serie progressiva di alterazioni. Una indicazione dello sviluppo in stadi multipli del cancro è data dal fatto che la maggior parte dei cancro 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 cancro si sviluppino come conseguenza di anomalie multiple che si accumulano nel corso di molti anni.



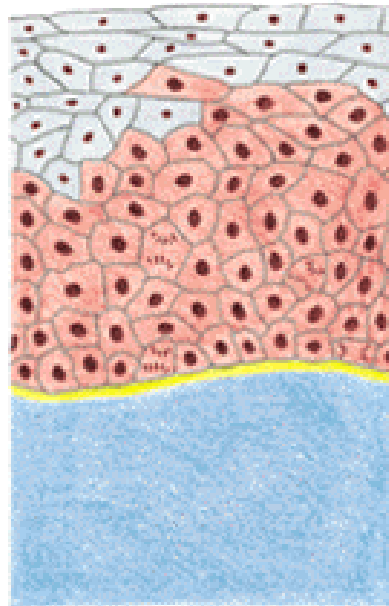
Stadi dello sviluppo del tumore



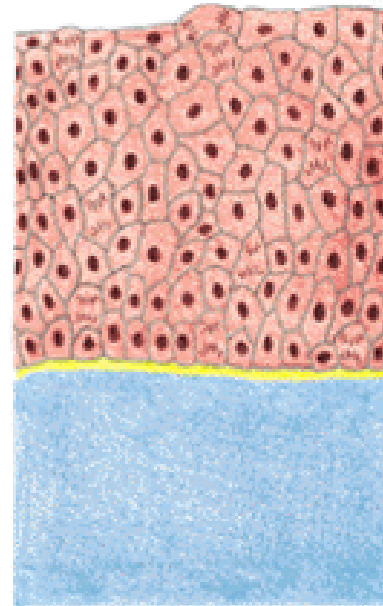
Stadi di progressione nello sviluppo del cancro dell'epitelio della cervice uterina



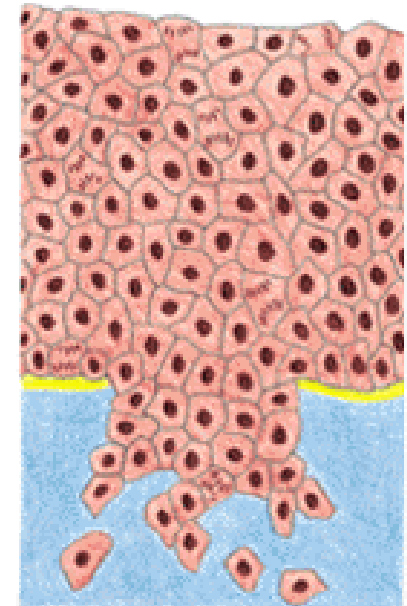
(A) normal



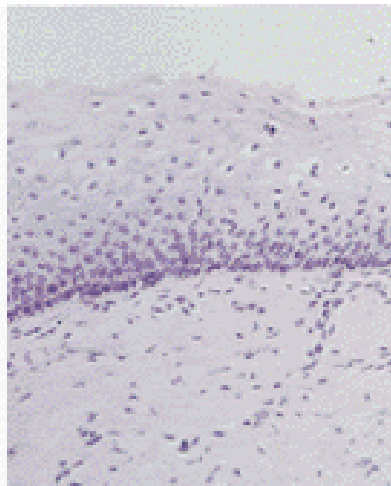
(B) dysplasia



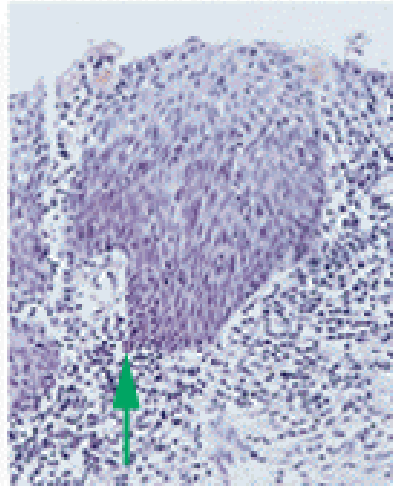
(C) carcinoma *in situ*



(D) malignant carcinoma

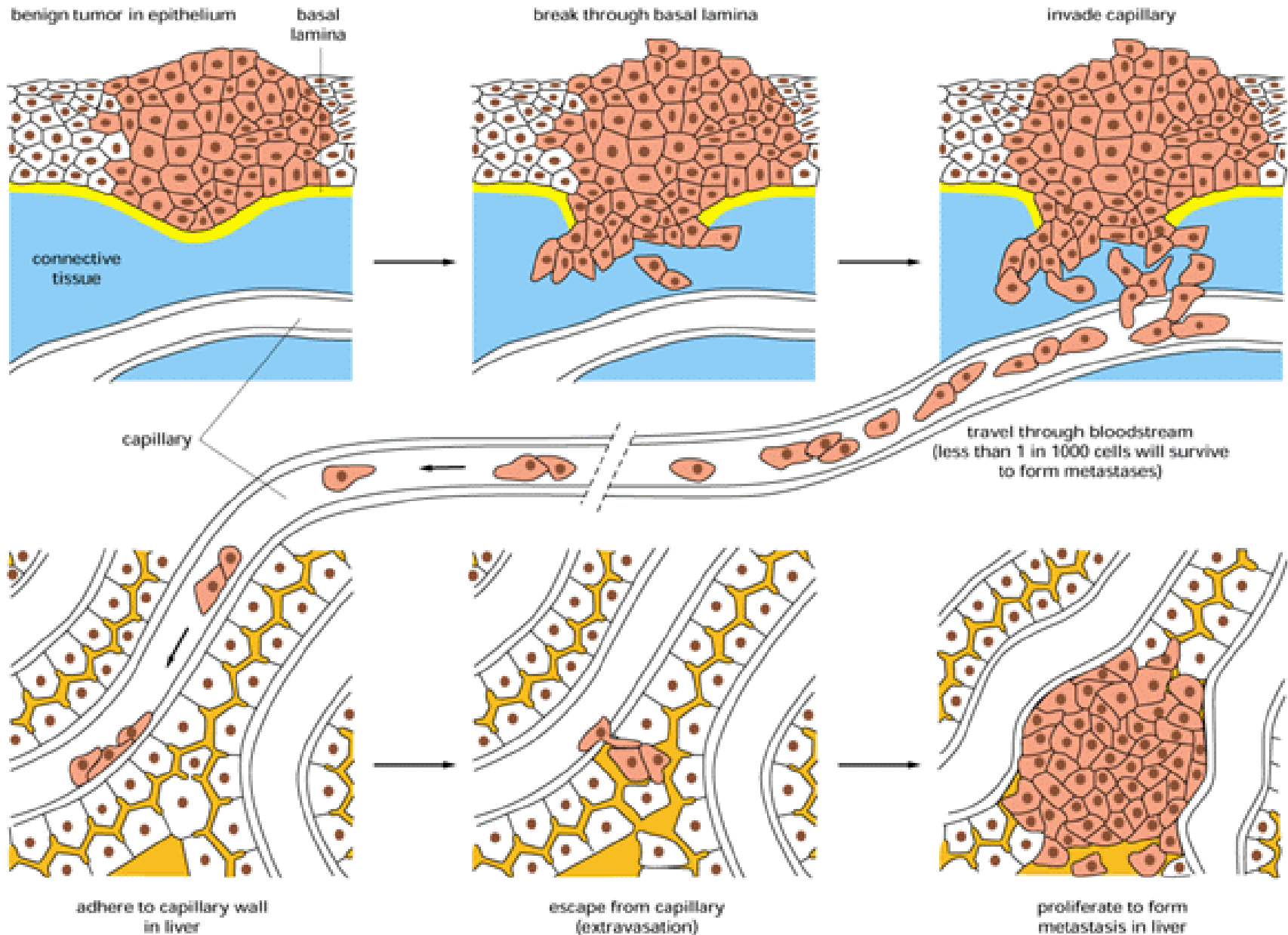


(E) normal



(F) carcinoma *in situ*
malignant carcinoma

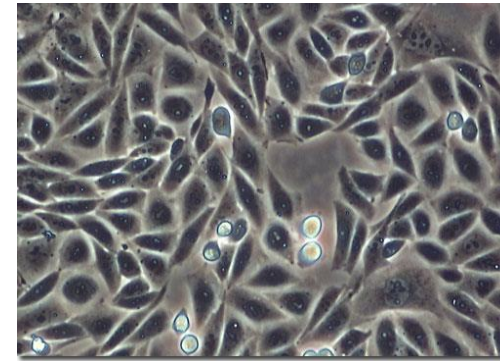
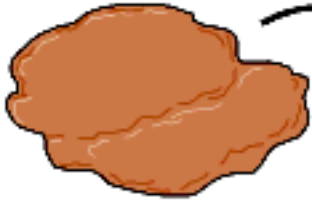
Tappe del processo di metastatizzazione



Uso delle colture cellulari nello studio della proliferazione cellulare

Come si rende stabile una coltura di cellule

Tessuto



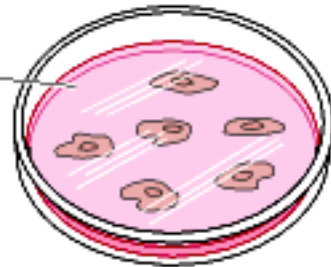
Cellule di ovaio di criceto

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

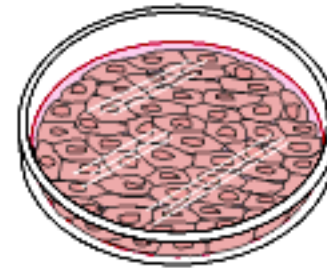
Le cellule sono piastrate in una piastra di coltura in un mezzo nutriente

