

Meccanismi di attivazione degli oncogeni

I proto-oncogeni sono geni che normalmente aiutano la cellula a crescere e dividersi per dare origine a altre cellule. Quando un proto-oncogene muta o sono presenti troppe copie di esso, può attivarsi anche quando non dovrebbe e viene definito oncogene.

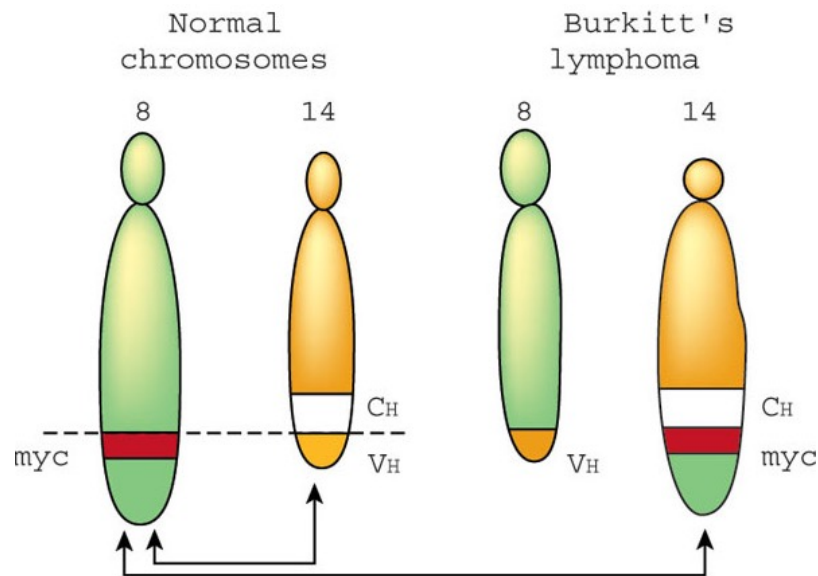
Gli oncogeni mediano la crescita incontrollata della cellula favorendo la trasformazione tumorale.

Gli oncogeni possono attivarsi in diversi modi:

- **Mutazioni geniche:** Acquisizioni di differenze nella sequenza genica del proto-oncogene che ne causano l'attivazione. Questi cambiamenti nella sequenza possono essere ereditati da un genitore o possono insorgere durante il corso della vita a causa di errori durante la duplicazione del DNA.
- **Cambiamenti epigenetici:** Modificazioni dell'espressione genica attraverso modificazioni del DNA (metilazione) o degli istoni (acetilazione).
- **Riarrangiamenti cromosomici**
- **Duplicazione genica**

Il danno genetico che attiva gli oncogeni

Tutti i tipi di riarrangiamento cromosomico (traslocazioni, inversioni, amplificazioni e delezioni) possono attivare proto-oncogeni. Le traslocazioni cromosomiche sono il meccanismo più comune. Un esempio è il linfoma di Burkitt in cui avviene la traslocazione fra il cromosoma 8q24 dove risiede il gene MYC sul cromosoma 14q32 dove si localizza il gene codificante la catena pesante delle Immunoglobuline.



Il danno genetico che attiva gli oncogeni

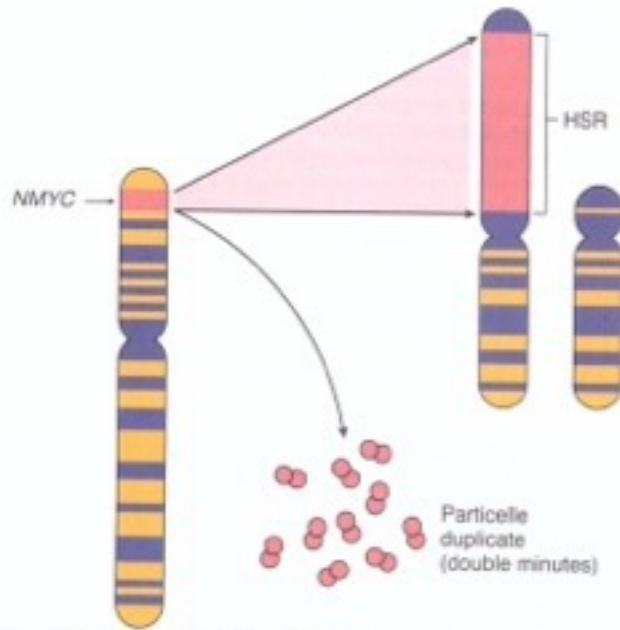


Figura 7.24 Amplificazione del gene *NMYC* nel neuroblastoma umano. Il gene *NMYC*, normalmente presente sul cromosoma 2p, è amplificato e si presenta sotto forma di particelle duplicate extracromosomiche (double minutes) o di regioni uniformemente colorate (HSR, Homogeneous Staining Region) integrate nel cromosoma. L'integrazione può coinvolgere altri autosomi, quali il 4, il 9 o il 13. (Modificata da Brodeur GM: Molecular correlates of cytogenetic abnormalities in human cancer cells: implications for oncogene activation. In Brown EB [editor] Progress in Hematology, vol 14, Orlando, Fla, Grune & Stratton, pp. 229-256.)

L'iperespressione di oncogeni può essere causata da duplicazioni e amplificazioni delle loro sequenze di DNA.

I geni amplificati possono dare origine a strutture multiple extracromosomiche chiamate particelle duplicate o a regioni a colorazione omogenea che derivano dall'inserimento dei geni amplificati in nuove collocazioni cromosomiche che possono essere distanti dalla collocazione normale.

Insensibilità ai segnali di inibizione della crescita

Table 1. Representative Tumor Suppressor Genes			
Gene	Function	Familial Cancer Association	Other Major Tumor Types
p53	Transcription factor	Li-Fraumeni syndrome	>50% of cancers
RB	Transcriptional corepression	Retinoblastoma	Many
INK4a (p16)	Cdk inhibitor (RB activation)	Melanoma	Many
ARF	Mdm2 antagonist (p53 activation)	Melanoma	Many
APC	Wnt/Wingless signaling	Familial adenomatous polyposis	Colorectal cancer
PTCH	Hedgehog signaling (receptor)	Basal cell nevus (Gorlin) syndrome	Medulloblastoma, basal cell carcinoma, rhabdomyosarcoma
SMAD4/DPC4	TGF- β signaling (Transcription factor)	Juvenile polyposis (hamartomas)	Pancreatic and colon cancer
PTEN	Lipid phosphatase (phosphoinositide metabolism)	Cowden syndrome	Glioblastoma, endometrial, thyroid, and prostate cancers
TSC1,2	GTPase activating protein complex (mTOR inhibition)	Tuberous sclerosis (hamartomas)	Renal cell carcinoma (rare), angiofibromas
NF1	GTPase activating protein for Ras	Neurofibromatosis	Sarcomas, gliomas
WT1	Transcription factor	Wilm's tumor	
MSH2 and MLH1	DNA mismatch repair	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)	Endometrial, gastric, ovarian, bladder cancer
ATM	DNA damage sensor (protein kinase)	Ataxia telangiectasia (T-cell lymphoma)	Lymphoreticular malignancies
NBS1	DNA repair, S phase checkpoint control	Nijmegen breakage syndrome (T cell lymphoma)	Lymphoreticular malignancies
CHK2	Protein kinase (G1 checkpoint control)	Li-Fraumeni syndrome	
BRCA1, BRCA2	DNA repair	Familial breast and ovarian cancer	
FA genes	DNA repair, S phase checkpoint	Fanconi Anemia	Acute myelogenous leukemia
VHL	E3 ligase recognition factor for HIF α	Von Hippel-Lindau syndrome	Renal cell carcinoma, cerebellar hemangiosarcoma

