

## Alterazioni della fisiologia cellulare nelle cellule tumorali

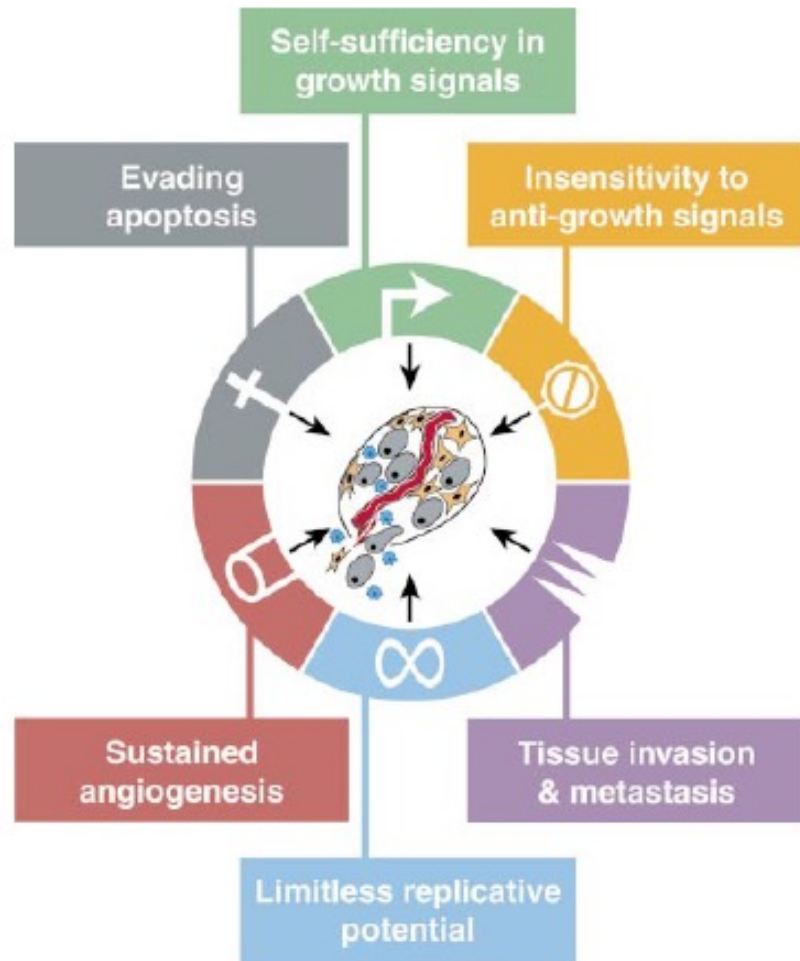


Figure 1. Acquired Capabilities of Cancer

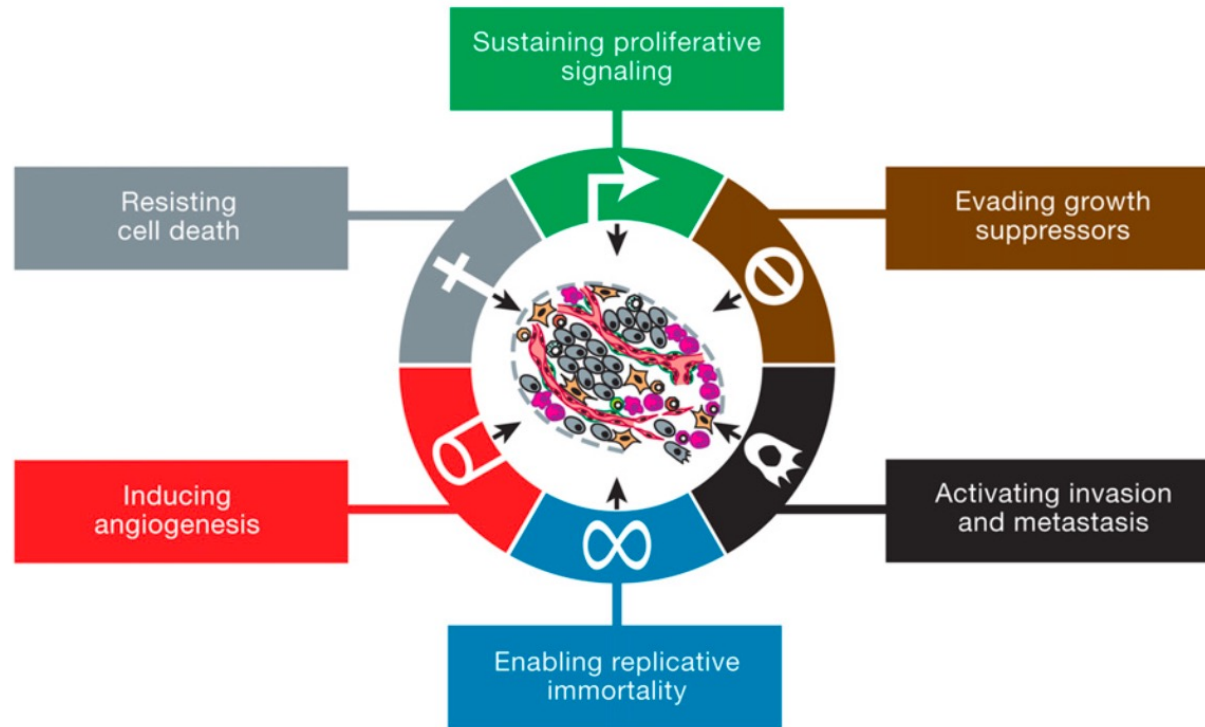
We suggest that most if not all cancers have acquired the same set of functional capabilities during their development, albeit through various mechanistic strategies.

Le cellule tumorali presentano alterazioni nei processi che regolano la proliferazione e l'equilibrio cellulare. Esistono più di 100 diversi tipi di cancro e alterazioni in centinaia di geni sono state associate ai tumori. Malgrado questa grande complessità è stato proposto che l'alterazione di sei funzioni fisiologiche cellulari caratterizza i genotipi delle cellule tumorali:

- 1) l'indipendenza dai segnali di crescita
- 2) Insensibilità ai segnali di inibizione della crescita
- 3) Evasione dall'apoptosi
- 4) Potenziale replicativo illimitato
- 5) Angiogenesi protratta
- 6) Capacità di invasione e di formare metastasi

1) Deficit nella riparazione del DNA  
Queste caratteristiche sono comuni probabilmente a tutti i tipi di tumori.

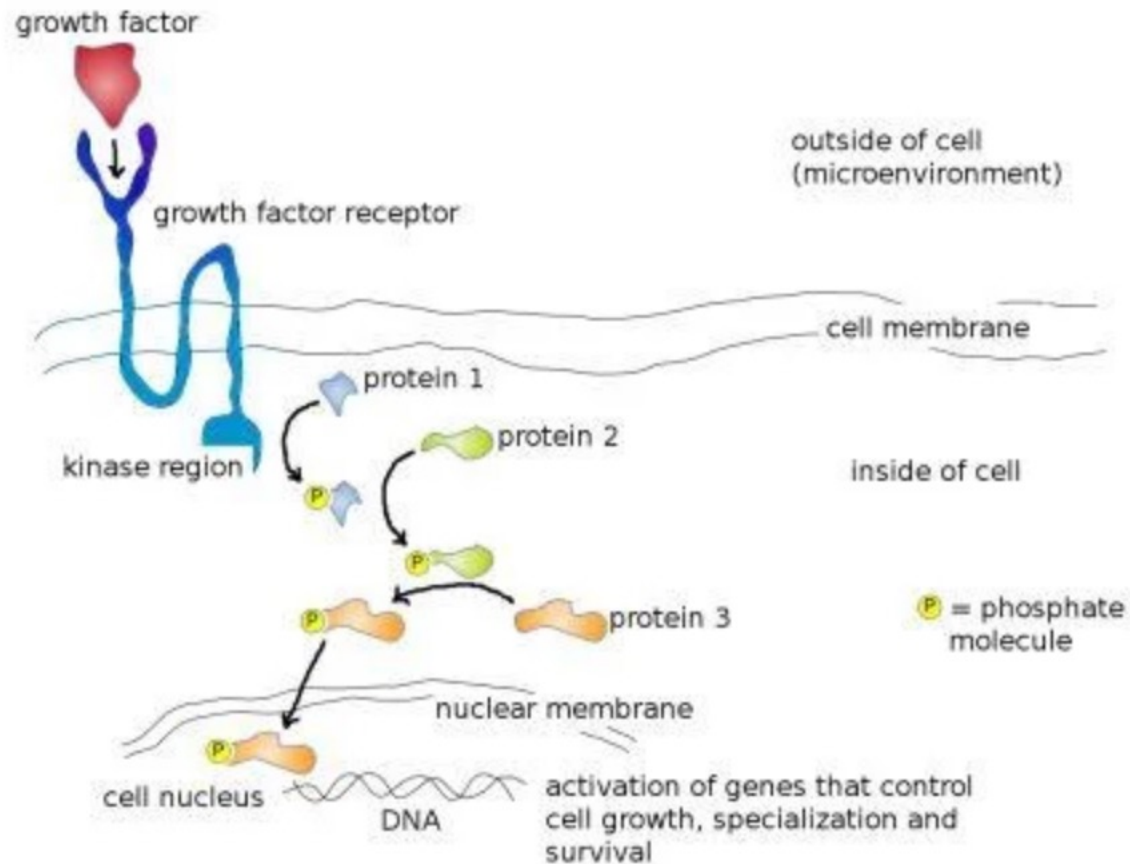
## Le cellule hanno diversi meccanismi di difesa antitumorali



Ogni cambiamento e nuova capacità acquisita durante il processo di trasformazione neoplastica rappresenta il superamento di un meccanismo di difesa dalla trasformazione neoplastica delle cellule e dei tessuti.

La molteplicità di queste barriere spiega la relativa rarità dell'insorgenza di tumore durante la vita.

## La proliferazione delle cellule normali



Le cellule normali per passare da uno stato di quiescenza in uno stato di proliferazione attiva hanno bisogno di ricevere stimoli da fattori in grado di promuovere la crescita (fattori di crescita solubili, interazione con molecole espresse da cellule o presenti nella matrice extracellulare).

Nelle cellule tumorali molti oncogeni agiscono mimando l'azione degli stimoli di crescita.

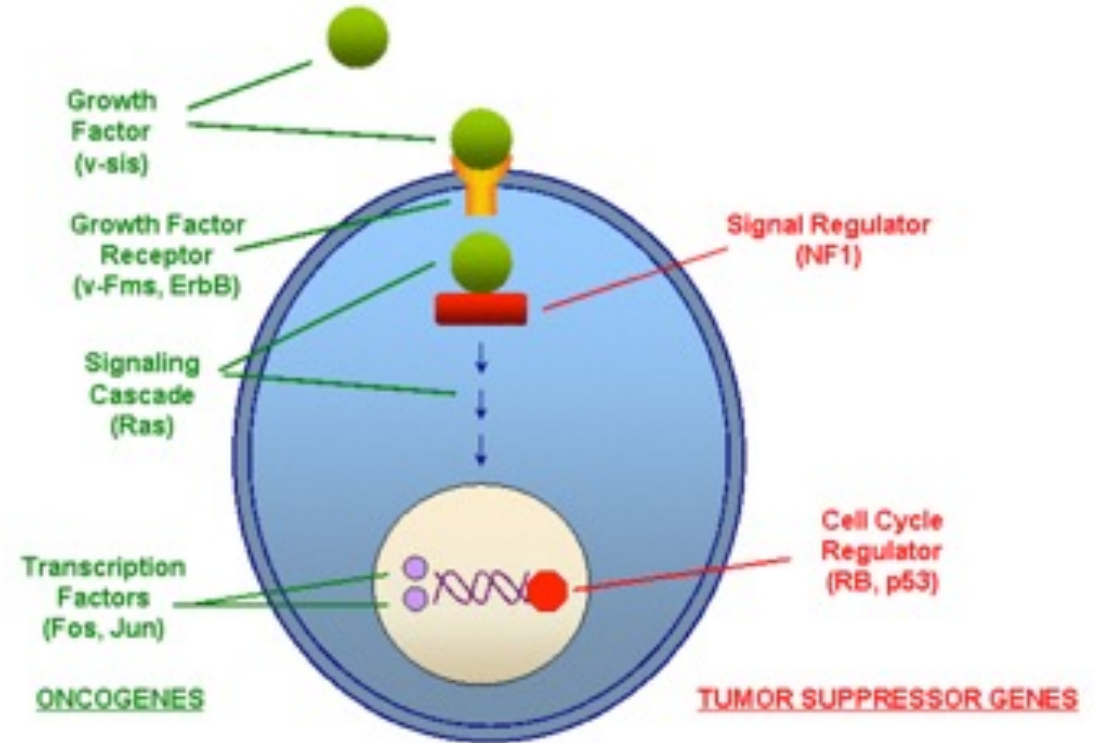
*In vitro* diversamente dalle cellule normali che per poter proliferare hanno bisogno della presenza di fattori di crescita, le cellule tumorali non dipendono dalla presenza di questi fattori.

## Induzione della proliferazione nelle cellule normali

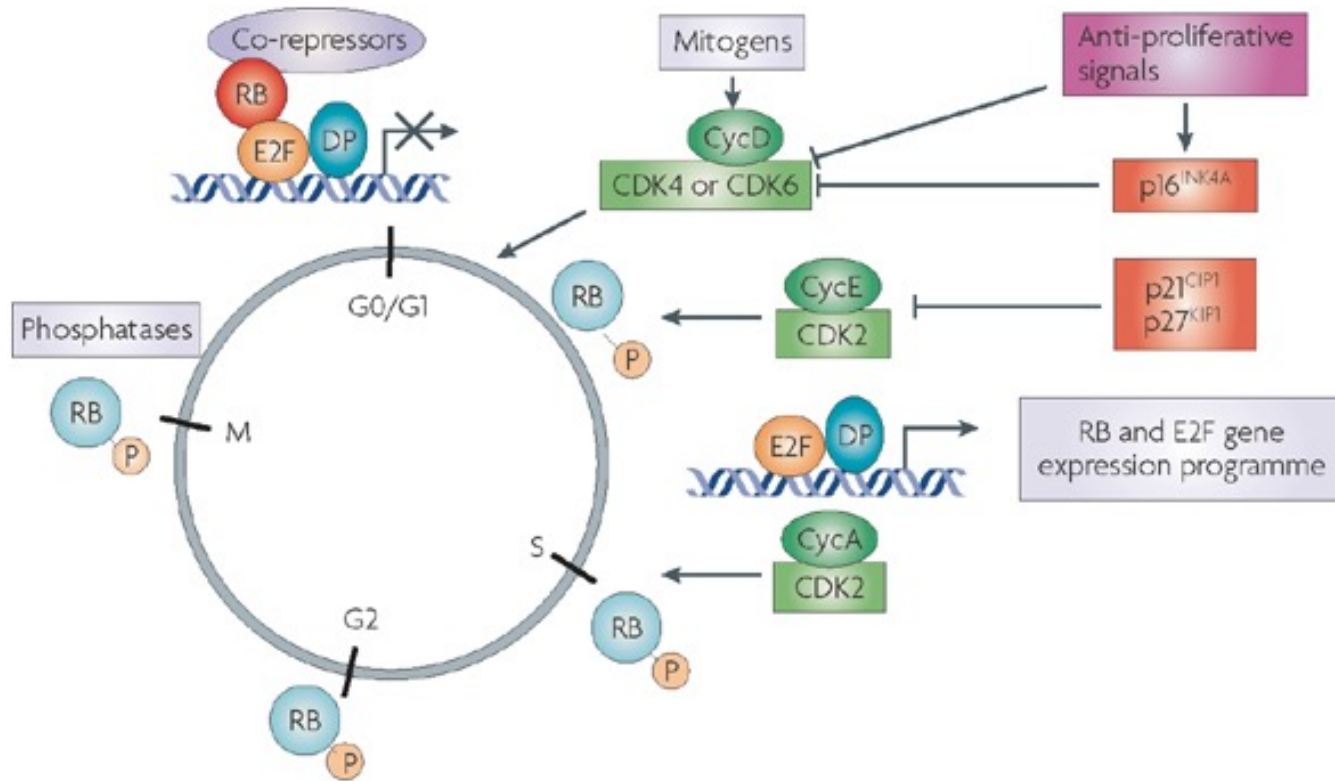
La normale proliferazione cellulare è indotta dalla interazione dei fattori di crescita con i loro **recettori cellulari**. Tale interazione determina l'attivazione **di vie di trasduzione intracellulari** che regolano l'entrata della cellula nel ciclo cellulare e la proliferazione.