Sospensione cellulare

Mezzo liquido



Coltura primaria



Coltura secondaria



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

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

Uso delle colture cellulari nello studio della proliferazione cellulare

Crescita di cellule animali in coltura

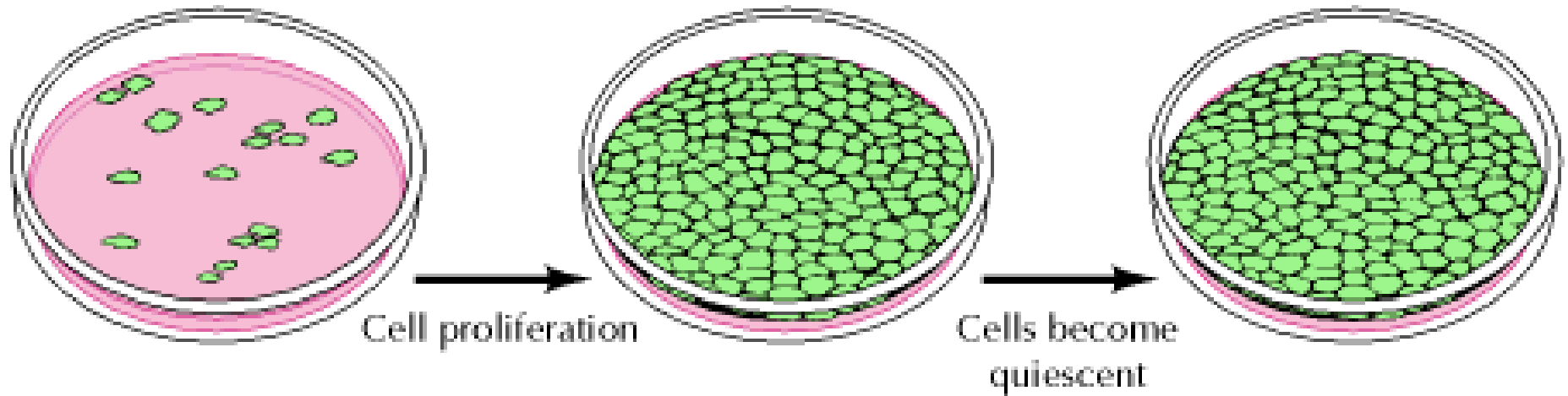
Composizione di un tipico mezzo adatto alla coltivazione di cellule di mammifero

<i>Amminoacidi</i>	<i>Vitamine</i>	<i>Sali</i>	<i>Vari</i>	<i>Siero</i>
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosio	Fattori di crescita/ mitogeni
Cistina	Colina	KCl	Penicillina	
Fenilalanina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Streptomicina	
Glutammina	Nicotinammide	NaHCO ₃	Rosso fenolo	
Isoleucina	Panotenato	CaCl ₂	Siero intero	
Leucina	Piridossale	MgCl ₂		
Leucina	Riboflavina			
Lisina	Tiamina			
Metionina				
Tirosina				
Treonina				
Triptofano				
Valina				

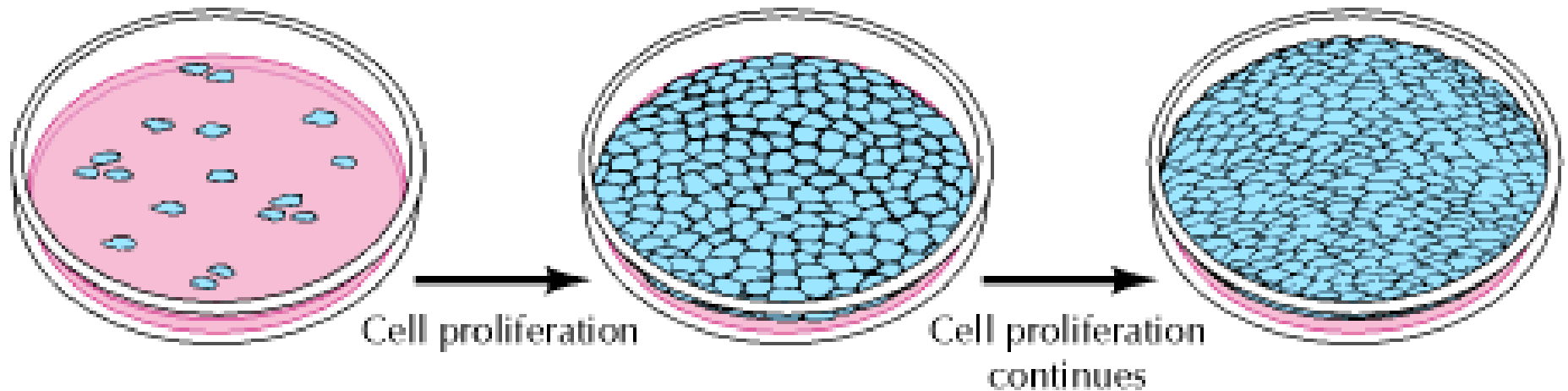
Proprietà delle cellule cancerose

1. Manca inibizione dipendente dalla densità
2. Manca inibizione da contatto

Normal cells



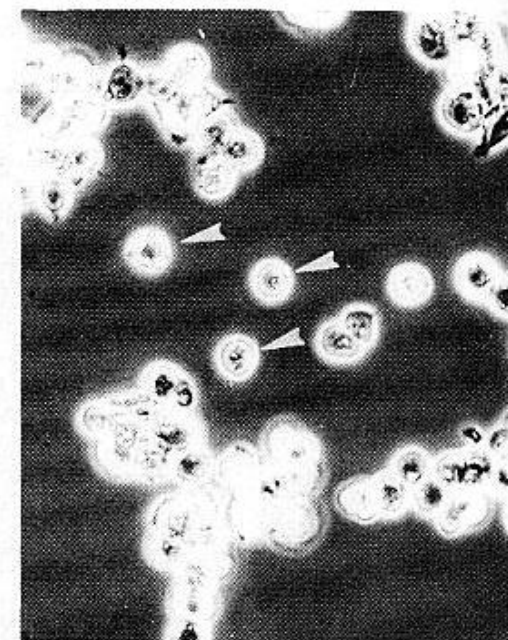
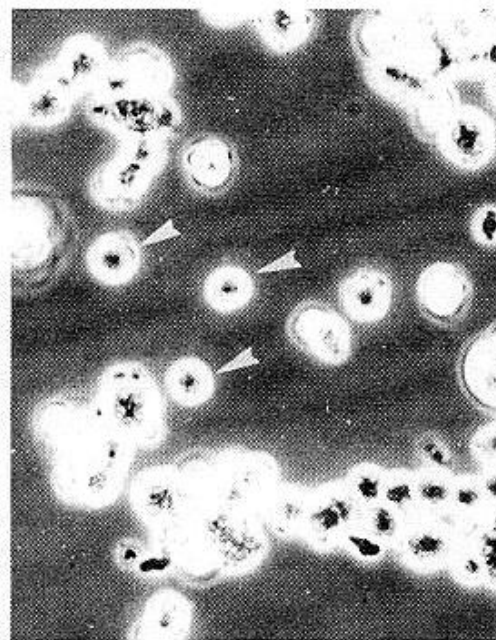
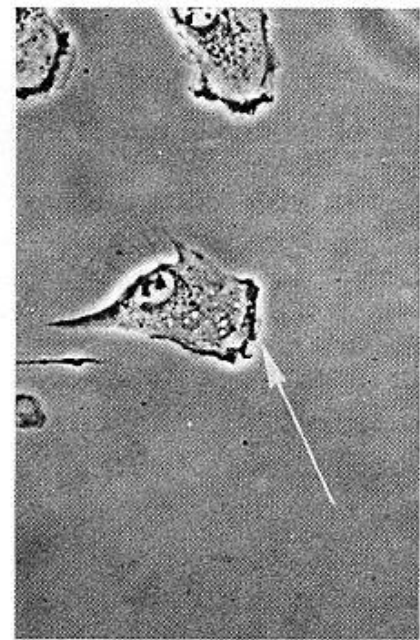
Tumor cells



Morfologia di cellule embrionali di criceto normali (linea cellulare 9), paragonata a quella di cellule trasformate (linea cellulare 14b).

(a e b) Le prime due microfotografie a contrasto di fase (250x) mostrano il carattere appiattito ed espanso delle cellule normali di criceto, in crescita su una superficie piana. La cellula al centro del campo di osservazione si sta spostando verso destra e il suo margine anteriore a forma di ventaglio contiene molte irregolarità (indicate da una freccia). Cinque ore separano le due fotografie riportate.

(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 e mostrano avere ben poca motilità (le frecce puntano verso le cellule che non si sono mosse affatto durante le 19 ore di intervallo fra le due fotografie). Le cellule figlie tendono a restare in gruppo, formando così delle isolette.



(a)

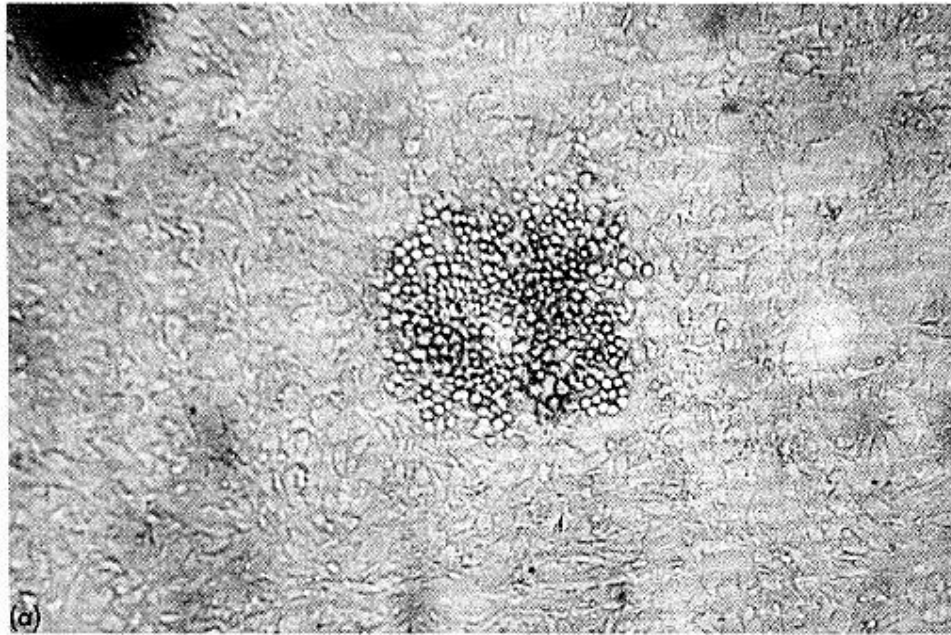
(b)

(c)

(d)

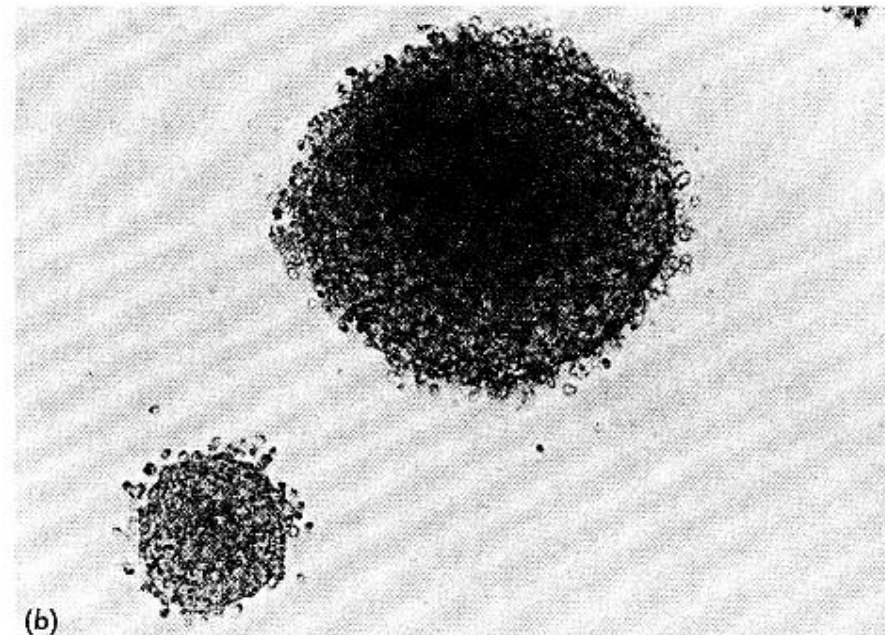
Le cellule si possono trasformare anche in vitro

Due saggi più usati per la trasformazione di cellule animali con virus tumorali



Saggio della formazione del focus.