La scoperta delle mutazioni in geni codificanti proteine che regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare ha fornito le basi molecolari per spiegare l’alterato comportamento delle cellule tumorali.

La scoperta degli oncogeni attivati, geneticamente dominanti aveva fatto ipotizzare l’esistenza di anti-oncogeni in grado di bloccare lo sviluppo del tumore.

Ad oggi sono stati identificati diversi geni onco-soppressori.

Le caratteristiche degli onco-soppressori classici sono:

- essere recessivi e inattivati in entrambi gli alleli nei tumori
- l’ereditarietà di un singolo allele mutato accelera lo sviluppo dei tumori
- lo stesso gene è inattivato nei tumori sporadici

Capacità acquisite dalle cellule tumorali

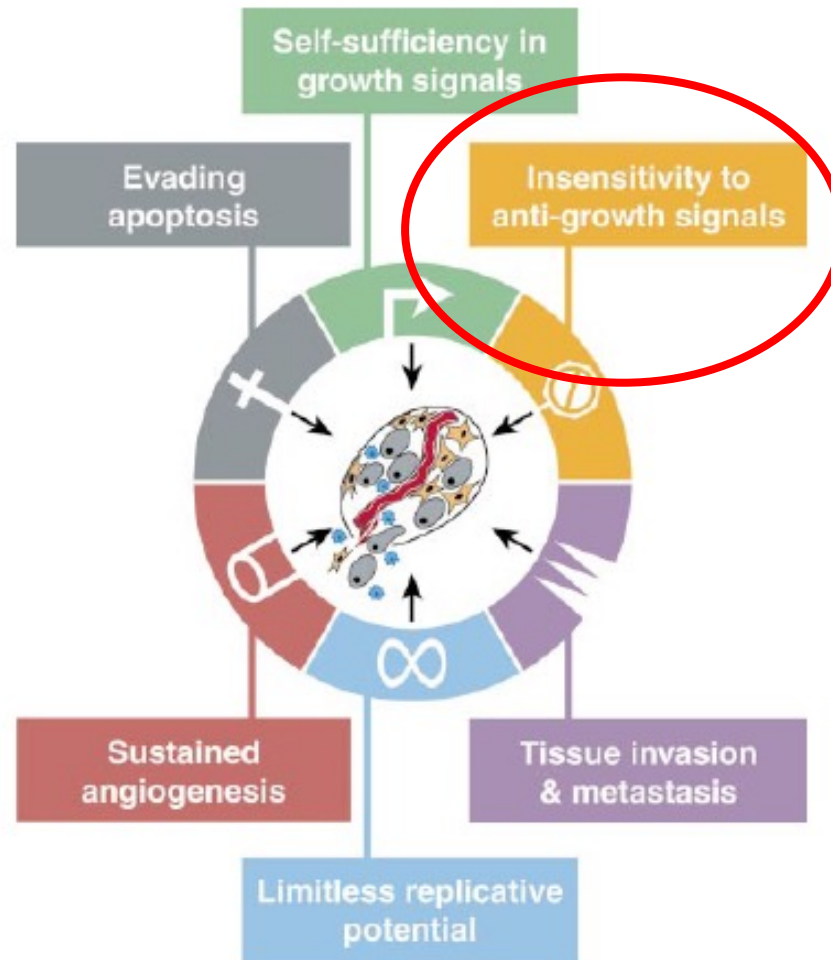


Figure 1. Acquired Capabilities of Cancer

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

Retinoblastoma

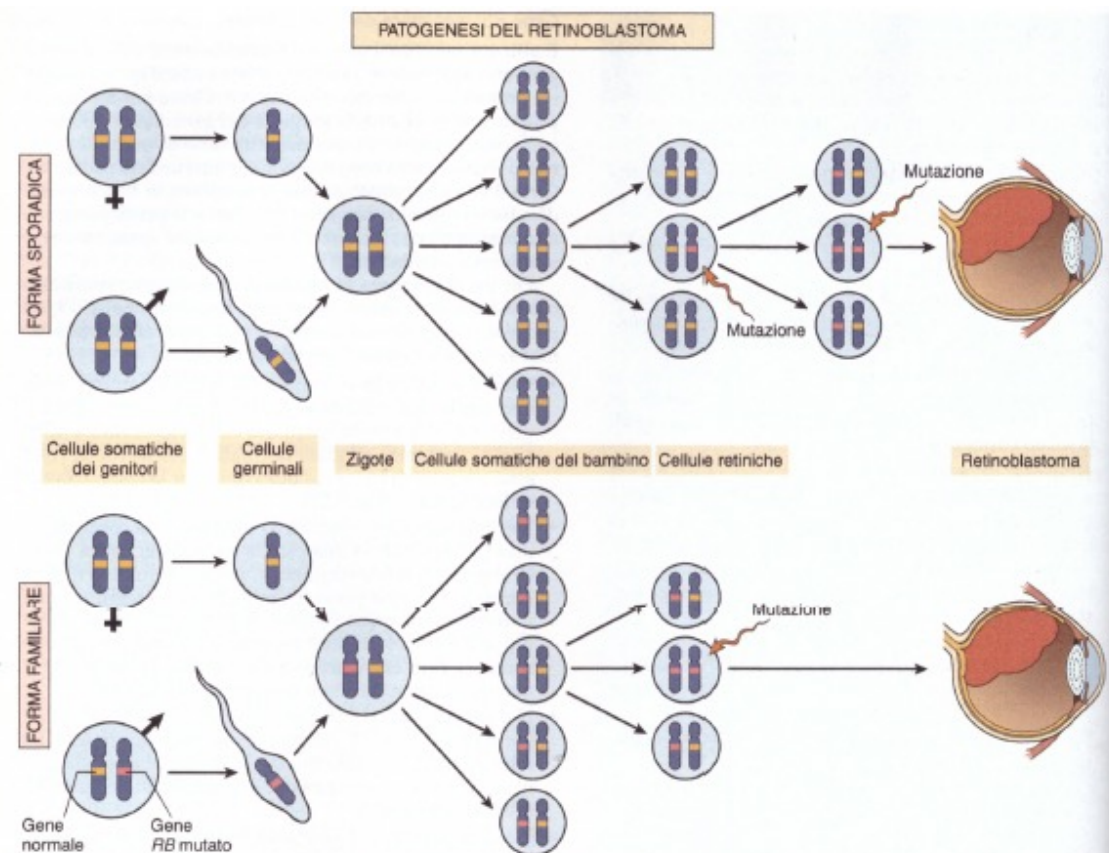


Figura 5.21 Patogenesi del retinoblastoma. Due mutazioni a livello del locus *RB* sul cromosomico 13q14 determinano la proliferazione neoplastica delle cellule della retina. Nella forma familiare, tutte le cellule somatiche ereditano un gene *RB* mutato da un genitore portatore. La seconda mutazione avviene a livello del locus *RB* in una cellula della retina dopo la nascita. Nella forma sporadica, entrambe le mutazioni del locus *RB* sono acquisite dalle cellule retiniche dopo la nascita.