Il legame del fattore di crescita al recettore determina:

- i) l'attivazione del recettore e trasduzione del segnale
- i) l'induzione e l'attivazione di fattori nucleari che iniziano la trascrizione del DNA.
- ii) l'ingresso e la progressione della cellula nel ciclo cellulare

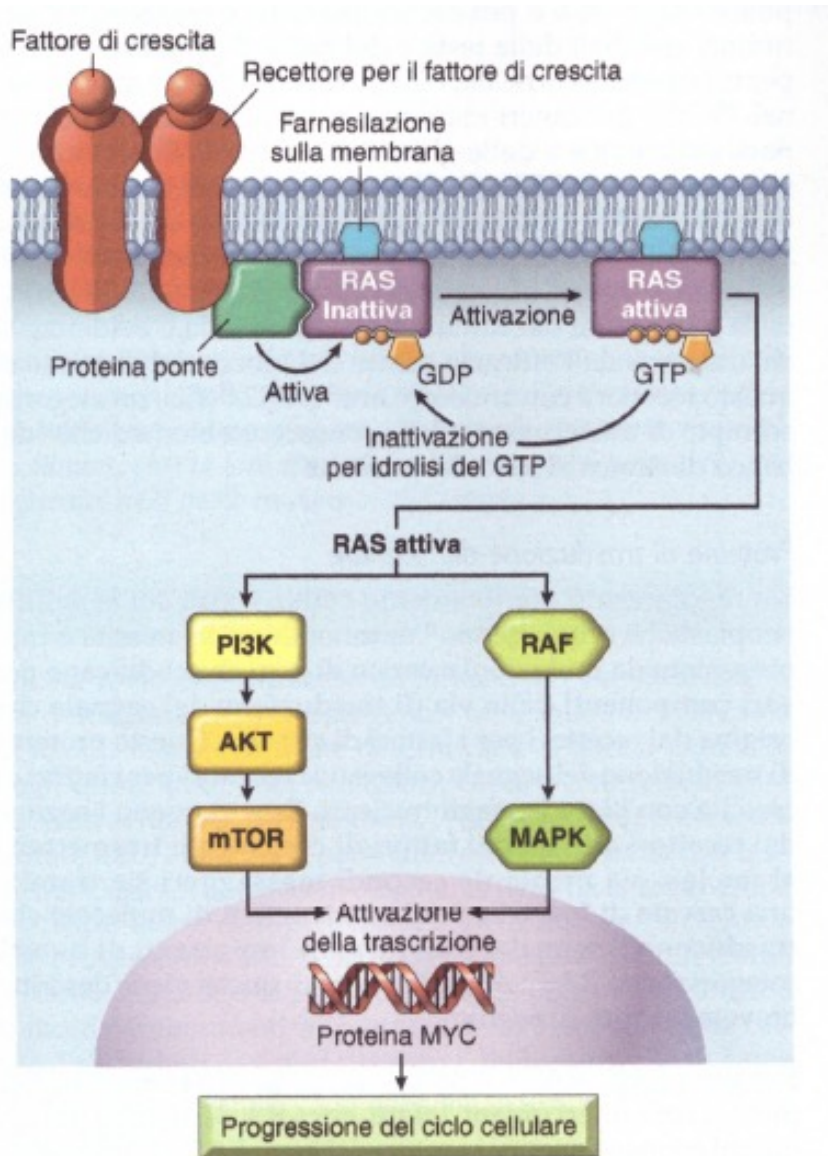


## Induzione della proliferazione da parte di fattori di crescita



I fattori di crescita promuovono l'assemblaggio dei complessi funzionali cicline D-CDK4 o cicline D-CDK6 nella fase G1 del ciclo cellulare. I complessi cicline D-CDK4/6 fosforilano le proteine della famiglia Rb favorendo la dissociazione fra Rb e i fattori E2F. In questo modo viene attivata la trascrizione dell'mRNA di diversi geni fra cui la ciclina E. La ciclina E si complessa con la CDK2 e completa la fosforilazione di Rb che promuove l'ulteriore rilascio dei fattori E2F che mediano l'espressione di geni responsabili della progressione del ciclo cellulare nella fase S.

## Capacità proliferativa indipendente dalla presenza di segnali di crescita



Le cellule neoplastiche possono acquisire la capacità di proliferare autonomamente perché possono:

- i) prodursi i fattori di crescita
- ii) avere mutazioni in recettori di crescita o alterata espressione dei recettori che li attivano indipendentemente dal legame con il ligando
- iii) avere mutazioni in componenti della cascata di trasduzione del segnale avviata dall'interazione del fattore di crescita con il suo recettore
- iv) avere mutazioni in geni codificanti fattori che regolano la trascrizione del DNA

# Gli oncogeni

| Categoria                                               | Proto-oncogene     | Modalità di attivazione                     | Tumore umano associato                                                                   |
|---------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fattori di crescita</b>                              |                    |                                             |                                                                                          |
| PDGFb                                                   | PDGFB              | Iperespressione                             | Astrocitoma                                                                              |
| Fattori di crescita fibroblastici                       | HST1               | Iperespressione                             | Osteosarcoma                                                                             |
|                                                         | FGF3               | Amplificazione                              | Tumore dello stomaco<br>Tumore della vescica<br>Tumore della mammella<br>Melanoma        |
| TGFa                                                    | TGFA               | Iperespressione                             | Astrocitomi                                                                              |
| HGF                                                     | HGF                | Iperespressione                             | Carcinomi epatocellulari<br>Tumore della tiroide                                         |
| <b>Recettori per fattori di crescita</b>                |                    |                                             |                                                                                          |
| Famiglia dei recettori dell'EGF                         | ERBB1 (EGFR)       | Mutazione                                   | Adenocarcinoma polmonare                                                                 |
|                                                         | ERBB2 (HER)        | Amplificazione                              | Carcinoma della mammella                                                                 |
| Tirosin-chinasi 3 FMS-simile                            | FLT3               | Mutazione puntiforme o piccole duplicazioni | Leucemia                                                                                 |
| Recettore per i fattori neurotrofici                    | RET                | Mutazione puntiforme                        | Neoplasie endocrine multiple di tipo 2A e B, carcinomi midollari familiari della tiroide |
| Recettore per il PDGF                                   | PDGFRB             | Amplificazione, traslocazione               | Gliomi, leucemie                                                                         |
| Recettore per il ligando KIT                            | KIT                | Mutazione puntiforme                        | Tumori stromali gastrointestinali, seminomi, leucemie                                    |
| Recettore per ALK                                       | ALK                | Traslocazione, mutazione puntiforme         | Adenocarcinoma del polmone, alcuni linfomi<br>Neuroblastoma                              |
| <b>Proteine coinvolte nella trasduzione dei segnali</b> |                    |                                             |                                                                                          |
| Leganti GTP (G)                                         | KRAS               | Mutazione puntiforme                        | Tumori del colon, del polmone e del pancreas                                             |
|                                                         | HRAS               | Mutazione puntiforme                        | Tumori della vescica e del rene                                                          |
|                                                         | NRAS               | Mutazione puntiforme                        | Melanomi, neoplasie ematologiche                                                         |
|                                                         | GNAQ               | Mutazione puntiforme                        | Melanoma uveale                                                                          |
|                                                         | GNAS               | Mutazione puntiforme                        | Adenoma della ghiandola pituitaria, altri tumori endocrini                               |
| Tirosin-chinasi non recettoriale                        | ABL                | Traslocazione                               | Leucemia mieloide cronica<br>Leucemia linfoblastica acuta                                |
| Trasduzione del segnale RAS                             | BRAF               | Mutazione puntiforme                        | Melanomi, leucemie, carcinoma del colon, altro                                           |
| Trasduzione del segnale Notch                           | NOTCH1             | Mutazione puntiforme, traslocazione         | Leucemie, linfomi, carcinomi della mammella                                              |
| Trasduzione del segnale JAK/STAT                        | JAK2               | Mutazione puntiforme, traslocazione         | Malattie mieloproliferative<br>Leucemia linfoblastica acuta                              |
| <b>Proteine di regolazione nucleare</b>                 |                    |                                             |                                                                                          |
| Attivatori trascrizionali                               | MYC                | Traslocazione                               | Linfoma di Burkitt                                                                       |
|                                                         | N-MYC              | Amplificazione                              | Neuroblastoma                                                                            |
| <b>Regolatori del ciclo cellulare</b>                   |                    |                                             |                                                                                          |
| Cicline                                                 | CCND1 (ciclina D1) | Traslocazione<br>Amplificazione             | Linfoma mantellare, mieloma multiplo<br>Tumore della mammella e dell'esofago             |
| Chinasi ciclina-dipendente                              | CDK4               | Amplificazione o mutazione puntiforme       | Glioblastoma, melanoma, sarcoma                                                          |

I geni che promuovono la crescita autonoma della cellula tumorale sono definiti oncogeni e la loro controparte fisiologica è definita proto-oncogene.

I proto-oncogeni regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare in condizioni fisiologiche.

Le proteine codificate dai proto-oncogeni possono funzionare come:

ligandi e recettori per fattori di crescita

trasduttori del segnale

fattori di trascrizione

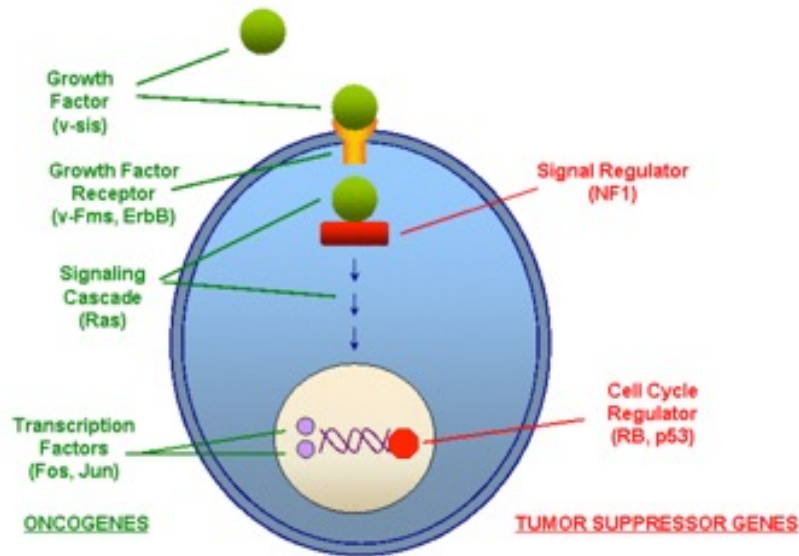
regolatori del ciclo cellulare

Diversi tipi di lesioni genetiche (mutazioni, riarrangiamenti cromosomici, amplificazioni) possono convertire i proto-oncogeni in oncogeni.

Gli oncogeni sono versioni mutate o iperespresse di proto-oncogeni che saranno così in grado di funzionare in maniera autonoma, indipendentemente dai normali meccanismi che li regolano.

E' sufficiente che sia alterato uno singolo allele affinché l'oncogene favorisca la trasformazione neoplastica.

## Capacità proliferativa indipendente dalla presenza di segnali di crescita: capacità di sintetizzare fattori di crescita



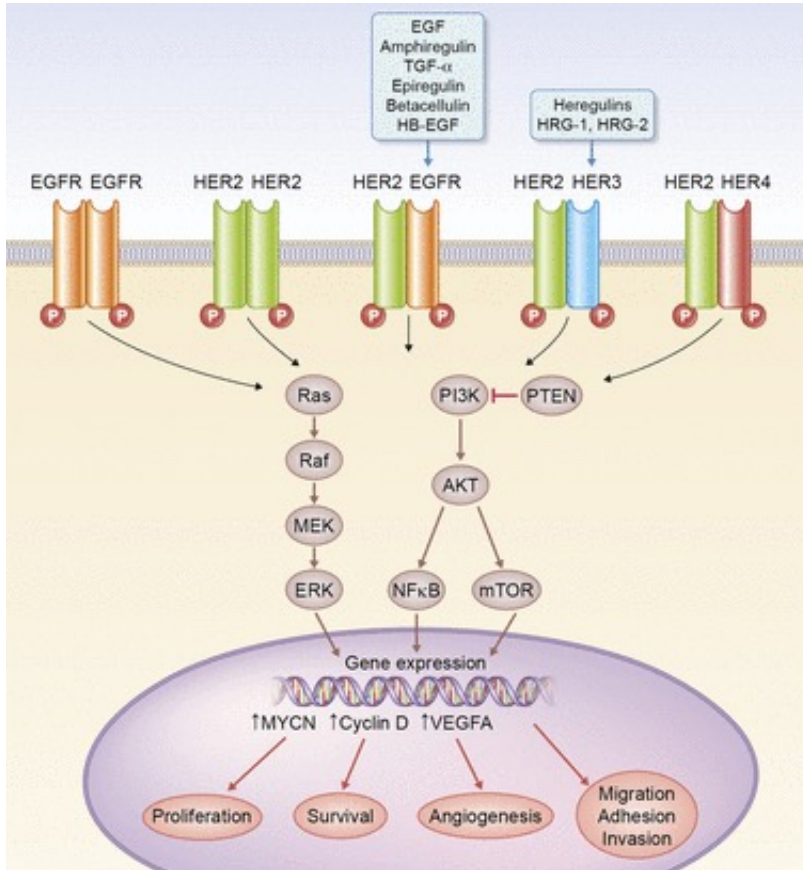
**Molte cellule tumorali sono in grado di sintetizzare i fattori di crescita a cui rispondono.**

Il proto-oncogene SIS codifica per la catena  $\beta$  del platelet derived growth factor (PDGF) è iperespresso in molti tumori quali gli astrocitomi e gli osteosarcomi che esprimono il recettore. In molti casi il gene del fattore di crescita non è alterato ma iperespresso.

Nel caso del Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) che è un fattore di crescita correlato all'EGF (epidermal growth factor) e che induce la proliferazione cellulare legandosi all'EGFR, la sua iper-espressione è causata dall'oncogene RAS che causa un aumento della produzione del fattore da parte delle cellule. L'espressione anormale del TGF- $\alpha$  è stata dimostrata nei tumori del fegato, della mammella, della pelle e negli astrocitomi.

Un gruppo di oncogeni che codificano per fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs) è attivato in tumori gastrointestinali e della mammella.

**Capacità proliferativa indipendente dalla presenza di segnali di crescita:  
alterazione nel legame fra recettore e fattore di crescita**

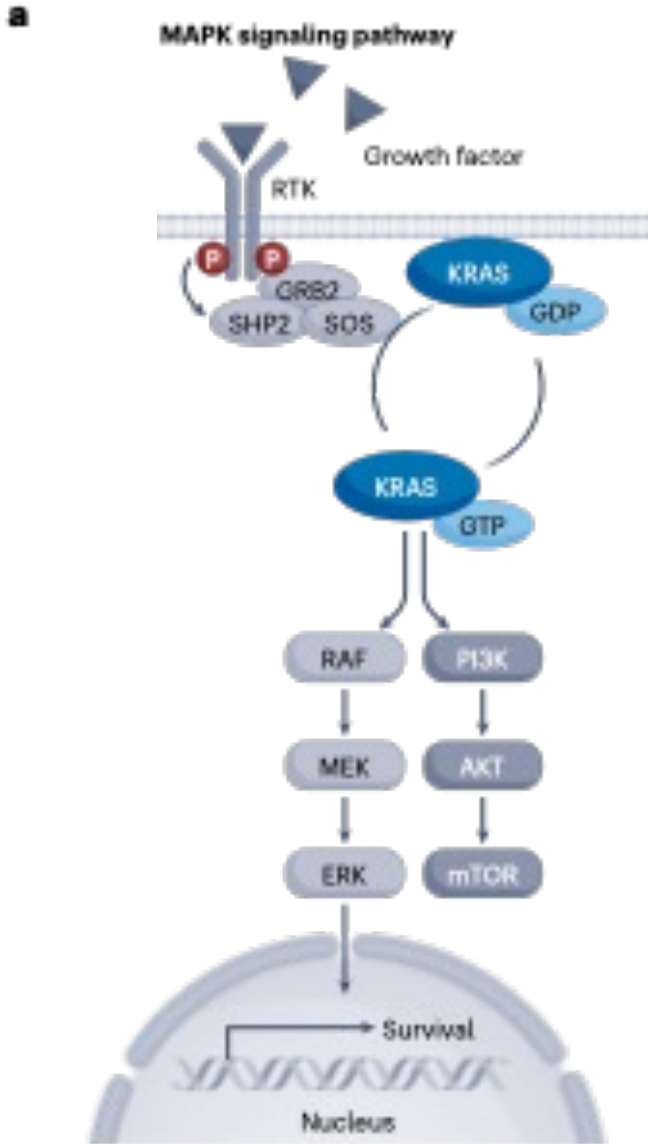


**Molti oncogeni codificano per i recettori di fattori di crescita.** Fra questi i più diffusi nei tumori sono i recettori ad attività tirosin chinastica. Tali recettori presentano una regione extracitoplasmatica che lega il fattore di crescita e una regione intracitoplasmatica che possiede attività tirosin chinastica. In seguito alla interazione con il ligando il recettore omo- o etero-dimerizza e fosforila le tirosine nella propria regione intracitoplasmatica. Questi residui fosforilati agiscono da sedi per l'interazione con altre molecole di segnalazione.

La famiglia dei recettori dell'epidermal growth factor (EGFR) sono recettori ad attività tirosin chinastica. Questa famiglia include ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4. ErbB2 non contiene il dominio che lega il ligando ma dimerizza con gli altri membri della famiglia.

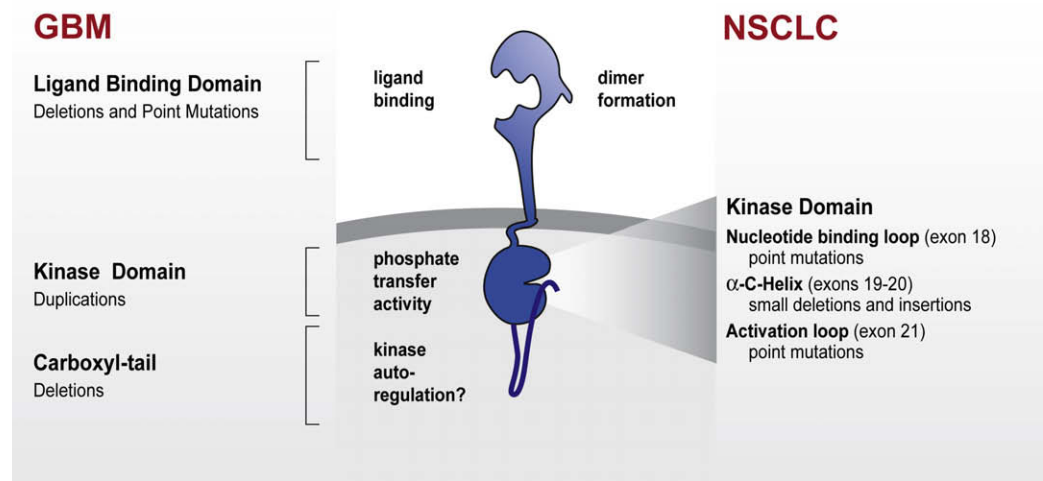
Tutte le cellule ad eccezione di quelle ematopoietiche esprimono le molecole appartenenti alla famiglia ErbB. Mutazioni nei geni ErbB causano la morte embrionaria o perinatale nel modello murino.