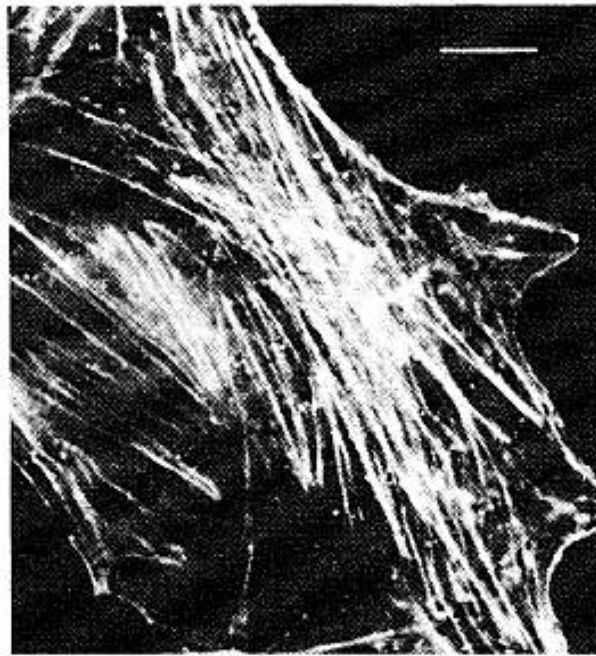
Cellule di pollo trasformate dopo infezione con il virus RSV.



Formazione di colonie in agar.

Una colonia di cellule di embrione di ratto (linea REF 52) trasformate dal gene *ras* e E1A di adenovirus.

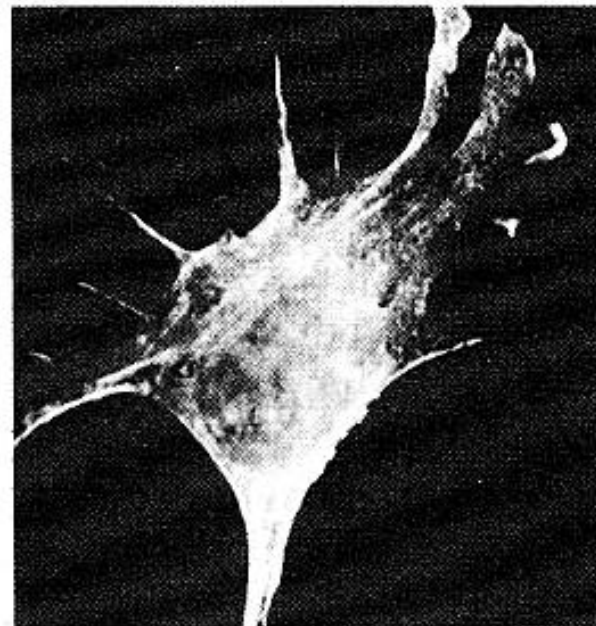
In questa figura viene paragonata l'organizzazione delle proteine muscolari di cellule normali con quelle tumorali di topo. Tecniche di immunofluorescenza vengono usate per visualizzare (a) l'actina all'interno di una cellula "normale" 3T3, (b) la miosina nelle stesse cellule, (c) l'actina di cellule 3T3 trasformate dal virus SV40 (SV3T3) e (d) la miosina di cellule SV3T3.



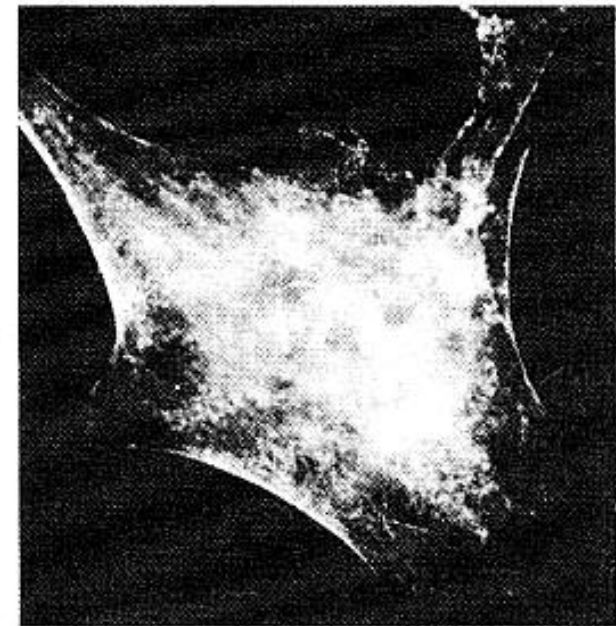
(a)



(b)



(c)



(d)

Le cellule trasformate in coltura

1. Anomalie associate alla membrana citoplasmatica
 - A. Aumentato trasporto di metaboliti
 - B. Eccessive vescicole della membrana citoplasmatica
 - C. Aumentata mobilità delle proteine di membrana

2. Anomalie nelle proprietà adesive
 - A. Diminuita adesione alle superfici
 - B. Incapacità dei filamenti di actina di organizzarsi in fibre da stress
 - C. Riduzione del rivestimento esterno di fibronectina
 - D. Alta produzione di attivatore di plasminogeno (aumenta proteolisi extracellulare)

3. Anomalie della crescita e della divisione
 - A. Crescita ad una densità cellulare particolarmente alta
 - B. Ridotto fabbisogno di fattori di crescita
 - C. Minore dipendenza dall'ancoraggio
 - D. Immortalizzazione (proliferazione cellulare all'infinito)
 - E. Può provocare tumori quando inoculata in animali suscettibili

I geni critici per il cancro

I geni critici del cancro sono raggruppati in due grandi classi, a seconda che il rischio del cancro derivi da un'attività del prodotto del gene eccessiva o ridotta. I geni della prima classe, per cui una mutazione porta la cellula ad un guadagno di funzione, sono i **protooncogeni**; le loro forme mutate iperattive si chiamano **oncogeni**. I geni della seconda classe, per cui una mutazione provoca alla cellula una perdita di funzione, sono chiamati geni **oncosoppressori** dei tumori.