Il gene del retinoblastoma *RB* è stato il primo gene oncosoppressore ad essere identificato.

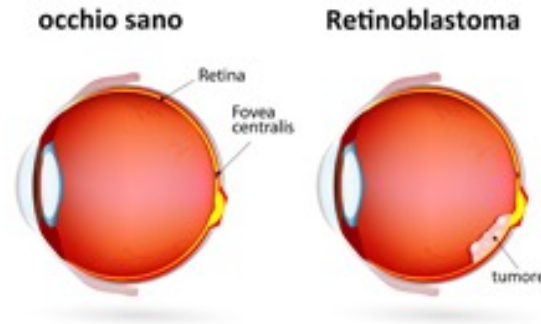
Il retinoblastoma è un tumore maligno dell'occhio che si sviluppa a partire dalle cellule della retina. Il retinoblastoma si manifesta quasi esclusivamente nei bambini di età inferiore ai 4-5 anni. Nella maggior parte dei casi compare nel corso del primo anno di vita.

Questo tumore è causato da mutazioni del gene *RB* ed esistono forme ereditarie e sporadiche di questo tumore.

Knudson, un pediatra e oncologo americano studiando le forme ereditarie di retinoblastoma notò che queste forme che avevano un esordio precoce erano caratterizzate dallo sviluppo di tumori in entrambi gli occhi mentre le forme sporadiche colpivano un solo occhio e apparivano più tardi. L'oncologo ipotizzò per primo che nelle forme ereditarie di retinoblastoma una copia del gene è mutata nelle cellule sessuali mentre l'altra copia acquisisce mutazioni nelle cellule somatiche nei primi anni di vita.

Nelle forme sporadiche gli individui nascono con gli alleli normali e acquisiscono successivamente le mutazioni nelle cellule somatiche per questo l'esordio è molto più tardivo.

Retinoblastoma



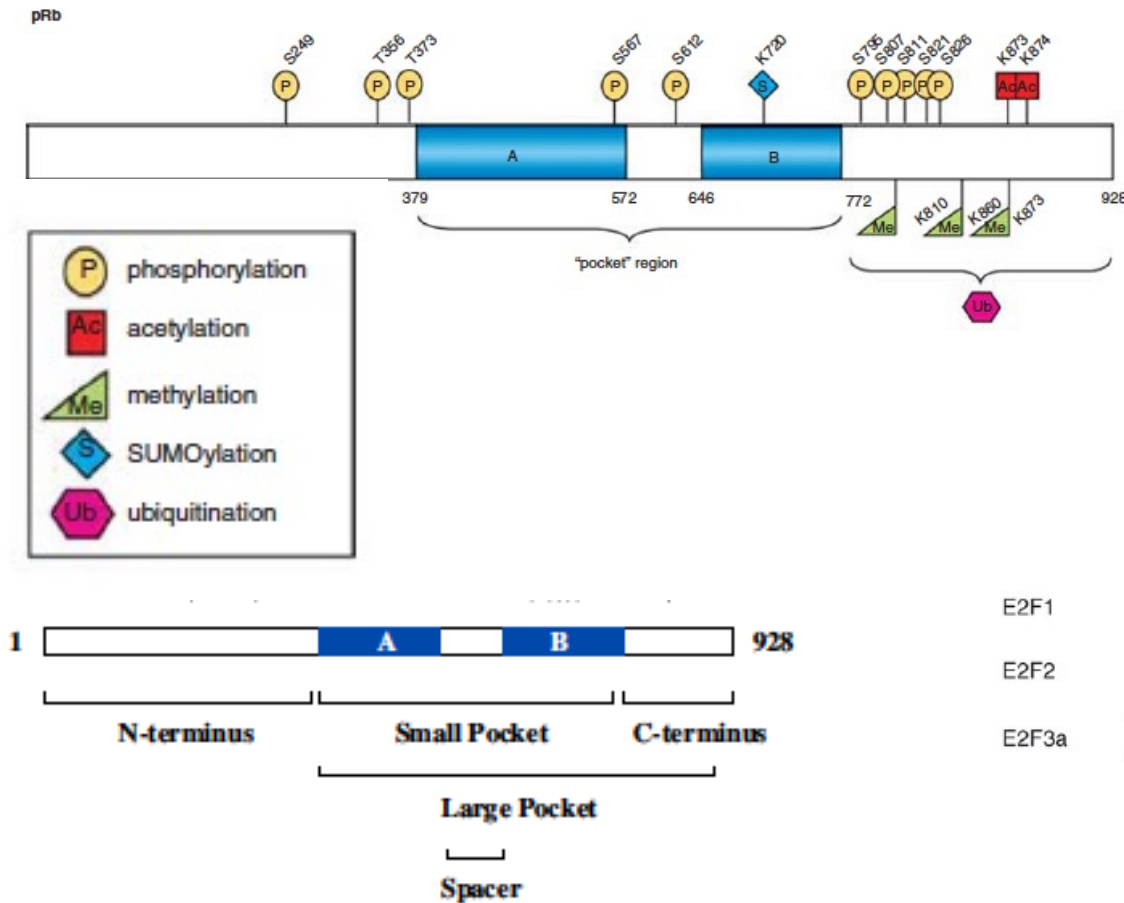
Il 40% dei retinoblastomi è familiare. Il restante 60% è sporadico. Il retinoblastoma è causato dalla inattivazione di entrambi gli alleli del gene codificante Rb. L'incidenza di Retinoblastoma è di 1/17000 nati vivi.