## Vie di segnalazione dell' EGFR



In seguito all'interazione con il ligando l'EGFR dimerizza e si transfosforila nella regione intracitoplasmatica avviando nelle cellule di mammifero diverse vie di segnalazione fra cui la via delle MAP chinasi (MAPK, RAS-ERK) e la via della PI3K-AKT-mTOR. Entrambe queste vie sono necessarie per stimolare la crescita e la proliferazione cellulare promuovendo l'entrata della cellula nella fase G1/S del ciclo cellulare.

## Mutazioni dell'EGFR nei tumori



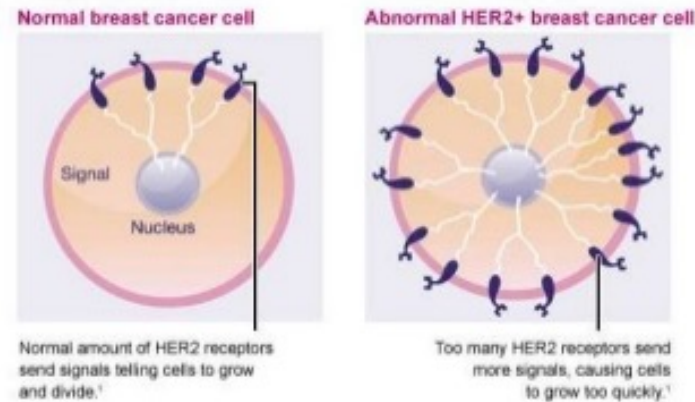
Mutazioni nell' EGFR avvengono in mutational «hotspots» nella regione extracitoplasmatica, nel dominio chinasi e nella regione C-terminale intracitoplasmatica.

Nei glioblastomi (GBM) sono presenti mutazioni nella regione extracitoplasmatica mentre nei tumori del polmone (non-small cell lung cancer NSCLC) mutazioni nel dominio chinasi. Queste mutazioni determinano l'attivazione costitutiva del recettore.

## Capacità proliferativa indipendente dalla presenza di segnali di crescita: alterazione nel legame fra recettore e fattore di crescita

### Overexpression

- HER2 is overexpressed in 15–30% of invasive breast cancer.
- Associated with high-grade disease, nodal metastases and tumour size.
- HER2 Overexpression occurs also in other forms of cancers also such as stomach, ovary, uterine serous endometrial carcinoma, colon, bladder, lung, uterine cervix, head and neck, and esophagus.



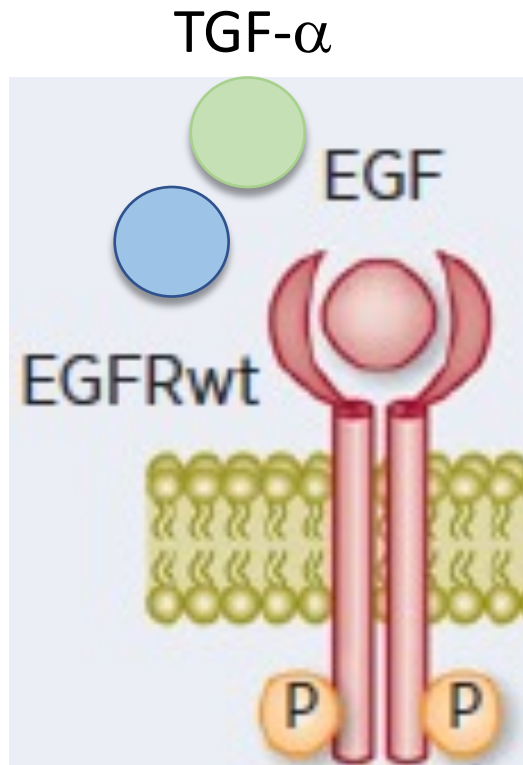
I recettori per i fattori di crescita possono essere alterati attraverso l'amplificazione del gene e l'overespressione del recettore.

HER2 è overespresso nel 15-30% dei tumori invasivi del seno e in altre forme di cancro.

L'importanza di questi recettori tirosin chinasi mutati nella crescita e proliferazione delle cellule tumorali è dimostrata dall'efficacia degli agenti che hanno come bersaglio tali molecole.

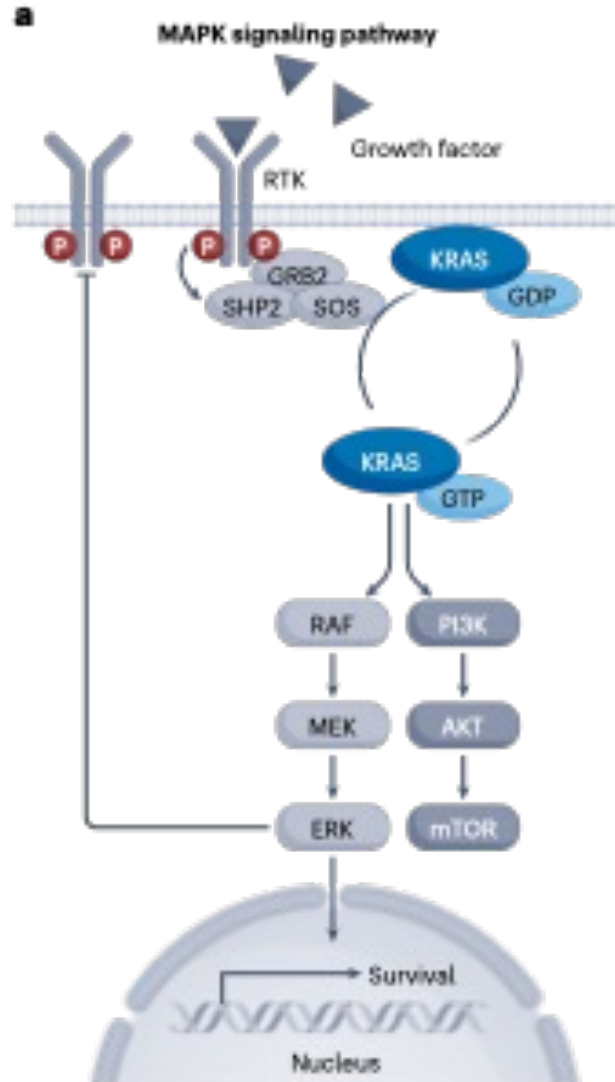
I tumori della mammella con amplificazione di HER2 rispondono al trattamento con anticorpi anti-HER2 che bloccano la crescita del tumore e ne inducono l'apoptosi.

## Ligandi della famiglia dell'EGFR



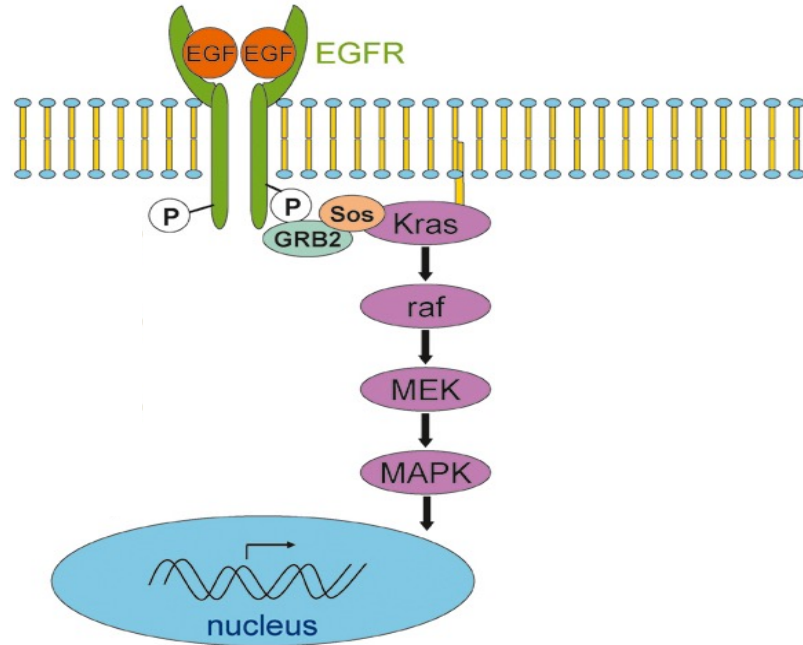
Il recettore per il fattore di crescita epidermico oltre all'EGF ha altri ligandi che includono: il (transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), l'amfiregulina (AREG) l'epiregulina (EREG), betacellulina (BTC)

## Vie di segnalazione dell' EGFR



La stimolazione dell'EGFR avvia diverse vie di segnalazione fra cui la **via delle MAP chinasi (MAPK, RAS-ERK)** e la via della PI3K-AKT-mTOR. Entrambe queste vie sono necessarie per stimolare la crescita e la proliferazione cellulare promuovendo l'entrata della cellula nella fase G1/S del ciclo cellulare.

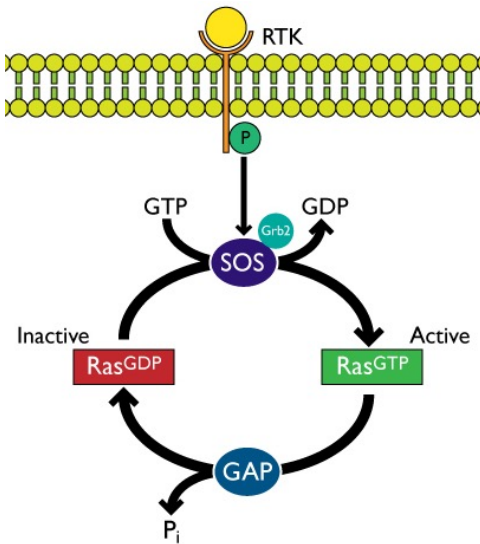
## La segnalazione dell'EGFR: attivazione della via delle MAP chinasi nelle cellule sane



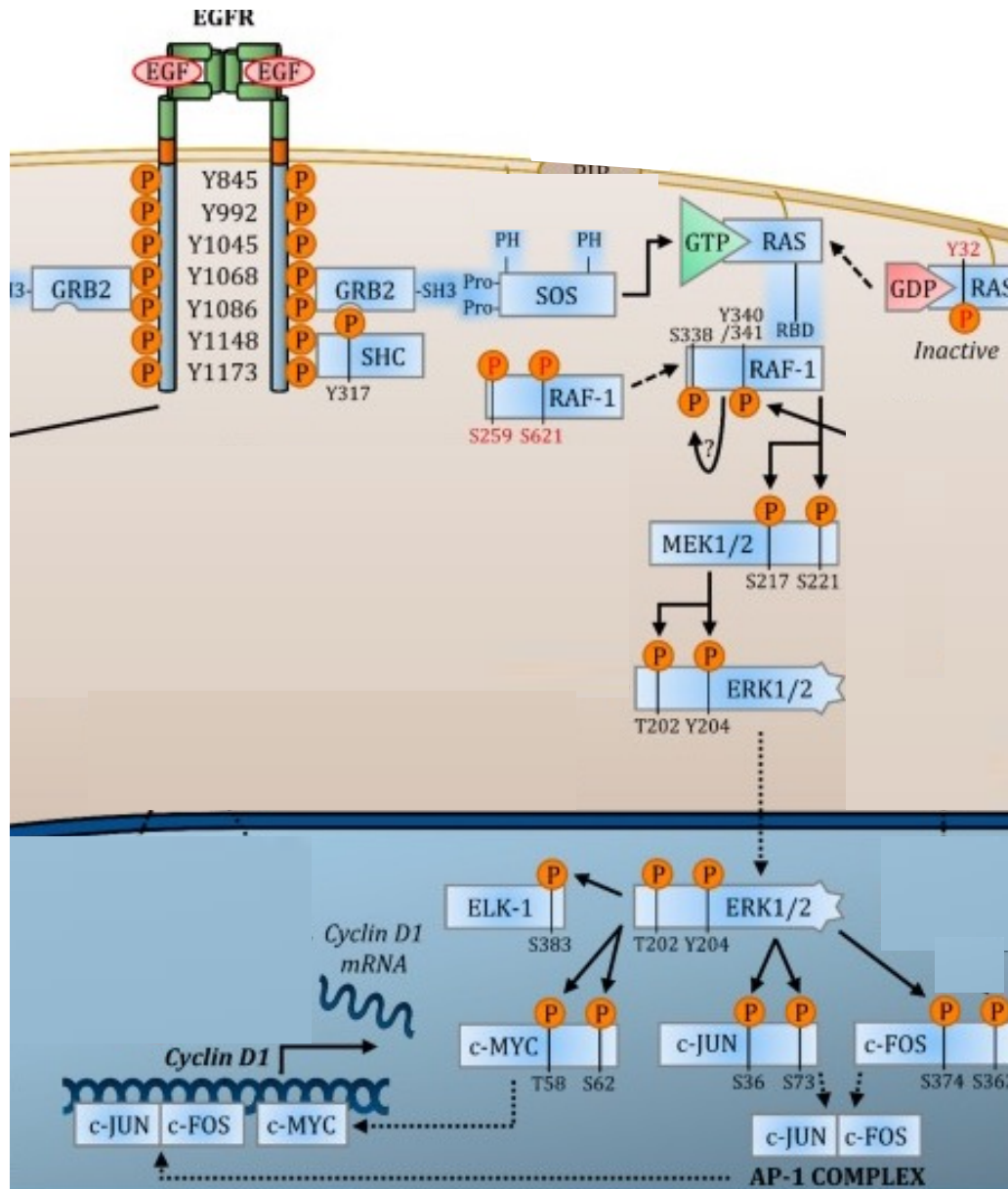
In seguito alla transfosforilazione dell' EGFR i residui di tirosina fosforilati legano la proteina GRB2 (growth factor binding receptor 2) attraverso il suo dominio SH2.

GRB2 a sua volta si lega allo scambiatore di nucleotidi SOS1 (son of sevenless 1) attraverso i suoi domini SH3.

- SOS1 attiva RAS attraverso lo scambio di GDP con il GTP inducendo un cambiamento conformazionale di RAS.
- RAS attivato attiva la serin treonin chinasi RAF
- RAF attiva le MAPKK chinasi MEK1/2
- MEK1/2 attivano attraverso la fosforilazione le MAPK ERK1/2 che a loro volta attivano diversi fattori trascrizionali responsabili della trascrizione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare.

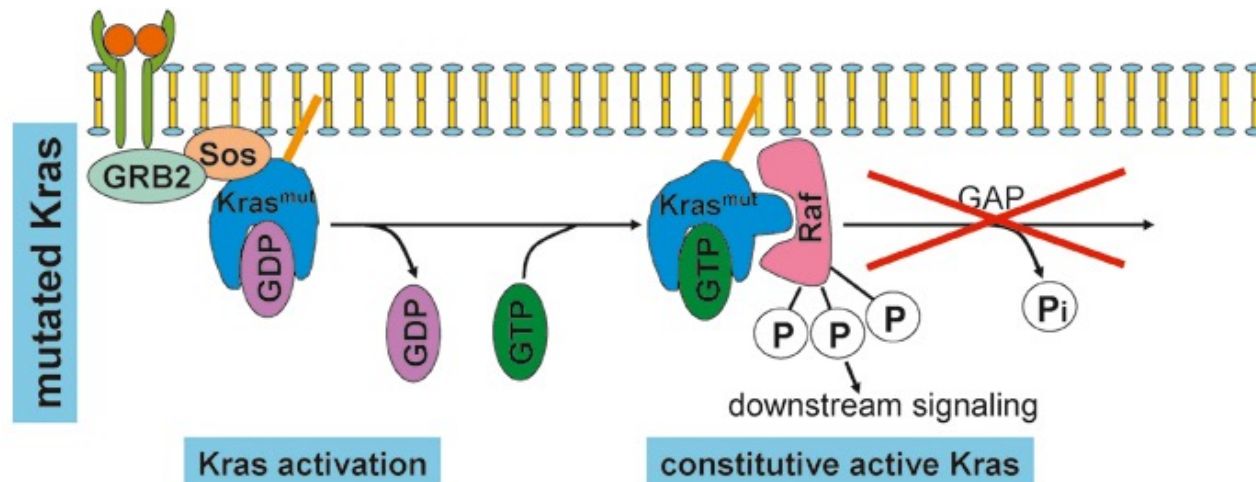
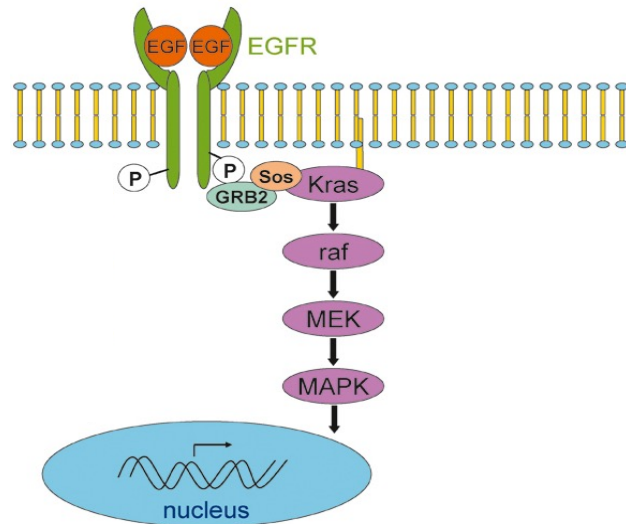


## La segnalazione dell'EGFR: attivazione della via delle MAP chinasi nelle cellule sane



I geni codificanti le proteine RAS sono tre (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) e codificano per proteine G associate alla membrana che legano il GDP e il GTP.

## Attivazione della via delle MAPK chinasi nei tumori umani



In circa il 25% dei tumori umani le proteine Ras presentano mutazioni che alterano la struttura della molecola causando l'attivazione costitutiva della segnalazione.