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

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

Ciclo cellulare

**BILANCIAMENTO
TRA FUNZIONE DEI
PROTOONCOGENI
E GENI ONCOSOPPRESSORI**

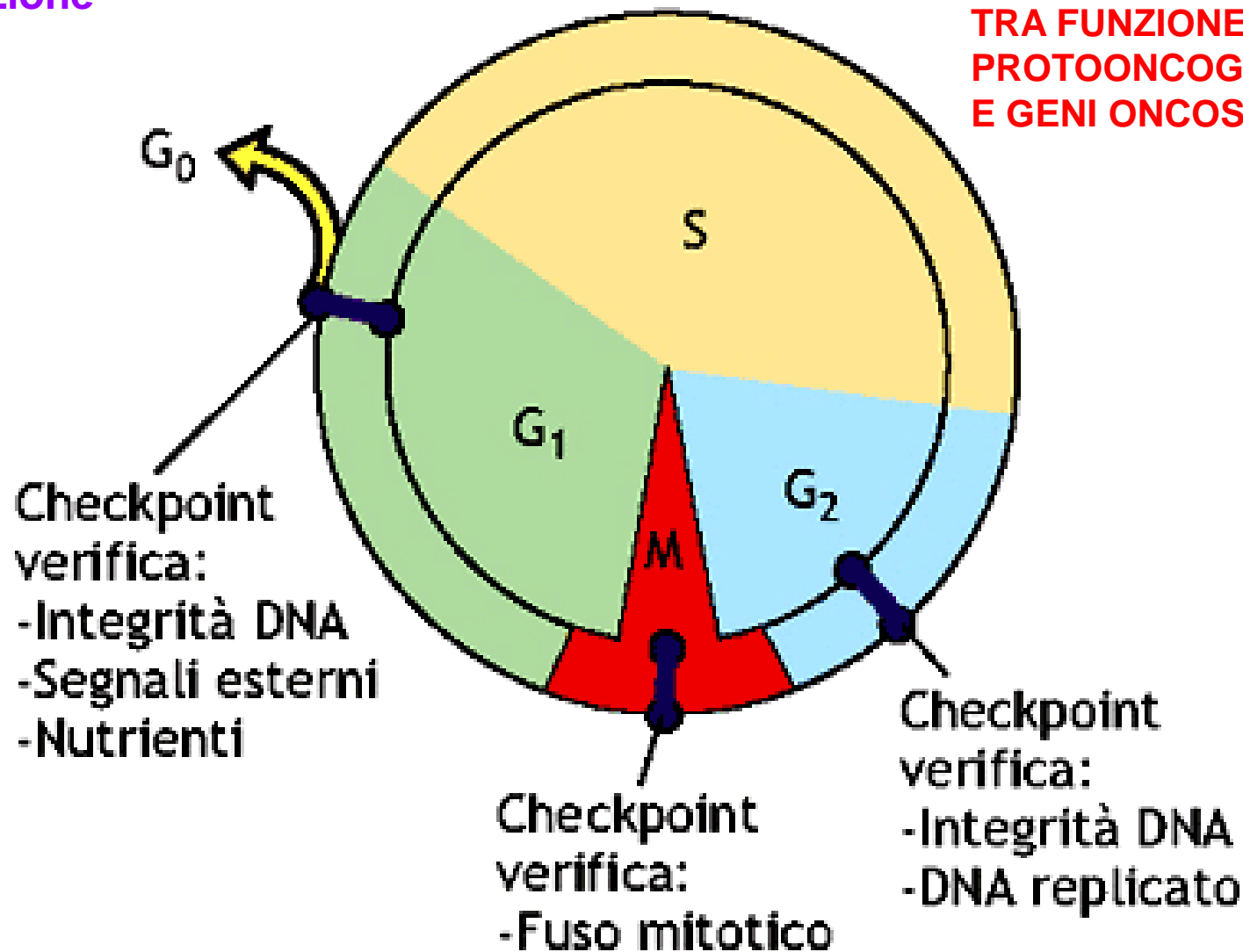
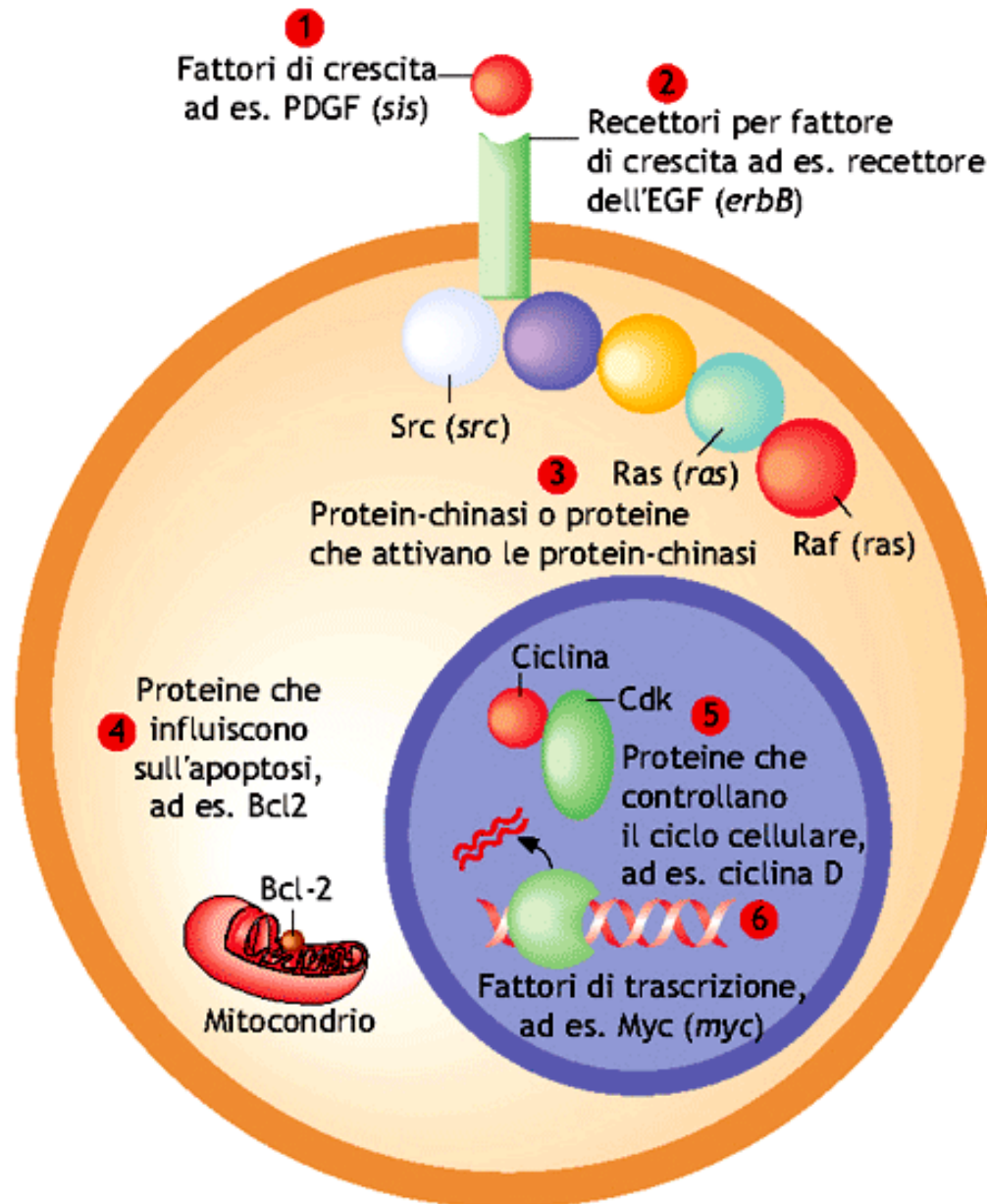


Figura 7.7 I diversi checkpoint (punti di controllo) che agiscono durante il ciclo cellulare.

Cellula trasformata

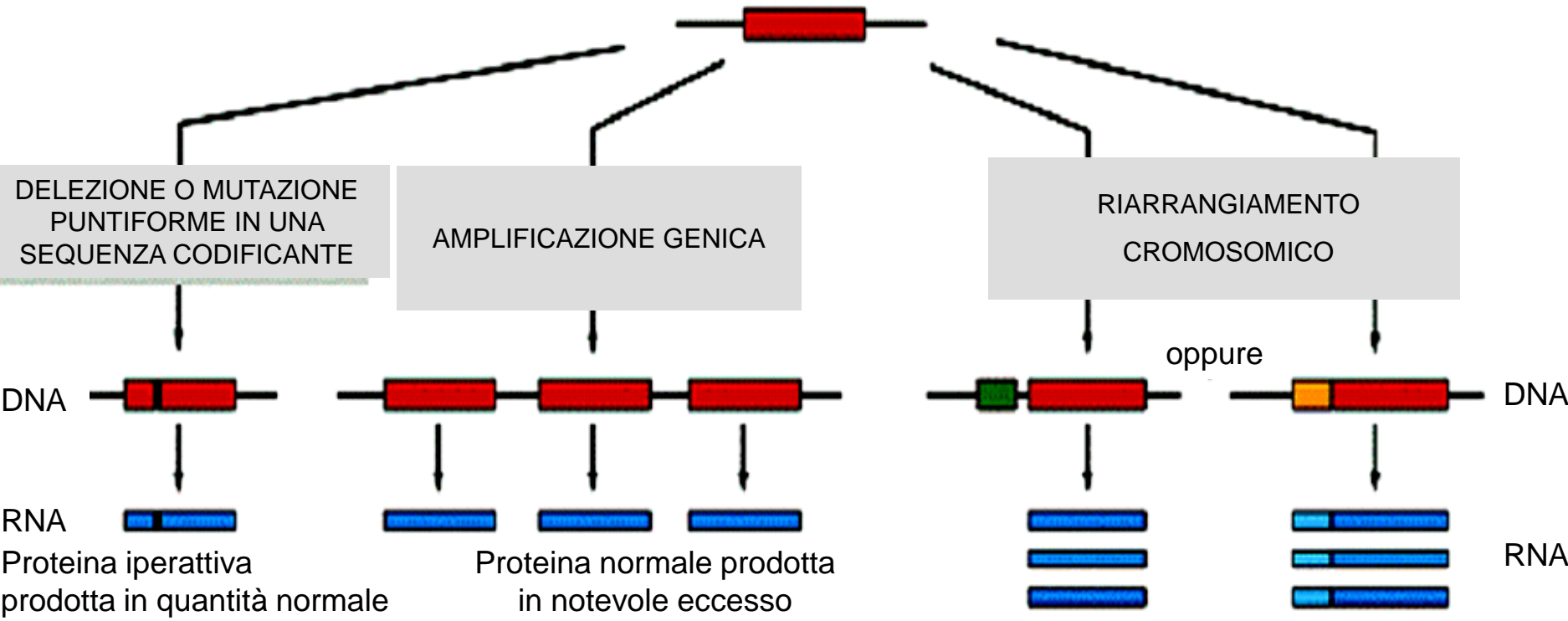
Protooncogeni-oncogeni



Oncogeni nel cancro umano

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

Attivazione di un protooncogene



Un esempio notevole dell'**amplificazione degli oncogeni** è il coinvolgimento del gene **N-myc**, che è correlato a c-myc, nel neuroblastoma (un tumore infantile delle cellule neuronali embrionali). Copie multiple di N-myc sono spesso presenti nei tumori aggressivi a crescita rapida, a indicare che l'amplificazione di N-myc è associata con la progressione dei neuroblastomi verso una maggiore malignità. L'amplificazione di un altro oncogene, **erbB-2**, che codifica un recettore proteina-tirosina chinasi, è correlata in modo simile alla progressione di carcinomi della mammella e dell'ovaio.

Un forte enhancer nelle vicinanze fa sì che la proteina normale sia prodotta in eccesso

La fusione ad un gene trascritto attivamente fa sì che la proteina di fusione sia prodotta in eccesso; oppure la proteina di fusione è iperattiva