Retinoblastoma

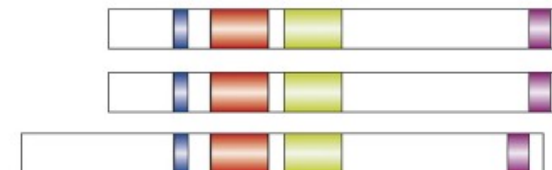
Retinoblastoma è una proteina di 928 aa che presenta tre domini: i domini N- e C-terminali e il dominio pocket (RBP). Questa famiglia include pRb, p130, p107. Queste molecole presentano una tasca «pocket region» in cui è stata identificata una regione in grado di interagire con la proteina virale E7 di HPV. La «large pocket» che include la pocket region e la porzione C-terminale rappresenta la regione di interazione con i fattori E2F.

La proteina Rb legandosi ai fattori E2F ne inibisce l'attività trascrizionale.

La famiglia di fattori E2F include 9 proteine di cui alcune attivatorie e altre inibitorie. E2F1, E2F2 e E2F3a attivano la trascrizione.



E2F1
E2F2
E2F3a



DP binding	Pocket-protein binding	Repression	Activation
+	pRB	-	++
+	pRB	-	++
+	pRB	-	++

■ = NLS
 ■ = DNA binding
 ■ = Dimerization/marked box
■ = Transactivation/pocket-protein binding

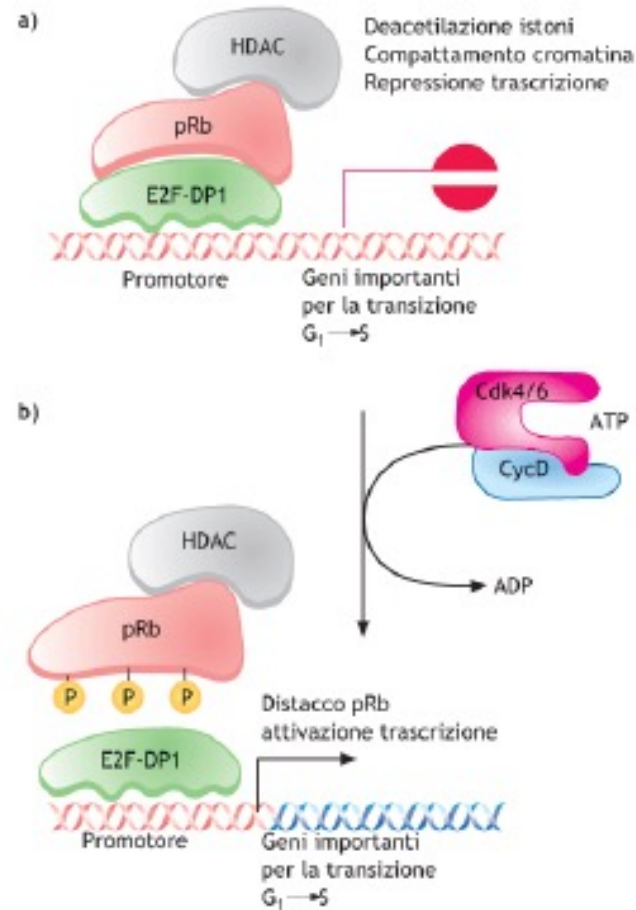


FIGURA 7.17 Fattore di trascrizione E2F e progressione $G_1 \rightarrow S$. In assenza di segnali che promuovono la proliferazione cellulare, quali ad esempio fattori di crescita, pRb non è fosforilata dai complessi Cdk-ciclina e può legare il fattore di trascrizione E2F-DP1. **(a)** In questo modo pRb posiziona sui promotori legati da E2F-DP1 enzimi modificatori della cromatina quali le HDAC che causano la repressione della trascrizione a causa del compattamento locale della cromatina. Questa condizione appena descritta è quella di una cellula nella fase G_0 del ciclo cellulare. **(b)** Segnali che portano all'attivazione del complesso Cdk-ciclina innescano la fosforilazione di pRb ed il suo distacco da E2F-DP1. In questo modo la cromatina è meno compatta e l'RNA polimerasi può iniziare a trascrivere i geni sotto il controllo di E2F.

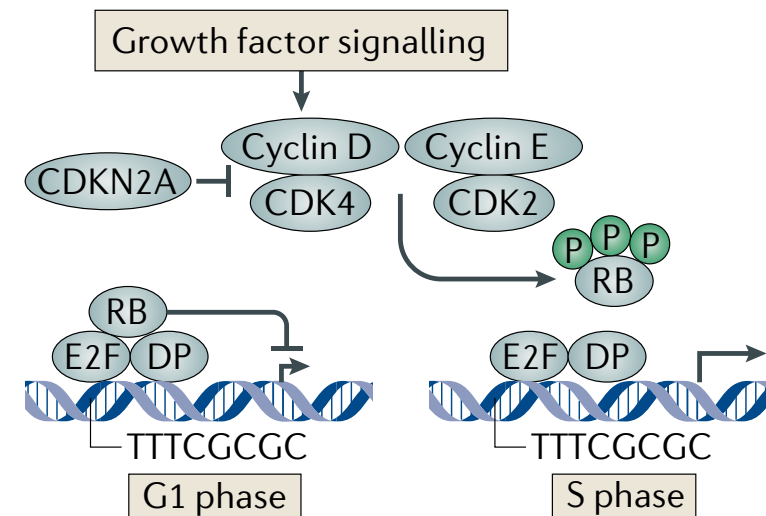
Funzione di retinoblastoma

Nelle cellule quiescenti pRB è associato ai complessi E2F-DP sui promotori di geni necessari per l'entrata della cellula in fase S.

RB recluta enzimi modificatori della cromatina come HDAC causando un compattamento della cromatina ed una inibizione della trascrizione da parte di E2F.