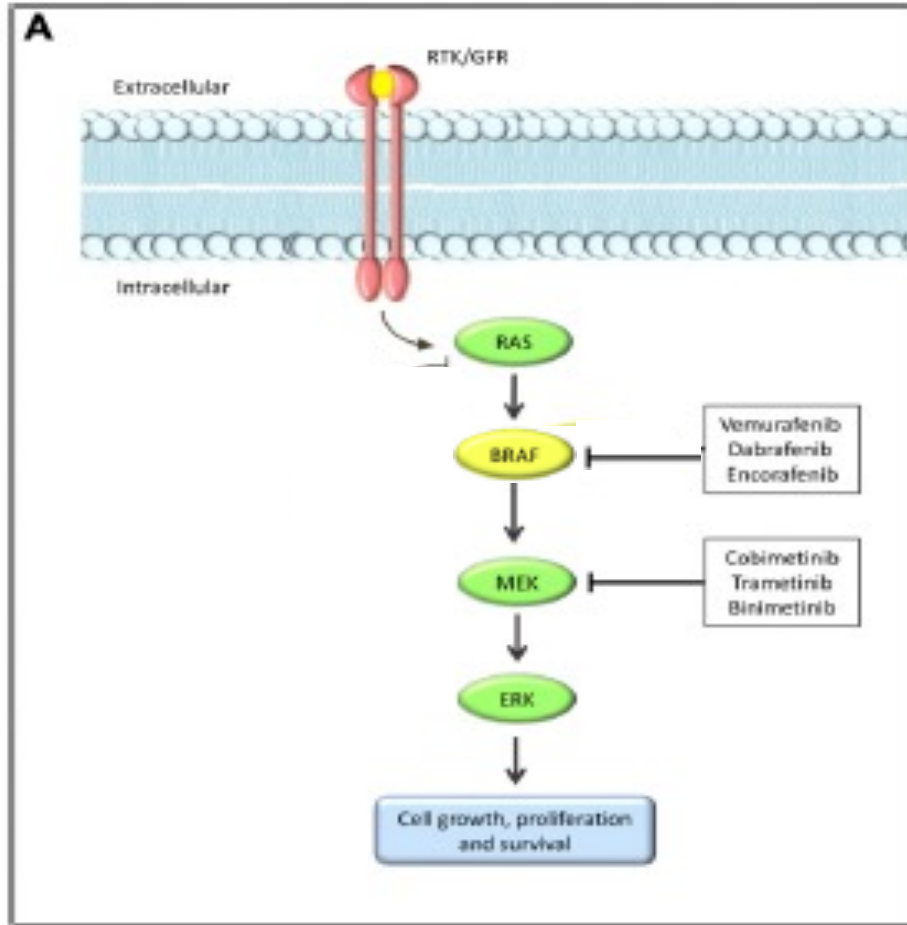
Nella forma attiva Ras interagisce con la proteina citosolica Raf sulla via delle MAP chinasi. Le MAP chinasi attivate attivano fattori trascrizionali e promuovono la mitosi. Mutazioni in RAS sono presenti nel 90% dei carcinomi del pancreas e nel 50% delle neoplasie del colon.

# Frequenza delle mutazioni di RAS nei tumori

**Table 2**  
Frequency of RAS mutation in various cancers.

| Tissue/<br>organ   | Type of cancers                                | Type of<br>mutation | Percentage of<br>RAS mutation | References |
|--------------------|------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------|
| Pancreas           | Pancreatic ductal<br>adenocarcinoma            | K-RAS               | 50–90%                        | [44–48]    |
| Colon              | Colorectal cancer                              | K-RAS               | > 40%                         | [57–60]    |
| Thyroid            | Anaplastic carcinoma                           | N-RAS               | 10–20%                        | [42,73]    |
|                    | Follicular carcinoma                           | N-RAS               | 15–20%                        | [42]       |
|                    | Hurthle cell carcinoma                         | H-RAS               | 15–20%                        | [42]       |
|                    | Papillary Thyroid<br>Carcinoma                 | K-RAS               | 15–30%                        | [74,75]    |
| Leukemia           | Chronic<br>myelomonocytic<br>leukemia          | N-RAS               | 17–60%                        | [42,80]    |
|                    | Juvenile<br>myelomonocytic<br>myeloid leukemia | N-RAS               | 15–20%                        | [42]       |
|                    | Acute myelogenous<br>leukemia                  | K-RAS               | 4–10%                         | [42,81]    |
|                    |                                                | N-RAS               | 4–10%                         |            |
|                    | Acute lymphoblastic<br>leukemia                | K-RAS               | 10–15%                        | [42,82]    |
|                    |                                                | N-RAS               | 10–15%                        |            |
| Lung               | Non-small cell lung<br>carcinoma               | K-RAS               | 20–50%                        | [91–93]    |
| Liver              | Hepatocellular<br>carcinoma                    | K-RAS               | 5–20%                         | [96]       |
| Breast             | Carcinoma                                      | K-RAS               | 0.9–20%                       | [97–100]   |
|                    |                                                | N-RAS               | 1–5%                          | [97,98]    |
| Ovary              | Ovarian carcinoma                              | N-RAS               | 1–10%                         | [101]      |
|                    |                                                | K-RAS               | 10–15%                        | [102]      |
| Kidney             | Renal cell carcinoma                           | H-RAS               | 2%                            | [103]      |
| Skin               | Malignant melanoma                             | N-RAS               | 10–25%                        | [104–107]  |
| Urinary<br>Bladder | Urothelial bladder<br>cancer                   | H-RAS               | 10–30%                        | [108–110]  |

## Capacità proliferativa indipendente dalla presenza di segnali di crescita: alterazione delle molecole che mediano la trasduzione del segnale dei recettori per i fattori di crescita



Oltre a RAS altri membri della cascata di trasduzione del segnale RAS/RAF/MAP chinasi possono essere alterati nelle cellule tumorali.

Il 40-50% dei melanomi presentano mutazioni attivanti la proteina BRAF.

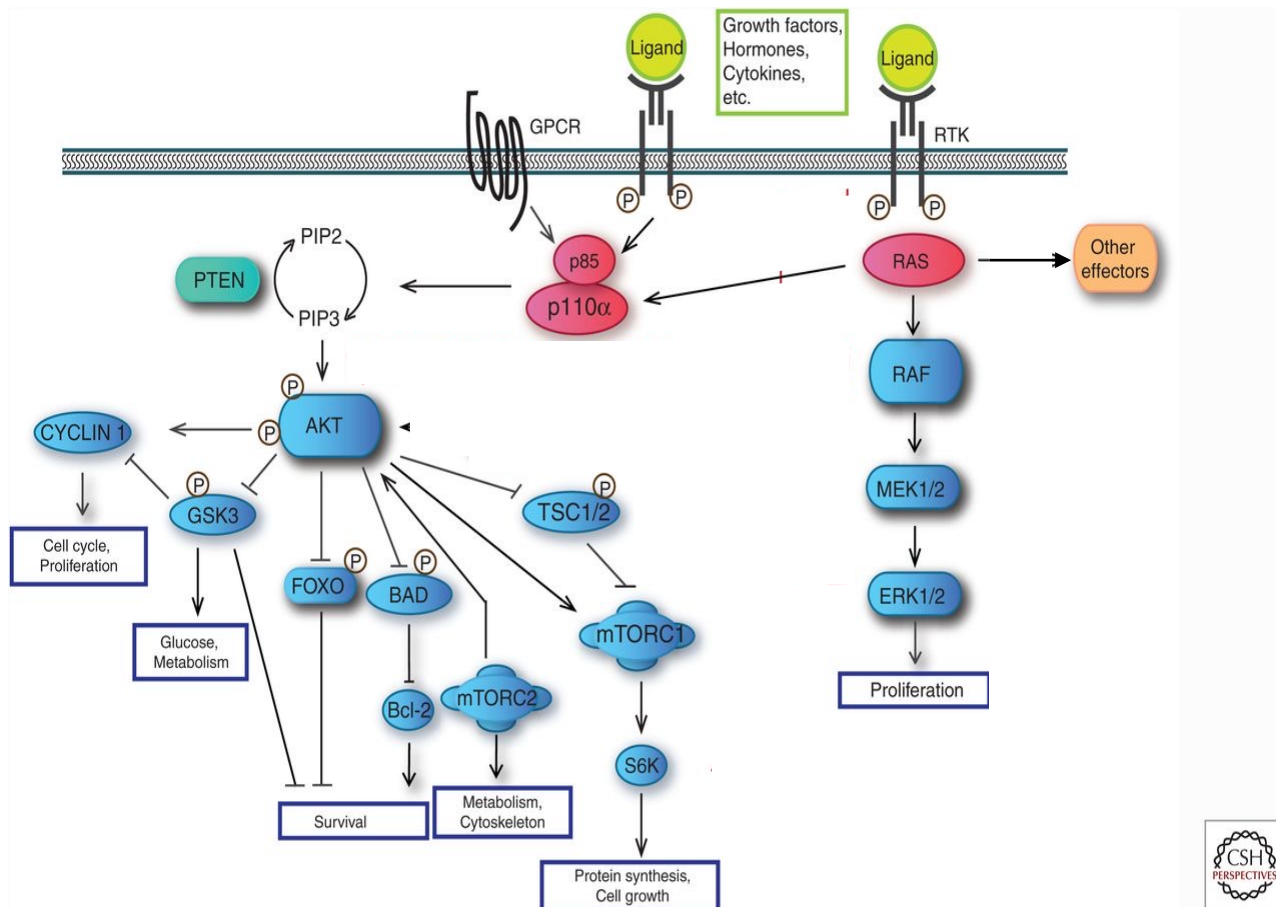
BRAF è una serin treonin chinasi e la mutazione V600E è presente nel 70-88% dei casi.

I melanomi con tale mutazione sono sensibili al trattamento con inibitori di BRAF.

La alta dipendenza di un tumore da un oncogene prende il nome di «oncogene addiction».

Sebbene, il cancro si sviluppi attraverso l'accumulo progressivo di mutazioni geniche che attivano diversi oncogeni, studi preclinici e di pazienti trattati con terapie oncogene-mirate suggeriscono che la sopravvivenza del tumore dipende da un numero ristretto di alterazioni geniche definite «driver». Il termine «oncogene addiction» è stato coniato per descrivere questo fenomeno di dipendenza del tumore da pochi oncogeni per sopravvivere.

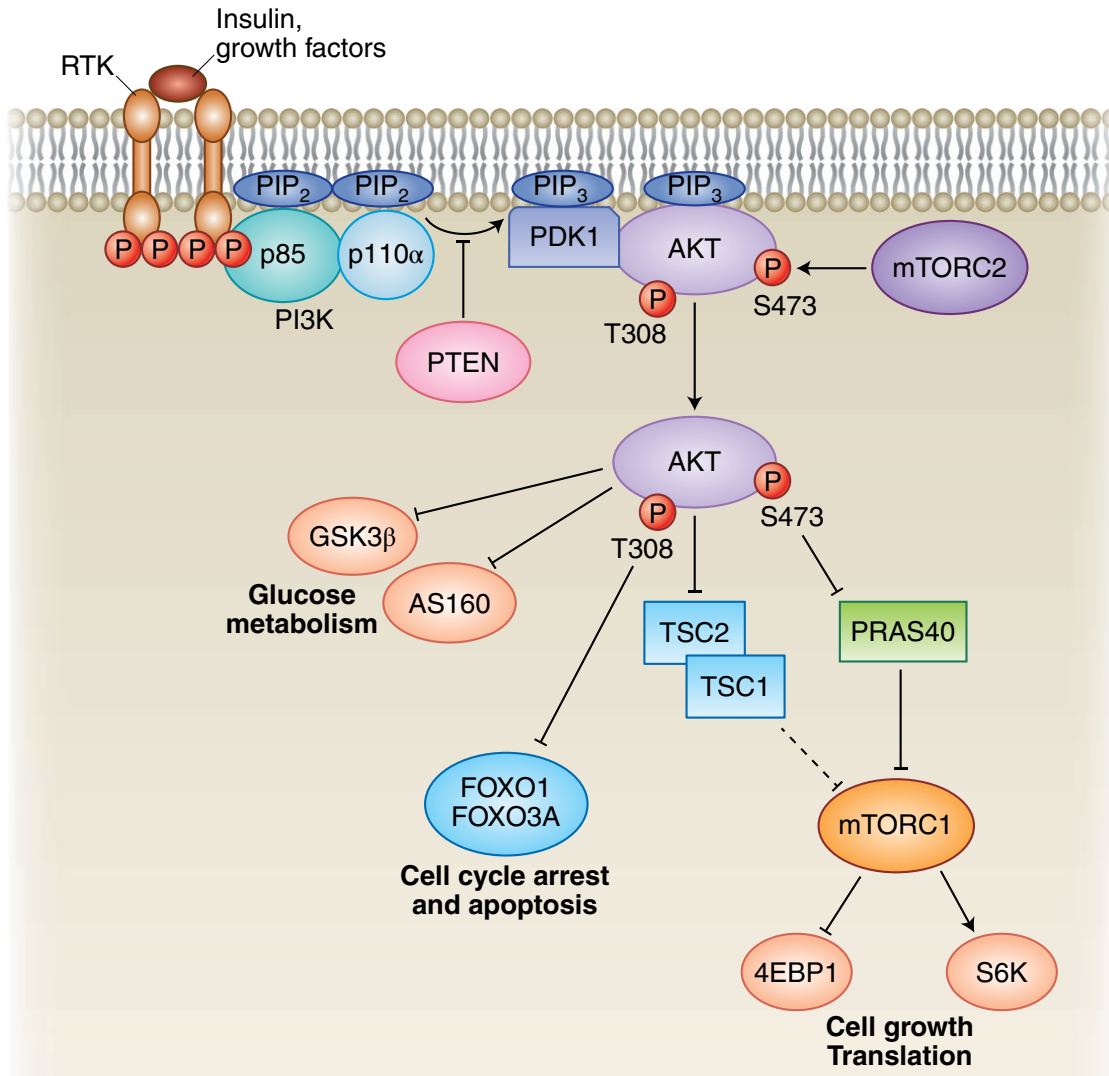
## Vie di segnalazione dell' EGFR



La stimolazione dell'EGFR avvia diverse vie di segnalazione che comprendono la via delle MAP chinasi (MAPK, RAS-ERK) e la via della fosfatidil inositolo 3 chinasi o PI-3 chinasi (PI3K) **PI3K-AKT-mTOR**. Entrambe queste vie sono necessarie per stimolare la crescita e la proliferazione cellulare promuovendo l'entrata della cellula nella fase G1/S del ciclo cellulare.



## La segnalazione dell'EGFR: attivazione della via della PI3K nelle cellule sane



L'interazione del fattore di crescita con il suo recettore ad attività tirosin chinasi media la fosforilazione del recettore che permette il reclutamento della PI3K alla membrana mediante la sua subunità regolatoria p85. La PI3K fosforila il fosfatidil inositolo bi-fosfato (PIP<sub>2</sub>) in fosfatidil inositolo trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Il PIP<sub>3</sub> recluta la serin treonin chinasi AKT alla membrana plasmatica dove è attivata dalla fosforilazione mediata dalla chinasi PDK1.

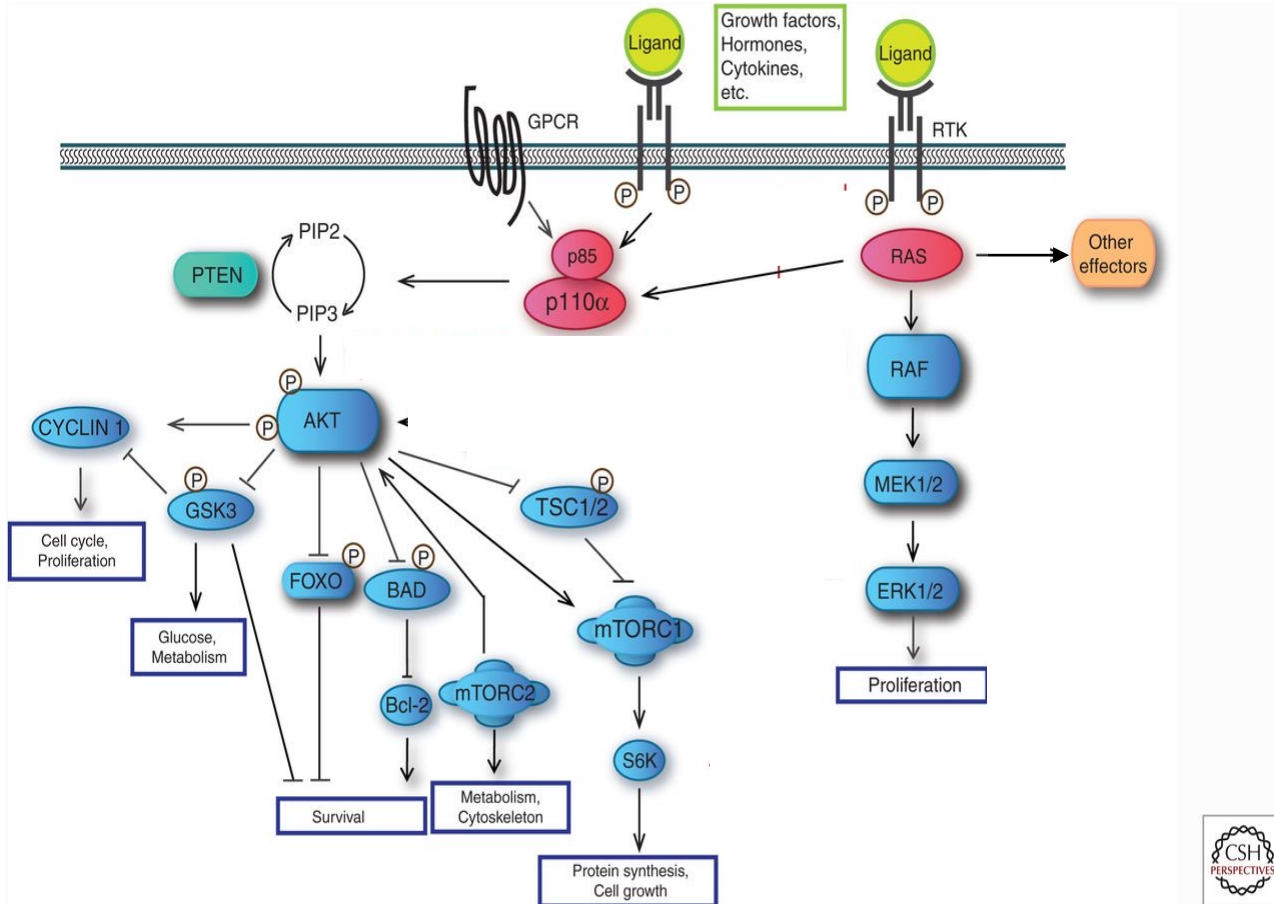
AKT fosforila diversi substrati che controllano processi cellulari fondamentali. Fra questi substrati è compreso mTORC1. AKT attiva mTORC1 inibendo gli inibitori di mTORC1 TSC2 e TSC1.

mTORC1 regola la crescita, la sintesi proteica e il metabolismo cellulare.

mTORC1 inibisce 4E-BP che inibisce eIF4E (eukariotic translation initiation factor 4E). Inoltre mTOR attiva la chinasi S6K che fosforila la proteina ribosomale S6. Questo determina un aumento della sintesi proteica della cellula.