Ciclo cellulare

Regolazione

I GENI ONCOSOPPRESSORI
ARRESTANO IL
CICLO CELLULARE

es: p53 E pRB

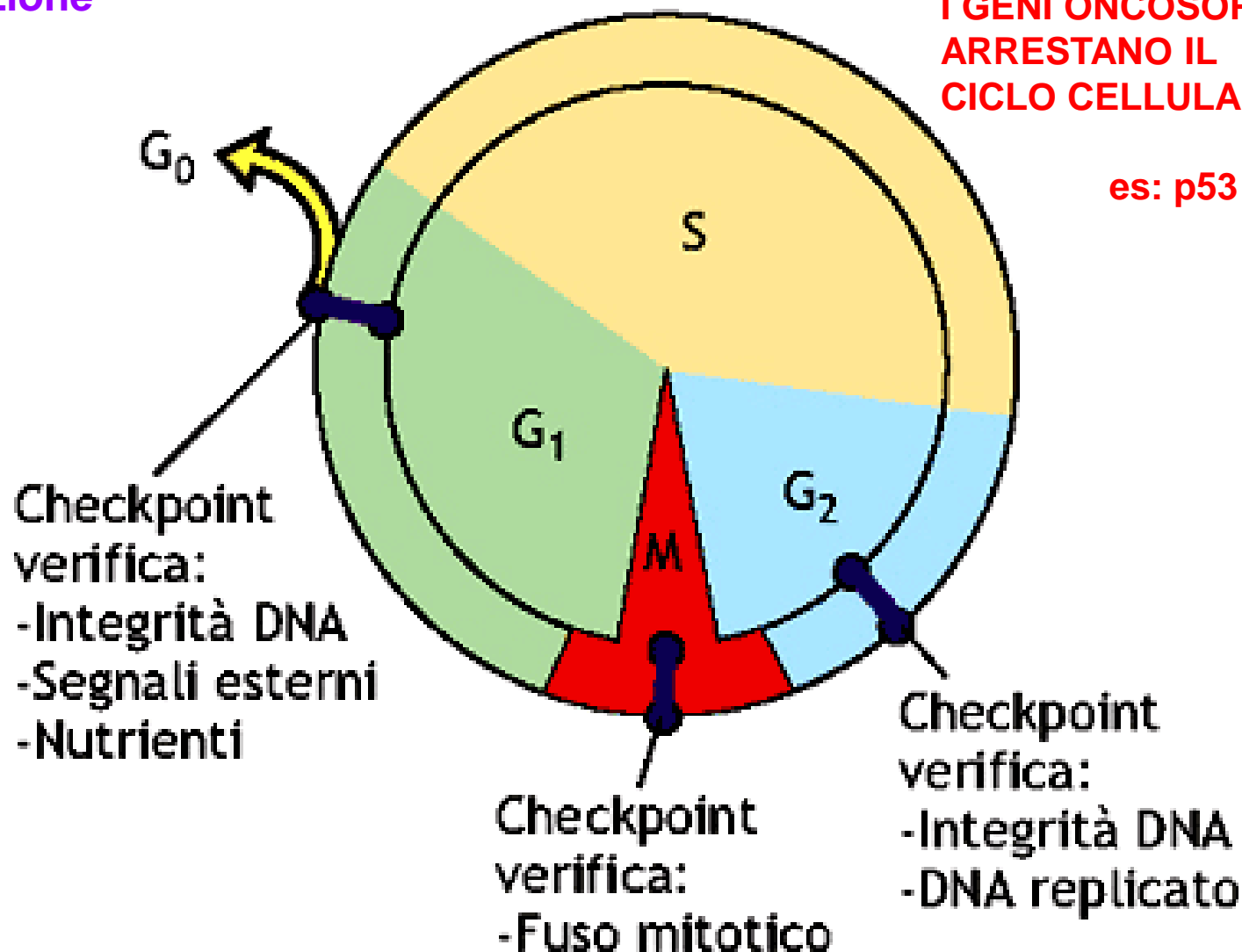
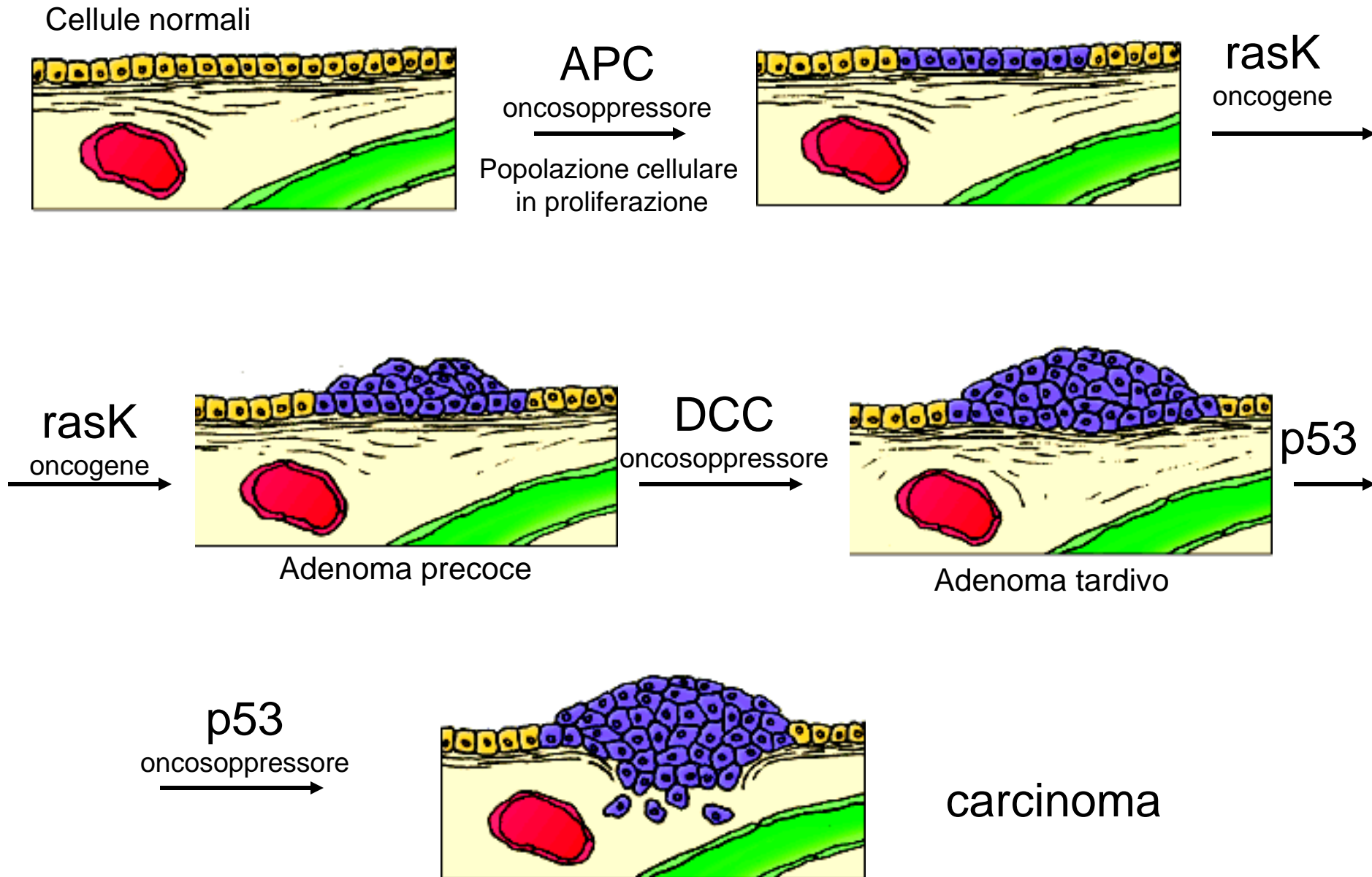


Figura 7.7 I diversi checkpoint (punti di controllo) che agiscono durante il ciclo cellulare.

Alterazioni genetiche nei carcinomi del colon



Mutazioni nel DNA

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)

b) Idrossilamina (NH_2OH)

c) Agenti alchilanti

CHIMICI

a) Radiazioni X, γ , U.V.

b) Calore

FISICI

a) Virus oncogeni a DNA

b) Virus oncogeni a RNA

BIOLOGICI

Mutazioni nel DNA: Agenti chimici

Azione mutagena

Mutageno

Base original

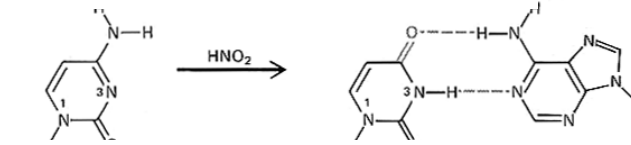
Base modificata

Base con cui si appaia

Transizione prevista

(a) Acido nitroso (HNO_2)

50



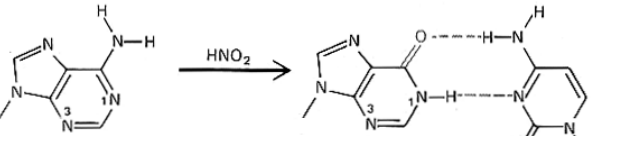
Citosina

Uracile

Adenina

CG \rightarrow TA

deaminazione



Adenina

Ipoxantina

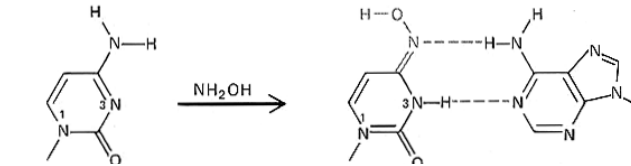
Citosina

AT \rightarrow GC

I **nitriti** in ambiente acido (soprattutto nello stomaco) si trasformano in acido nitroso il quale legandosi alle ammine da origine alle nitrosammine, composti dimostratesi cancerogeni.

(b) Idrossilamina

nina

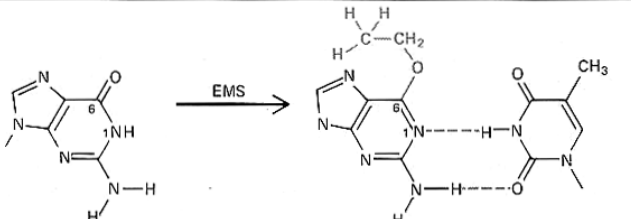


Citosina

Adenina

CG \rightarrow TA

(c) Etilmetano
sulfonato
agente alchilante

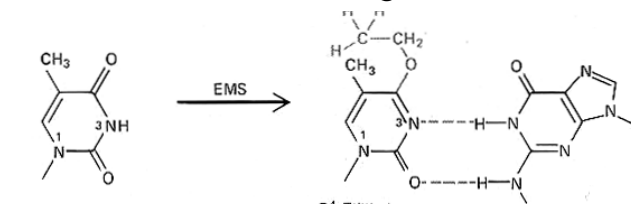


Guanina

O⁶-Etilguanina

Timina

GC \rightarrow AT



Timina

O⁴-Etiltimina

Guanina

TA \rightarrow CG

Mutazioni nel DNA

Agenti fisici: raggi X

8.6 Radiazioni

I raggi X, i raggi gamma (γ) e la luce ultravioletta (uv) sono mutageni ampiamente usati che determinano un vasto spettro di lesioni nel DNA. I raggi X, ad esempio, inducono la formazione intracellulare di **radicali liberi** (molecole contenenti un atomo con un elettrone libero), specialmente in presenza di ossigeno. Questi composti altamente reattivi possono determinare numerosi cambiamenti chimici a livello delle singole basi oppure possono danneggiare addirittura la struttura cromosomica, provocando rotture in uno o in entrambi i filamenti del DNA. I spezzati possono riavvolgersi in modo sbagliato dando origine a deficienze o a duplicazioni (Paragrafo 7.7); alternativamente frammenti di cromosomi eterologhi possono riunirsi originando delle traslocazioni (Paragrafo 7.9).

Il grafico della figura 8.8 illustra una importante proprietà dei raggi X; il loro effetto mutageno è direttamente proporzionale alla dose somministrata (misurata in **unità roentgen, r**) per lo meno per quanto riguarda l'ambito delle dosi basse. Il dosaggio dei raggi X è cumulativo nel senso che l'esposizione a parecchie dosi basse per un lungo periodo produce lo stesso effetto mutageno di una singola esposizione ad una dose più elevata. È per questo motivo che deve essere evitata ogni esposizione non necessaria ai raggi X.

L'effetto mutageno principale sia dei raggi uv che delle radiazioni ionizzanti è probabilmente l'induzione di una riparazione difettosa, come verrà detto nel paragrafo 8.12.