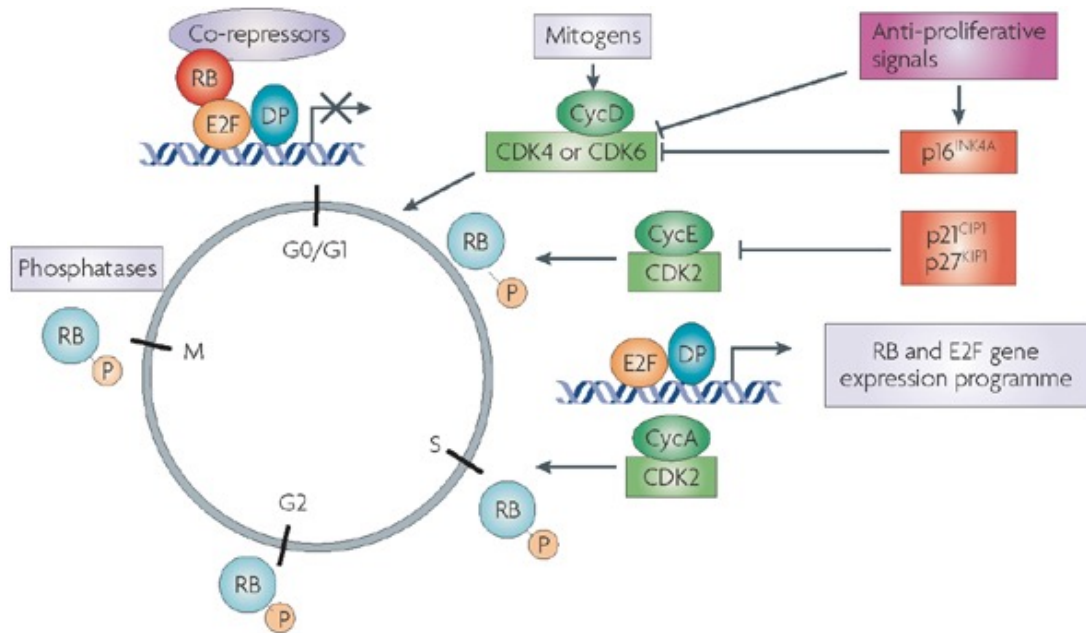
In seguito a fosforilazione RB si distacca da E2F-DP permettendo la trascrizione dei geni bersaglio di E2F.

a Canonical RB function

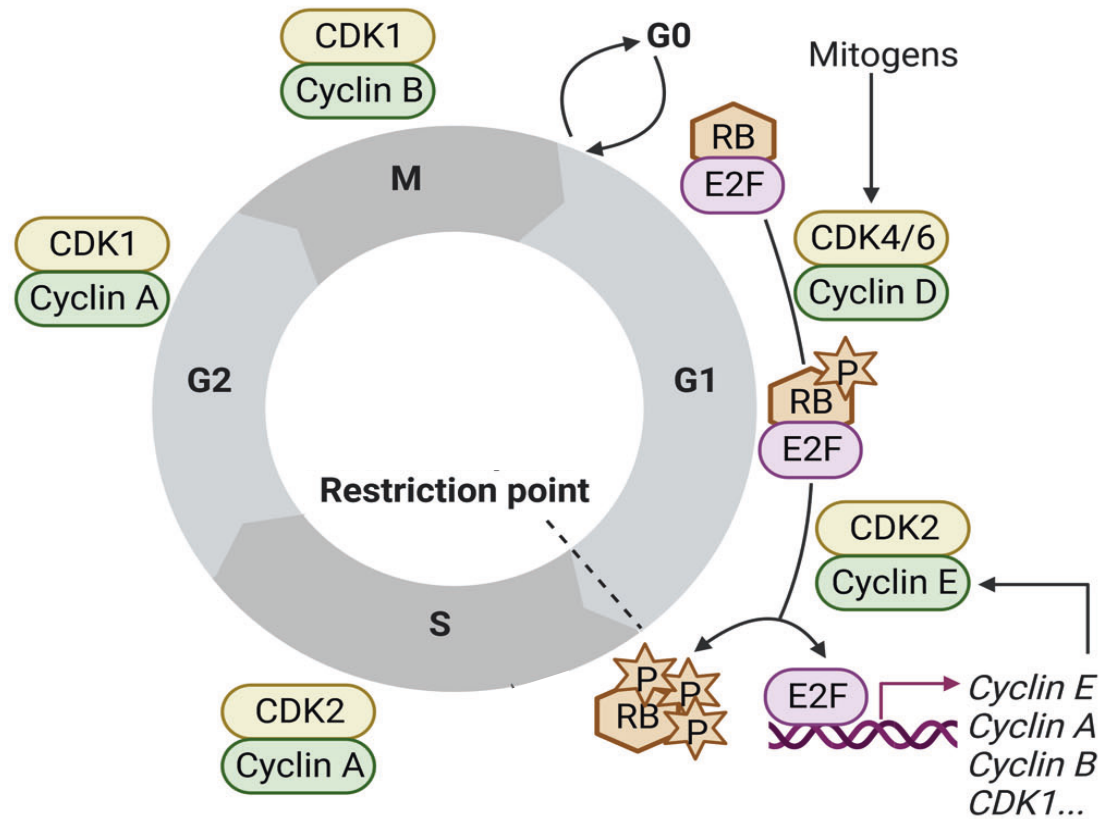


I complessi pRb/E2F sono repressori trascrizionali

Una funzione importante di pRb è di inibire la sintesi del DNA. Nelle cellule a riposo pRb non è fosforilata ed è complessata con i fattori trascrizionali E2F che consistono di un membro della famiglia E2F (E2F 1-6) e una molecola partner DP (DP-1 o DP-2). I complessi E2FpRb sono dei repressori che bloccano l'espressione di geni necessari per la replicazione del DNA e per la progressione della cellula nel ciclo cellulare.

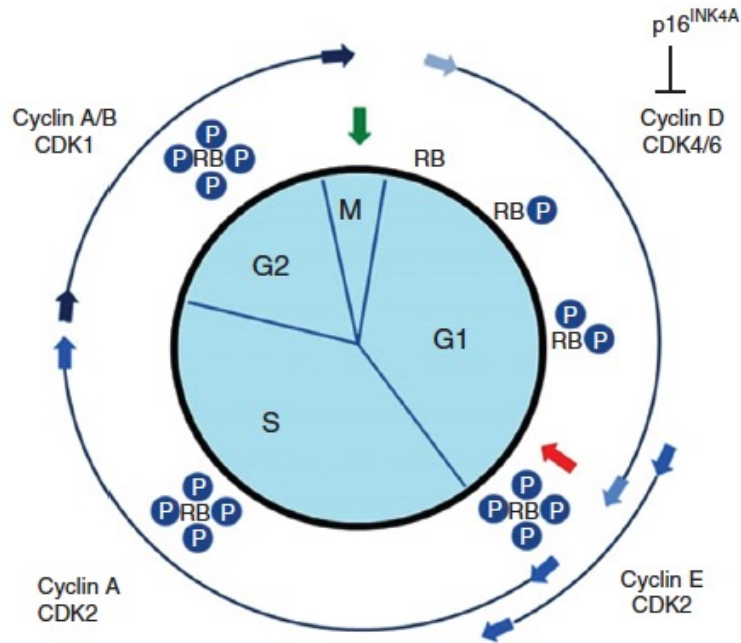


pRB e la progressione del ciclo cellulare



Durante la fase G1 i fattori di crescita promuovono l'assemblaggio dei complessi CDK4/6 ciclina D che fosforilano la famiglia della proteine RB. La fosforilazione di RB in diversi siti porta alla dissociazione di pRB da E2F attivando la trascrizione di geni bersaglio fra cui le cicline E. L'associazione delle cicline E con la CDK2 contribuisce alla ulteriore fosforilazione di pRB promuovendo il rilascio dei fattori E2F e la trascrizione di ulteriori geni bersaglio. In questo modo viene assicurato un livello di complessi ciclinaE/CDK2 sufficiente a mantenere RB fosforilata indipendentemente dallo stimolo da parte dei fattori mitogenici.

