

Il Cancro

Vietate riproduzione, vendita e
copia

Il cancro è una malattia genetica

1- Capacità trasformante di oncogeni virali

2- Natura clonale dei tumori

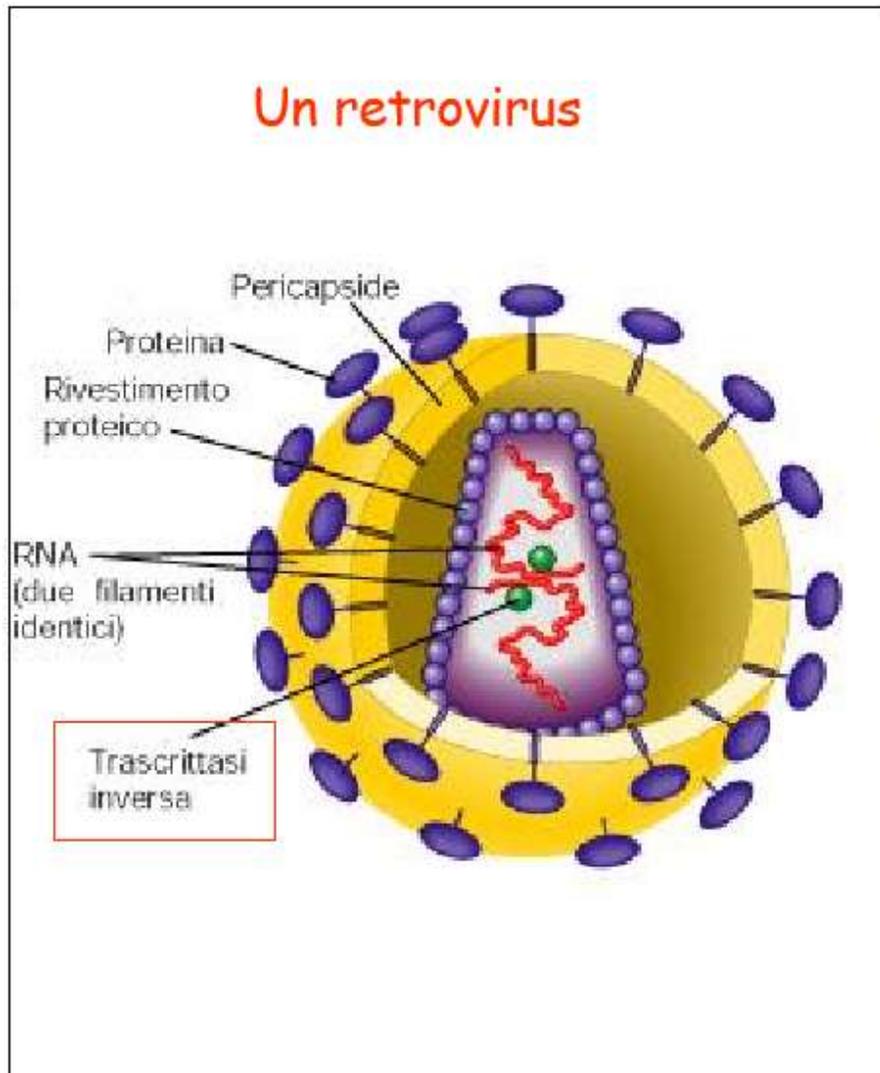
3-Azione mutagena di molte sostanze cancerogene

4-Presenza di mutazioni genetiche somatiche e di aberrazioni cromosomiche nelle cellule tumorali

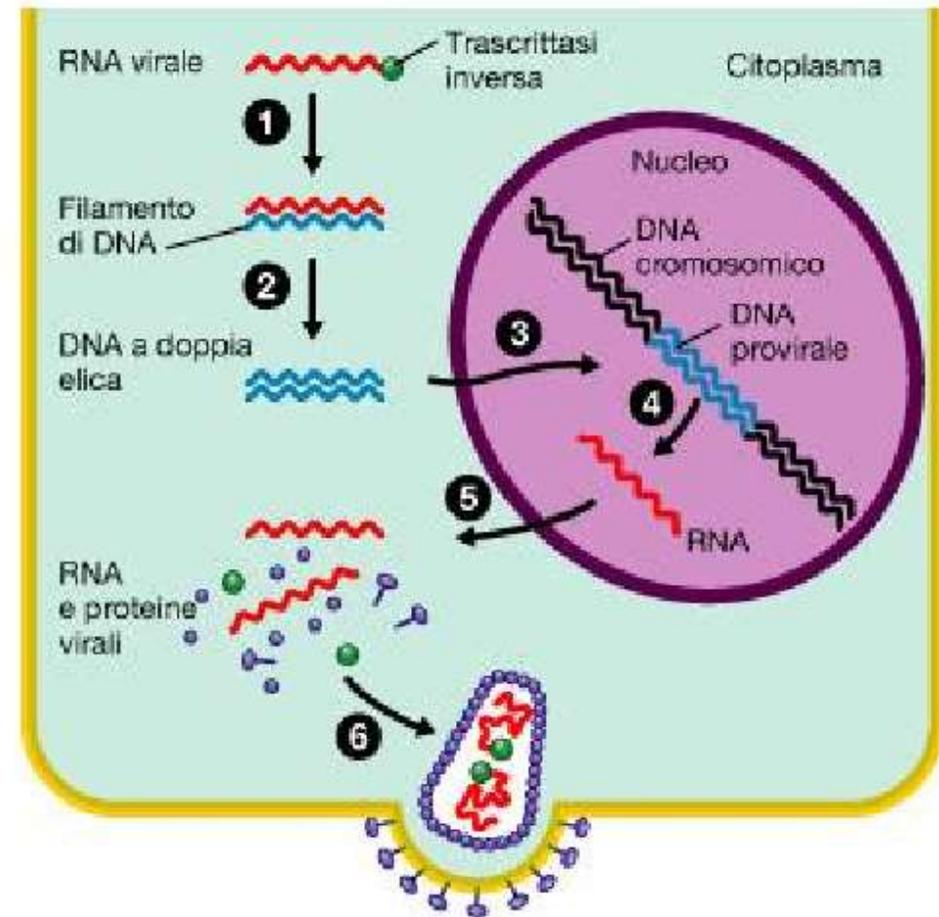
5-L'incidenza dei tumori aumenta con l'età (processo multistep)

6-Ereditabilità di certi tumori

1) Alcuni virus oncògeni portano una versione attivata di proto-oncogèni cellulari: i retrovirus



Il comportamento dell'acido nucleico d un retrovirus in una cellula infettata

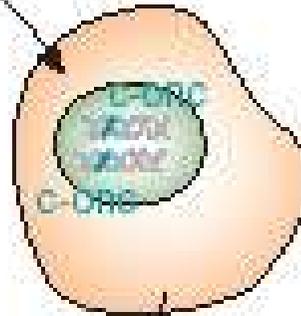




Retrovirus non trasformato

Formazione di un retrovirus cancerogeno

INFEZIONE



TRASDUZIONE

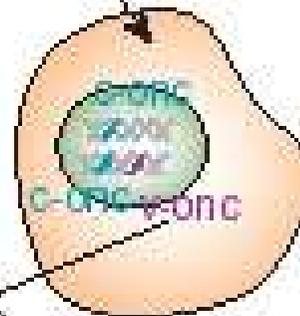
Formazione di un virus oncògeno



Retrovirus trasformato

Trasformazione di una cellula tramite un retrovirus cancerogeno

TRASFORMAZIONE



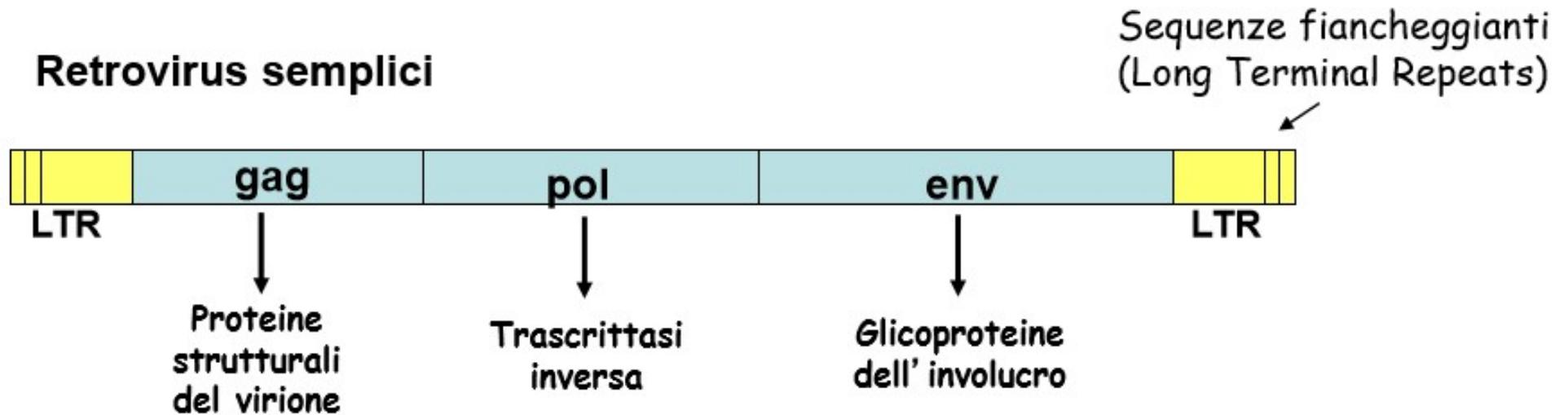
Proteine trasformate v-onc

Cellule trasformate

Vietate riproduzione, vendita e copia

ORGANIZZAZIONE GENETICA DEI RETROVIRUS

Retrovirus semplici

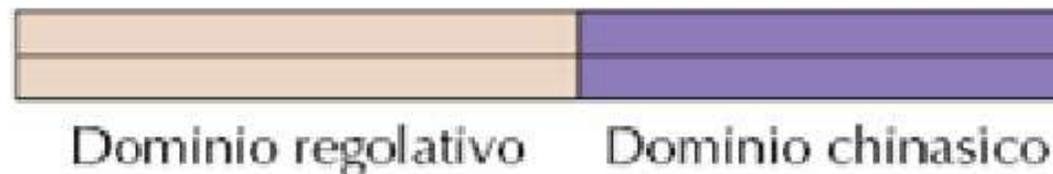


Retrovirus che trasducono un proto-oncogene cellulare (c-onc)

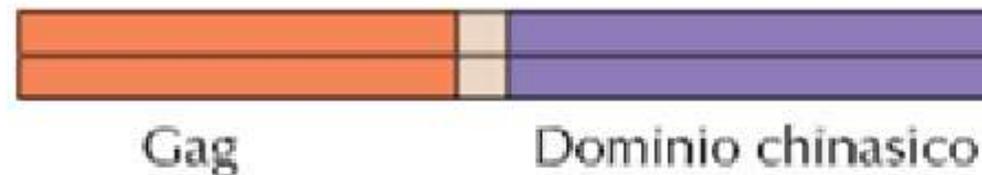


Possibile meccanismo di mutagenesi durante la cattura di un proto-oncogene da parte di un retrovirus

Proteina proto-oncogenica Raf

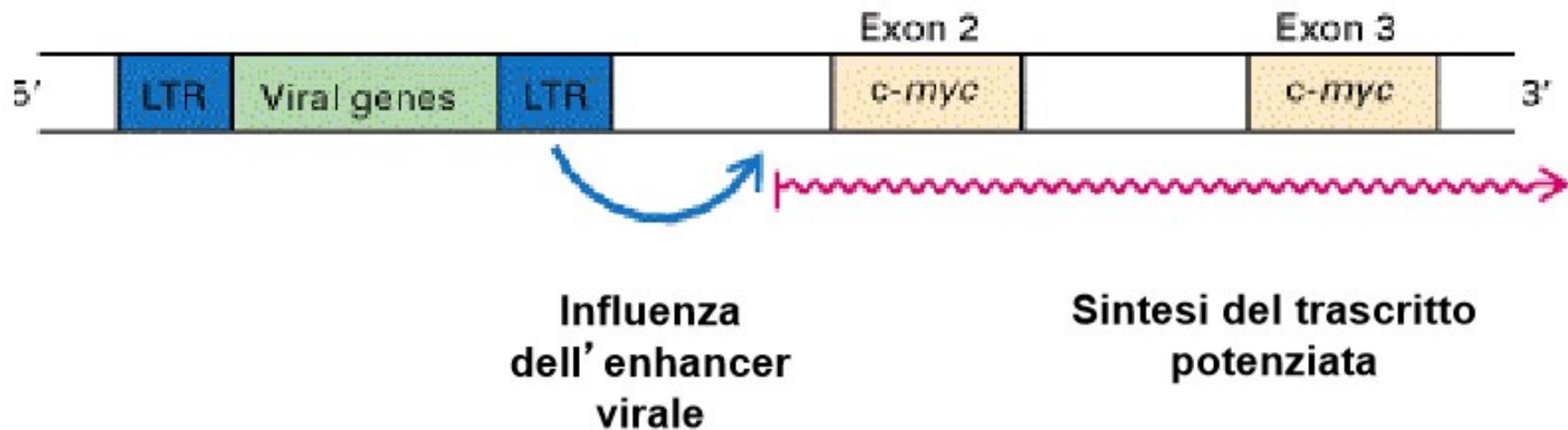


Proteina oncogenica Raf



Nella proteina oncogenica virale Raf, il dominio regolativo è stato deletato e sostituito dalle sequenze Gag virali, col risultato che il dominio chinasi è costitutivamente attivo

Attivazione di un oncogene cellulare per mutagenesi inserzionale



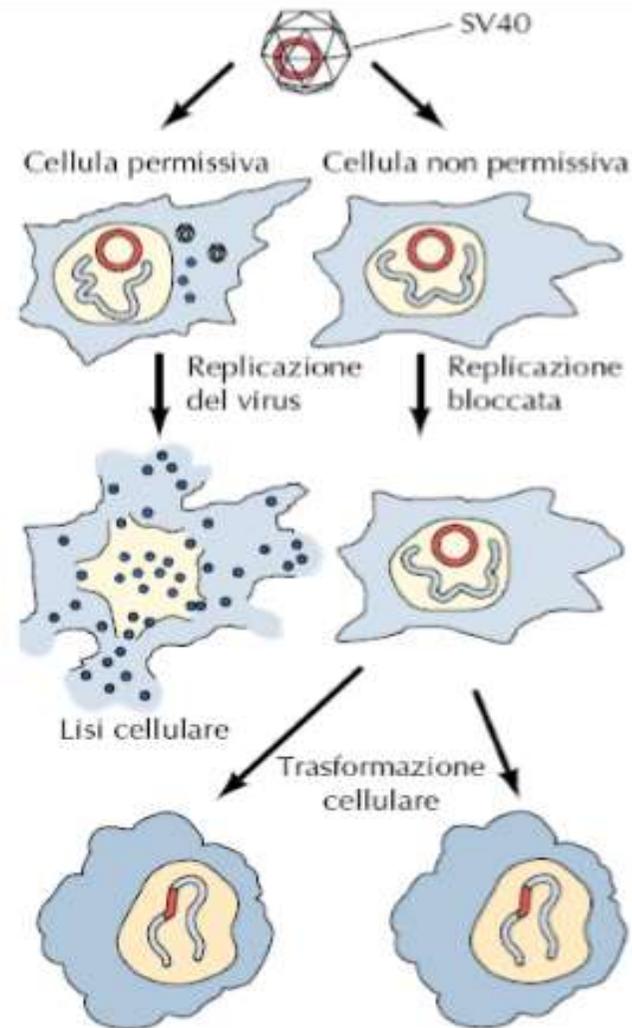
♦ **TABELLA 19.5**
Oncogeni virali identificati in retrovirus animali

Virus	v-onc	Funzione
Simian sarcoma virus	v-sis	Fattore di crescita
Avian Erythroblastosis Receptor	v-erbB	Recettore per fattore di crescita
Rous sarcoma virus	v-src	Tirosina chinasi
Kirsten murine sarcoma virus	v-kras	Proteina G
Moloney murine sarcoma virus	v-mos	Serina/treonina chinasi
MC29 avian myelocytoma virus	v-myc	Fattori di trascrizione

Vietata riproduzione, vendita e
 copia

Virus oncogeni a DNA

I **virus oncogeni a DNA** inducono la trasformazione cellulare quando si integrano nel genoma dell'ospite



SV40 è stato utilizzato per immortalizzare cellule primarie e creare linee cellulari utilizzabili in laboratorio

Vietata riproduzione, vendita e
copia

Virus oncogeni a DNA

Meccanismi di azione oncogenica

Inattivazione di proteine codificate da oncosoppressori da parte di proteine virali

Attivazione di proteine codificate da proto-oncogeni cellulari da parte di proteine virali