Questa via è regolata dalla fosfatasi PTEN che converte il PIP<sub>3</sub> in PIP<sub>2</sub> inattivando la segnalazione della PI3K.

## Attivazione della via della PI3K

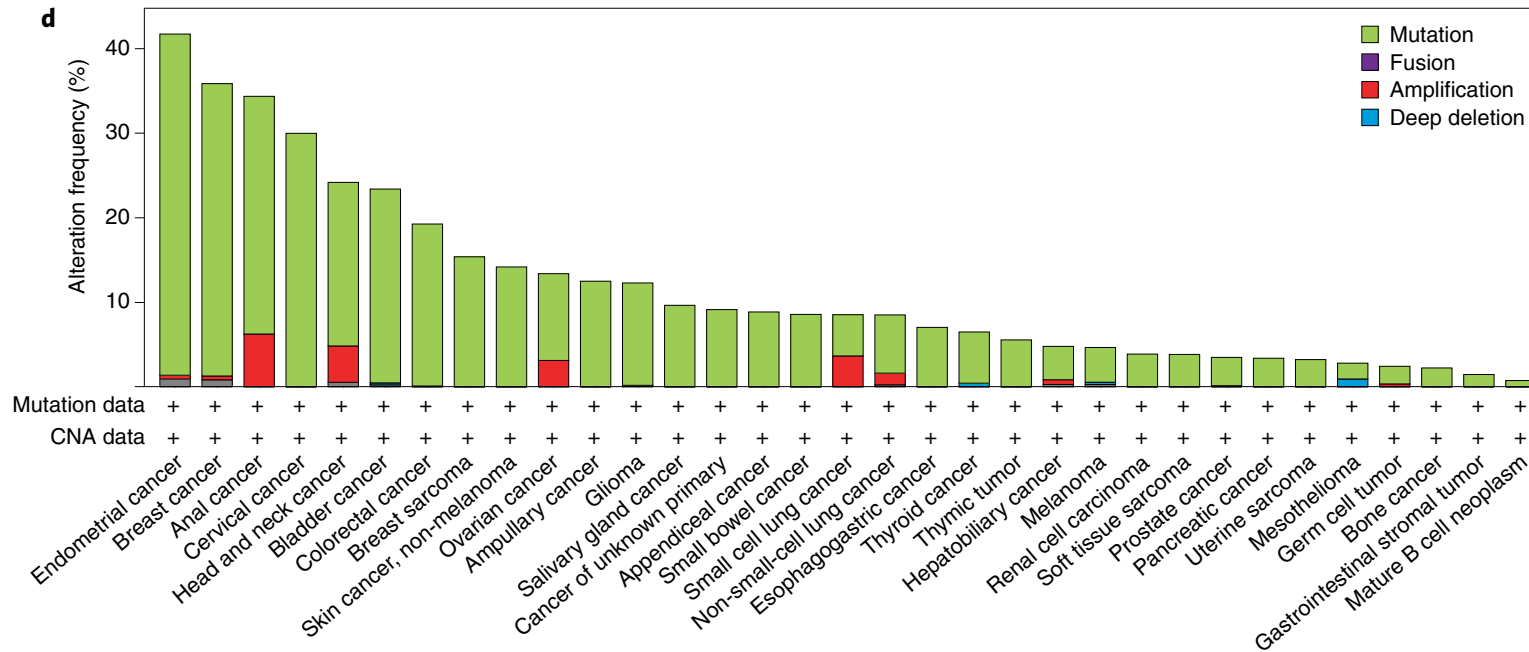


La via della PI3K può essere attivata direttamente dal recettore ad attività tirosin chinasi o attraverso RAS. L'attivazione della PI3K avviene in seguito alla dissociazione della sub-unità p85 dalla chinasi p110 $\alpha$  che fosforila il PIP2 nella membrana citoplasmatica.

Questa via è regolata dalla fosfatasi PTEN che converte il PIP<sub>3</sub> in PIP<sub>2</sub> inattivando la segnalazione della PI3K.

# Mutazioni attivanti la via di segnalazione PI3K/AKT sono frequenti nei tumori solidi umani

Frequenza delle mutazioni della PI3K

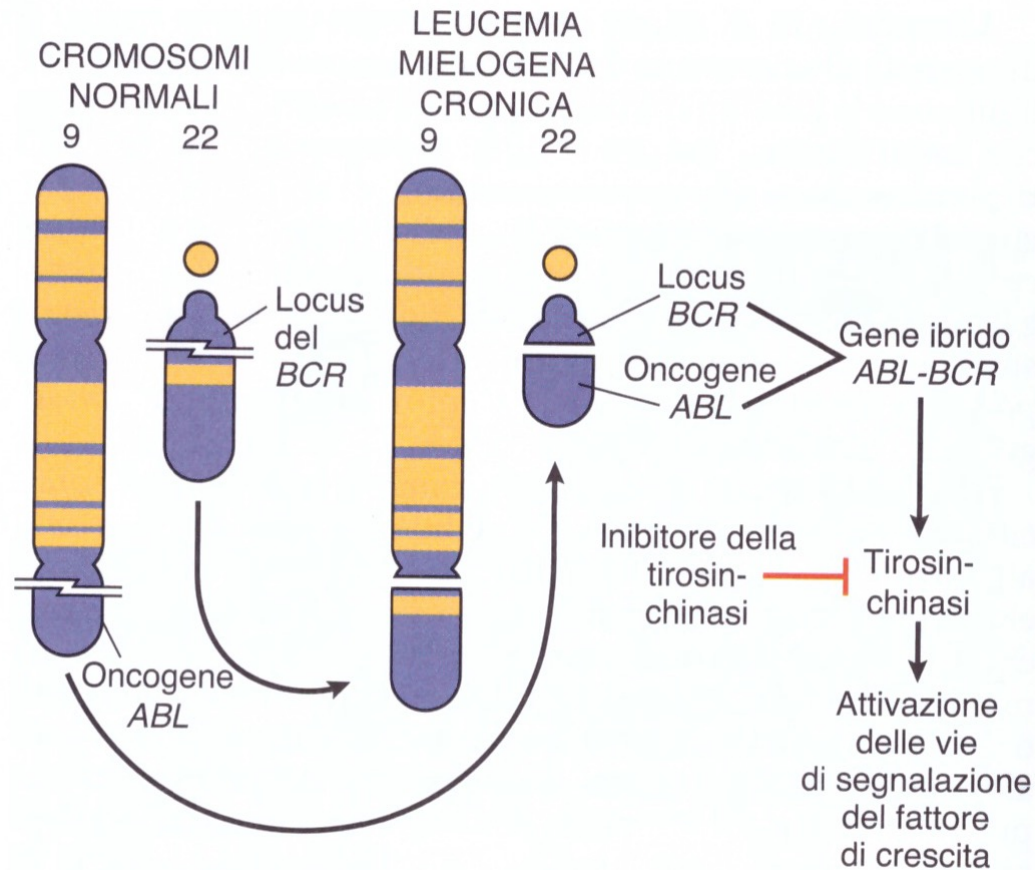


L'iper-attivazione genetica della via di segnalazione PI3K/AKT è uno dei meccanismi «driver» in molti tumori. Questo determina un aumento della proliferazione cellulare, della migrazione e dell'invasione dei tessuti.

L'analisi di tutti i tumori nel Cancer Genome Atlas ha identificato *PIK3* (*PIK3CA*) e *PTEN* come i geni che più frequentemente presentano mutazioni in più di 12 tumori solidi.

I tumori che presentano più frequentemente mutazioni attivanti di *PIK3* sono il carcinoma dell'endometrio (40%) della mammella (30%), della vescica (20%) e del colon-retto (17%).

## Mutazioni oncogeniche in proteine intracitoplasmatiche



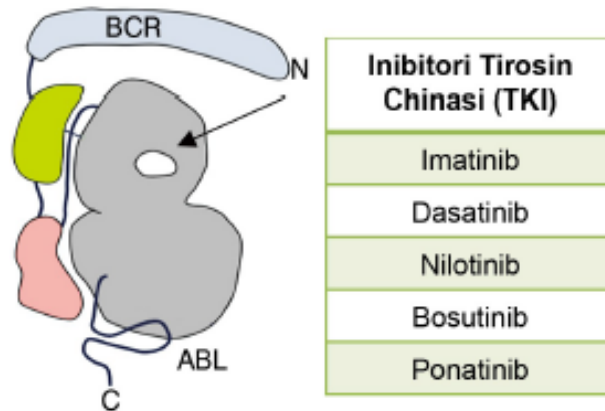
Le mutazioni oncogeniche avvengono anche in proteine localizzate nel nucleo o nel citoplasma delle cellule.

Nella leucemia mieloide cronica e in un sottogruppo di leucemia linfoblastica acuta il gene ABL è soggetto a traslocazione dalla sua normale sede sul cromosoma 9 al cromosoma 22 dove si fonde con il gene BCR dando origine al cromosoma Philadelphia. Il gene risultante codifica per una proteina chimerica BCR-ABL che ha attività tirosin chinasi costitutiva.

L'oncoproteina bcr-abl ha un'attività tirosina chinasi incontrollata, che deregola la proliferazione cellulare, diminuisce l'aderenza delle cellule leucemiche allo stroma del midollo osseo e protegge le cellule leucemiche dalla morte cellulare programmata normale (apoptosi).

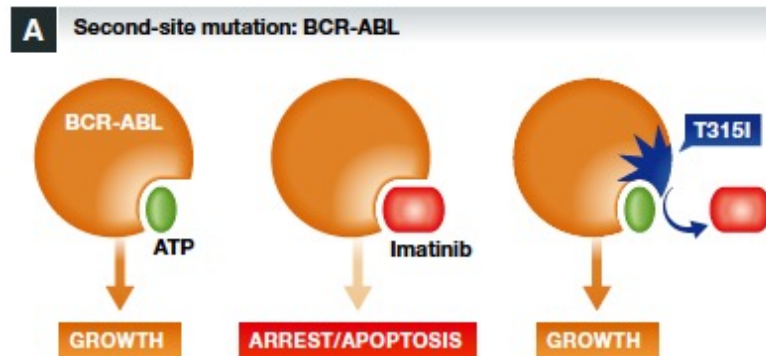
La leucemia mieloide cronica si verifica quando una cellula progenitrice ematopoietica pluripotente anormale dà inizio a un'eccessiva produzione di sole cellule di stirpe mieloide, principalmente nel midollo osseo ma anche in sedi extramidollari (p. es., milza, fegato). Benché la produzione di granulociti predomini, il clone neoplastico comprende globuli rossi, megacariociti, monociti e perfino alcune cellule T e B. Le chinasi ABL sono tirosin chinasi coinvolte nello sviluppo embrionario, nella divisione cellulare, adesione e risposta allo stress.

## Trattamento con gli inibitori della chinasi BCR-ABL

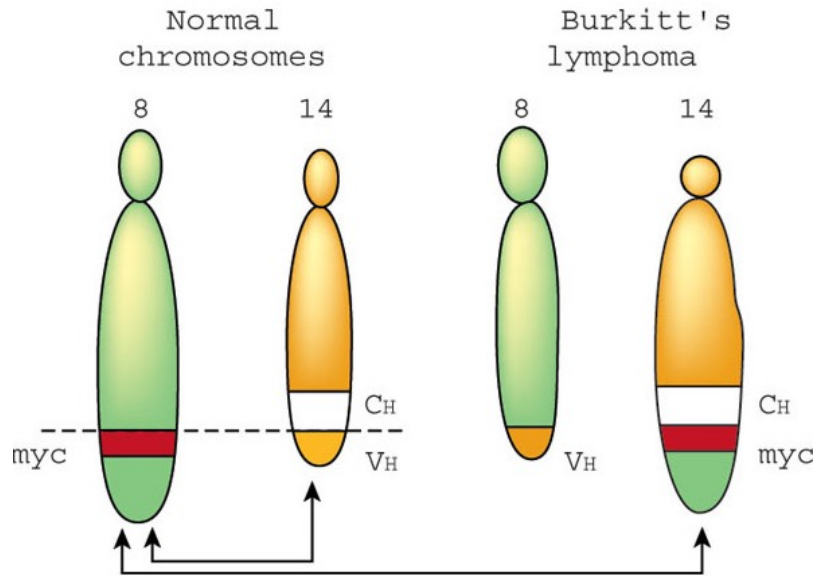


Il trattamento con inibitori della chinasi BCR-ABL rappresenta un esempio di «oncogenic target therapy» (terapia oncogene mirata). Il trattamento con l'inibitore Imatinib ha dimostrato una robusta risposta clinica in un elevata percentuale di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica dovuta alla induzione di apoptosi nelle cellule tumorali. Questo è un altro esempio di «oncogene addiction».

Nel tempo tuttavia una frazione di pazienti sviluppa resistenza al trattamento.



## Oncogeni: fattori trascrizionali



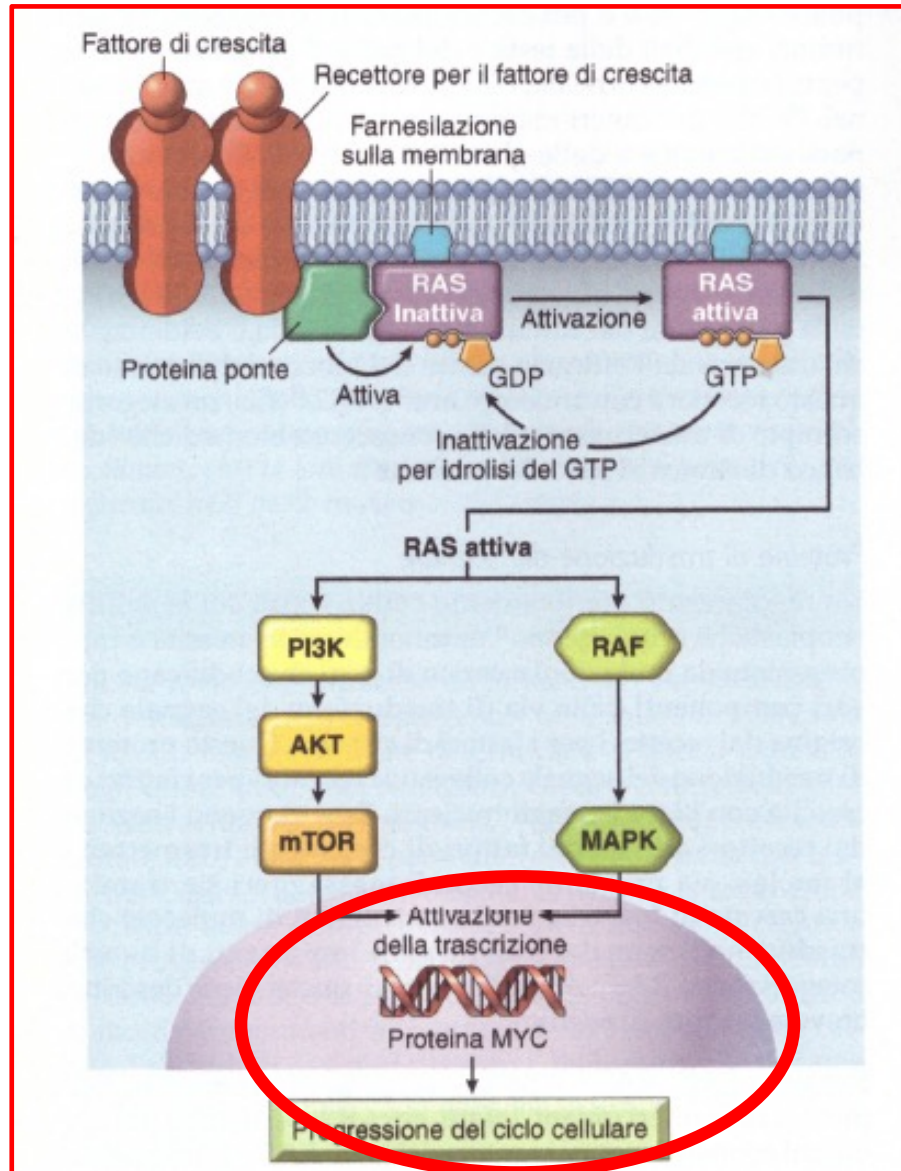
Tutte le vie di trasduzione del segnale avviate dai fattori di crescita culminano con la attivazione di fattori trascrizionali che guidano l'espressione di geni che promuovono la crescita cellulare.

L'autonomia della crescita cellulare può essere acquisita dalle cellule tumorali come conseguenza di mutazioni in geni che regolano la trascrizione del DNA.

Diverse oncoproteine fra cui MYC, JUN, FOS sono fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni che promuovono la crescita cellulare. Fra questi MYC è quello più comunemente attivato nel cancro.

L'attivazione dell'oncogene MYC è stata inizialmente descritta nel linfoma di Burkitt. MYC è trascrizionalmente attivato come conseguenza della traslocazione fra il cromosoma 8 e il cromosoma 14 nella regione contenente i geni per le immunoglobuline.