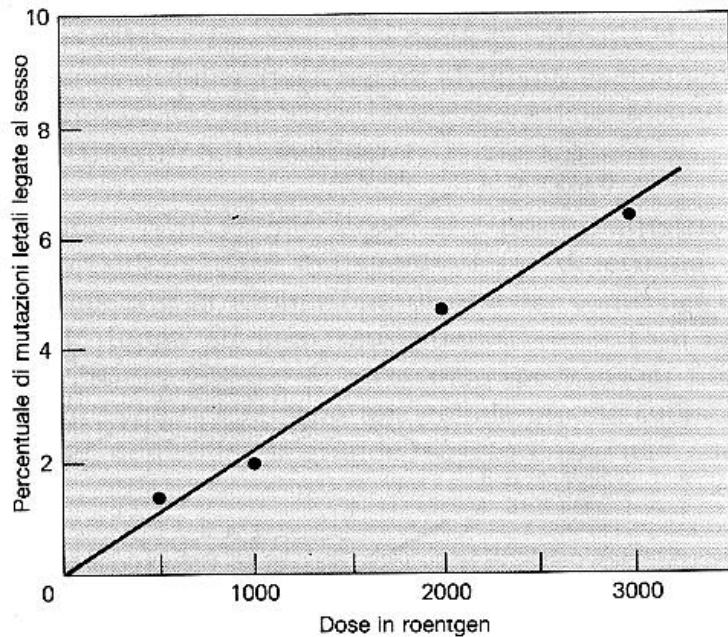


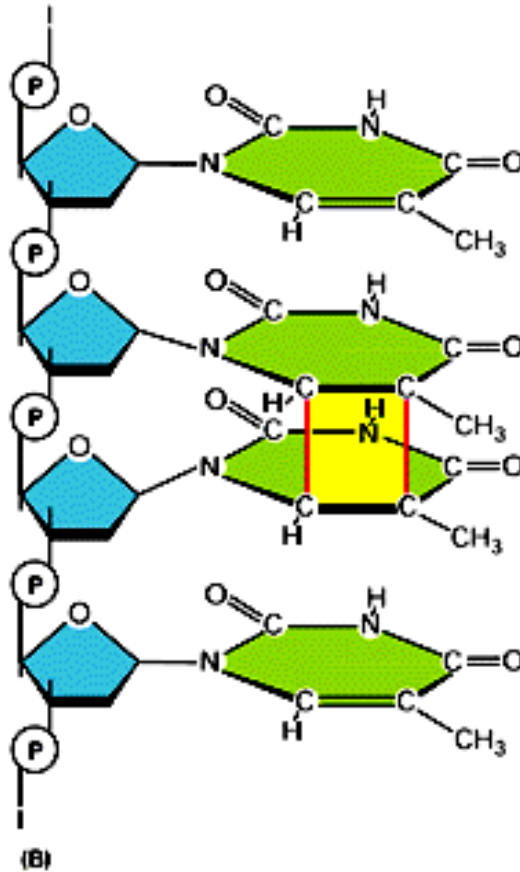
Figura 8.8 Mutagenesi indotta dai raggi X.

Aumento delle mutazioni letali legate al sesso in *Drosophila* con l'incremento della dose di raggi X. Le unità roentgen si basano sul numero di ionizzazioni prodotte in un centimetro cubo di aria in condizioni standard.

Mutazioni nel DNA

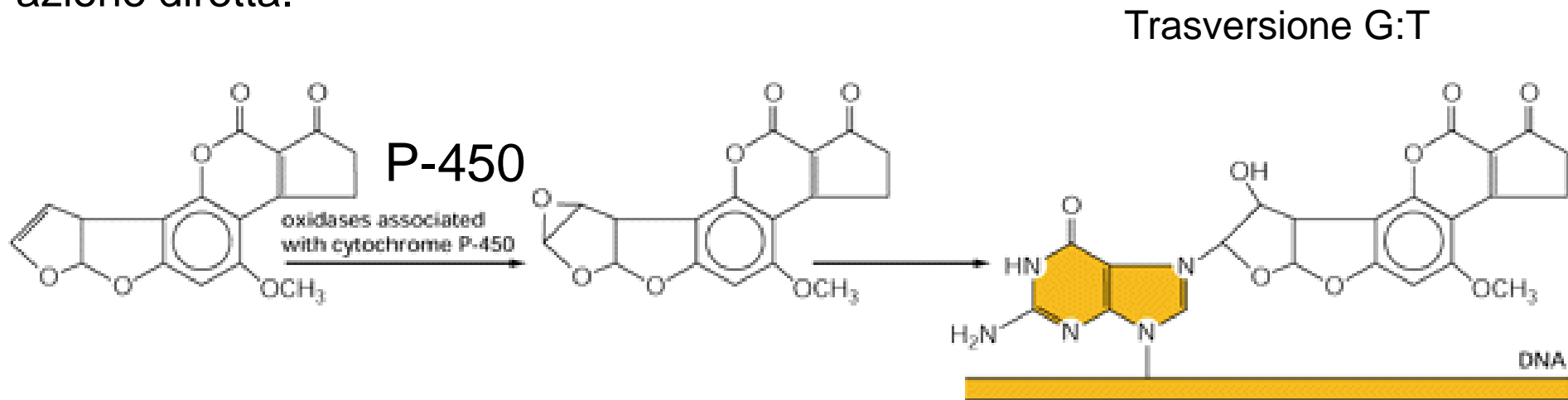
Agenti fisici: raggi U.V.

DIMERI DI TIMINA



La maggior parte dei cancro inizia da una alterazione nella sequenza del DNA

Alcuni carcinogeni agiscono direttamente sul DNA della cellula bersaglio, altri devono essere modificati per dare origine a composti più reattivi. E' il caso del gruppo di enzimi intracellulari noto come **citocromo P-450** ossidasi che normalmente convertono le tossine ingerite e i materiali estranei in componenti non nocivi e facilmente eliminabili ma in alcuni casi falliscono in questa impresa nel caso di certe sostanze e le convertono, al contrario, in carcinogeni ad azione diretta.



AFLATOSSINA B1 (tossina derivante da una muffa: *aspergillus flavus orzae*. Cresce su cereali e arachidi. Cancro del fegato nei tropici).

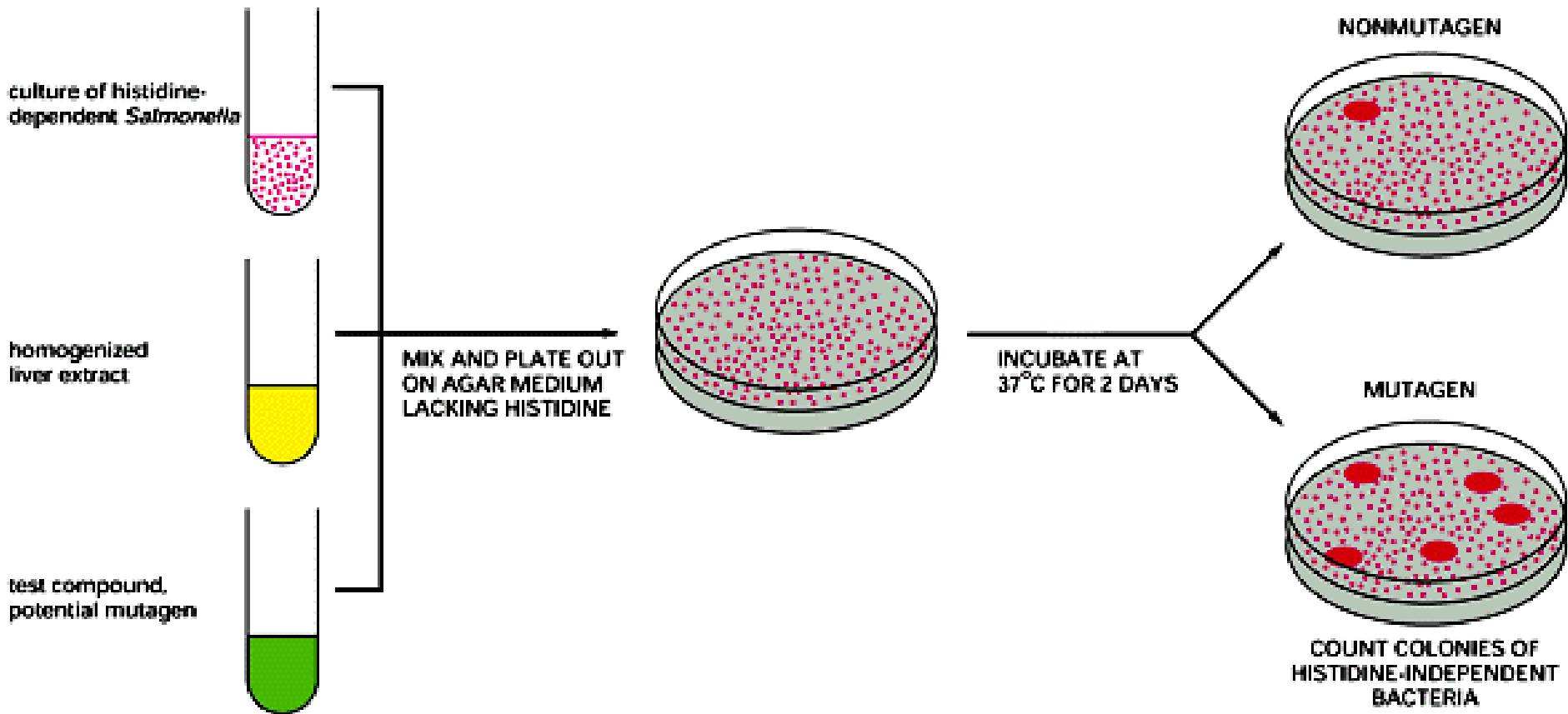
2,3 EPOSSIDO DI AFLATOSSINA B1

CARCINOGENO LEGATO AD UNA G DEL DNA

La conversione avviene anche per il benzo[a]-pirene, un composto chimico che provoca il cancro, presente nel carbone e nel fumo di tabacco.

Attivazione metabolica di un carcinogeno.