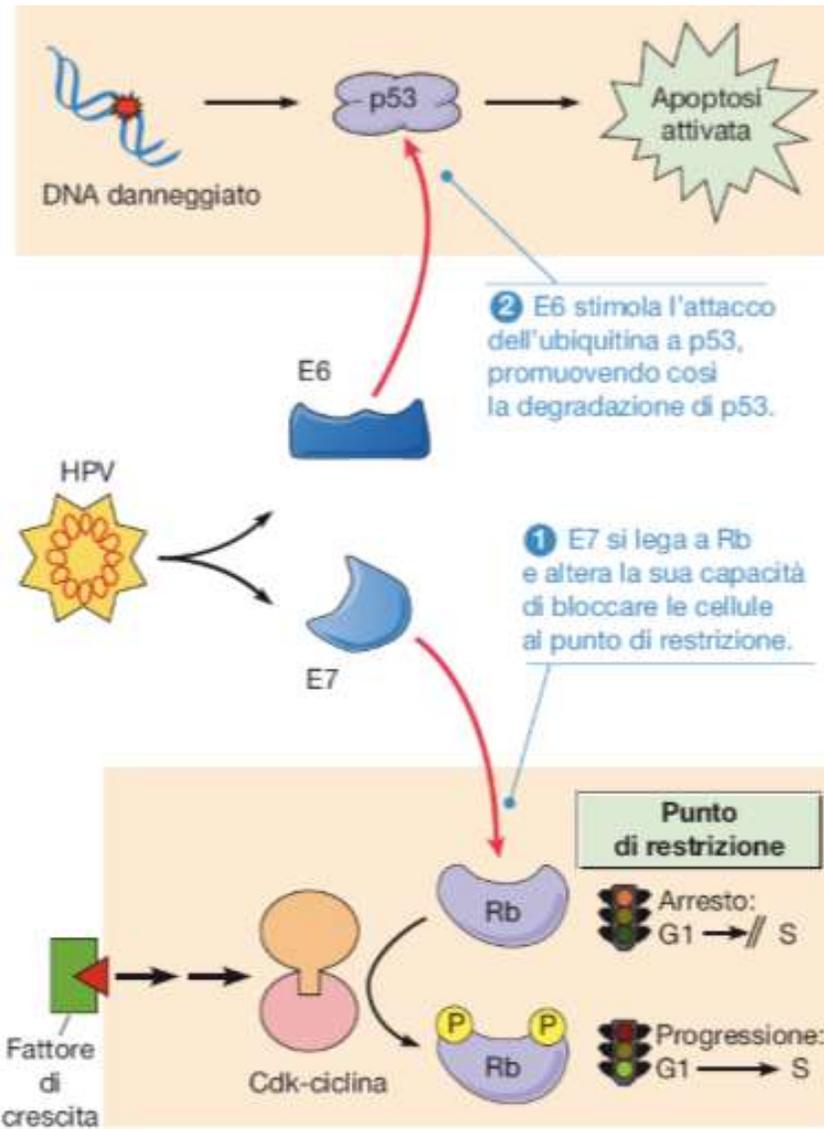
Attivazione di proto-oncogeni cellulari mediante mutagenesi inserzionale

Trans-attivazione di proto-oncogeni cellulari mediante proteine virali che regolano la trascrizione

TABLE 5. Cellular targets of the DNA tumor virus oncoproteins

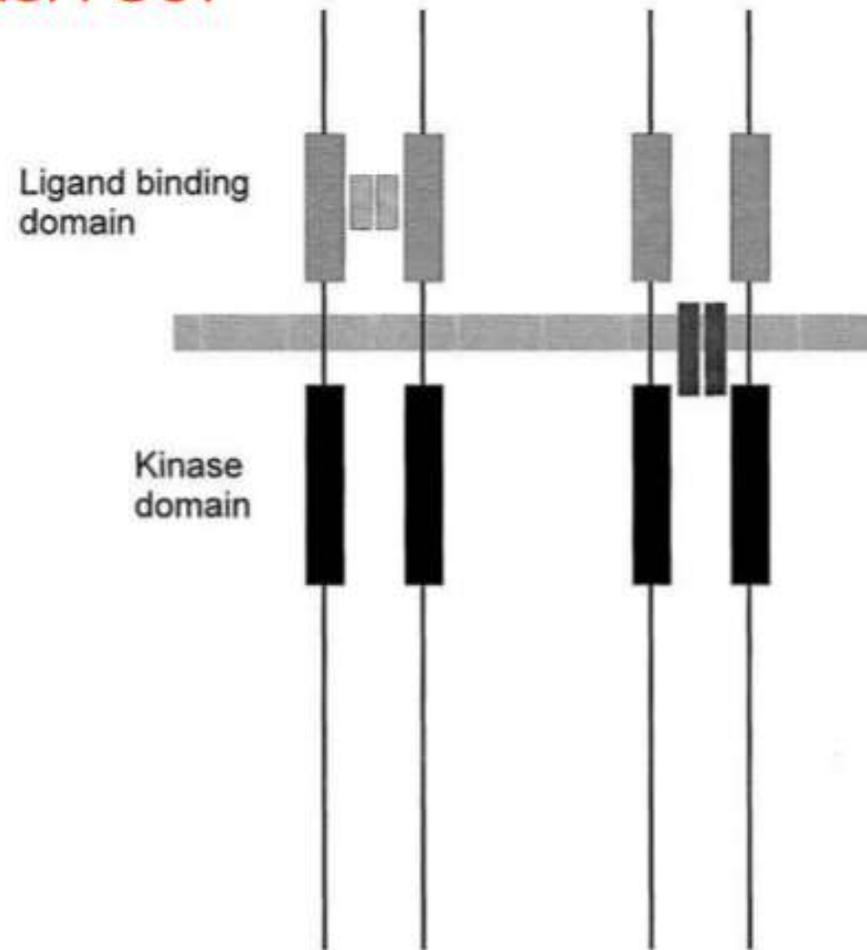
Virus	Gene Product	Cellular Target
Adenovirus	E1A	Rb
	E1B	p53
SV40	Large T antigen	Rb, p53
Polyomavirus	Large T antigen	Rb
	Middle T antigen	Src, PI 3-K
Papillomavirus	E7	Rb
	E6	p53
	E5	PDGF receptor

Le proteine E6 e E7 del virus del papilloma inattivano Rb e p53



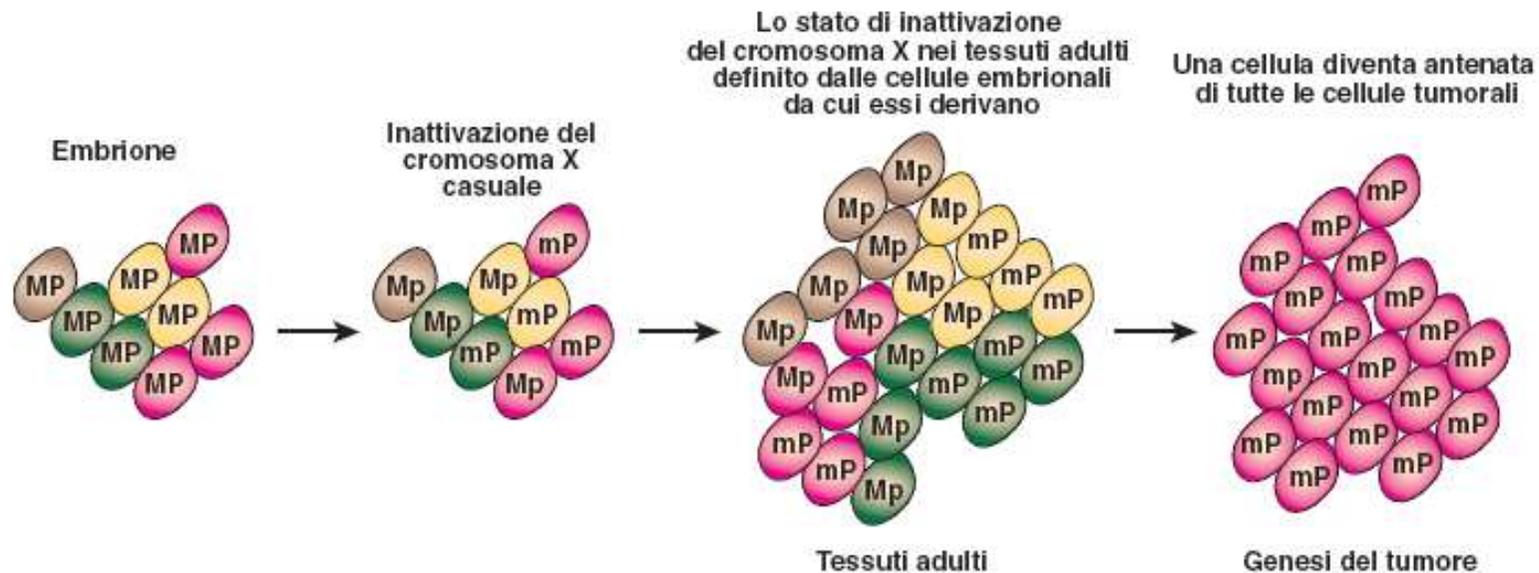
Vietate riproduzione, vendita e copia

La proteina E5 del virus del papilloma attiva il recettore del PDGF



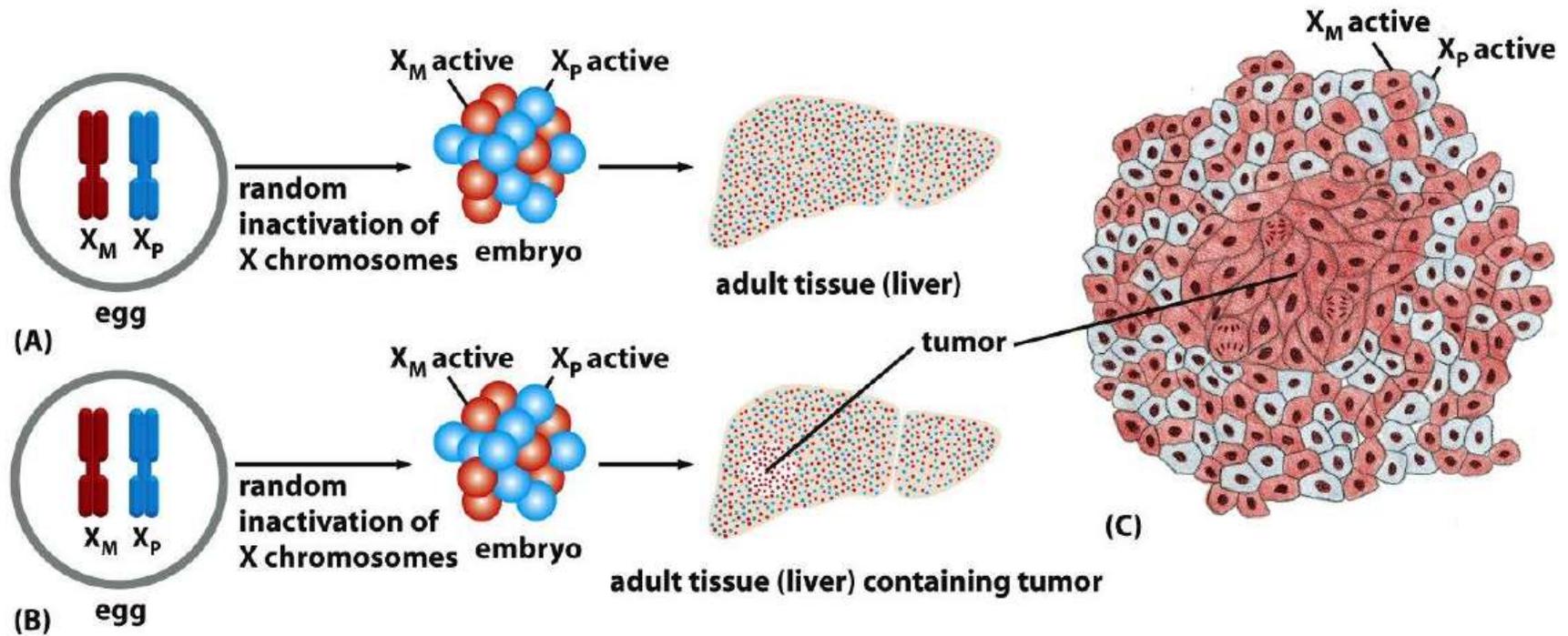
Vietate riproduzione, vendita e
copia

2) Origine clonale dei tumori



◆ FIGURA 19.3

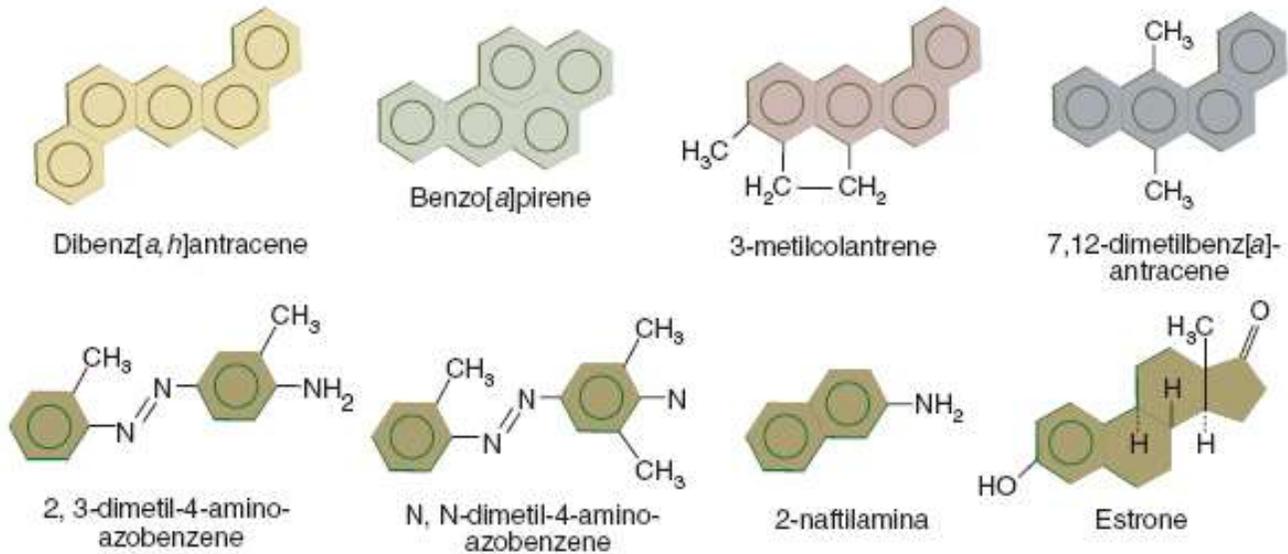
Dimostrazione dell'origine monoclonale dei tumori. Nell'uomo il cromosoma X è uno dei due cromosomi sessuali (l'altro è il cromosoma Y). Nell'embrione femmina i cromosomi X, quello d'origine paterna (P) e materna (M), sono entrambi attivi. Precocemente, nello sviluppo dell'embrione però uno dei due cromosomi (indifferentemente quello di derivazione paterna o materna) viene inattivato permanentemente (indicato con la lettera minuscola). Questo fenomeno, chiamato inattivazione dell'X o Lyonizzazione (dalla scopritrice Mary Lyon) porta al silenziamento genico su tale cromosoma. Conseguentemente nell'adulto tutte le cellule somatiche derivate da una particolare cellula embrionale continueranno a silenziare lo stesso cromosoma X. Nella donna questo comporta la presenza nei tessuti adulti di cellule del tipo M-p o di tipo m-P. Nel caso in cui da un tessuto si svilupperà una massa tumorale questa presenterà una solamente delle due combinazioni (m-P o M-p) e non un mosaico d'entrambe le combinazioni. Infatti, essendo derivata da un'unica cellula, la massa tumorale continuerà ad avere lo stesso assetto d'inattivazione del cromosoma X.