Ruolo di Rb



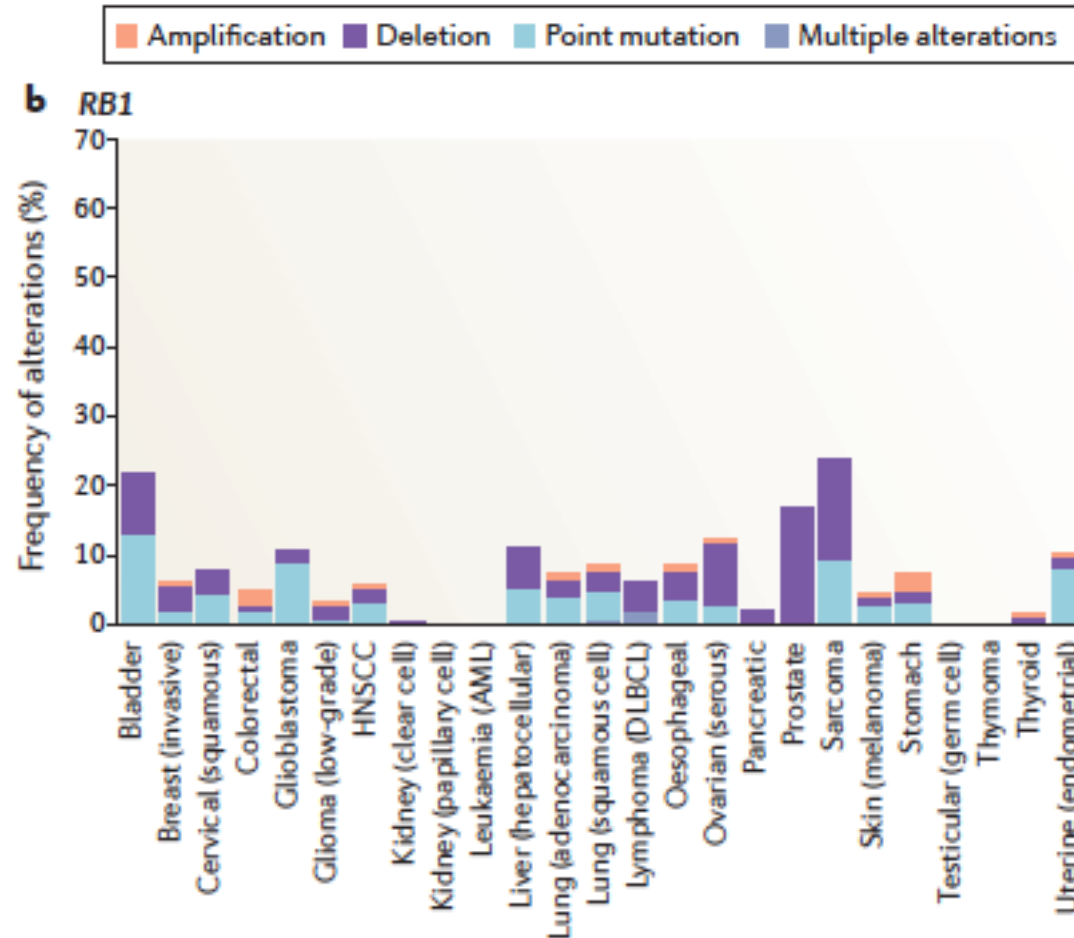
La proteina Rb è soggetta a fosforilazione durante la divisione cellulare.

Rb è defosforilata alla fine della mitosi e resta ipofosforilata fino alla successiva metà della fase G1 e nella fase tardiva quando viene fosforilata dai complessi CDK4/6-CycD e successivamente dai complessi CDK2-CycE..

Il ruolo di pRb ipofosforilata nel limitare la proliferazione agendo da oncosoppressore è stato ulteriormente dimostrato dall'evidenza che la funzione di soppressione della proliferazione viene inattivata in seguito al legame con oncoproteine virali come la proteina E7 del virus HPV.

Disregolazione di Rb nei tumori umani

Gene	Chromosomal location	Cellular location	Mode of action	Neoplasm associated with somatic mutation	Neoplasm associated with inherited mutation
Rb	13 q 14	Nucleus	Transcriptional regulator	Retinoblastoma, osteosarcoma, carcinomas of breast, prostate, bladder and lung	Retinoblastoma, osteosarcoma



Mutazioni di Rb impediscono il controllo del ciclo cellulare e contribuiscono alla trasformazione neoplastica.

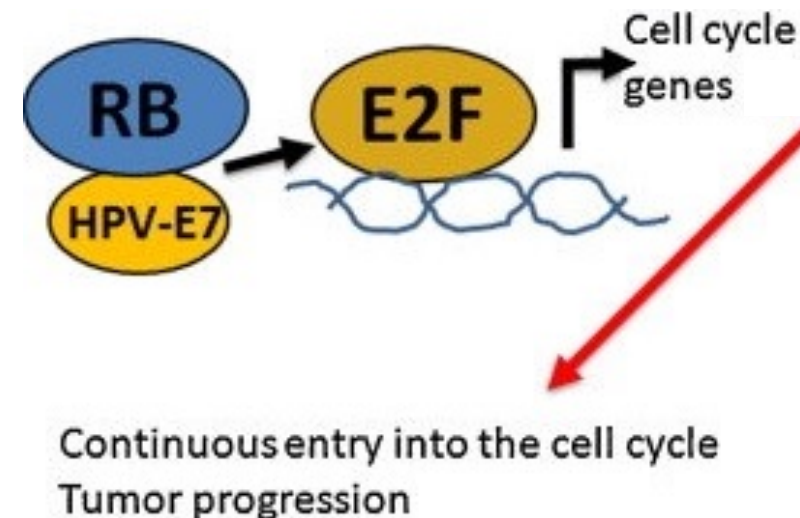
I componenti della via CDK4/6-pRB sono comunemente mutati nei tumori umani