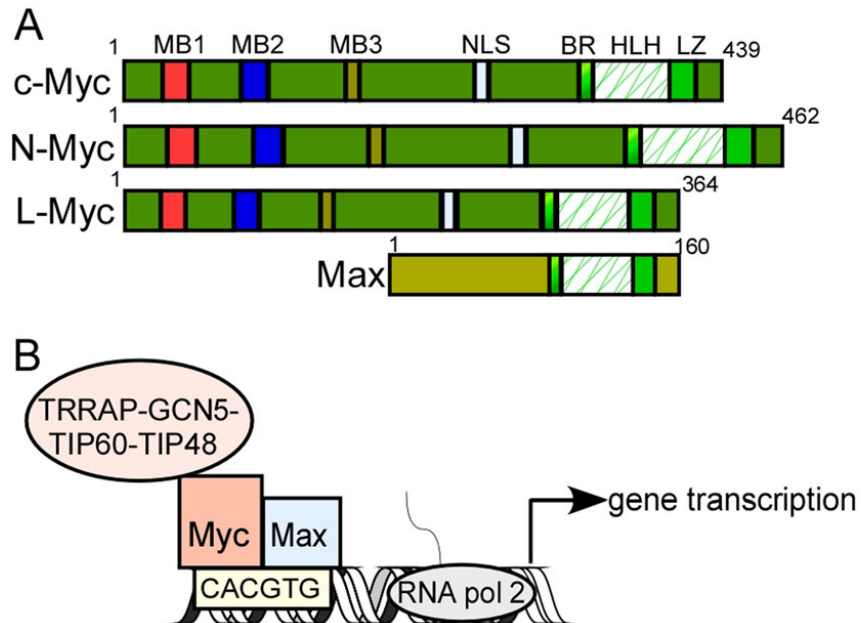
## Capacità proliferativa indipendente dalla presenza di segnali di crescita



I meccanismi che conferiscono alle cellule neoplastiche la capacità di proliferare possono interessare ognuna di queste fasi. Quindi le cellule tumorali possono

- i) produrre i fattori di crescita
- ii) avere mutazioni in recettori di crescita o alterata espressione dei recettori
- iii) avere mutazioni in componenti della cascata di trasduzione del segnale del fattore di crescita
- iv) avere mutazioni in geni che codificano per molecole che regolano la trascrizione del DNA

# La famiglia dei proto-oncogeni MYC

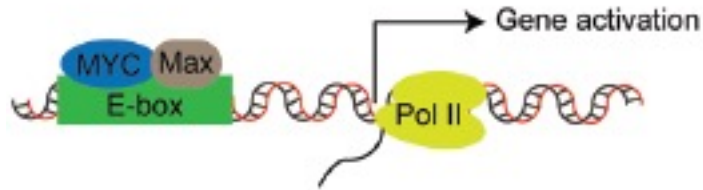


I proto-oncogeni MYC codificano per una famiglia di fattori di trascrizione a cui appartengono *MYC*, *MYCL* e *MYCN*.

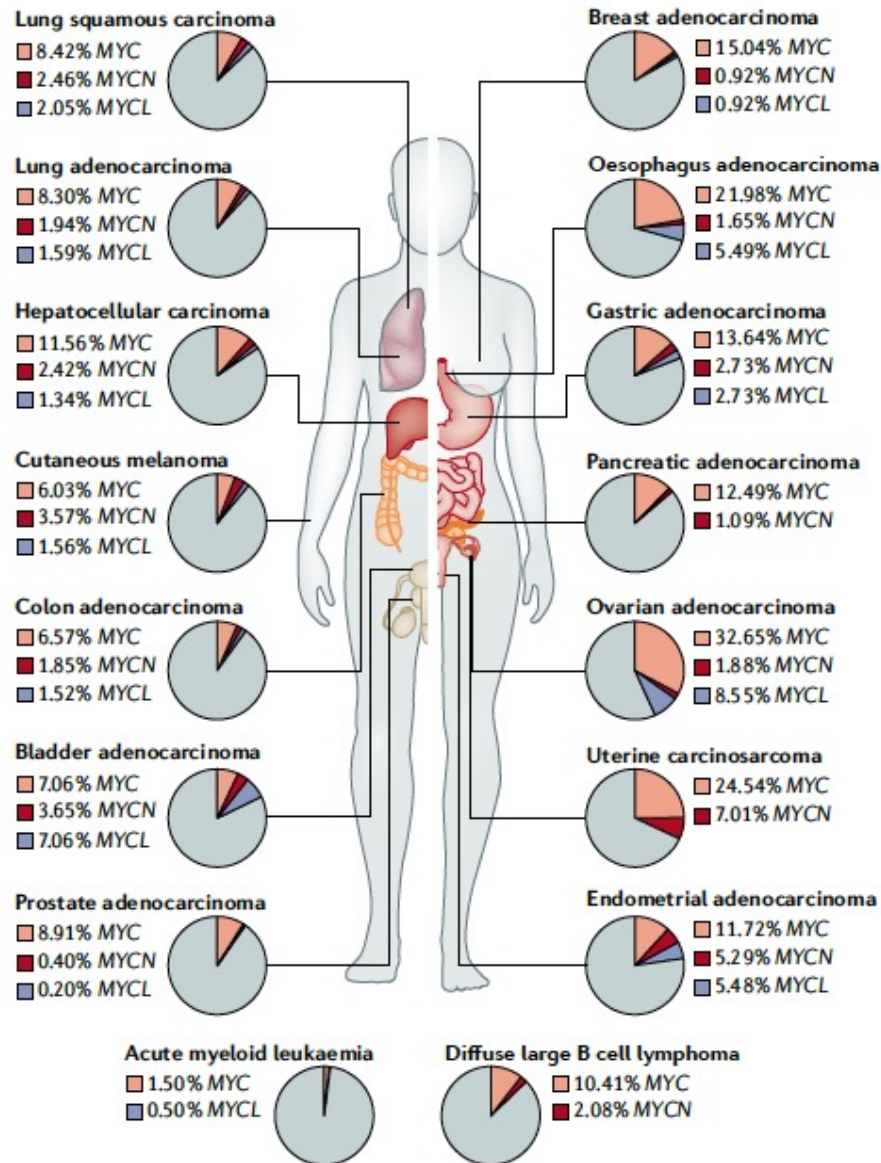
Le oncoproteine Myc regolano potenzialmente la trascrizione di almeno il 15% dell'intero genoma. I geni bersaglio di Myc includono quelli coinvolti nella biogenesi dei ribosomi, nella traduzione delle proteine, nella progressione del ciclo cellulare orchestrando diverse funzioni biologiche come la proliferazione, la sopravvivenza, il differenziamento cellulare.

## Proto-oncogene: c-MYC

- Il proto-oncogene c-MYC codifica per un fattore di trascrizione
- negli adulti è espresso nei tessuti con elevata capacità proliferativa come la pelle, l'intestino e la sua espressione correla con la proliferazione
- nelle cellule in coltura in risposta a fattori di crescita l'mRNA e la proteina c-MYC sono rapidamente espressi e la cellula entra nella fase G1 del ciclo cellulare.
- C-MYC forma un complesso eterodimerico con la molecola MAX che lega specifiche sequenze di DNA denominate E-box. Attraverso il reclutamento di molecole co-regolatorie associate alla acetilazione degli istoni aumenta l'espressione di una serie selettiva di geni.



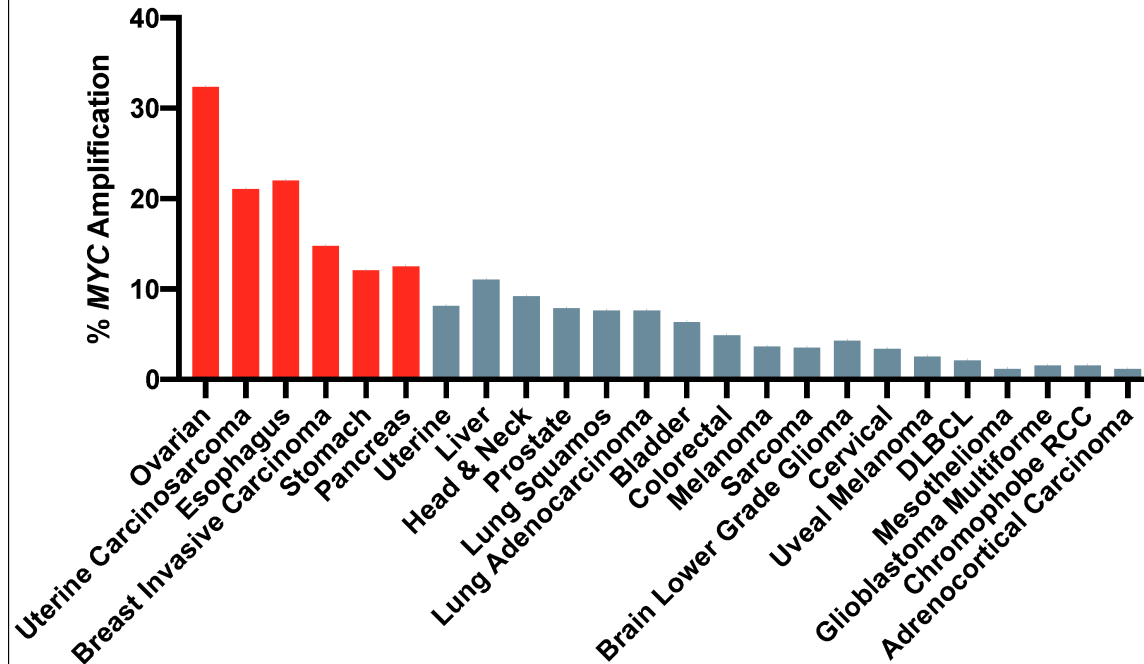
# Alterazioni dei fattori di trascrizione della famiglia MYC nei tumori umani



Alterazioni dei proto-oncogeni MYC sono riscontrate nel 28% dei tumori umani. Le alterazioni geniche includono l'amplificazione del gene, traslocazioni e mutazioni che determinano un aumento della espressione di MYC.

Fig. 1 | Major genetic alterations involving MYC and its paralogues in human cancers. Prevalence of gene amplification of the three MYC paralogues MYC, MYCL and MYCN across 16 major human cancer types in The Cancer Genome Atlas.

**MYC Amplification Across Cancers**



L'espressione di c-MYC è deregolata in un ampio numero di tumori umani.

Mutazioni puntiformi, traslocazioni cromosomiche, amplificazione genica che attivano la trascrizione o stabilizzano MYC sono state osservate in numerosi tumori umani.

## Meccanismi di attivazione di MYC nei tumori

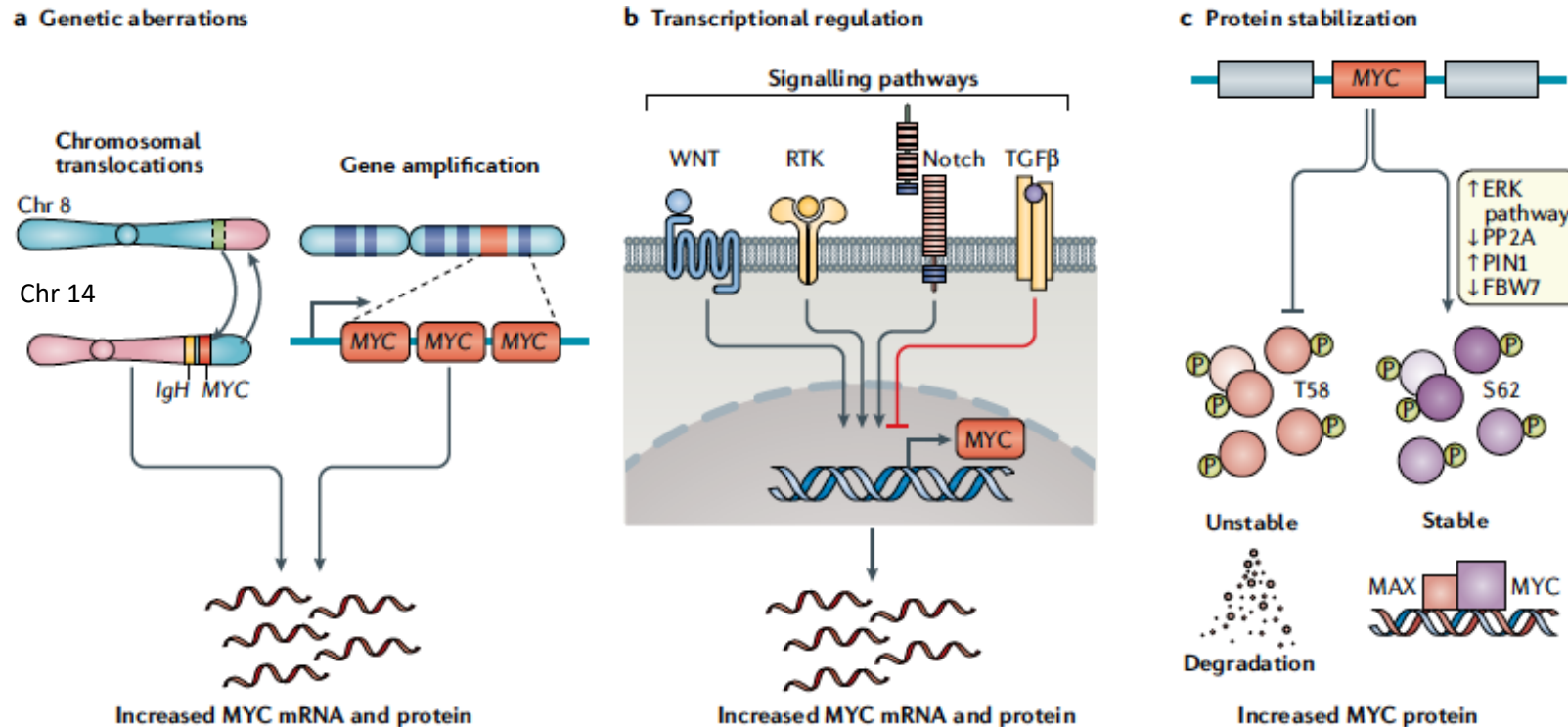
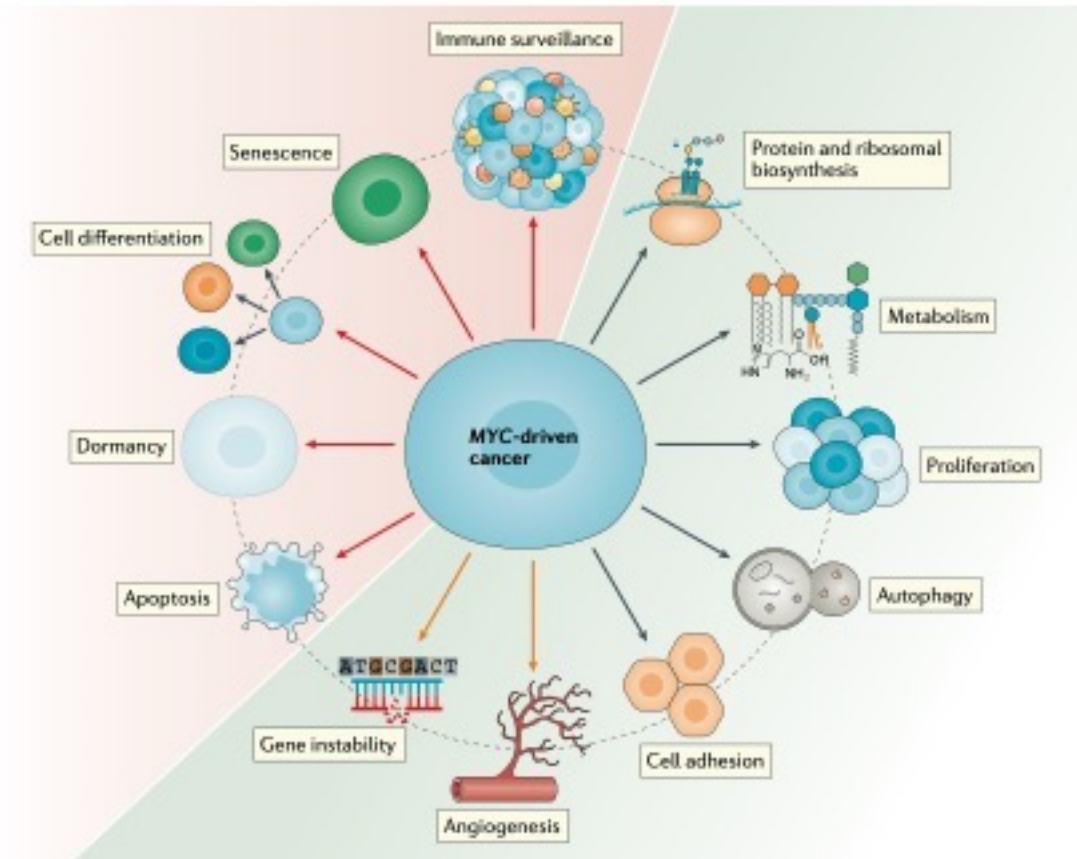


Fig. 2 | **Mechanisms leading to MYC activation in human cancers.** **a** | Genetic aberrations, such as chromosomal translocations and genomic amplifications, lead to increased MYC mRNA expression. **b** | Alteration of upstream regulatory pathways can lead to increased or decreased transcription of the MYC oncogene. **c** | Post-translational modifications of the MYC protein, such as preferential phosphorylation of the serine 62 (S62) residue versus threonine 58 (T58), can block degradation and promote stabilization of MYC, thereby enhancing activation of the MYC pathway.

MYC è amplificato in tumori solidi umani come il tumore della mammella e del fegato. Nelle leucemie T e B e nei linfomi l'attivazione di MYC è conseguente a traslocazione cromosomica. Inoltre l'espressione di MYC può essere aumentata dall'attivazione anomala delle vie di segnalazione oncogeniche come quelle mediate dai recettori ad attività tirosin chinasi (RTK), WNT, Notch o attraverso la perdita di oncosoppressori come il TGF-beta. MYC può essere attivata da modificazioni della stabilità della proteina attraverso l'aumento della forma fosforilata in serina 62 rispetto a quella fosforilata in treonina 58. La via di segnalazione RAS-MEK (MAPKK)-ERK (MAPK) aumenta i livelli di MYC S62 stabilizzando la proteina.