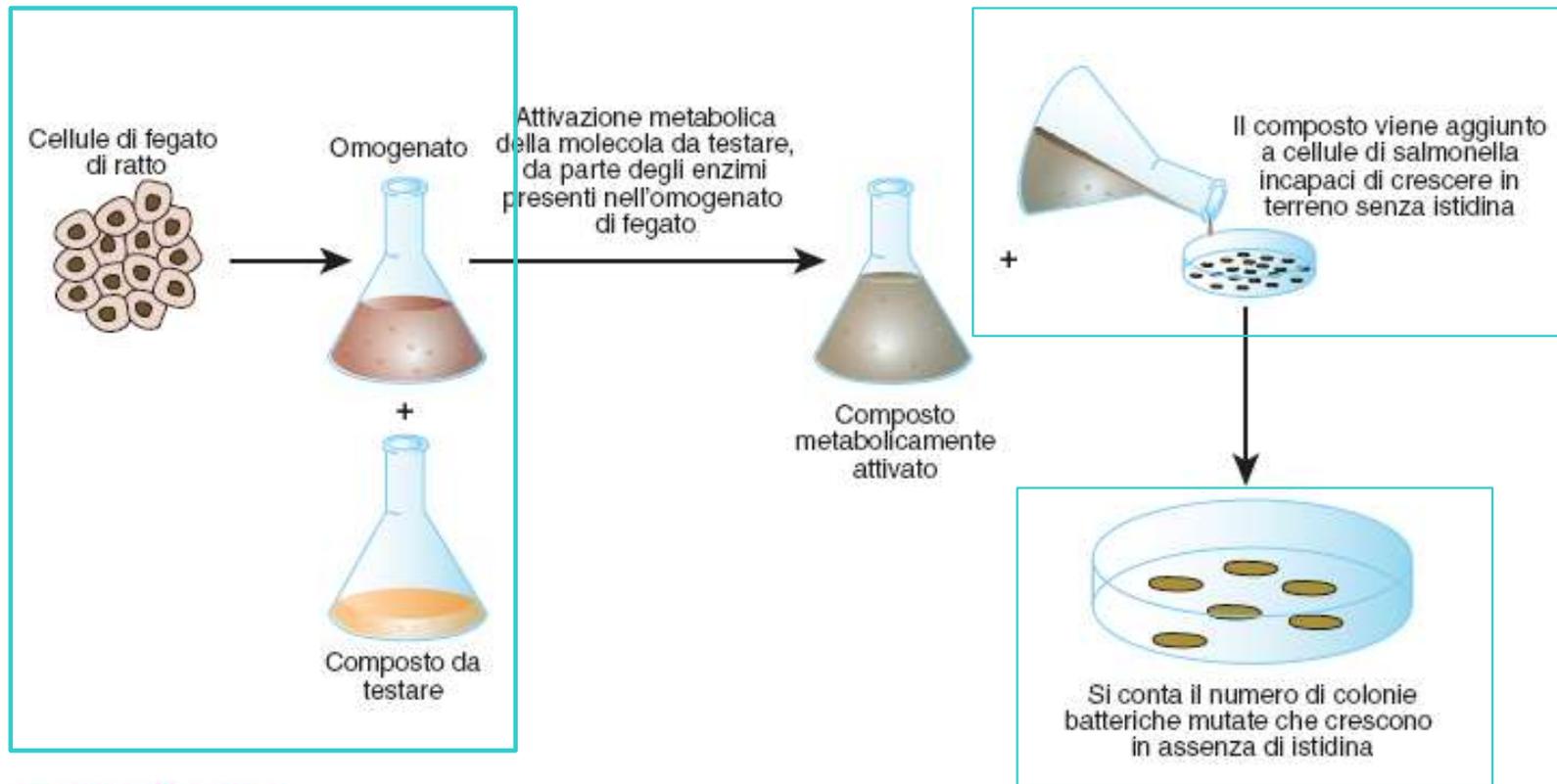
La prova derivata da mosaici di inattivazione del cromosoma X

3) Molti cancerogeni sono mutageni

◆ FIGURA 19.5
Struttura chimica
di alcuni carcino-
geni.



Vietata riproduzione, vendita e
copia



◆ **FIGURA 19.7**

Il test di Ames. Questo test permette di valutare il potenziale mutagenico di una molecola. Il test impiega una ceppo di *Salmonella* incapace di crescere in un terreno privo di istidina. Se il composto da testare possiede proprietà mutageniche, esso può convertire il batterio dallo stato istidina dipendente allo stato istidina indipendente. Il batterio esposto al composto mutageno viene piastrato su un terreno privo di istidina, e quindi solo i cloni di *Salmonella* modificati (dall'azione mutagenica) dal composto riusciranno a crescere. Alcune sostanze non agiscono in modo diretto (vedi Fig. 19.6) e per manifestare le loro proprietà mutageniche hanno bisogno di subire un'attivazione metabolica da parte di enzimi nell'organismo. Per questi composti il test di Ames prevede anche un passaggio iniziale durante il quale la sostanza da testare è preventivamente esposta ad enzimi di origine epatica che l'attivano metabolicamente e la rendono mutagenica.

Processo di cancerogenesi chimica

Processo progressivo a tappe multiple nel quale si riconoscono 3 fasi:

- **Iniziazione**: da parte di agenti cancerogeni o di condizioni genetiche ereditarie, responsabili della comparsa di una o più mutazioni trasformanti
- **Promozione**: agenti che stimolano la proliferazione della cellula trasformata
- **Progressione**: acquisizione di nuove mutazioni e comparsa di diversi fenotipi con caratteristiche di aggressività, invasività, ridotta immunogenicità, capacità di formare metastasi

- ✓ **INIZIAZIONE:** un agente cancerogeno provoca danno genetico irreversibile.
- ✓ **PROMOZIONE:** agenti che promuovono un aumento della proliferazione cellulare
- ✓ **PROGRESSIONE:** acquisizione di nuove mutazioni. Comparsa di fenotipi caratteristici: aggressività, invasività, capacità di formare metastasi



Vietate riproduzione, vendita e
copia

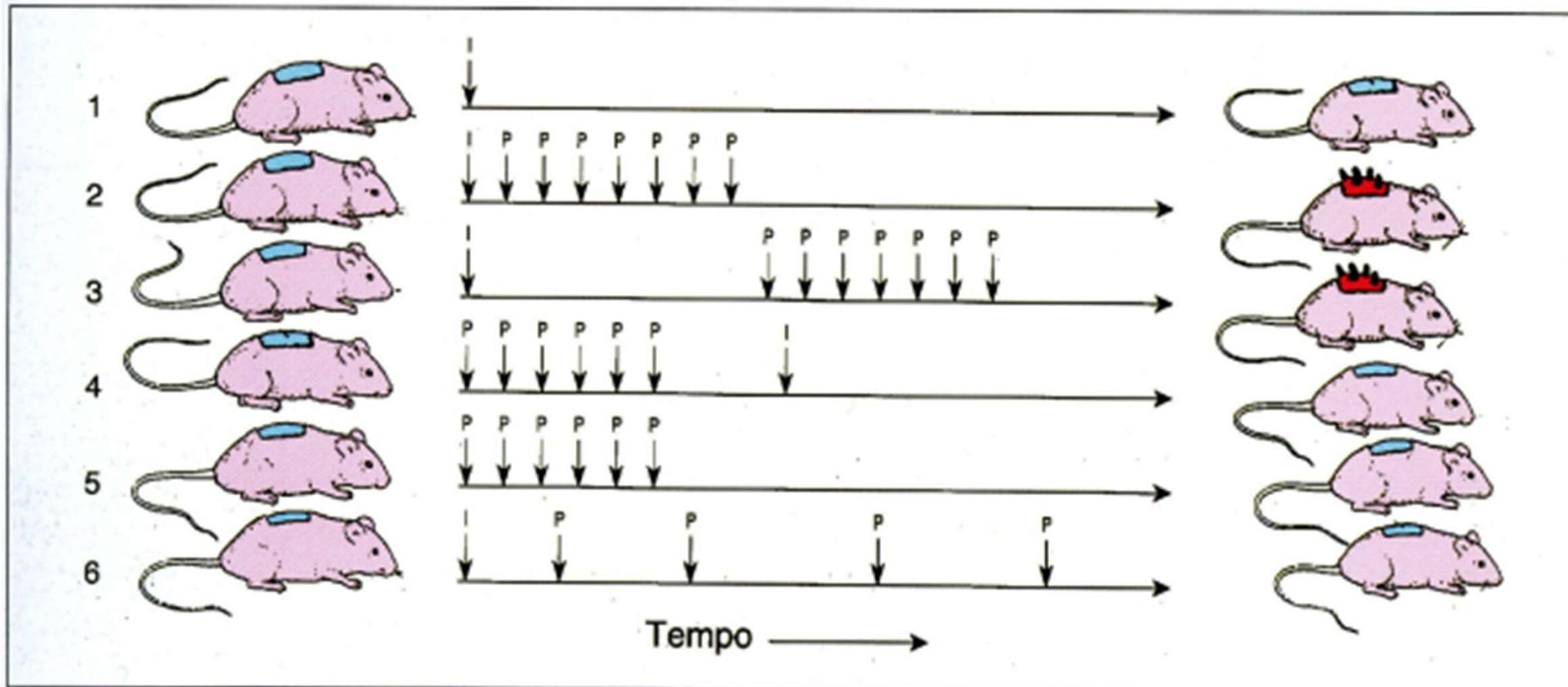


Figura 8.1. Schema del protocollo sperimentale di Beremblum e Boutwell che dimostra l'esistenza nella cancerogenesi cutanea del topo di uno stadio di iniziazione e di uno stadio di promozione. Le frecce verticali indicano le varie applicazioni dell'agente iniziante o trasformante (I) e di quello promotore (P). Nell'esperimento indicato in figura col numero 3, l'intervallo di tempo intercorso tra l'applicazione dell'agente iniziante e le successive stimolazioni con quello promotore è stato superiore a un anno. Nell'esperimento indicato col numero 6, l'intervallo di tempo tra le singole applicazioni dell'agente promotore è stato di 4 settimane o più, mentre in tutti gli altri esperimenti l'agente promotore è stato applicato due volte alla settimana. I risultati degli esperimenti indicati con i numeri 1 e 2 sono illustrati nella Figura 8.2. Il risultato dell'esperimento indicato col numero 3 conferma l'ipotesi che i tumori traggano origine da elementi staminali (vedi Scheda 6.1). Tutte le cellule della cute del topo, ad eccezione di quelle staminali, vengono infatti rinnovate entro 1-2 settimane, molto prima cioè dell'applicazione dello stimolo promotore.

Vietata riproduzione, vendita e
 copia

Alcuni composti chimici sono detti 'agenti cancerogeni completi' perché sono in grado di svolgere sia la funzione di iniziazione che quella di promozione

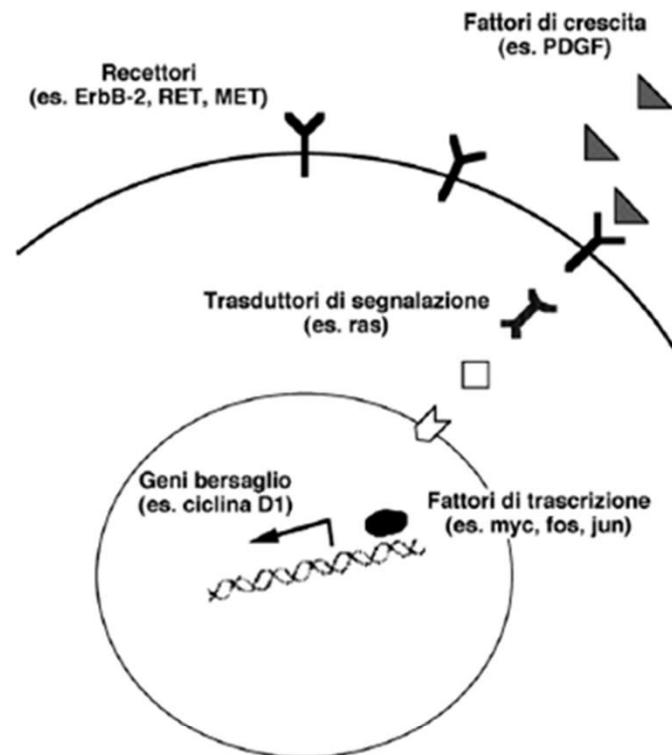
4) Mutazioni geniche e aberrazioni cromosomiche sono tipiche di particolari forme di tumore

Attivazione di oncogeni

Inattivazione di oncosoppressori

Oncogeni

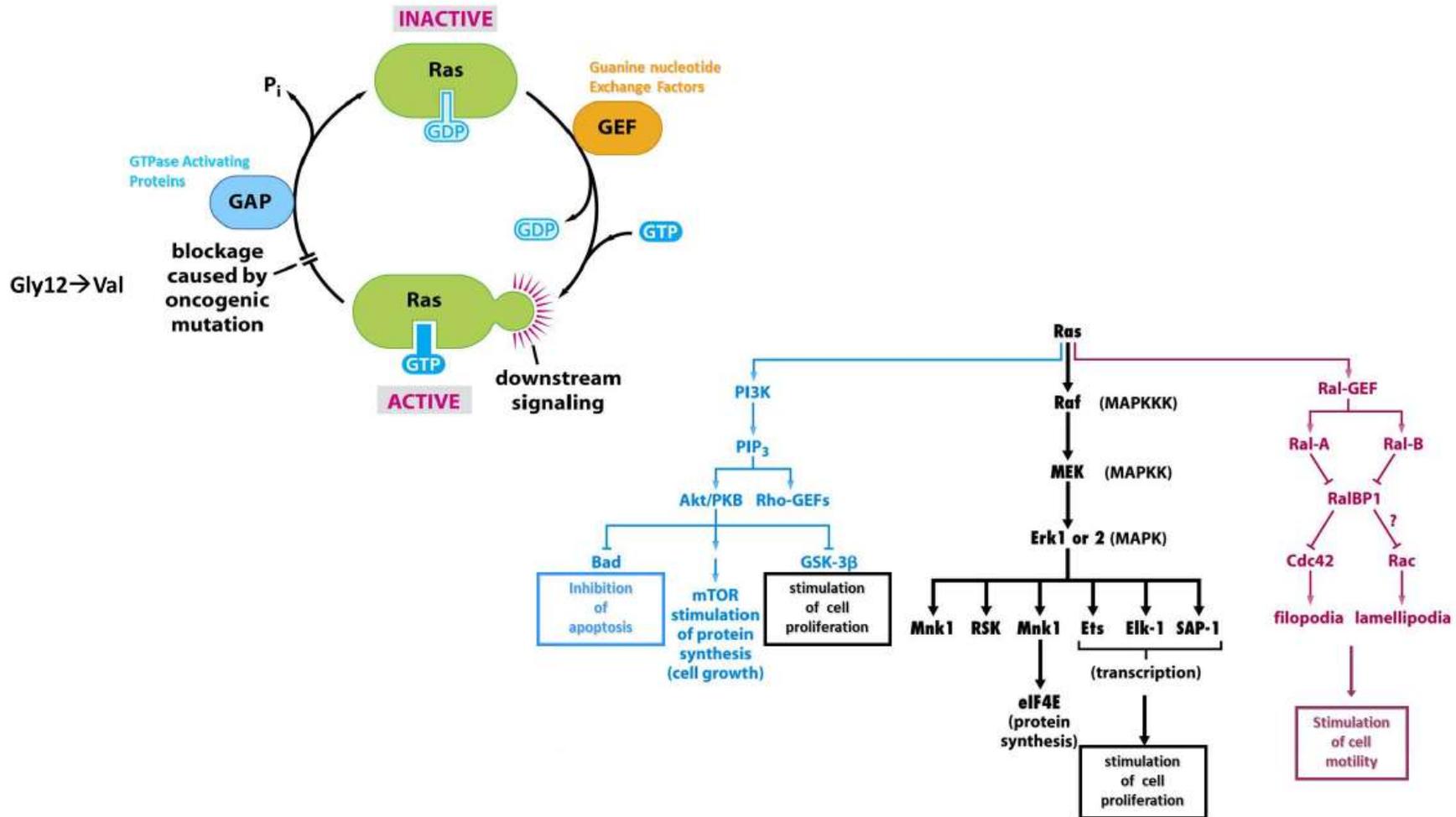
- Fattori di crescita (*c-sis*/PDGF)
- Recettori per fattori di crescita (ErbB2, HER/neu)
- Trasduttori del segnale (Ras, Src, Abl)
- Fattori trascrizionali (β -catenina, myc)
- Effettori coinvolti nella proliferazione (ciclina D1)



Attivati da diversi meccanismi (mutazioni gain-of-function)