Componente del ciclo cellulare	Funzione principale
Cicline e chinasi ciclina-dipendenti	
CDK4; D cicline	Forma un complesso che fosforila RB, permettendo alla cellula di progredire attraverso il punto di restrizione di G ₁
Inibitori del ciclo cellulare	
Famiglia CIP/KIP: p21, p27 (CDKN1A-D)	Bloccano il ciclo cellulare legando i complessi ciclina-CDK p21 è indotta dall'oncosoppressore p53 p27 risponde ai soppressori della crescita come il TGFβ
Famiglia INK4/ARF (CDKN2A-C)	p16/INK4a si lega al complesso ciclina D-CDK4 e promuove gli effetti inibitori di RB p14/ARF aumenta i livelli di p53 inibendo l'attività di MDM2
Oncosoppressori	
RB	Proteina oncosoppressiva "pocket" che si lega ai fattori di trascrizione E2F in stato di ipofosforilazione, evitando così la transizione G ₁ /S; Interagisce con fattori di trascrizione che regolano il differenziamento
p53	Oncosoppressore alterato nella maggior parte dei tumori Indotta da danno del DNA Causa l'arresto del ciclo cellulare tramite upregulation dell'inibitore p21 della CDK Induce l'apoptosi tramite upregulation di BAX e di altri geni pro-apoptotici

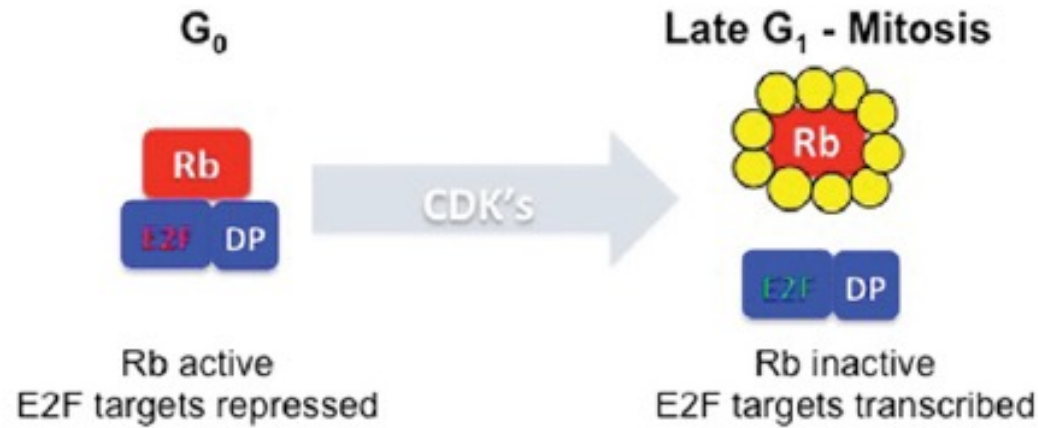
Nella maggior parte delle neoplasie almeno uno dei 4 regolatori chiave del ciclo cellulare (p16/INK4a, ciclinaD, CDK4, RB) è deregolato.

La perdita di controllo sul ciclo cellulare normale è fondamentale per la trasformazione tumorale.

Anche le proteine trasformanti di diversi virus oncogeni come l'E7 dell'HPV umano si legano a RB attraverso la tasca utilizzata per legare i fattori E2F. Il legame di E7 a RB lo inattiva rilasciando i fattori E2F determinando la progressione del ciclo cellulare.



Altri meccanismi di azione di Rb



Nella forma più semplice pRb funziona nel nucleo dove lega E2F reprimendo i promotori di diversi geni. In seguito ad inattivazione mediante fosforilazione libera i fattori E2F permettendo la trascrizione di un insieme di geni necessari per iniziare la fase S (es: DNA polimerasi, ciclina E, ciclina A)

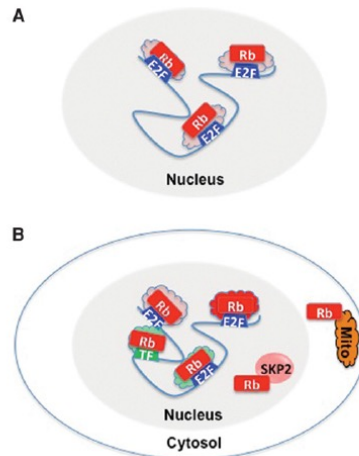


Figure 2. pRB has multiple mechanisms of action. (A) Shortly after the discovery of the interaction between RB and E2F, the model for pRB's mechanism of action was relatively simple: pRB acts in the nucleus, where it associates with E2F complexes and represses promoters. Initially, the mechanism of repression was not known, and E2F targets were thought to be regulated in much the same way. (B) An updated model illustrating several of the layers of complexity that have been added to pRB's mechanism of action over the past two decades. Note that pRB recruits several different types of corepressors to E2F targets (depicted in red and pink), and, under certain conditions, E2F/RB complexes associate with coactivator complexes (green) and increase transcription of some targets. pRB does not act solely at E2F-binding sites but also associates with several transcription factors in addition to E2F. pRB has transcription-independent activities in the nucleus (illustrated here by its association with Skp2) and in the cytosol, where it associates with mitochondria.

Diversi altri meccanismi di azione sono stati descritti per Rb fra cui la capacità di reclutare diversi tipi di corepressori e di associarsi ad altri fattori di trascrizione.

Inoltre pRb ha funzioni indipendenti dalla trascrizione come la capacità di stabilizzare p27.

Key figure

Retinoblastoma protein (RB) maintains genomic stability and is involved in many other cellular processes