Test di Ames

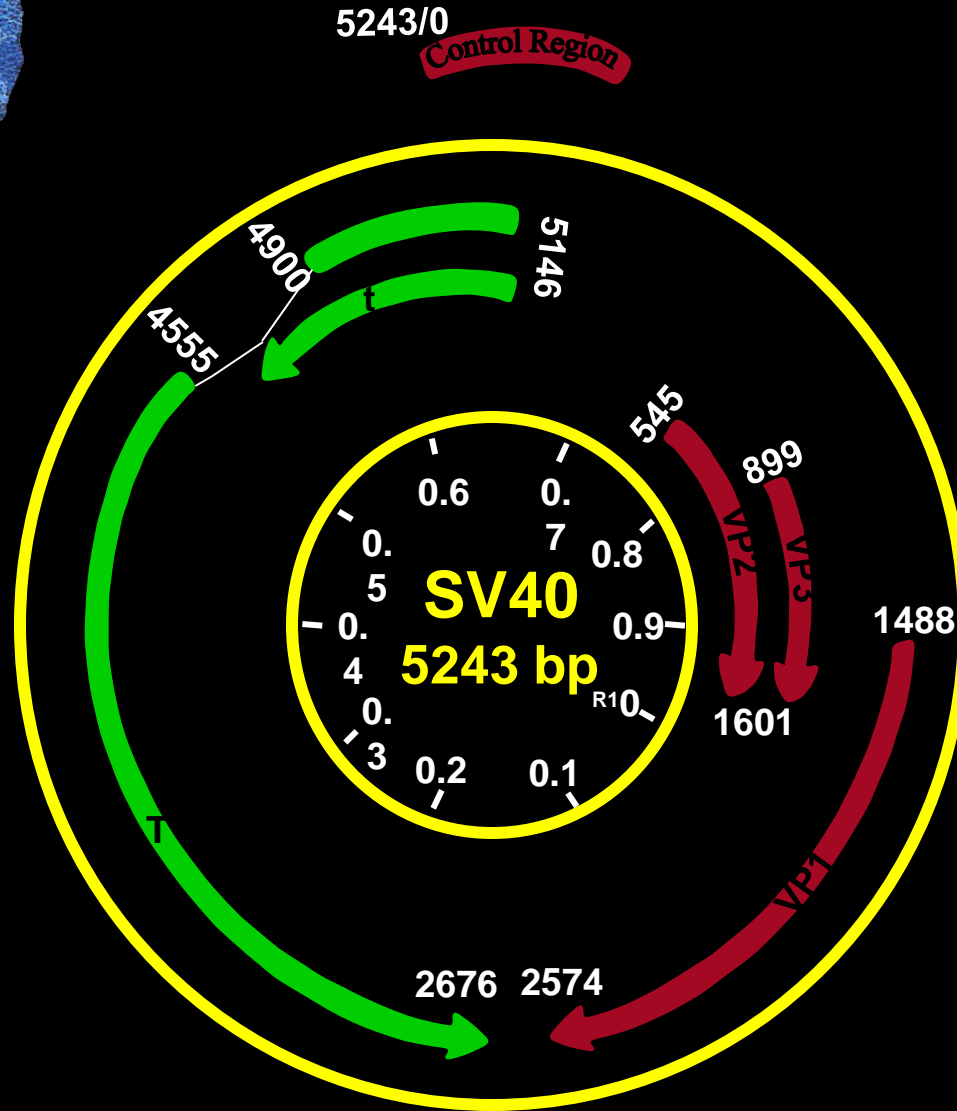
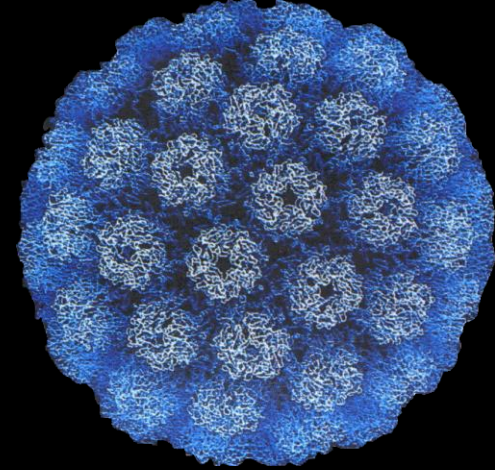


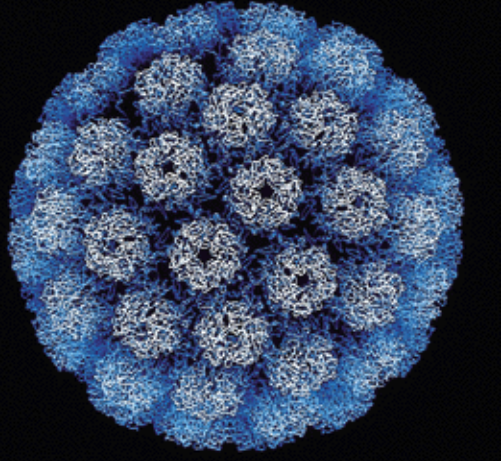
Virus tumorali

Famiglia del virus	Tumori umani	Dimensioni genoma (Kb)
Virus tumorali a DNA		
Virus dell'epatite B	Cancro del fegato	3
SV40 e poliomavirus	Nessuno	5
Papillomavirus	Carcinoma cervicale	8
Adenovirus	Nessuno	35
Herpesvirus	Linfoma di Burkitt, carcinoma nasofaringeo	100-200
Virus tumorali ad RNA		
Retrovirus	Leucemia T dell'adulto	9

Virus tumorali a DNA

SV40



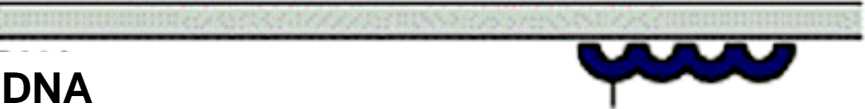


Attivazione della proliferazione cellulare da parte del virus tumorale a DNA SV40

La proteina Rb sequestra il fattore di proliferazione cellulare



Fattore di proliferazione cellulare inattivo (proteina che regola geni)

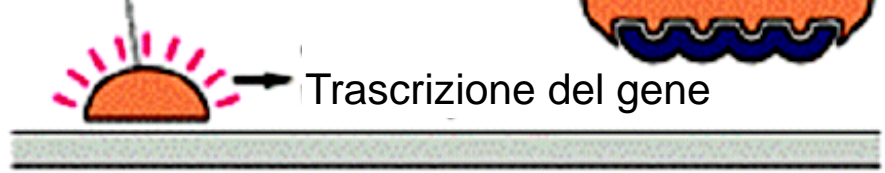


DNA

La proteina p53 attiva un freno di sicurezza della proliferazione cellulare

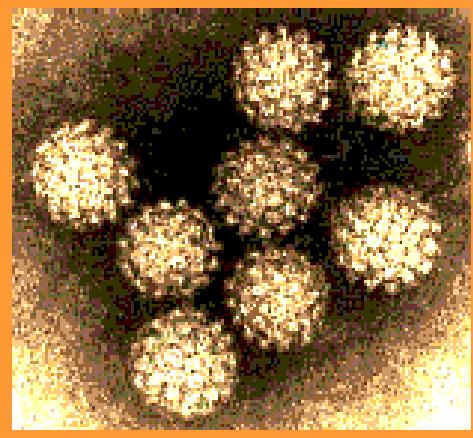
La proteina virale antigene T grande sequestra Rb e p53

Fattore di proliferazione cellulare attivo



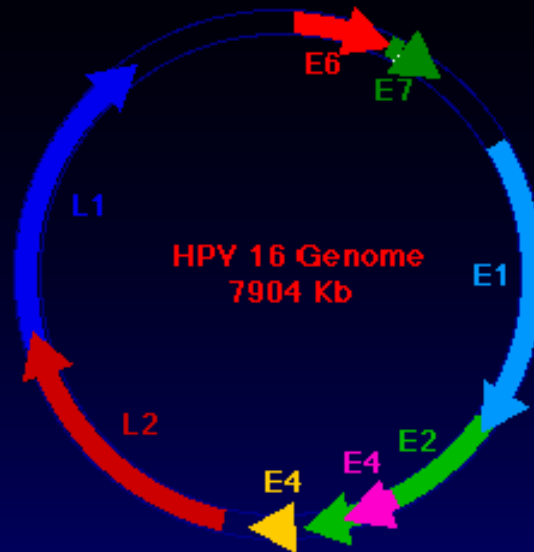
Trascrizione del gene

Virus tumorali a DNA



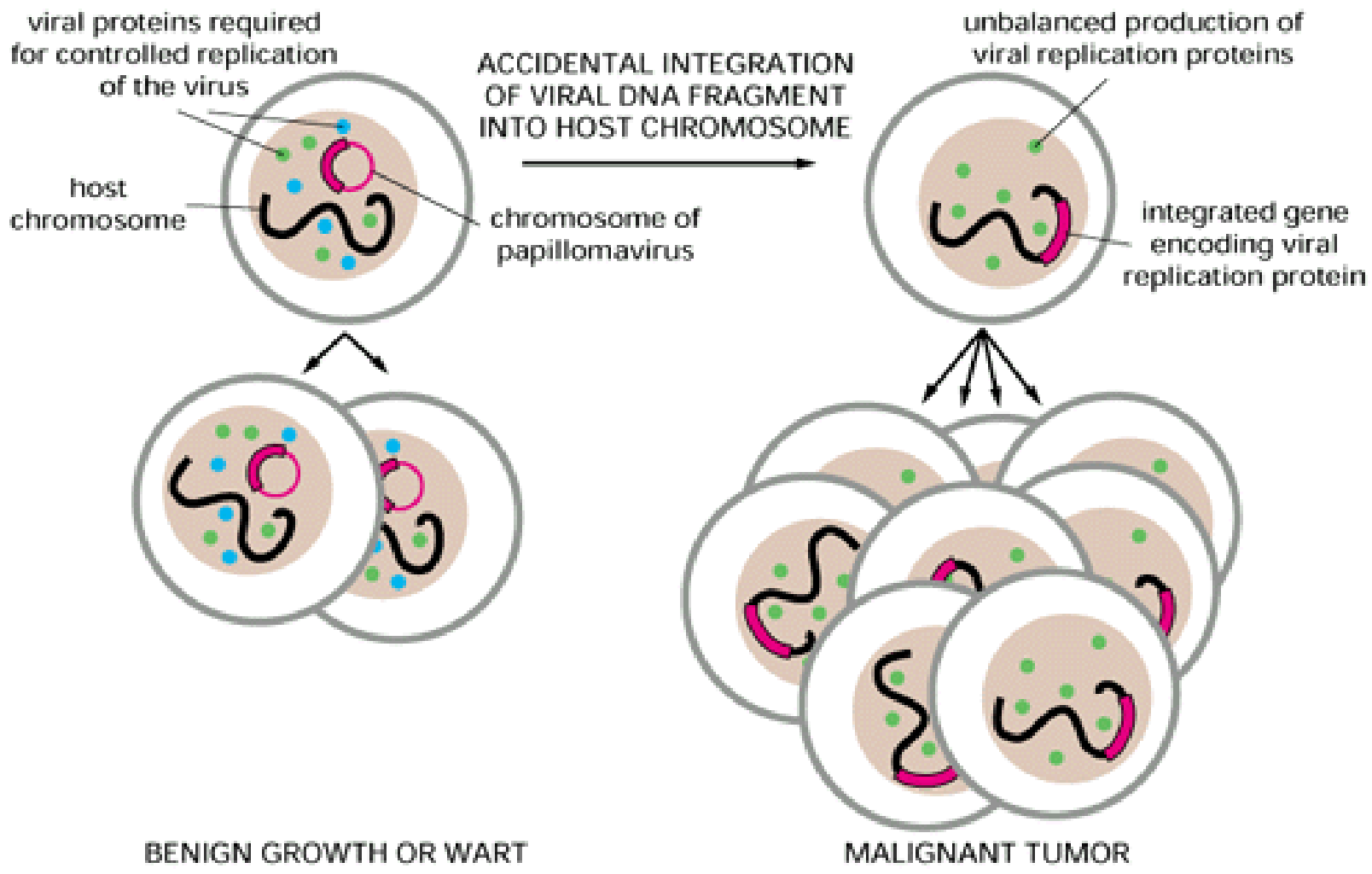
Inducono tumori benigni e maligni.