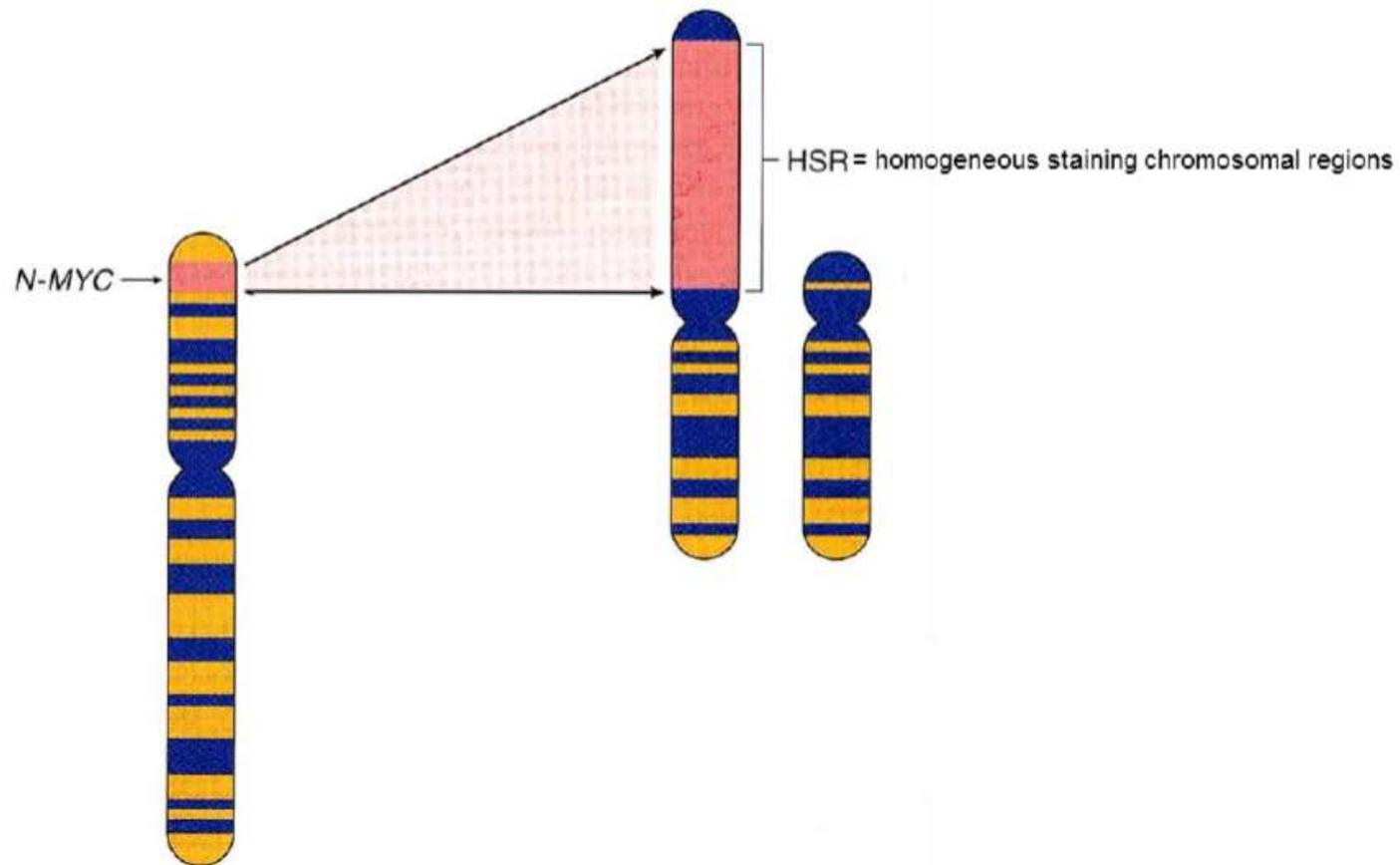
- ❖ Mutazioni puntiformi
 - ❖ Delezioni/Inserzioni
 - ❖ Amplificazione genica
 - ❖ Riarrangiamenti cromosomici (traslocazioni)
- vietata riproduzione, vendita e
copia

Una mutazione puntiforme –un oncogene: l'es. di Ras



Vietate riproduzione, vendita e
copia

Amplificazione genica: es. di N-Myc nel neuroblastoma



Vietate riproduzione, vendita e
copia

Traslocazioni cromosomiche possono iperattivare geni endogeni o creare nuovi geni chimerici

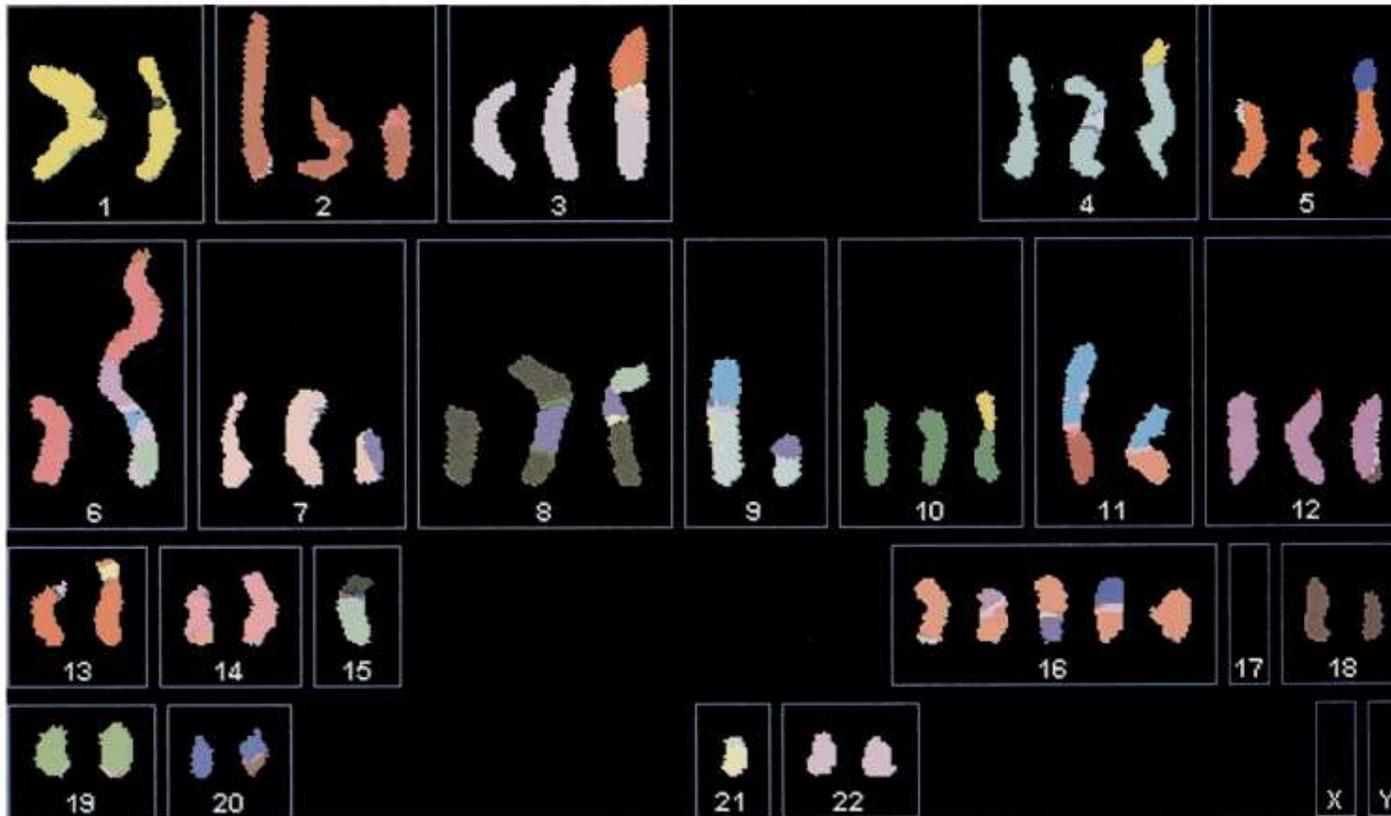
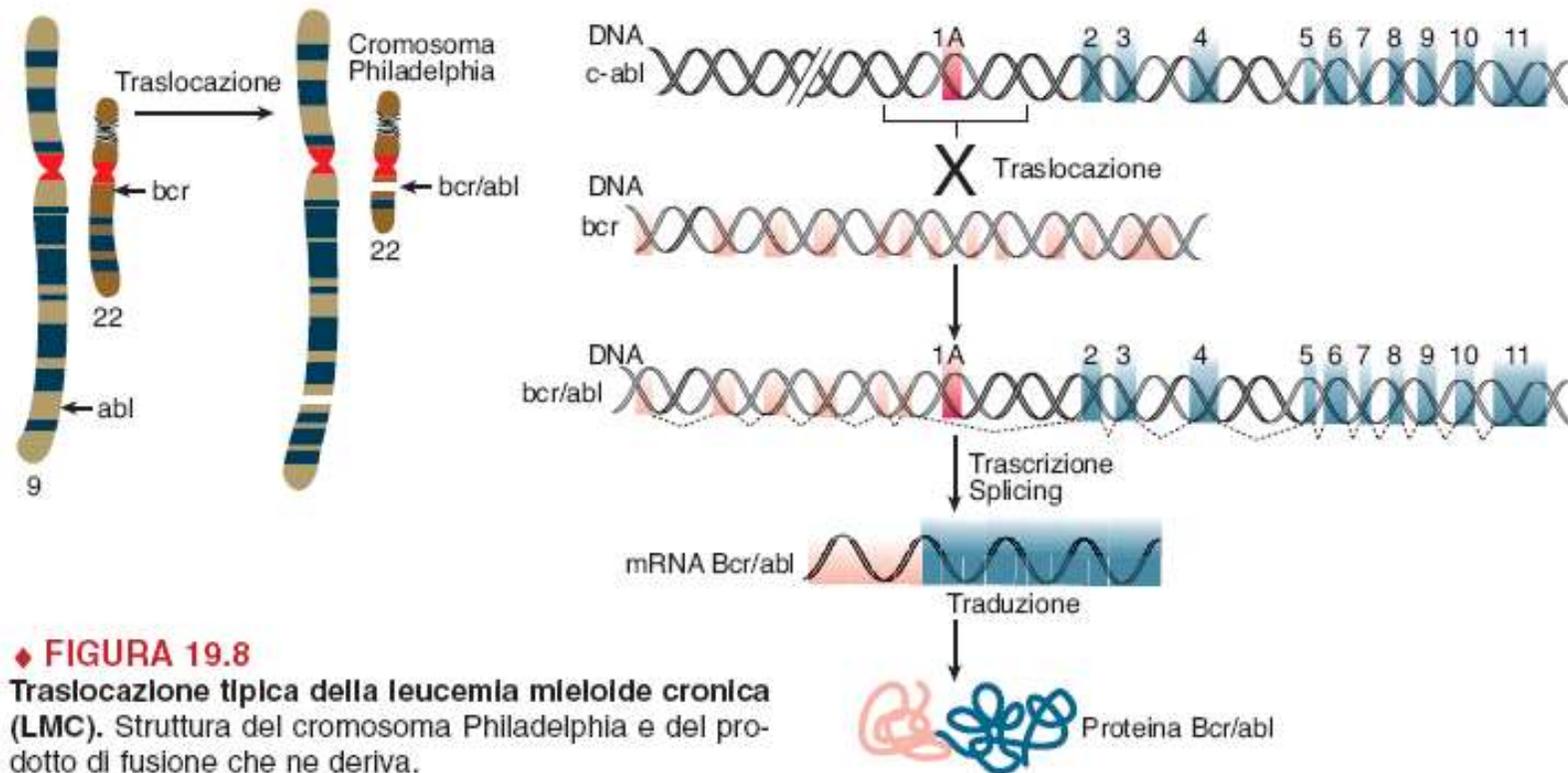


Figura 16.4 Cariotipo di una cellula di un tumore della mammella che mostra un assetto cromosomico decisamente anomalo. Una cellula diploide normale avrebbe 22 paia di autosomi e due di cromosomi sessuali. I due membri dello stesso paio dovrebbero essere identici, e ciascun cromosoma dovrebbe essere di un unico colore uniforme (come nel cariotipo di una cellula normale che si

Le cellule tumorali di solito presentano cariotipi anormali molti di questi cambiamenti sono casuali e riflettono semplicemente instabilità genomica

Vietata riproduzione, vendita e
copia

Traslocazioni cromosomiche e nuovi geni: es. Leucemia mieloide cronica

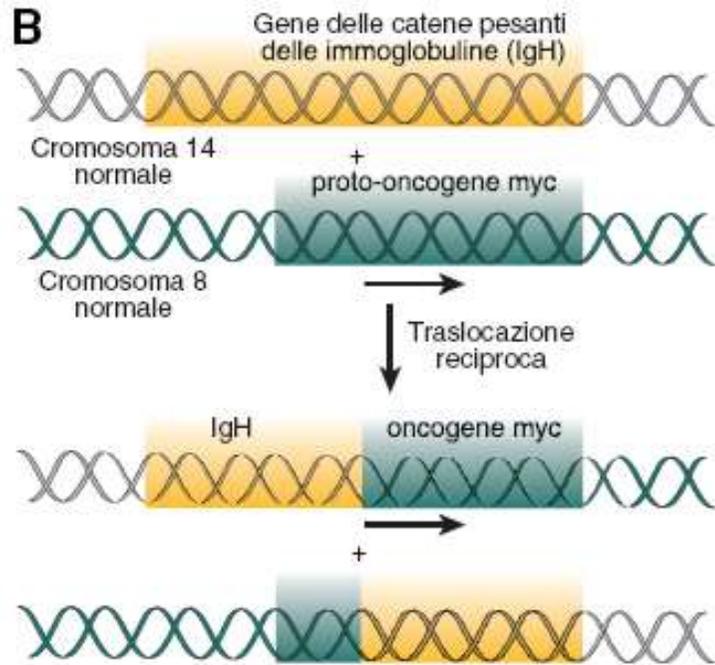
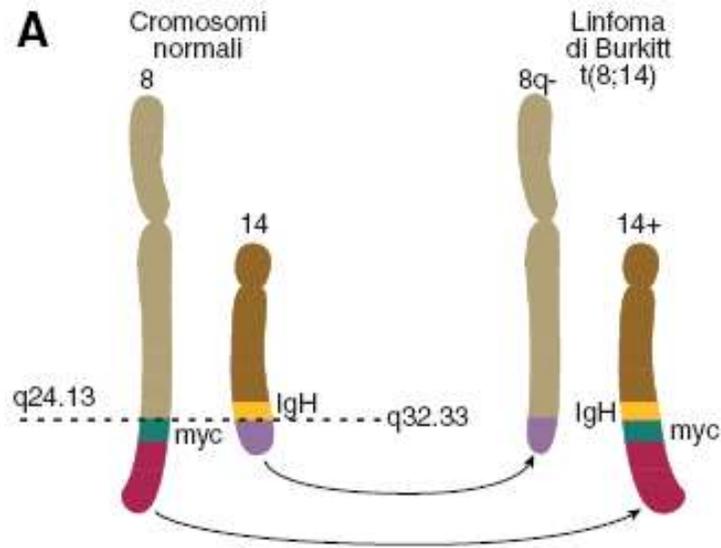


◆ **FIGURA 19.8**
Traslocazione tipica della leucemia mieloide cronica (LMC). Struttura del cromosoma Philadelphia e del prodotto di fusione che ne deriva.

ABL è una tirosina chinasi non recettoriale presente nel citoplasma e nel nucleo in grado di fosforilare una grande varietà di substrati a loro volta coinvolti in molti processi cellulari, dal ciclo al differenziamento, all'apoptosi, alla riorganizzazione del citoscheletro, all'autofagia.

BCR è una serina/treonina chinasi i cui bersagli meglio caratterizzati sono Rac1 (riorganizzazione del citoscheletro e mitosi) e cdc42 (ciclo cellulare). Rac1 è un regolatore pleiotropico di molti processi cellulari, dal ciclo, all'adesione cellula-cellula, alla motilità, al differenziamento epiteliale.

Traslocazioni cromosomiche e overespressione: es. Linfoma di Burkitt



◆ FIGURA 19.13

Traslocazione cromosomica tipica del linfoma di Burkitt. Nel corso della traslocazione il gene *myc* si pone sotto il controllo trascrizionale dei geni delle immunoglobuline.