## Effetti dell'attivazione di MYC nelle cellule tumorali

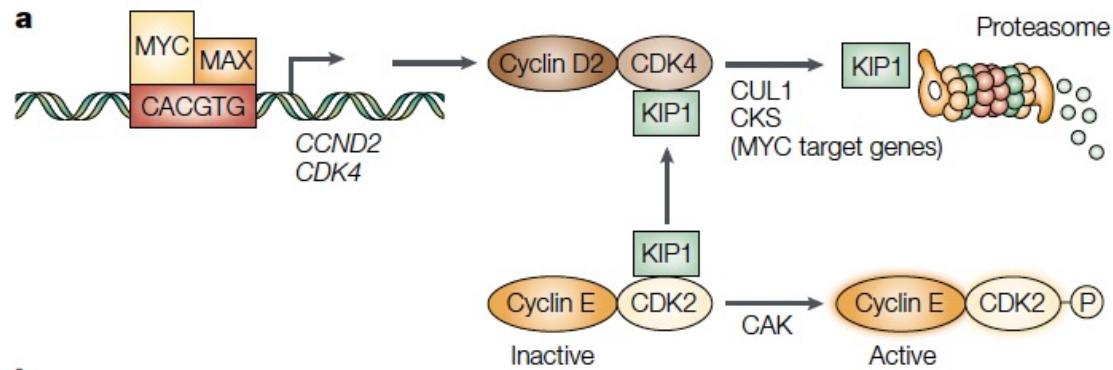


L'attivazione di MYC da sola non è sufficiente a indurre la trasformazione neoplastica nelle cellule non maligne. L'over-espressione di MYC nelle cellule normali induce l'arresto del ciclo cellulare, la morte cellulare. Per questo l'inattivazione di geni oncosoppressori o regolatori dell'apoptosi è necessaria per la trasformazione tumorale.

Nelle cellule normali l'espressione di MYC è strettamente controllata. L'overespressione di MYC promuove la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali attraverso:

- i) l'aumento della sintesi proteica e dei ribosomi
- ii) modificazioni del metabolismo che facilitano l'assorbimento di nutrienti. Es: l'induzione di trasportatori del glucosio e della glutammina
- iii) lo shift metabolico dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi (effetto Warburg)
- iv) L'aumento di espressione dei geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare come la ciclina D.

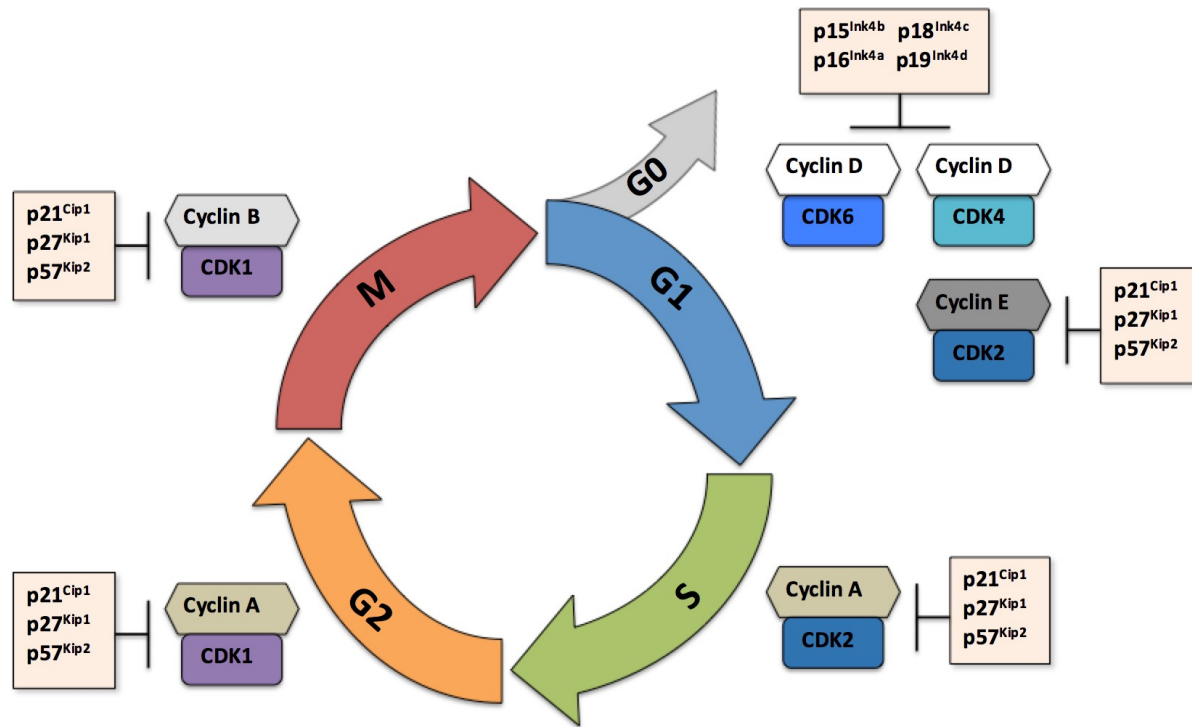
## C-MYC e proliferazione cellulare



C-MYC promuove la proliferazione cellulare inducendo:

- l'espressione delle cicline D
- la degradazione dell'inibitore KIP1 (p27) attraverso i suoi geni target CUL1 e CKS.

# Ciclo cellulare



L'esito finale di tutti gli stimoli che promuovono la crescita cellulare è l'ingresso delle cellule nel ciclo cellulare.

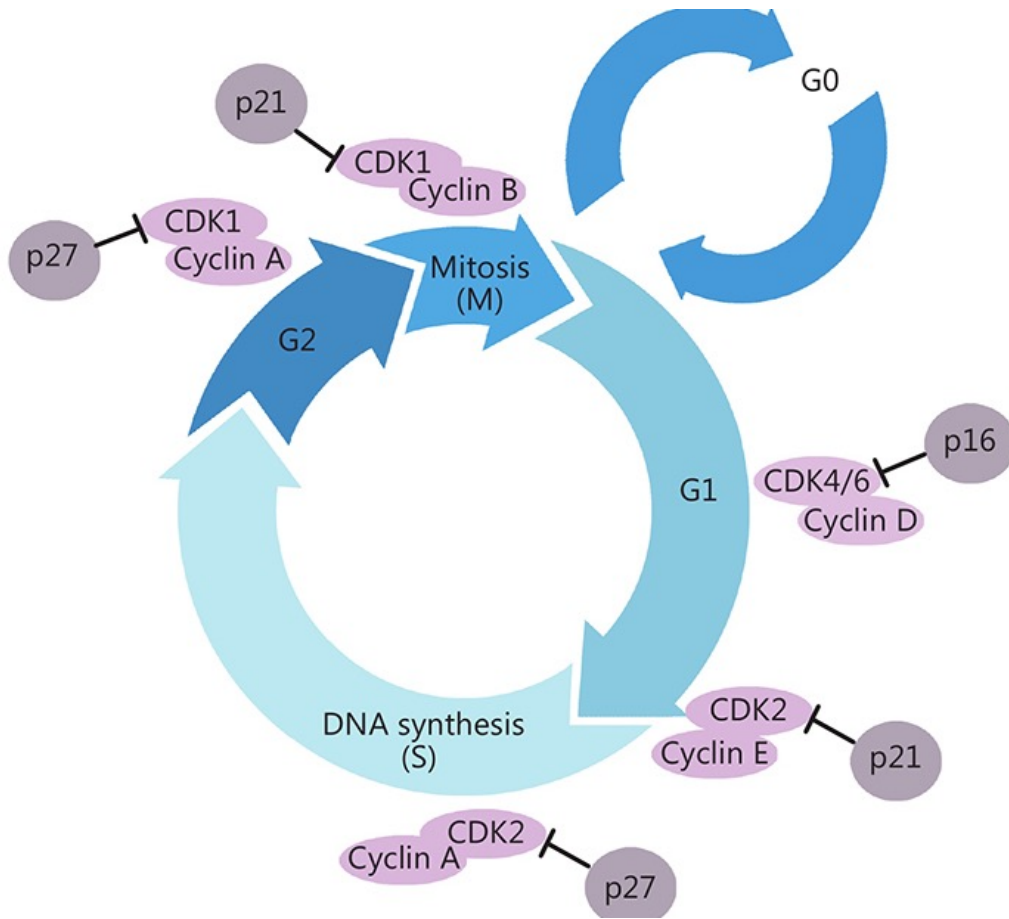
I tumori possono proliferare in modo autonomo nel caso in cui i geni codificanti molecole che regolano il ciclo cellulare diventano deregolati a causa di mutazioni o amplificazioni.

La replicazione delle cellule prevede la duplicazione del DNA e la divisione cellulare che dà origine a due cellule figlie. Per poter duplicare la cellula va incontro ad una serie di eventi ordinati che prende il nome di ciclo cellulare.

Il ciclo cellulare consiste di 4 fasi G1 (presintetica), S (sintesi del DNA) G2 (premitotica) M (mitosi).

Il ciclo cellulare è controllato da numerose molecole e ciascuna fase del ciclo cellulare dipende dall'attivazione appropriata della fase precedente.

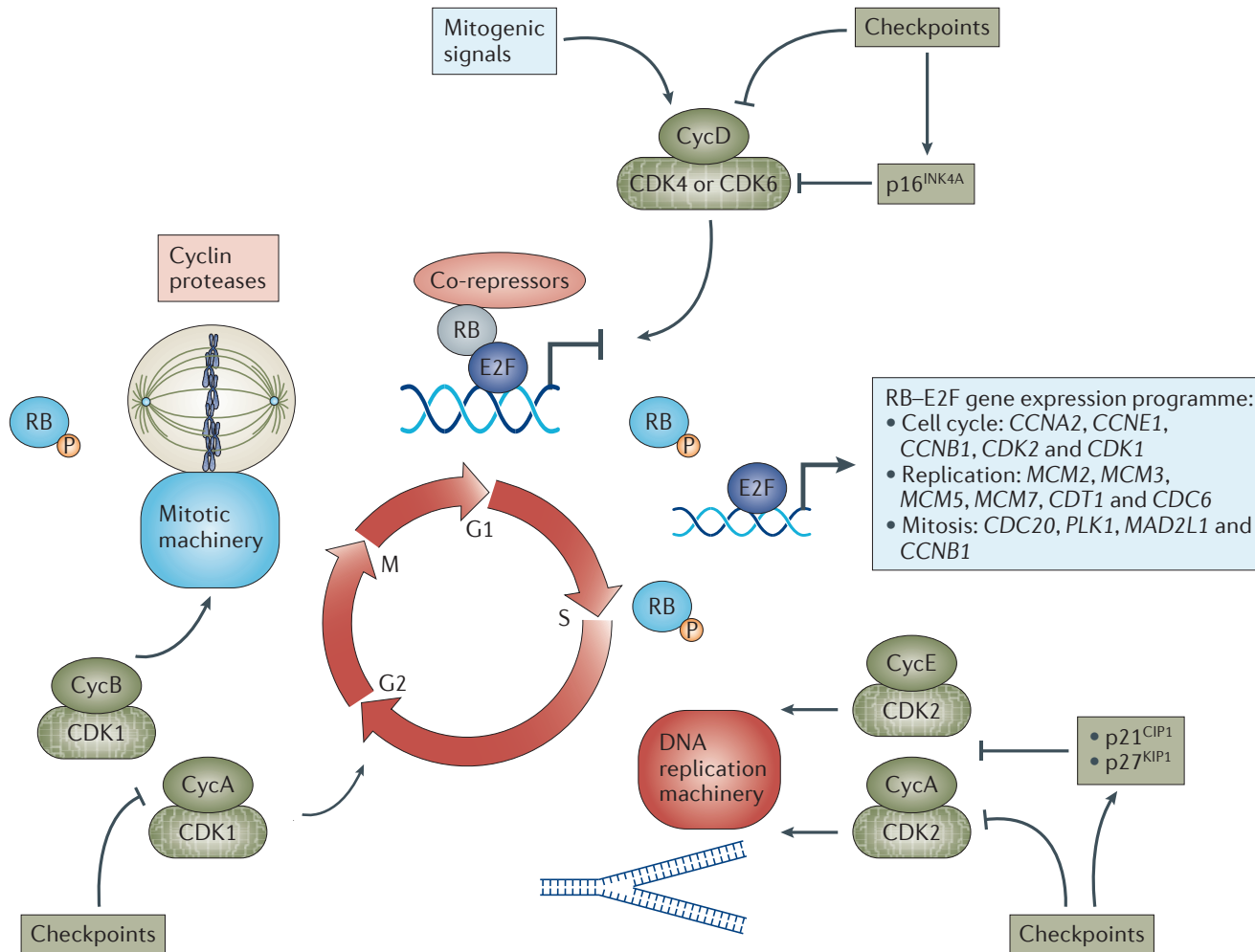
## I complessi CDK-ciclina



Ogni fase del ciclo cellulare è strettamente regolata dalle CDK (cyclin dependent kinase) che sono serin/treonin chinasi con i loro partner le cicline. Le CDK sono inibite da inibitori denominati CDKI.

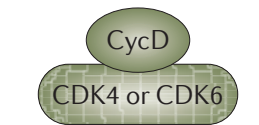
Le diverse fasi del ciclo cellulare richiedono diverse cicline e CDK. Le cicline D (D1, D2, D3) si associano alle CDK4 e CDK6 e sono essenziali per l'entrata in G1. La ciclina E associata alla CDK2 regola la tarda fase G1. La ciclina A associata alla CDK2 controlla la sintesi del DNA e la replicazione in fase S. La ciclina A si associa alla CDK1 per promuovere l'entrata in fase M. La mitosi è promossa dalla CDK1 ciclina B.

# Progressione del ciclo cellulare



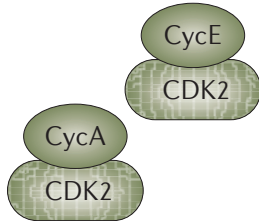
## CDK-Cyc complex

## Function



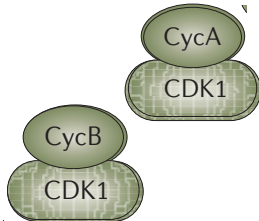
G1-S progression:

- Phosphorylation of RB stimulates E2F
- Accumulation of FOXM1



G1-S progression (DNA replication):

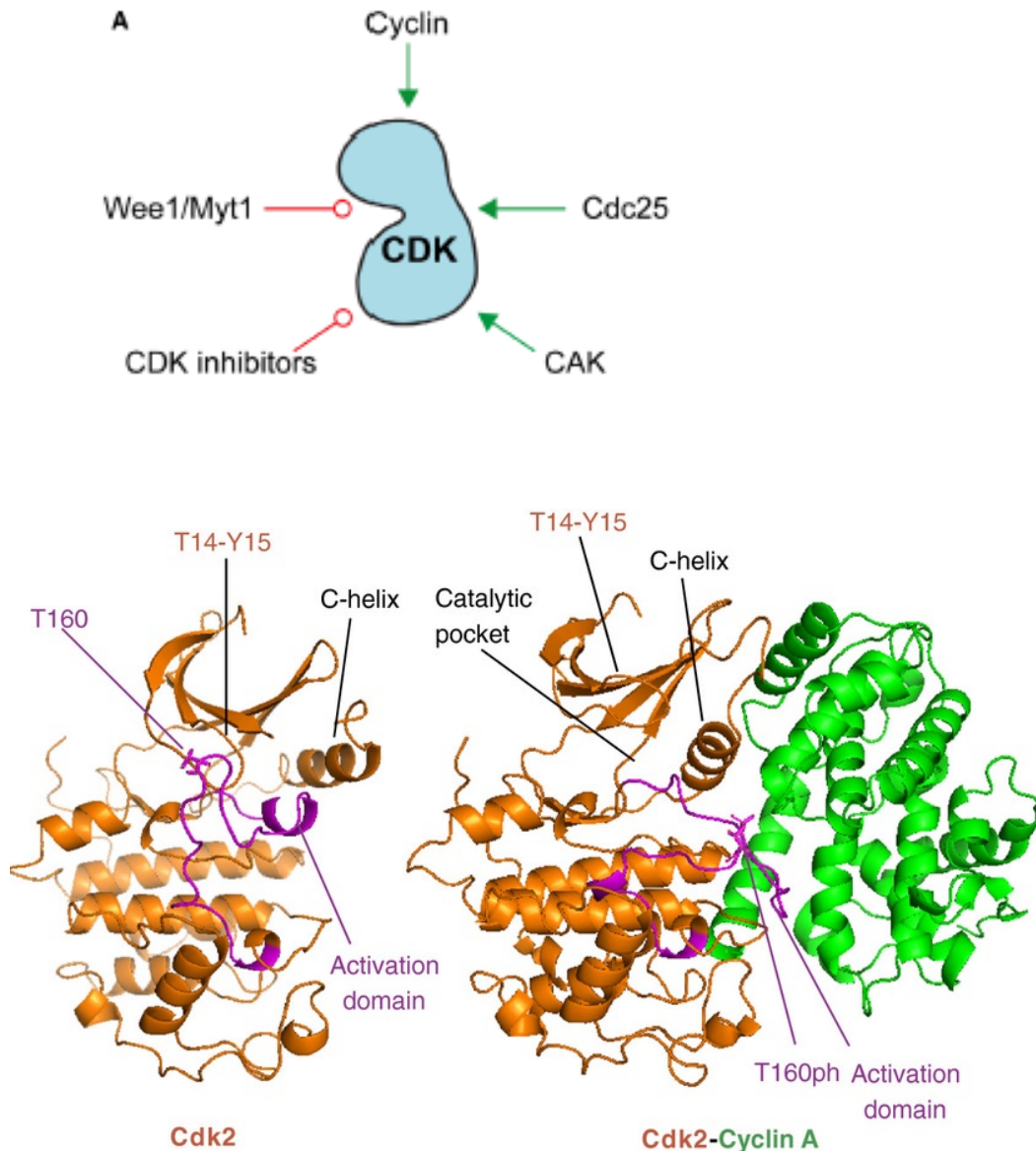
- Hyperphosphorylation of RB
- Centrosome duplication
- Induction of histone synthesis
- Phosphorylation of replication factors