Human Papillomavirus Genome

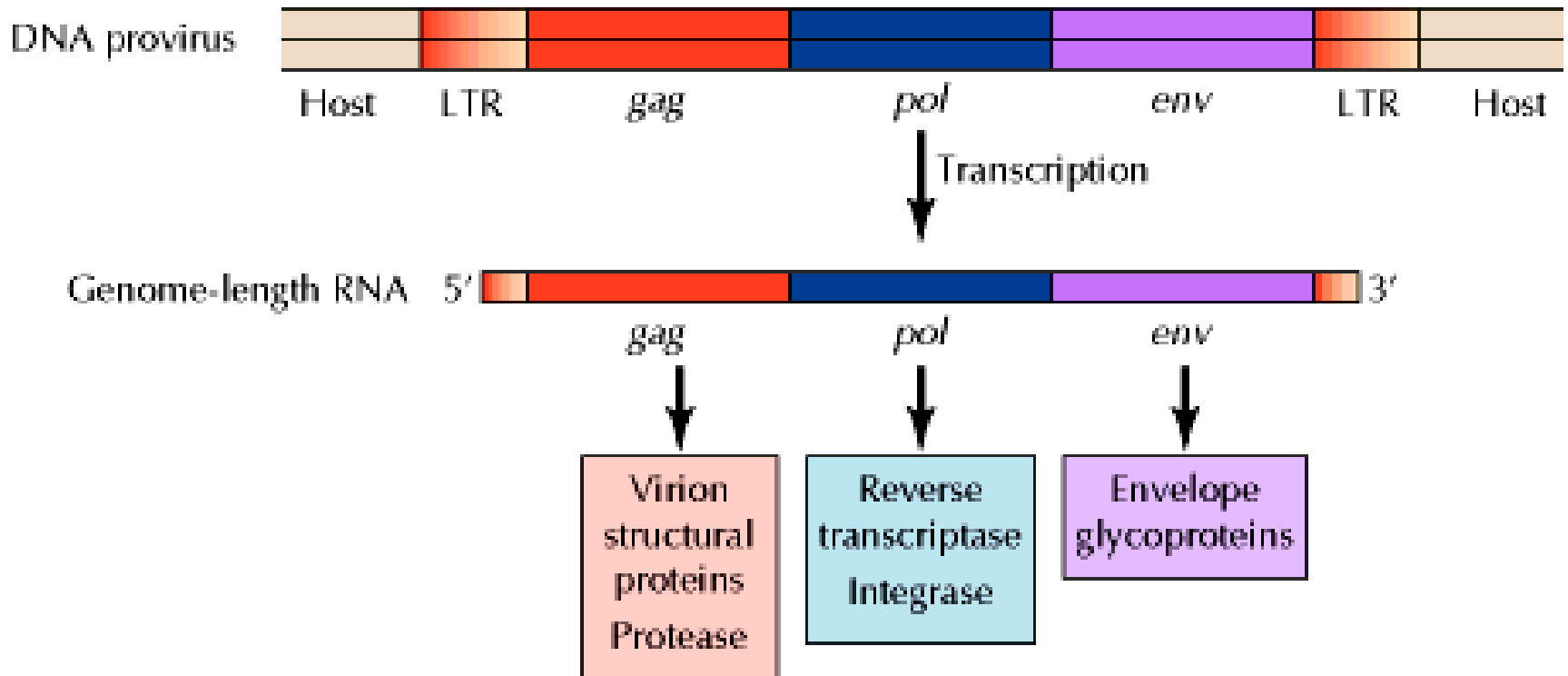


La trasformazione cellulare deriva dall'espressione di due geni della regione precoce, E6 e E7. E7 sequestra pRb mentre E6 degrada p53.

In modo in cui si pensa che certi papillomavirus diano origine al cancro della cervice uterina



Virus ad RNA: retrovirus



Virus tumorali ad RNA: retrovirus

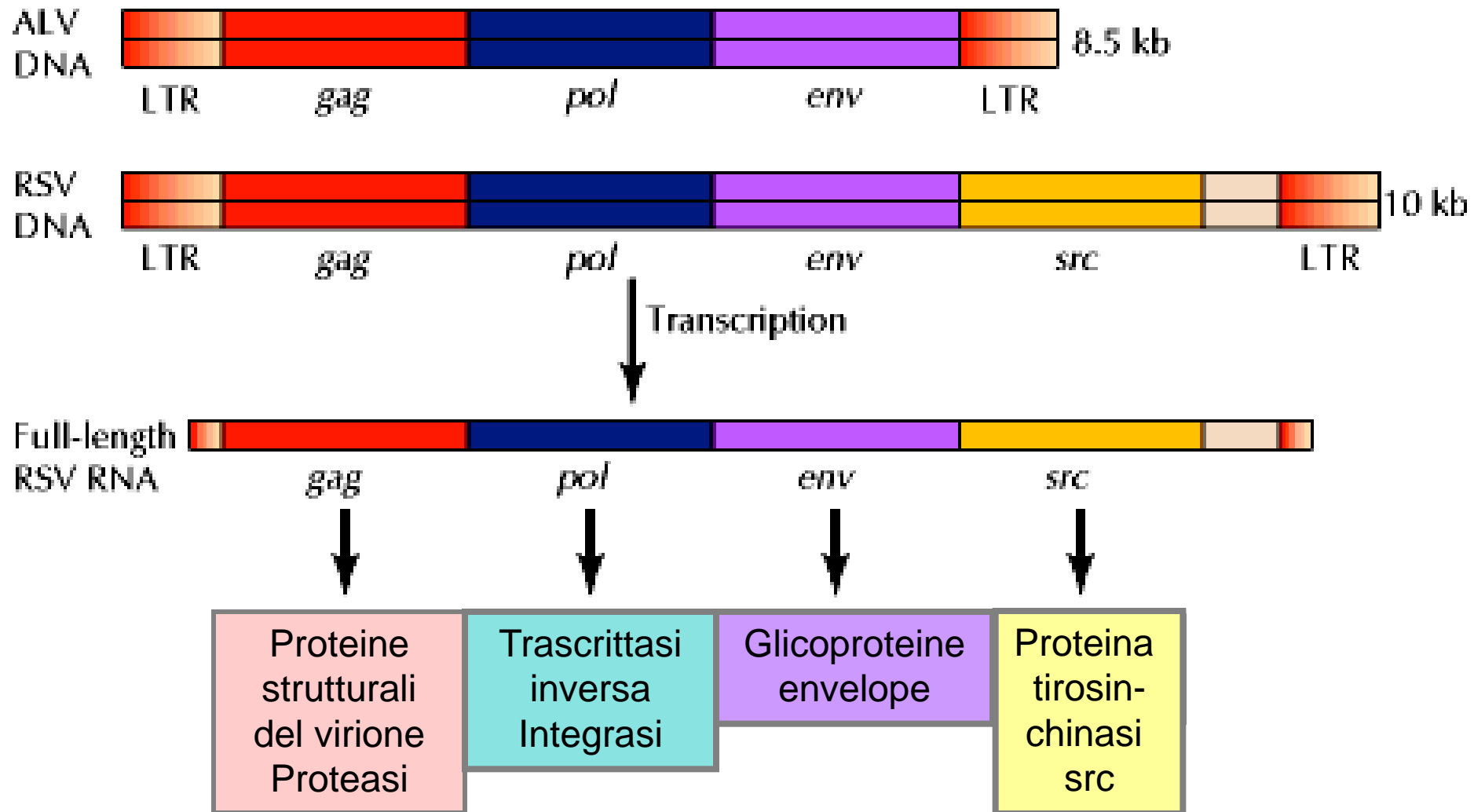
Virus del sarcoma di Rous (RSV). Isolato per la prima volta da un sarcoma di pollo nel 1911 da Rous. Più di 50 anni dopo, studi sull'SRV portarono all'identificazione del primo oncogene virale, che ha fornito un modello per la comprensione di molti aspetti dello sviluppo del tumore a livello molecolare.

RSV



Oncogeni retrovirali

Il genoma di RSV contiene un gene addizionale, *src*, che non è presente in ALV e codifica la proteina-tirosina chinasi Src (60 kd).



Protooncogeni- oncogeni virali

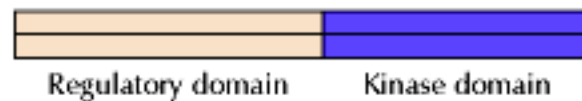
Un oncogene incorporato in un genoma retrovirale differisce sotto parecchi aspetti dal corrispondente protooncogene.

1. L'oncogene virale è trascritto sotto il controllo del promotore e dell'enhancer virale invece di essere controllato dalle normali sequenze regolatrici della trascrizione del protooncogene. Di conseguenza gli oncogeni virali sono **espressi a livelli molto più elevati** dei protooncogeni e sono talvolta espressi in tipi cellulari non appropriati. In alcuni casi queste anomalie dell'espressione dei geni sono sufficienti a convertire un protooncogene che funziona normalmente in un oncogene che induce la trasformazione cellulare.

Oltre a queste alterazioni nell'espressione dei geni, gli oncogeni codificano spesso proteine che differiscono per struttura e funzione da quelle codificate dai loro omologhi normali.

2. Molti oncogeni come *raf* sono espressi come **proteine di fusione** con sequenze virali al terminale amminico. Eventi di ricombinazione che portano alla formazione di queste proteine di fusione avvengono durante la cattura dei protooncogeni da parte dei retrovirus e sequenze di entrambi i terminali amminici e carbossilici di protooncogeni sono spesso delete durante il processo. Queste delezioni possono portare alla perdita di domini regolatori che controllano l'attività della proteina, generando così proteine oncogene che funzionano in modo sregolato.

Raf proto-oncogene protein



La proteina oncogena *raf*

Raf oncogene protein



3. Molti altri oncogeni differiscono dai corrispondenti protooncogeni per **mutazioni puntiformi** che portano a sostituzioni di singoli aminoacidi nei prodotti dell'oncogene. Un esempio di queste mutazioni è fornito dall'oncogene *ras*.