Vietato riproduzione, vendita e copia

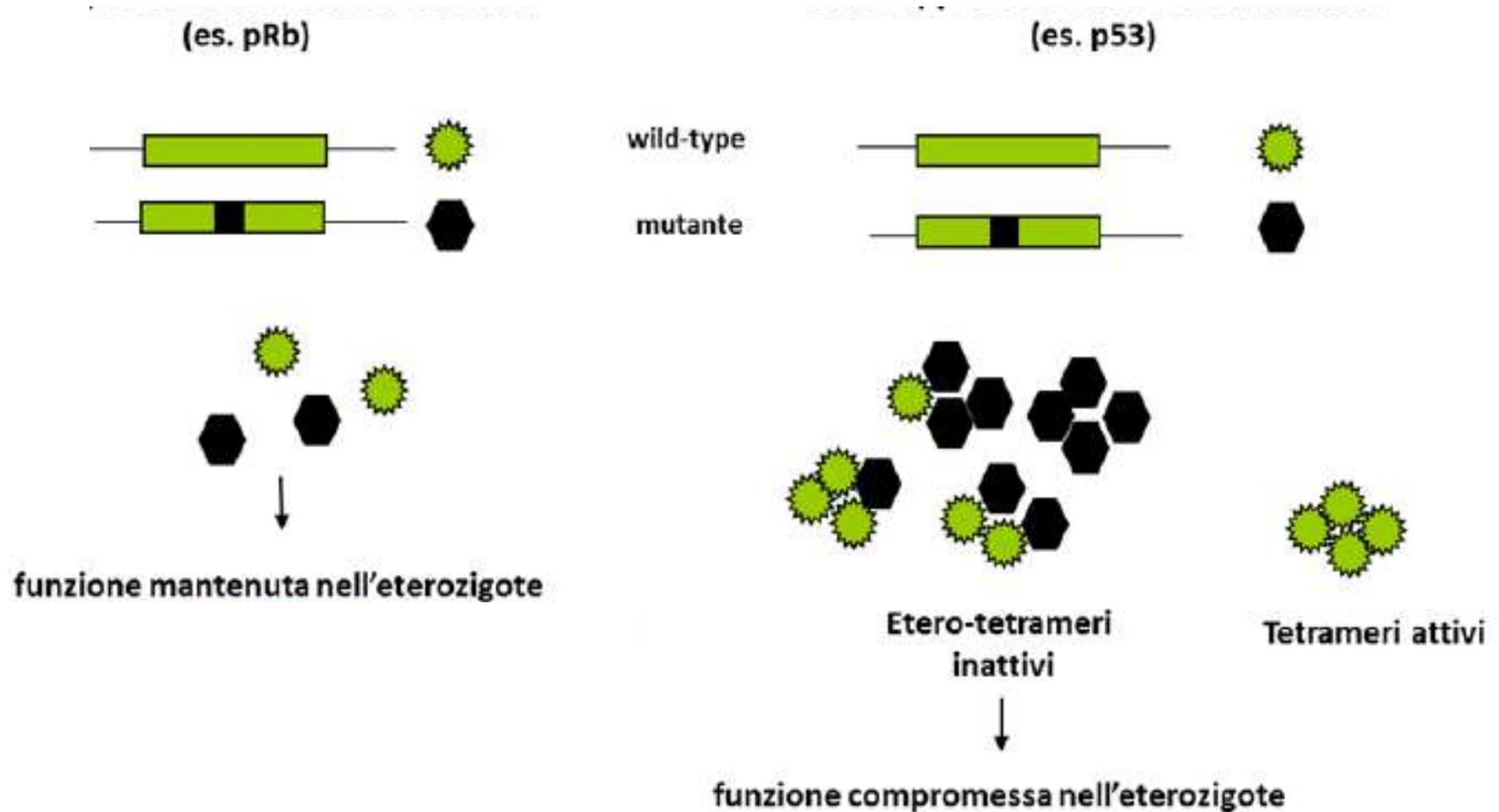
Oncosoppressori

- Regolatori del ciclo cellulare (**INK4a, pRb, p53**) INK4 è una famiglia di inibitori delle cdk
- Proteine dei “checkpoint” (**p53, ATM, CHK1 e 2**) Chk1 fosforila cdc25 inibendola o mandandola in proteolisi
ATM fosforila molti oncosoppressori causando arresto del ciclo cellulare
- Enzimi di riparazione del DNA (**BRCA1 e 2**)

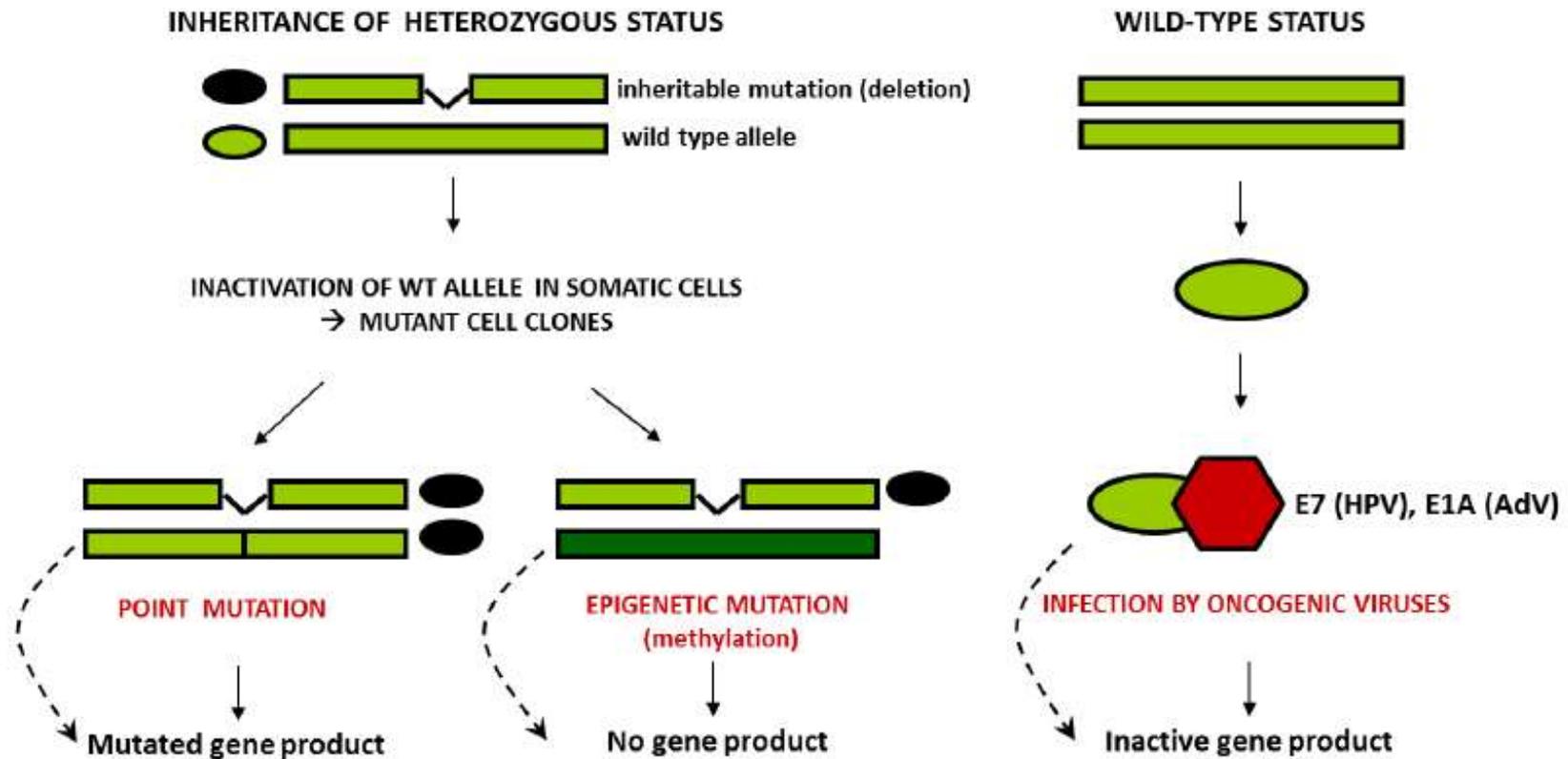
Attivati da diversi meccanismi (mutazioni loss-of-function)

- | | | |
|--|--|---------------------|
| <input type="checkbox"/> Mutazioni puntiformi | - missenso
- nonsense
- con frameshift
- con effetto sullo splicing | INK4a, BRCA1 |
| <input type="checkbox"/> Delezioni/Inserzioni | | Rb/FHIT |
| <input type="checkbox"/> Traslocazioni cromosomiche | | FHIT |
| <input type="checkbox"/> Perdita di eterozigosi | | P53, Rb, BRCA1, etc |
| <input type="checkbox"/> Silenziamento per metilazione del DNA | | INK4a, BRCA1 |

Mutazioni recessive o dominanti negative



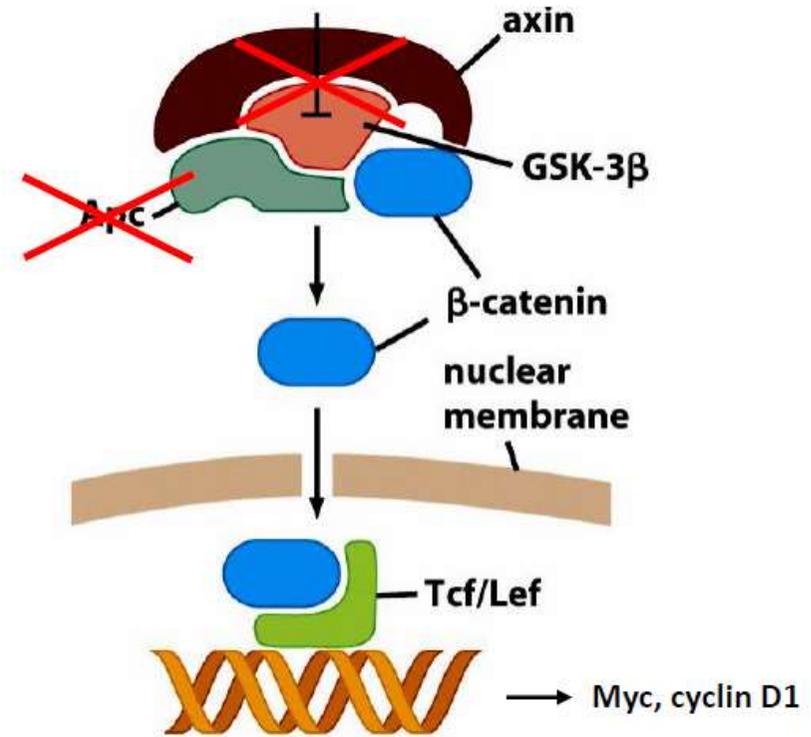
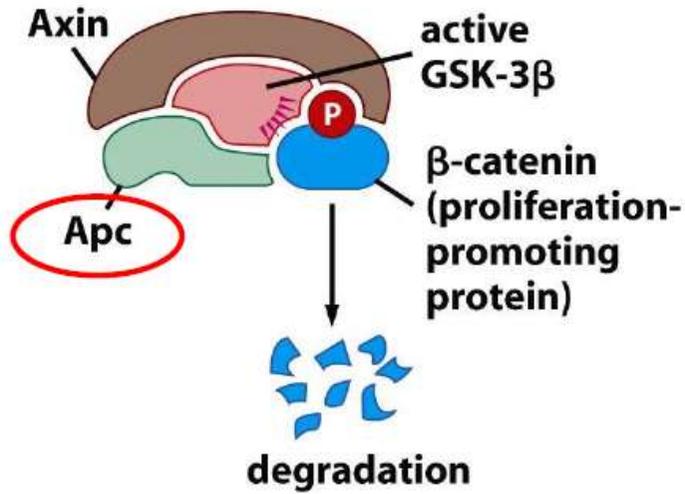
LOSS OF FUNCTION OF pRb TUMOR SUPPRESSOR GENE



CONTINUOUS CELL-CYCLE RE-ENTRY

Vietate riproduzione, vendita e
copia

APC



Normal colon



Colon from FAP patient

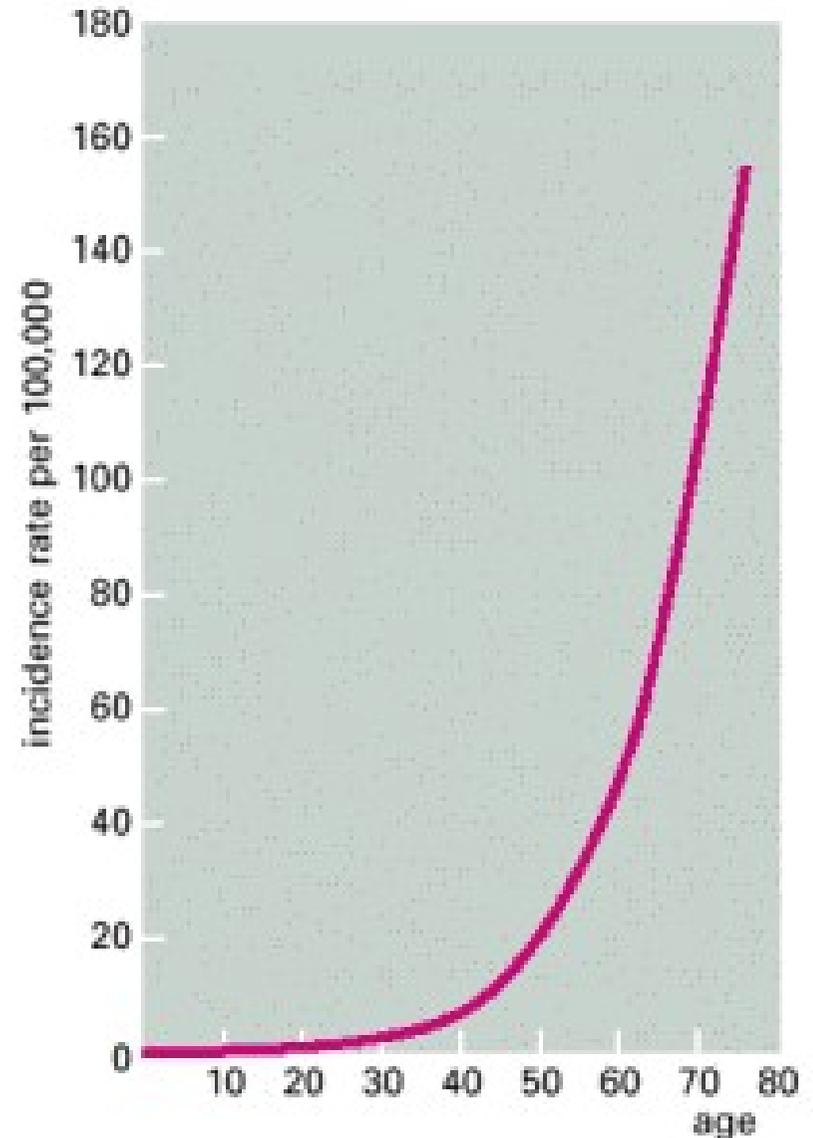
Mutazioni in APC sono correlate con l'insorgenza della Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP) → proteina tronca non più in grado di fosforilare la β-catenina

5) L'incidenza aumenta con l'età

Il tumore è un processo multistep

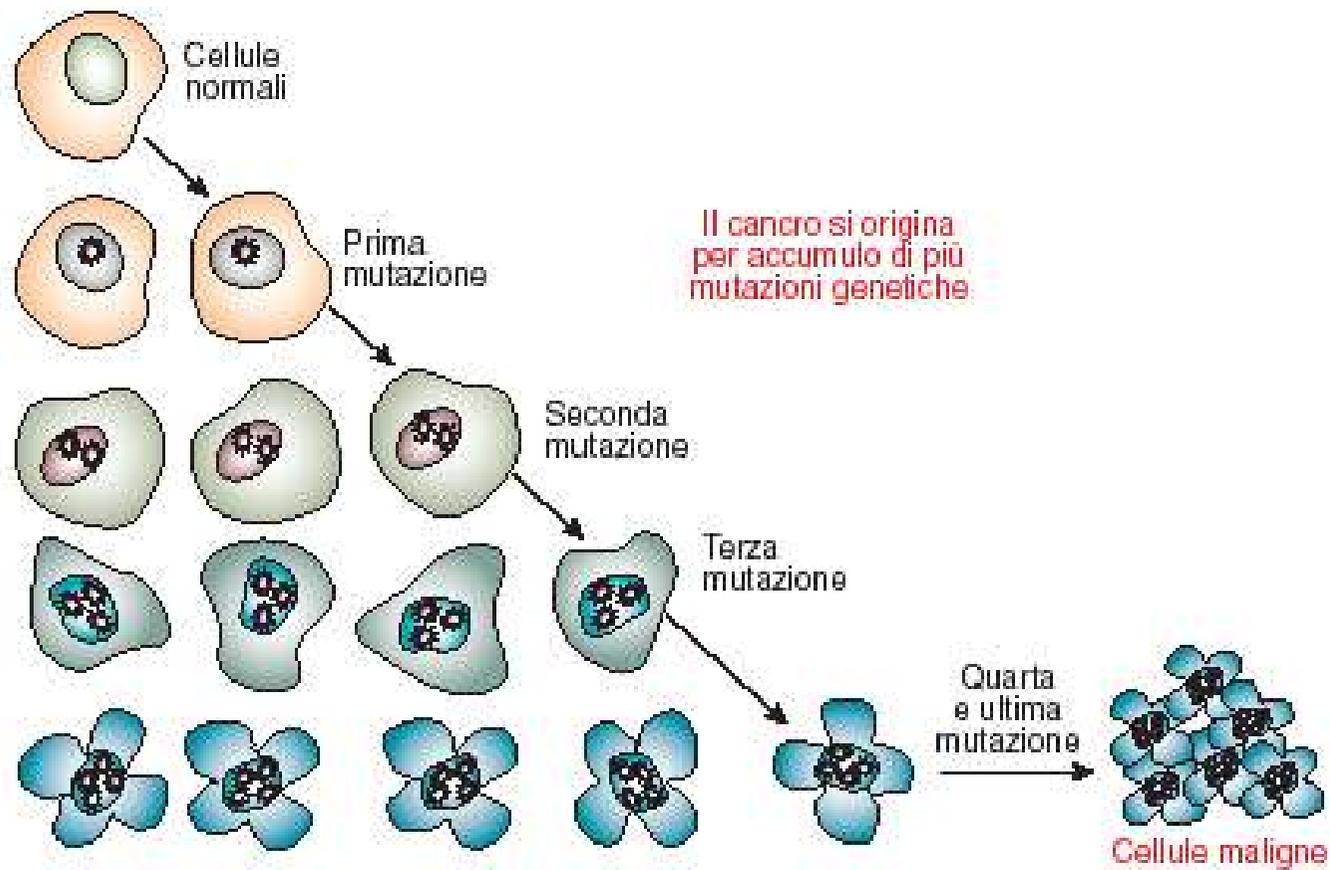
Se fosse richiesta una singola mutazione per provocare il tumore e se questa mutazione avesse la stessa probabilità di verificarsi ad ogni età, l'incidenza del tumore sarebbe indipendente dall'**età**.