G2-M progression (mitotic entry):

- Nuclear envelope breakdown
- Mitotic condensation
- Spindle assembly

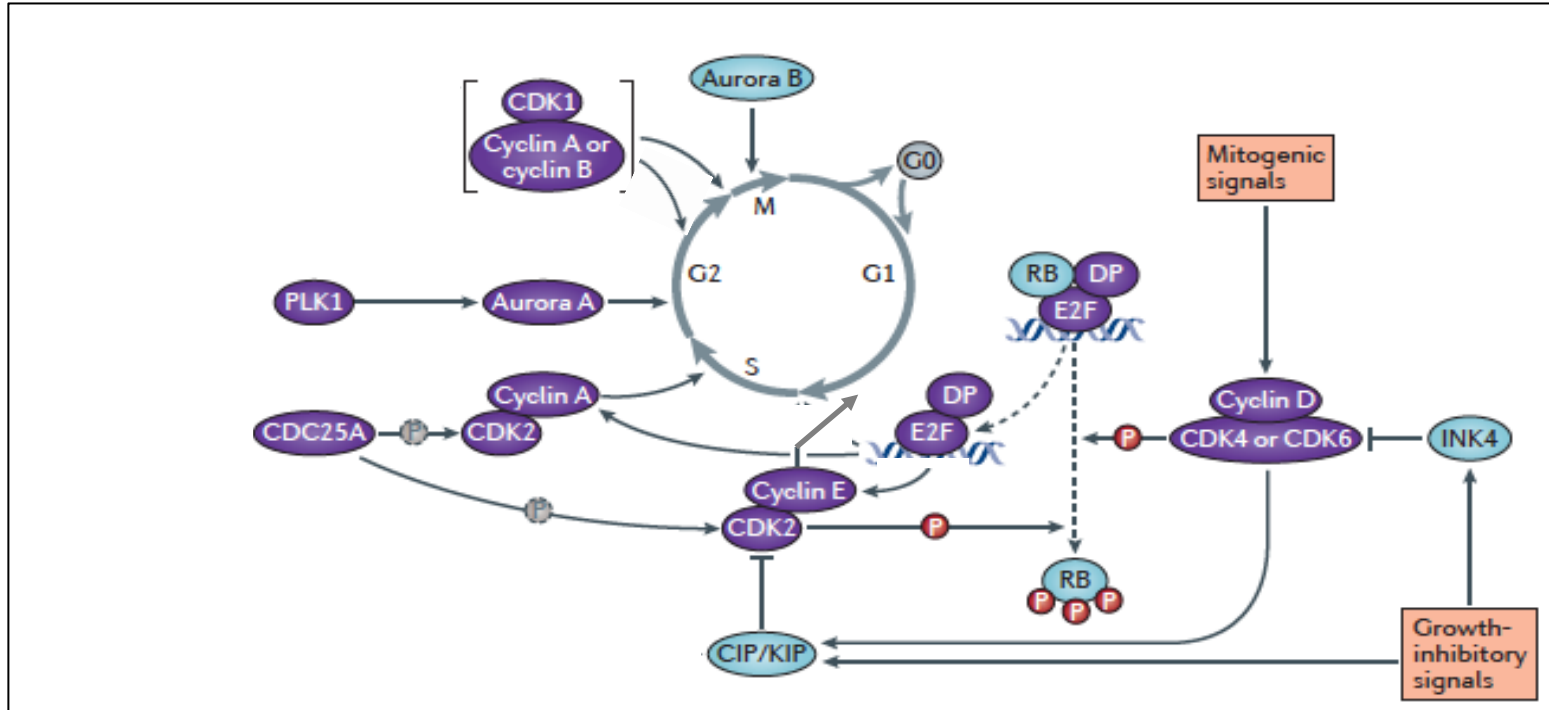
# Meccanismi di regolazione delle chinasi ciclina dipendenti



L'attività delle chinasi ciclina dipendenti è controllata a diversi livelli:

- legame con le cicline specifiche
- fosforilazione da parte delle chinasi attivanti le CDK (CAK)
- interazione con gli inibitori
- fosforilazioni inibitorie

## Progressione del ciclo cellulare e principali regolatori

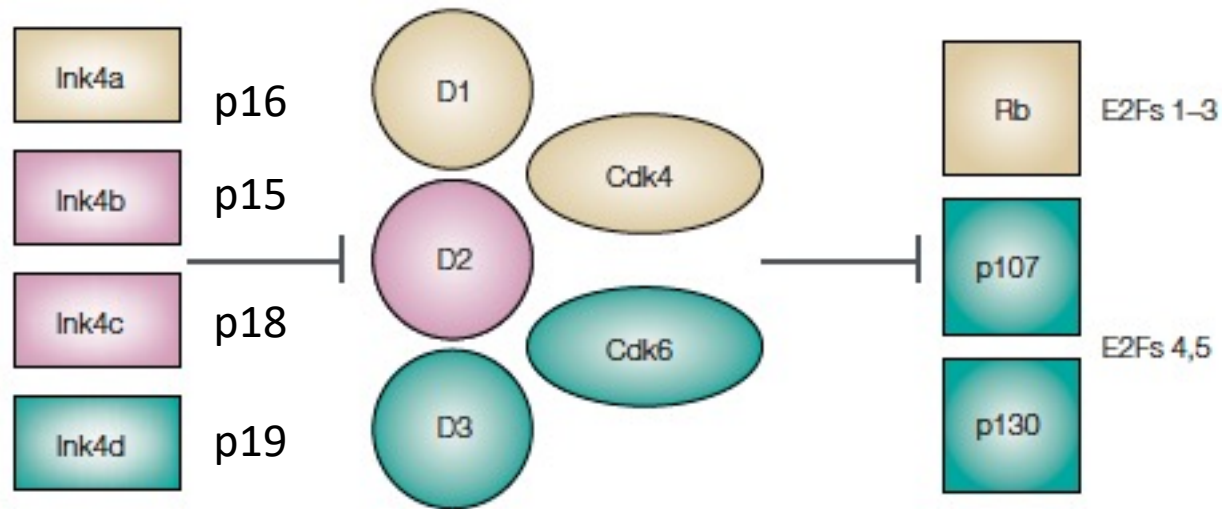


L'attività delle chinasi ciclina dipendenti è regolata dalla associazione con gli inibitori CKI (inibitori delle chinasi ciclina dipendenti).

I CKI includono:

- i membri della famiglia INK4 (p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup>, p19<sup>INK4D</sup>) che si legano alle CDK4 e CDK6 e bloccano l'associazione alle cicline D.
- i membri della famiglia Cip/Kip (p21, p27, p57) che si legano e inibiscono l'attività chinasi delle CDK2 e CDK1.

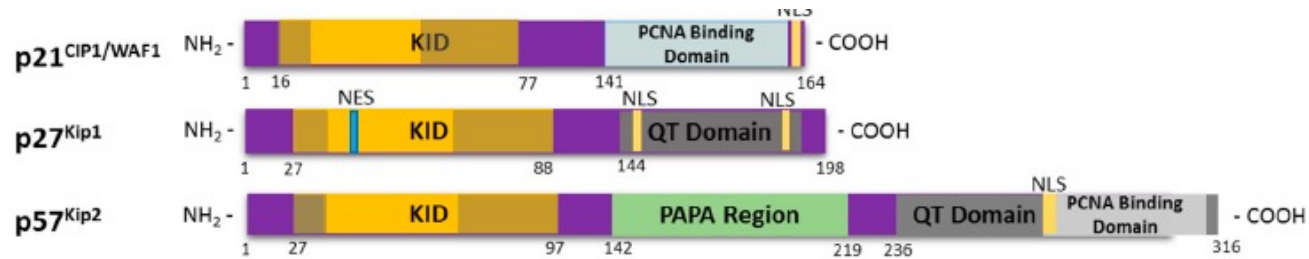
## La famiglia INK4



Gli inibitori del ciclo cellulare denominati p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c, and p19INKd inibiscono le CDK4 e CDK6 inducendo un cambio conformazionale della chinasi che abroga la sua capacità di legare le cicline D. Questo impedisce la fosforilazione della proteina retinoblastoma da parte dei complessi CDK4/6-ciclina D e di conseguenza la progressione della cellula nel ciclo cellulare. Le proteine p15 e p16 hanno una omologia dell'85%.

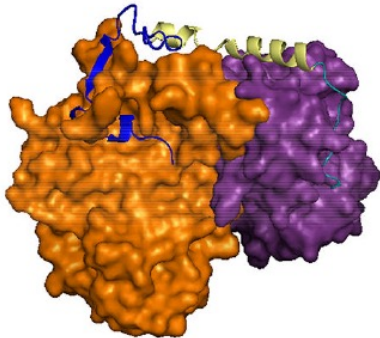
# Proteine CIP/KIP

## Struttura delle proteine della famiglia CIP/KIP

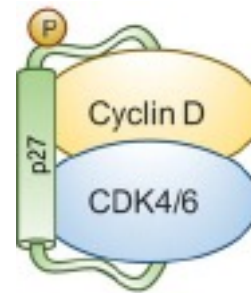


L'attività delle CDK1/2 è regolata negativamente dalle proteine della famiglia Cip/Kip a cui appartengono p21<sup>CIP/WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>. Queste proteine inibiscono le CDK1/2 complessate alle cicline A/E/B mentre favoriscono l'assemblaggio dei complessi CDK4/6 ciclina D.

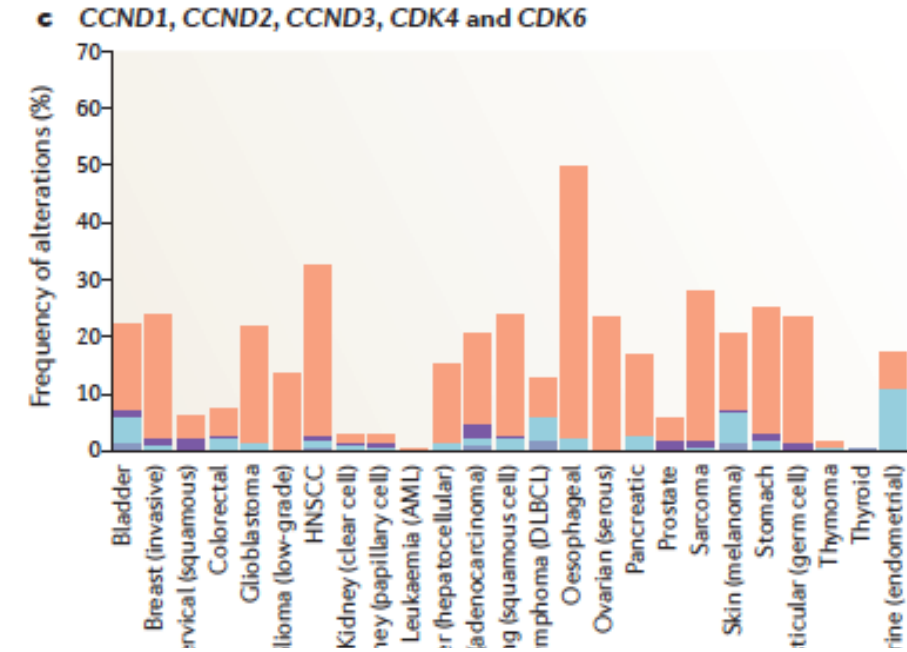
A.



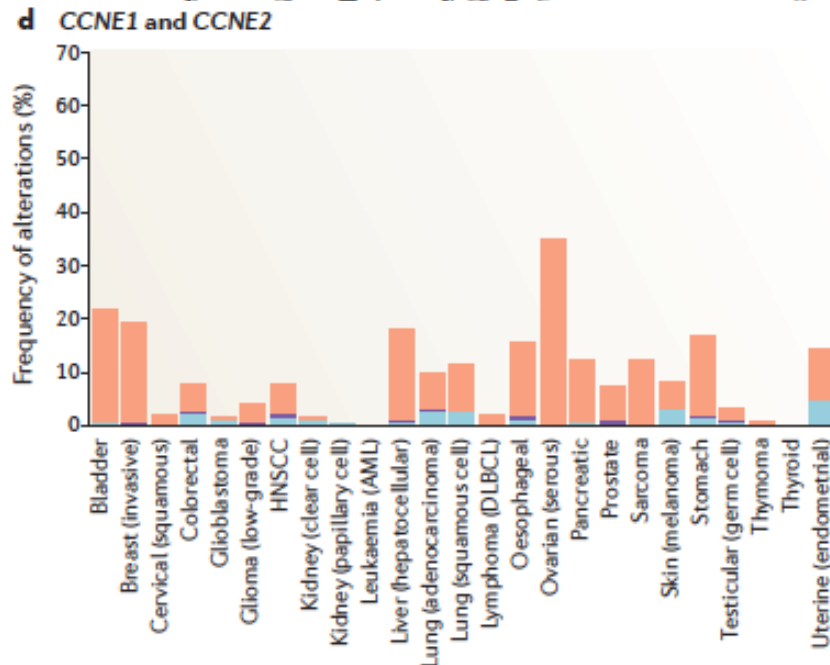
Struttura cristallografica della CDK2/ciclina A con p27



# Oncogeni codificanti molecole che regolano la fase G1 del ciclo cellulare



Componenti dei complessi CDK cicline della fase G1 sono frequentemente mutati nei tumori umani. Il gene delle cicline D è spesso amplificato nei tumori umani. Il gene *CDK4* è amplificato nel 50% dei glioblastomi mentre presenta una mutazione puntiforme che impedisce l'interazione con gli inibitori della famiglia INK4 causando l'attivazione della chinasi nei melanomi.



Amplification Deletion Point mutation Multiple alterations

# Oncogeni

| Categoria                                               | Proto-oncogene     | Modalità di attivazione                     | Tumore umano associato                                                                   |
|---------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fattori di crescita</b>                              |                    |                                             |                                                                                          |
| PDGFb                                                   | PDGFB              | Iperespressione                             | Astrocitoma                                                                              |
| Fattori di crescita fibroblastici                       | HST1               | Iperespressione                             | Osteosarcoma                                                                             |
|                                                         | FGF3               | Amplificazione                              | Tumore dello stomaco<br>Tumore della vescica<br>Tumore della mammella<br>Melanoma        |
| TGFa                                                    | TGFA               | Iperespressione                             | Astrocitomi                                                                              |
| HGF                                                     | HGF                | Iperespressione                             | Carcinomi epatocellulari<br>Tumore della tiroide                                         |
| <b>Recettori per fattori di crescita</b>                |                    |                                             |                                                                                          |
| Famiglia dei recettori dell'EGF                         | ERBB1 (EGFR)       | Mutazione                                   | Adenocarcinoma polmonare                                                                 |
|                                                         | ERBB2 (HER)        | Amplificazione                              | Carcinoma della mammella                                                                 |
| Tirosin-chinasi 3 FMS-simile                            | FLT3               | Mutazione puntiforme o piccole duplicazioni | Leucemia                                                                                 |
| Recettore per i fattori neurotrofici                    | RET                | Mutazione puntiforme                        | Neoplasie endocrine multiple di tipo 2A e B, carcinomi midollari familiari della tiroide |
| Recettore per il PDGF                                   | PDGFRB             | Amplificazione, traslocazione               | Gliomi, leucemie                                                                         |
| Recettore per il ligando KIT                            | KIT                | Mutazione puntiforme                        | Tumori stromali gastrointestinali, seminomi, leucemie                                    |
| Recettore per ALK                                       | ALK                | Traslocazione, mutazione puntiforme         | Adenocarcinoma del polmone, alcuni linfomi<br>Neuroblastoma                              |
| <b>Proteine coinvolte nella trasduzione dei segnali</b> |                    |                                             |                                                                                          |
| Leganti GTP (G)                                         | KRAS               | Mutazione puntiforme                        | Tumori del colon, del polmone e del pancreas                                             |
|                                                         | HRAS               | Mutazione puntiforme                        | Tumori della vescica e del rene                                                          |
|                                                         | NRAS               | Mutazione puntiforme                        | Melanomi, neoplasie ematologiche                                                         |
|                                                         | GNAQ               | Mutazione puntiforme                        | Melanoma uveale                                                                          |
|                                                         | GNAS               | Mutazione puntiforme                        | Adenoma della ghiandola pituitaria, altri tumori endocrini                               |
| Tirosin-chinasi non recettoriale                        | ABL                | Traslocazione                               | Leucemia mieloide cronica<br>Leucemia linfoblastica acuta                                |
| Trasduzione del segnale RAS                             | BRAF               | Mutazione puntiforme                        | Melanomi, leucemie, carcinoma del colon, altro                                           |
| Trasduzione del segnale Notch                           | NOTCH1             | Mutazione puntiforme, traslocazione         | Leucemie, linfomi, carcinomi della mammella                                              |
| Trasduzione del segnale JAK/STAT                        | JAK2               | Mutazione puntiforme, traslocazione         | Malattie mieloproliferative<br>Leucemia linfoblastica acuta                              |
| <b>Proteine di regolazione nucleare</b>                 |                    |                                             |                                                                                          |
| Attivatori trascrizionali                               | MYC                | Traslocazione                               | Linfoma di Burkitt                                                                       |
|                                                         | N-MYC              | Amplificazione                              | Neuroblastoma                                                                            |
| <b>Regolatori del ciclo cellulare</b>                   |                    |                                             |                                                                                          |
| Cicline                                                 | CCND1 (ciclina D1) | Traslocazione<br>Amplificazione             | Linfoma mantellare, mieloma multiplo<br>Tumore della mammella e dell'esofago             |
| Chinasi ciclina-dipendente                              | CDK4               | Amplificazione o mutazione puntiforme       | Glioblastoma, melanoma, sarcoma                                                          |