- L'aumento della sua incidenza con l'età dimostra che il cancro **è causato dal lento accumulo di numerose mutazioni randomiche lungo una singola linea cellulare.**



Una singola mutazione non è sufficiente a causare il cancro

- Si stima che nella vita di un uomo si verifichino circa 10^{16} divisioni cellulari.
- Anche in ambienti privi di mutageni le mutazioni si verificano spontaneamente con un tasso di circa 10^{-6} mutazioni per gene per divisione cellulare—un valore determinato da limiti intrinseci nell'accuratezza dei sistemi di replicazione e riparo del DNA.
- Così, nella vita di un essere umano, ogni singolo gene ha 10^{10} distinte "occasioni" di mutare.
- Chiaramente se una singola mutazione fosse sufficiente a convertire una cellula sana in una tumorale non saremmo organismi vitali. Molte evidenze indicano che il cancro richiede che molti eventi indipendenti e rari si verifichino lungo il lineage di una cellula.



Vietata riproduzione, vendita e
copia

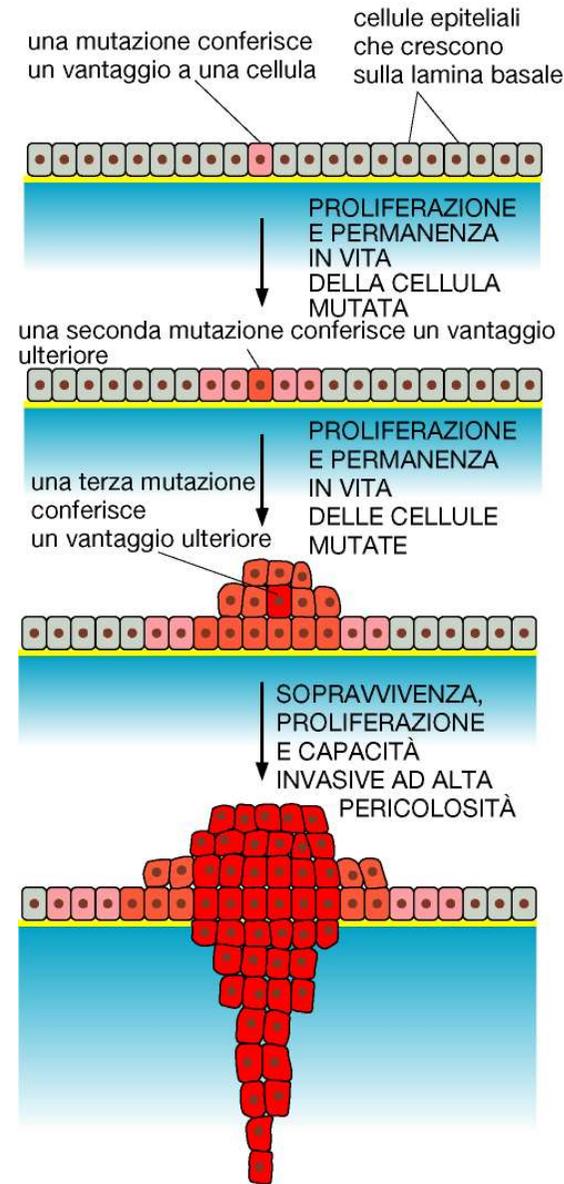
SE LA TEORIA DELLA ORIGINE MONOCLONALE DEL CANCRO AMMETTE CHE IL CANCRO PARTA DA UNA SINGOLA CELLULA MUTATA, L'ACCUMULARSI DI **MUTAZIONI VANTAGGIOSE** PER LA PROLIFERAZIONE E PROCESSI DI **COMPETIZIONE CELLULARE** FANNO SI CHE UN TUMORE E' IN GENERE COMPOSTO DA DIVERSE POPOLAZIONI CELLULARI CON DIVERSE MUTAZIONI E DIVERSO GRADO DI MALIGNITA'

Evoluzione clonale
un tumore si sviluppa tramite
cicli ripetuti di mutazione e
proliferazione

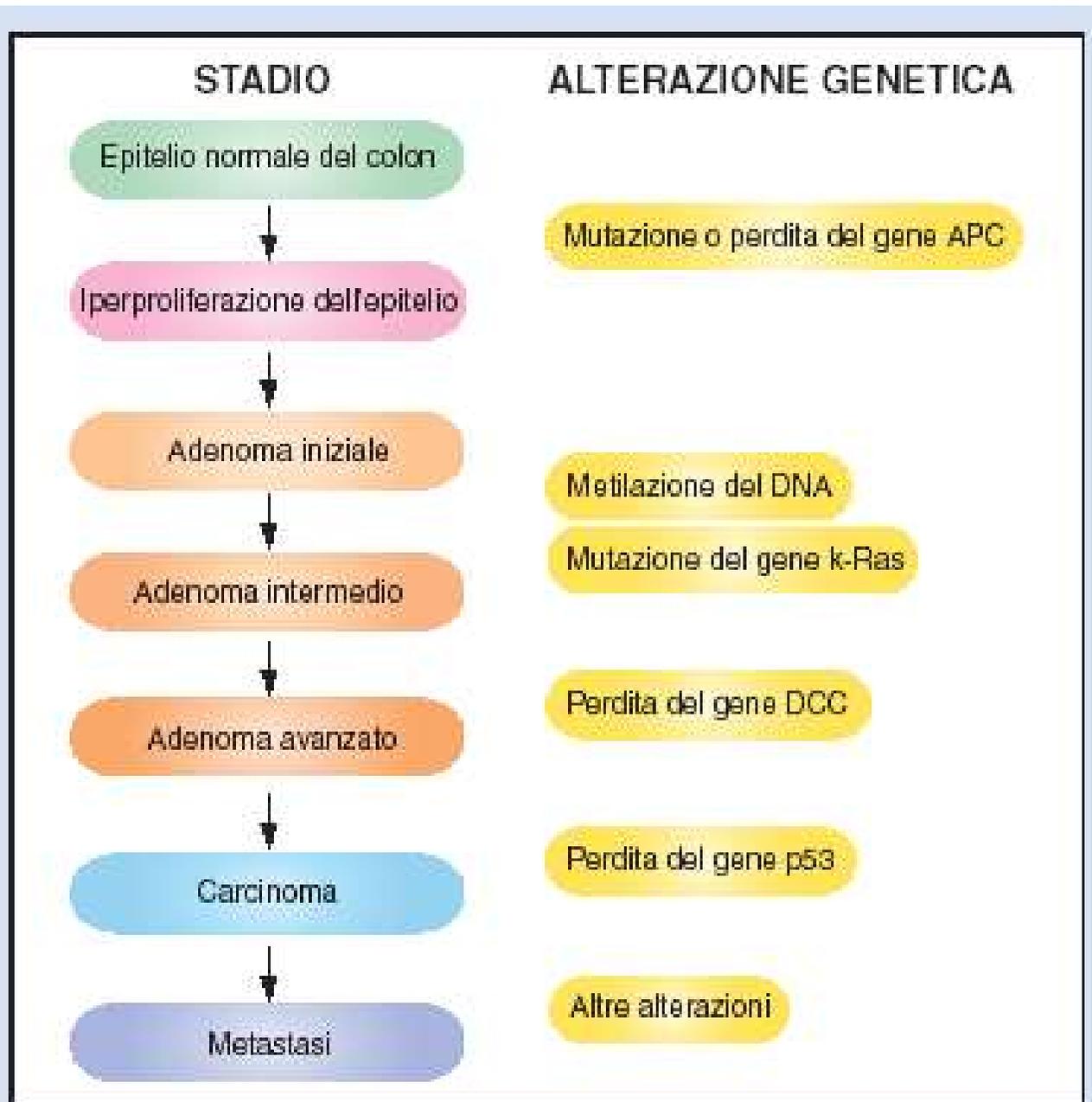


Esempio: tumore del colon-retto

Un tumore diventa maligno quando diventa in grado di superare la **membrana basale** e ha quindi accesso a vasi sanguigni e linfatici, che gli permettono l'accesso a nutrienti e la diffusione in sedi lontane



Vietata riproduzione, vendita e
copia



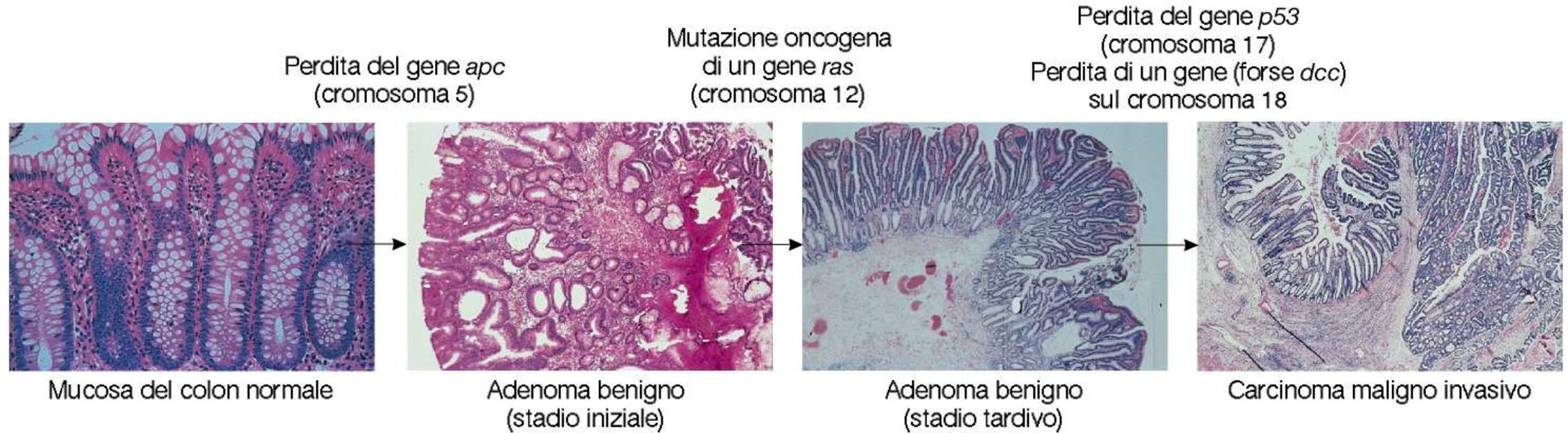
← Questa mutazione insorge ex-novo in casi di tumore sporadico, mentre si eredita in caso di tumore familiare (Poliposi Adenomatosa Familiare)

◆ FIGURA 37.3

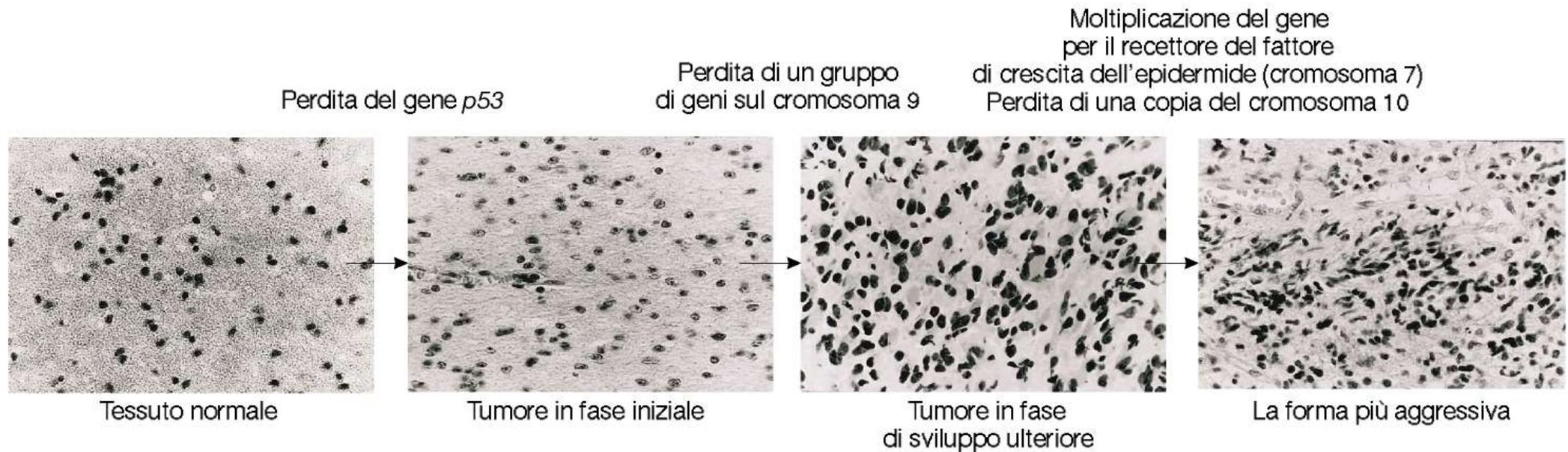
Accumulo di mutazioni responsabili del tumore del colon-retto: APC, DCC e p53 sono oncosoppressori; k-Ras è un oncogene.

Vietate riproduzione, vendita e
 copia

(a) **Cancro del colon**



(b) **Astrocitoma**



Vietate riproduzione, vendita e
copia

- **Modelli animali** confermano che una singola alterazione genetica è insufficiente a causare il cancro.

Quando si ingegnerizza un topo con una singola mutazione si producono di solito leggere alterazioni della crescita tissutale seguite dalla formazione di occasionali e randomici tumori benigni mentre la maggior parte delle cellule rimane normale.

Synergy between truncated c-Met (cyto-Met) and c-Myc in liver oncogenesis: importance of TGF- β signalling in the control of liver homeostasis and transformation†

Laura Amicone¹, Olivier Terradillos², Ludovica Calvo⁴, Barbara Costabile¹, Carla Cicchini¹, Carlo Della Rocca³, Francesco Lozupone¹, Mauro Piacentini^{4,5}, Marie Annick Buendia² and Marco Tripodi^{*1,4}

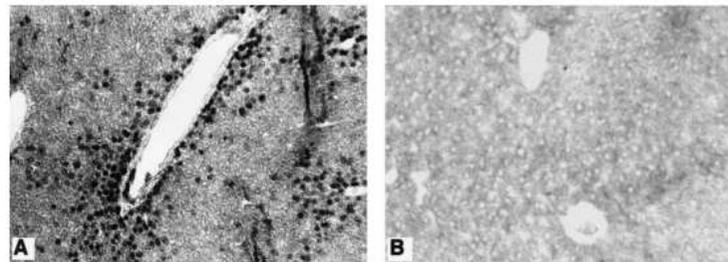


Figure 1 Cyto-Met transgene expression in the liver detected by *in situ* hybridization with an anti-sense riboprobe. (a): 6-month-old transgenic liver showing that transgene expression is localized mainly in the periportal areas; (b): age-matched wild-type liver as a negative control. Original magnification, 25 \times

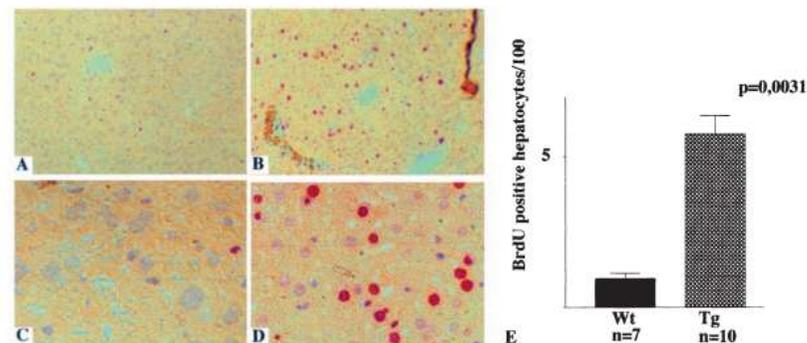


Figure 2 Constitutive hepatocyte proliferation in cyto-Met animals. Representative examples of BrdU labelling in livers of 4-month-old animals. (a, b): low magnification (25 \times) of transgenic and wild-type livers, respectively. BrdU-positive cells are scattered over the lobules with no obvious zonation; sections were counterstained with haematoxylin. Original magnifications: a and b, 25 \times ; c and d, 40 \times . (e): percentage BrdU-positive hepatocytes in transgenic (Tg) and age-matched wild-type (Wt) animals. Error bars represent s.d. of the mean. *P* indicates the significant difference between transgenic and wild-type animals (Student *t*-test). *n* indicates the number of animals analysed for each genotype. At least 3000 nuclei were scored for each animal

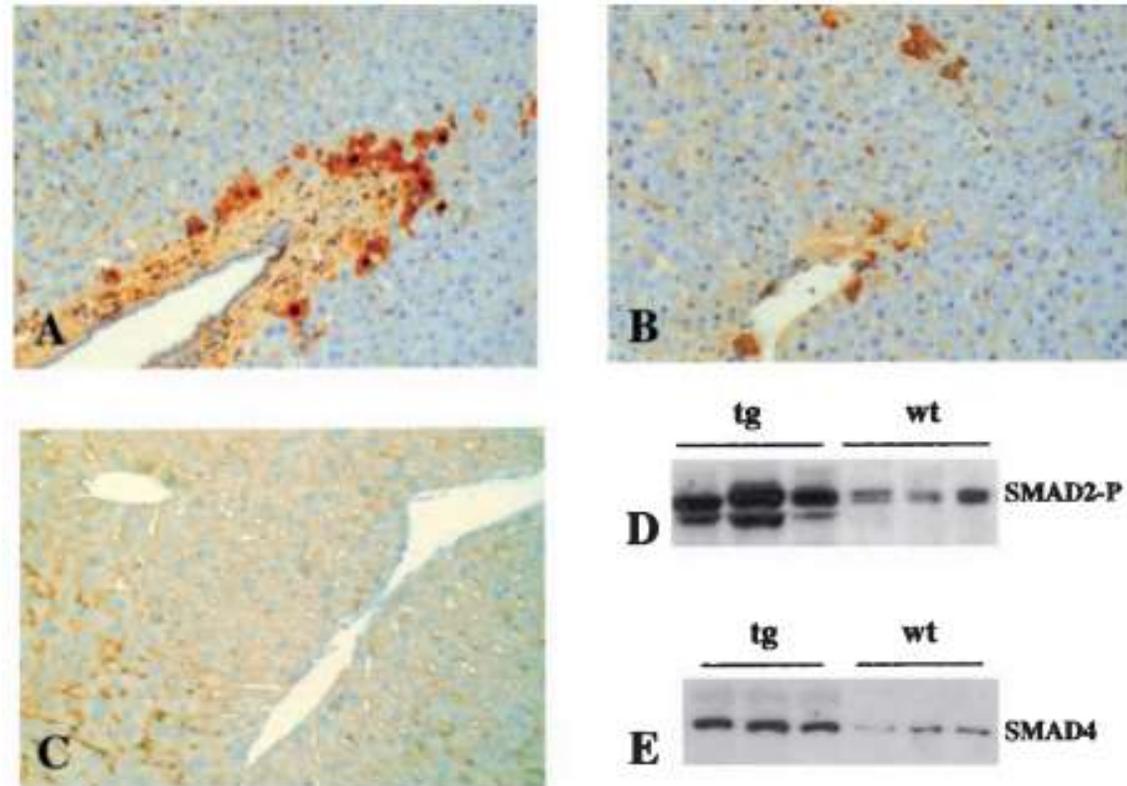


Figure 4 TGF- β 1-mediated liver mass control. (a,b,c): representative TGF- β 1 immunostaining in transgenic and control livers. The cytokine expression is localized both in the periportal areas (a) and in randomly distributed hepatocytes (b) of transgenic liver. No staining is detectable in wild-type livers (c). Sections were counterstained with haematoxylin. Original magnification, 25 \times . (d): differential phosphorylation level of Smad2 protein in total extracts of cyto-Met (tg) and wild-type (wt) livers. (e): differential accumulation of Smad4 protein in nuclear extracts of cyto-Met (tg) and control (wt) livers

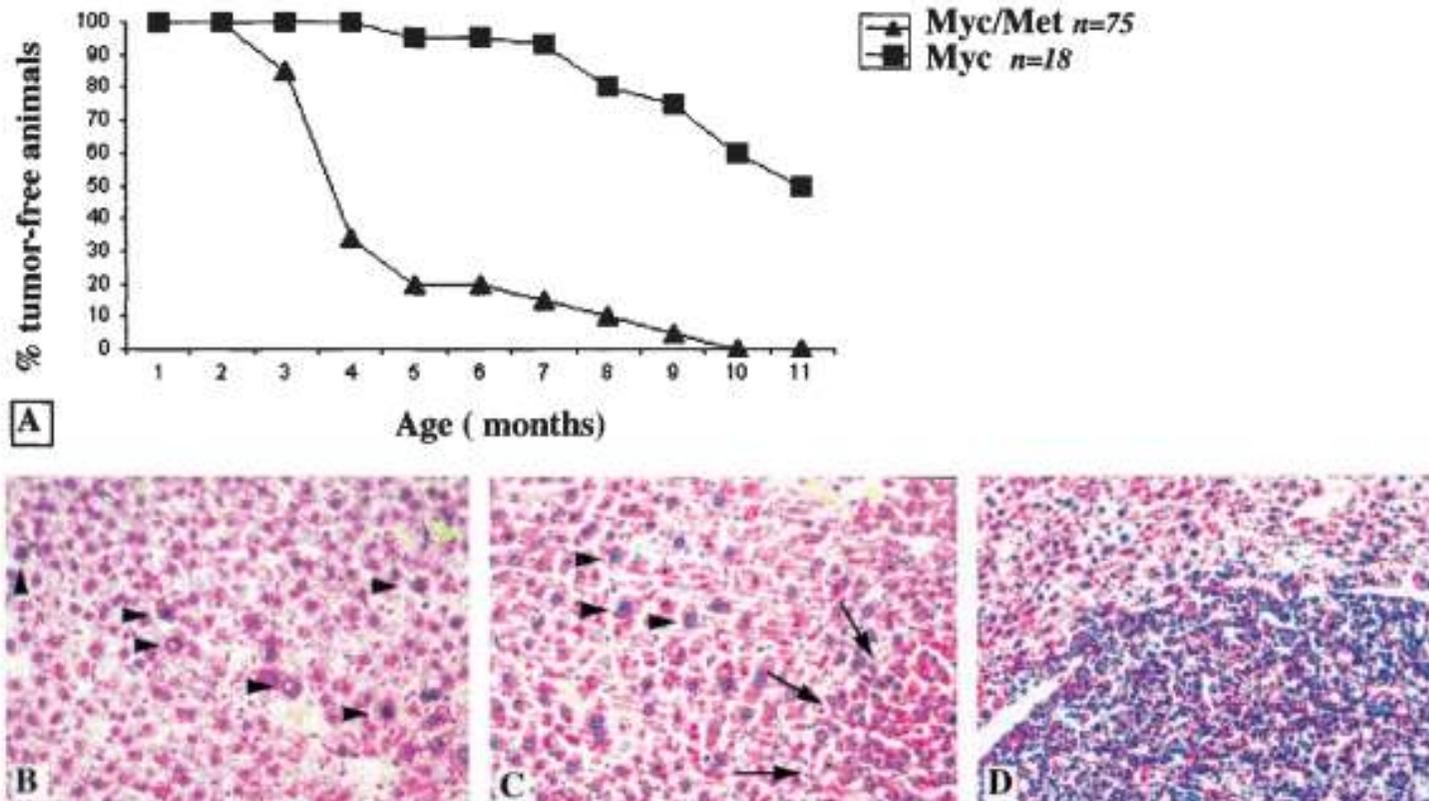
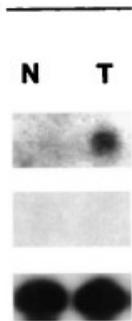
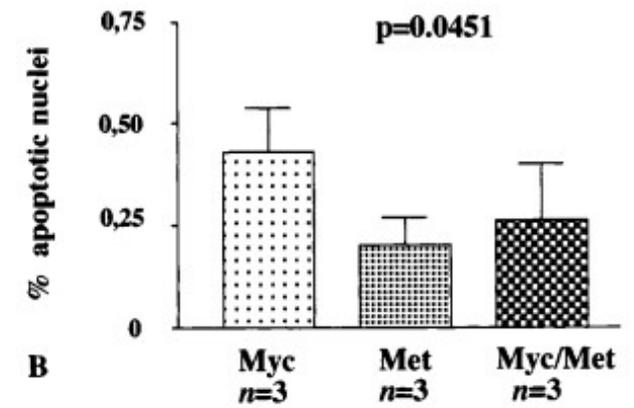
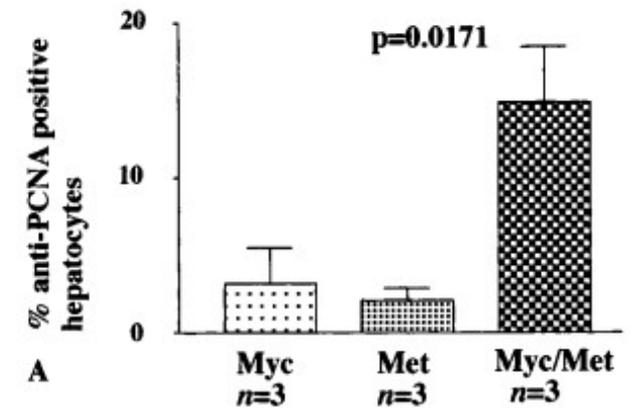
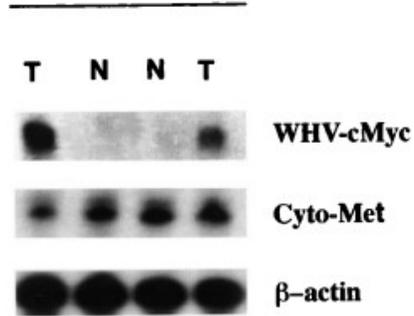


Figure 5 Cyto-Met cooperates with c-Myc in hepatocarcinogenesis. (a): kinetics of tumour occurrence in WHV/*c-myc* (Myc) and in WHV/*c-myc* x cyto-Met (Myc/Met) transgenic mice, showing a dramatic acceleration of tumour onset in bi-transgenic animals. *n* indicates the number of animals of each genotype. (b–d): histology of tumours in Myc/Met transgenic mice. (b): liver of 2.5-month-old mouse with cellular and nuclear dysplasia, nuclear polymorphism and polymetrism (arrowheads); (c): liver of 3.5-month-old mouse with a proliferating neoplastic focus at the right of the panel (arrows); (d): liver of 5-month-old mouse with a poorly differentiated hepatocarcinoma. Original magnification: b,c, 25 \times ; d, 10 \times . Sections stained with haematoxylin/eosin

Transgenics
WHV-cMyc



Bi-transgenics
WHV-cMyc/Cyto-Met



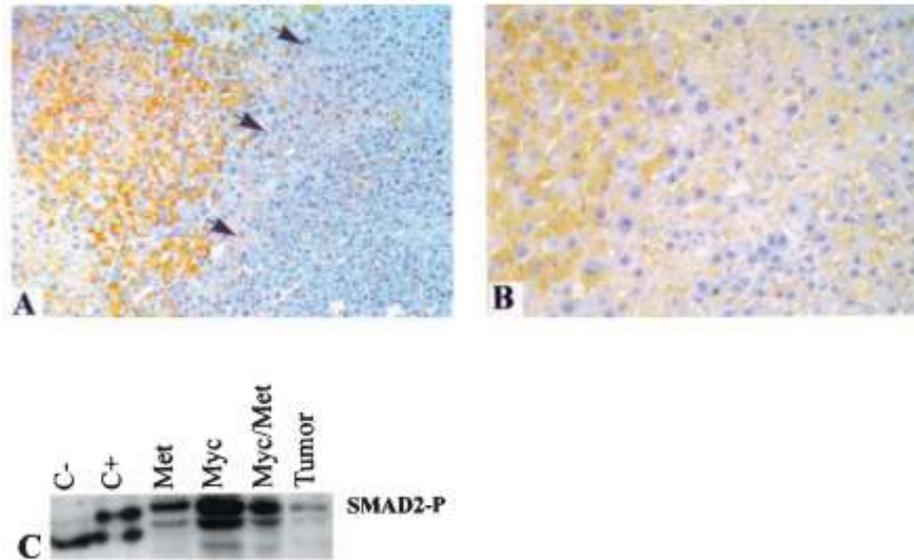


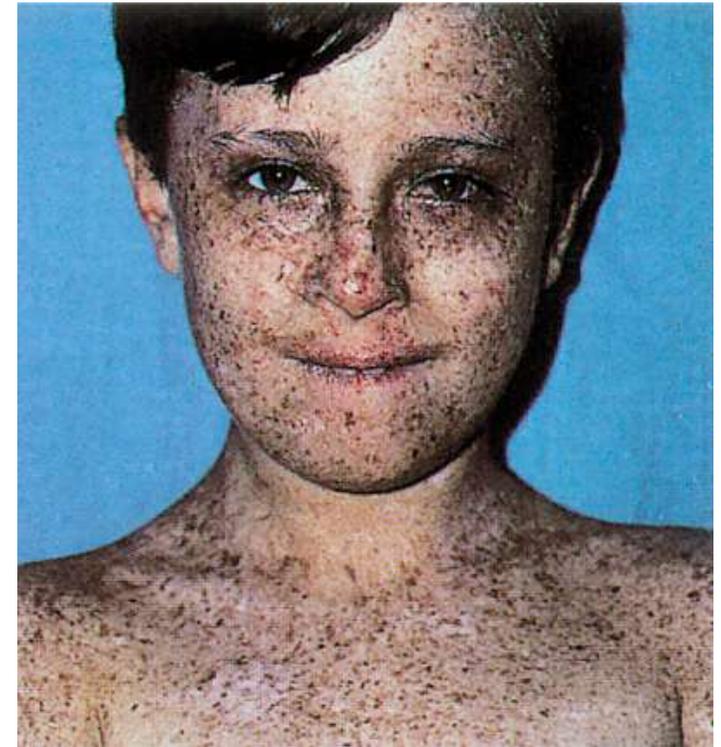
Figure 8 Impairment of TGF- β 1 pathway in transformed hepatocytes. (a,b): downregulation of T β RII in liver tumours. Representative T β RII immunostaining of liver sections from a 5-month-old Myc/Met bi-transgenic mouse. Note the faint staining in tumour cells in contrast to the strong reactivity of the surrounding parenchyma. The boundary of tumoral lesion is indicated with arrows. Original magnifications: a, 10 \times and b, 25 \times . (c): differential phosphorylation state of Smad2 protein in total extracts from single Met, Myc and Myc/Met livers and from tumor of a bi-transgenic mouse. The controls are total extracts of MMH cell line (Amicone *et al.*, 1997) before (-) and after (+) TGF- β 1 *in vitro* treatment

6) Ereditabilità della suscettibilità a certi tumori

- la prova finale che mutazioni somatiche sono alla base del tumore viene da studi di ereditarietà della **suscettibilità** alla malattia tumorale.

In una percentuale significativa di casi la propensione al tumore può essere tracciata come un difetto genetico nei meccanismi di riparo del DNA che induce un accumulo di mutazioni.

Mutazioni umane nei sistemi di riparo



Malattia e tipo di eredità	Sintomi	Funzioni alterate	NER
Xeroderma pigmentosum (XP) – autosomico recessivo	Sensibilità alla luce del sole con lentiggini e cancro della pelle; letale in età relativamente giovane come conseguenza della malignità	Riparazione del DNA danneggiato da radiazioni UV o sostanze chimiche	

NER= Nucleotide ^{copla}excision repair

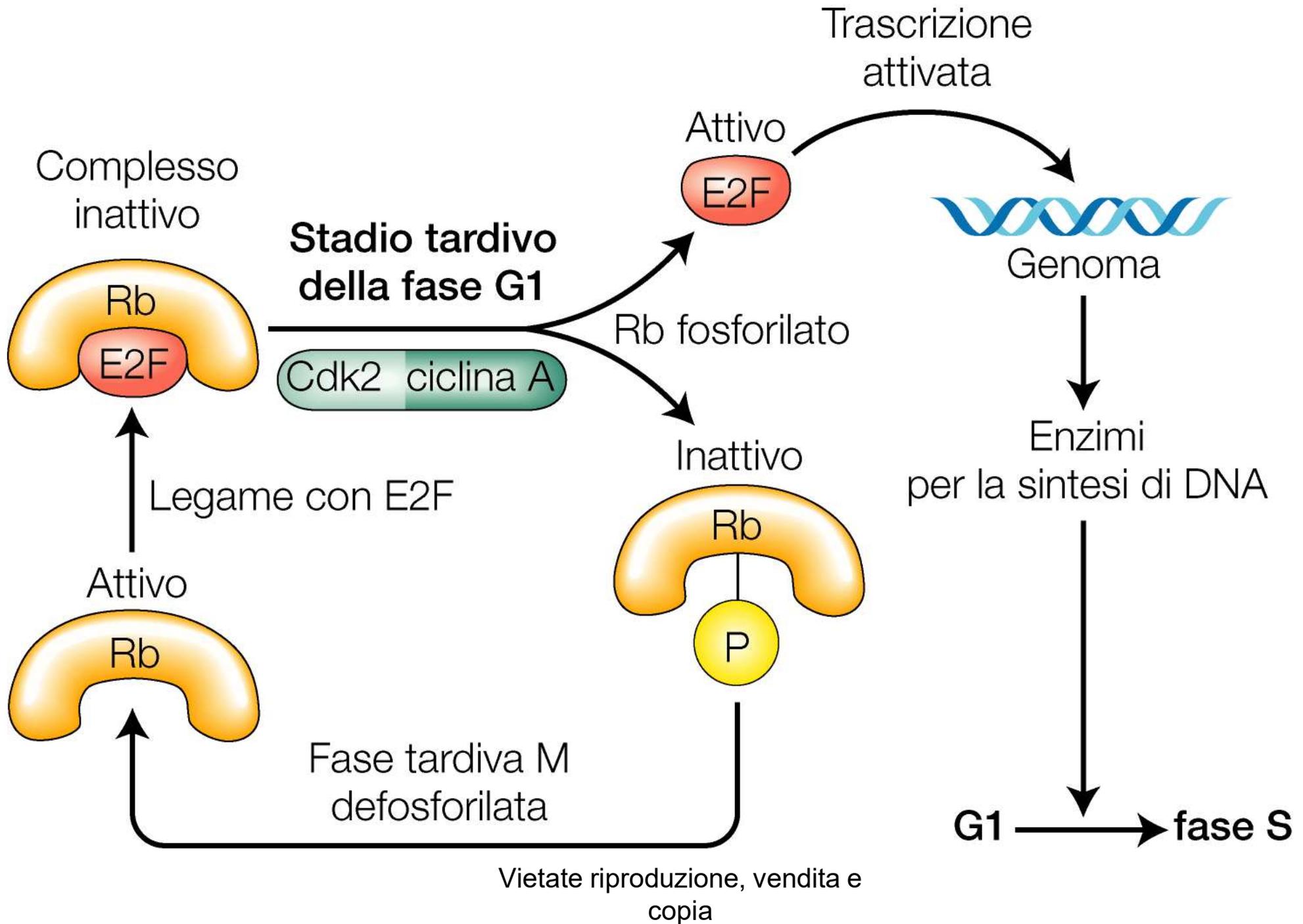
Vietata riproduzione, vendita e

Il retinoblastoma (MIM 180200)

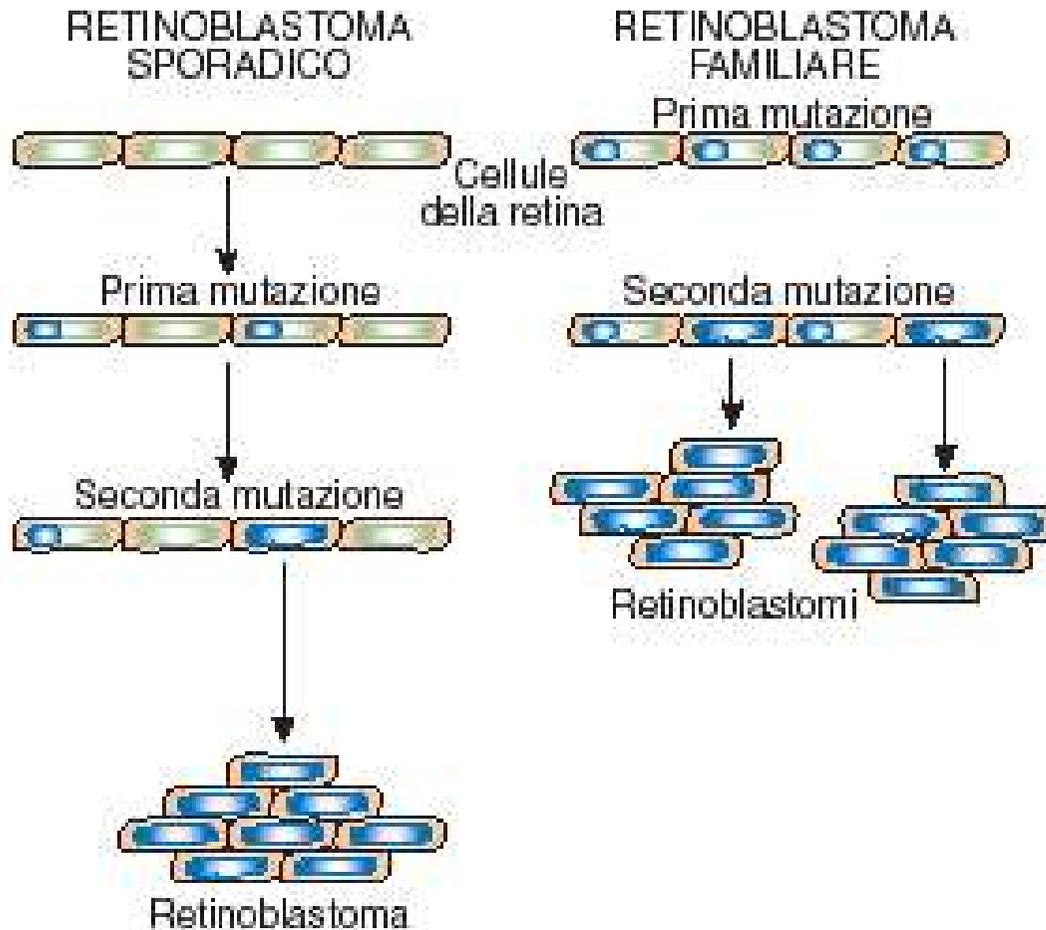


- Tumore aggressivo infantile che colpisce la retina (incidenza 1/20000 nascite);
- 60% casi sporadici;
- 40% casi ereditari (autosomico dominante, bilateralità comune);
- Cromosoma 13q14

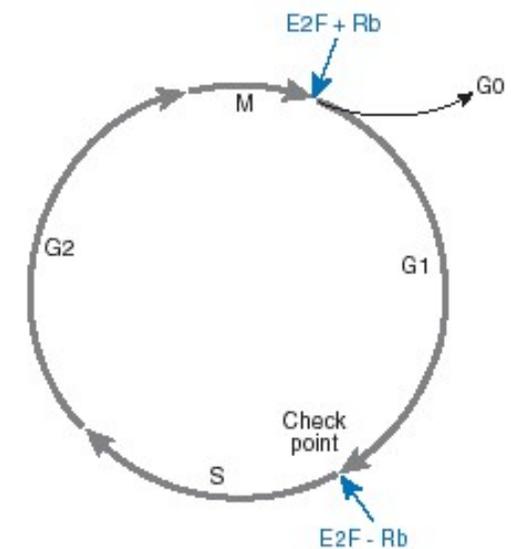
Mutazione di una proteina che inibisce la proliferazione



Retinoblastoma e la teoria del doppio colpo

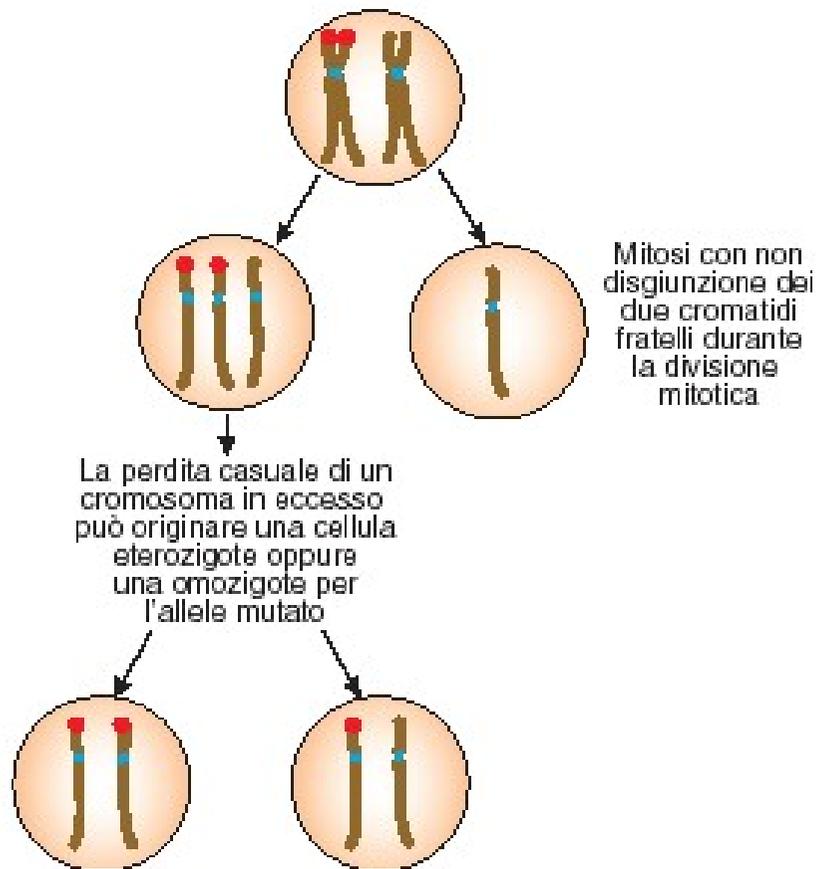


La frequenza e la precocità con cui si verifica l'evento spiega il fatto che l'ereditarietà della malattia appare come un tratto autosomico dominante, nonostante la ormai dimostrata recessività a livello cellulare.

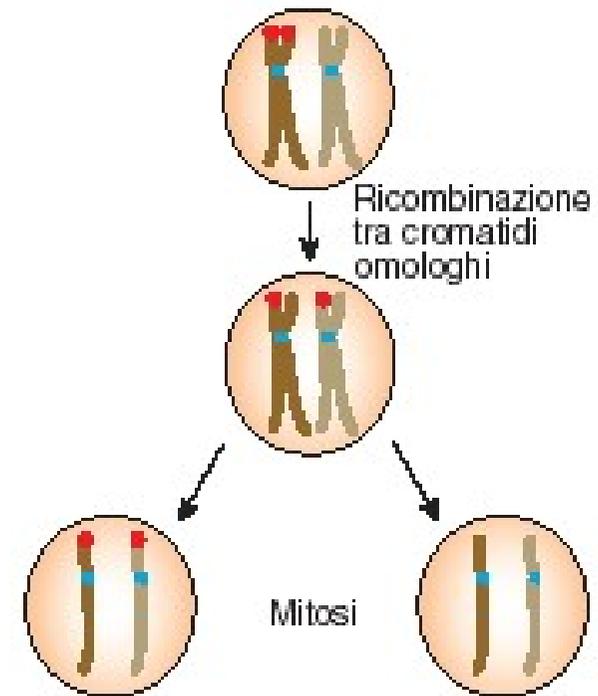


Vietate riproduzione, vendita e copia

Perdita di eterozigotità nei tumori ereditari (LOH)



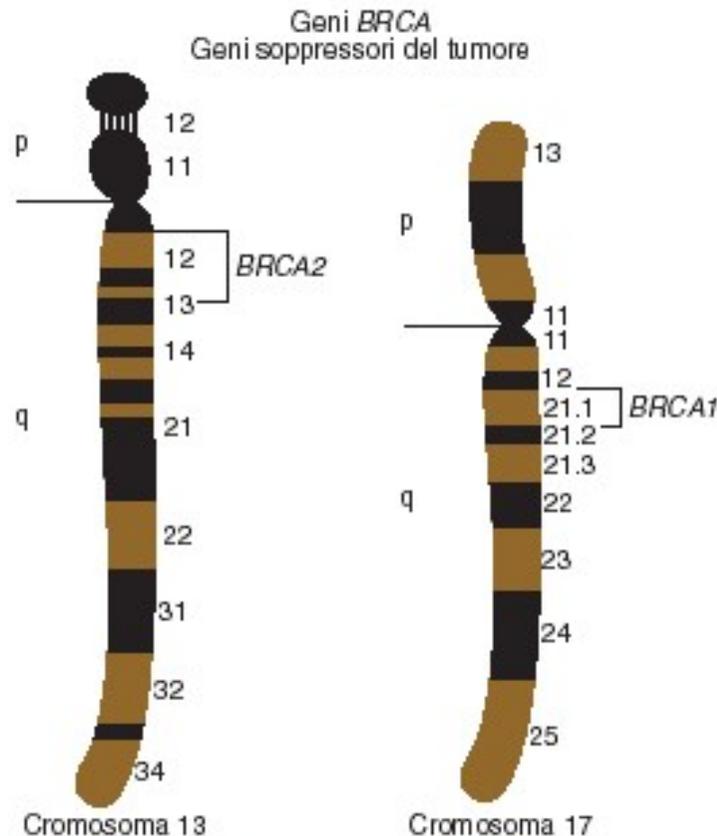
◆ FIGURA 37.4
LOH da non-disgiunzione mitotica.



◆ FIGURA 37.5
LOH da ricombinazione mitotica.

Abbastanza raro che l'allele sano sia mutato per mutazione puntiforme indipendente

Tumore della mammella e oncosoppressori BRCA1 e BRCA2



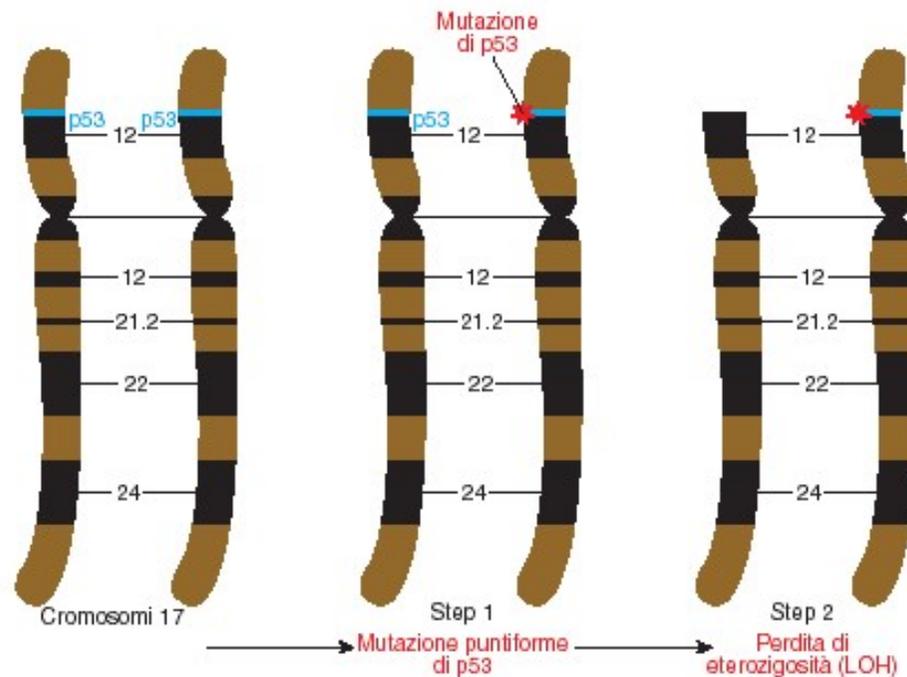
Ereditare un allele mutato di BRCA1 e BRCA2 predispone fortemente (80%) allo sviluppo della malattia (tumore familiare)

◆ FIGURA 37.8

Localizzazione cromosomica degli oncosoppressori BRCA1 e BRCA2.

I geni BRCA1 E BRCA2 codificano per proteine coinvolte nel riparo di rotture del DNA. BRCA1, inoltre, è correlata all'attività del recettore per gli estrogeni, il che può fornire un razionale alla tessuto specificità della funzione di questo oncosoppressore.

Sindrome di Li-Fraumeni e oncosoppressore p53



La mutazione di p53 di un allele viene ereditata, quella dell'altro allele viene acquisita per LOH

Una LOH del tratto cromosomico che porta il gene p53 è la causa di una **sindrome ereditaria** caratterizzata da alta incidenza di sarcomi, osteosarcomi, tumori della mammella, del sistema nervoso centrale e leucemie.

La funzione di p53 può essere inibita anche senza che si riscontrino mutazioni nel relativo gene.

La proteina **E6 di HPV (Virus del Papilloma Umano)** si lega ad una proteina cellulare che così induce la degradazione di p53.

La proteina **MDM2** è in grado di legare p53 e determinarne una massiccia ubiquitinazione.