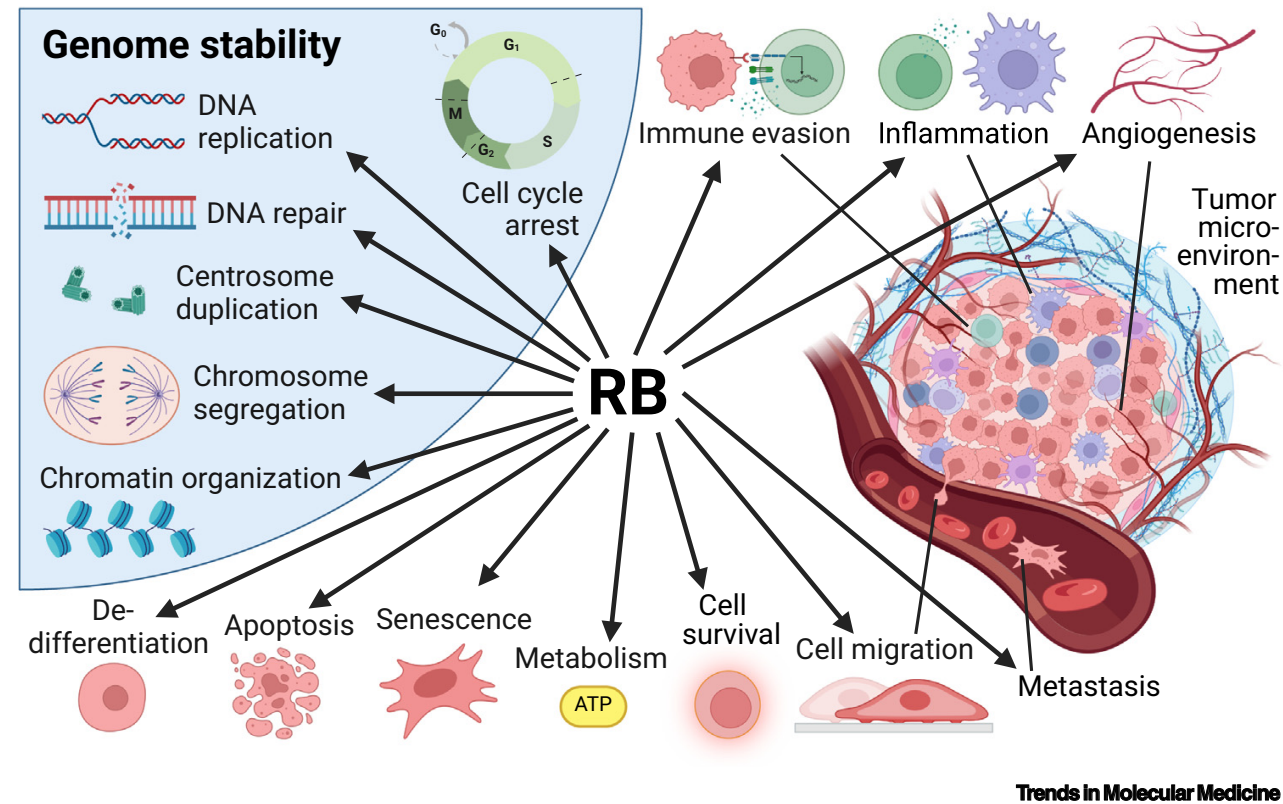
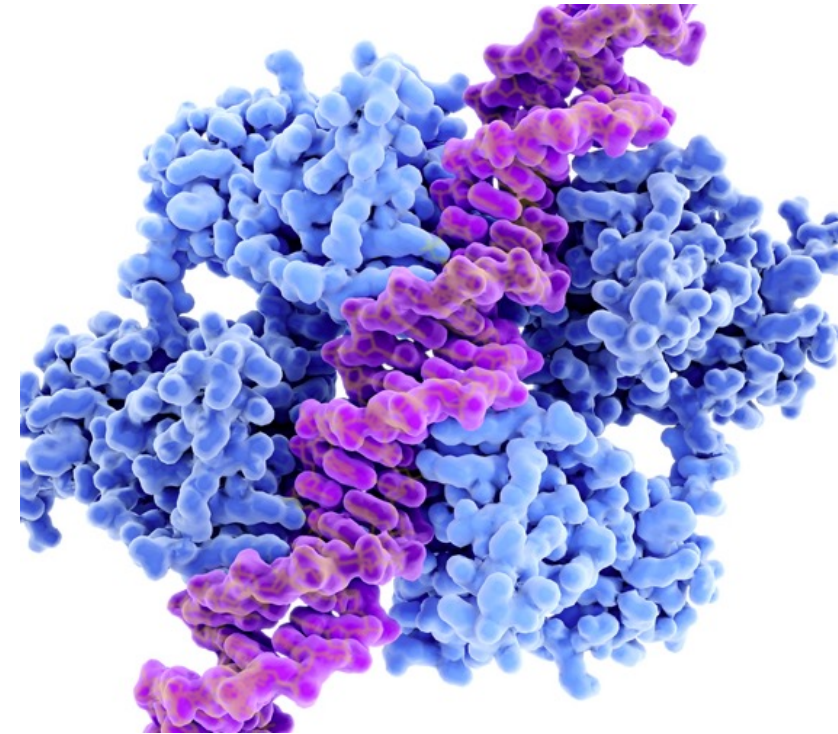


Figure 2. While classically known as the gatekeeper of cell cycle entry, research in the past decades has implicated RB in a very broad range of other cellular and molecular processes, including cell-autonomous and non-cell-autonomous roles in the tumor microenvironment. The various ways in which RB controls processes that maintain genomic stability are shown on a light-blue background. Figure created with BioRender.

L'oncosoppressore p53 il guardiano del genoma

La proteina p53 è un importante oncosoppressore che è attivato nelle cellule in risposta a segnali di stress come il danno al DNA.

- l'inattivazione di p53 è presente in più del 50% dei tumori umani. Il restante 100% mostra alterazioni nei pathway che portano all'attivazione di p53 (amplificazioni di MDM2, perdita dell'attività chinastica di Chk2).
- gli individui affetti dalla Sindrome di Li-Frument che ereditano una mutazione nel gene TP53 in un allele sviluppano diversi tumori
- I tumori deficienti in p53 sono meno differenziati e sono più invasivi e metastatici
- La forma wildtype di p53 agisce da oncosoppressore. Per esempio la sua trasfezione in cellule di osteosarcoma deficienti nella p53 ne abroga le caratteristiche neoplastiche.

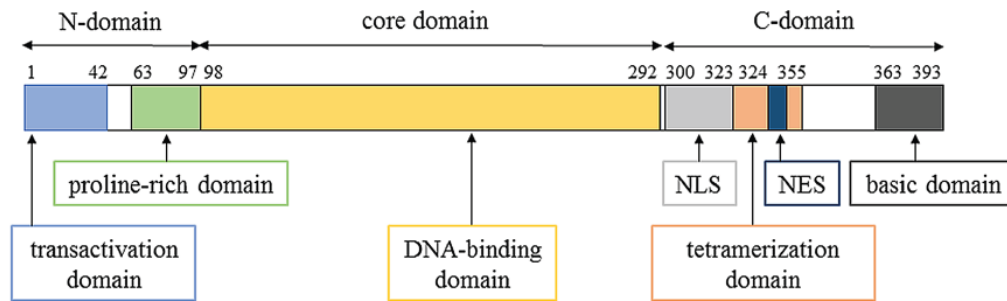


Sindrome di LiFraumeni

La sindrome di Li-Fraumeni (LFS) è una malattia rara a trasmissione autosomica dominante che colpisce il soggetto giovane e consiste in una predisposizione a sviluppare tumori diversi. I tumori più caratteristici sono gli osteosarcomi, i sarcomi dei tessuti molli, i tumori del seno nei soggetti giovani, le leucemie/linfomi, i tumori cerebrali e i tumori della corteccia surrenale; nulla impedisce, però, che si possano riscontrare tutti i tipi di tumore. In circa il 70% delle famiglie LFS è stata identificata una mutazione germinale del gene TP53. Come per il gene RB la trasmissione ereditaria di un allele mutato predispone le persone affette alla comparsa di tumori maligni.

p53

(a)



(b)



La proteina p53 lega specifiche sequenze di DNA e funziona da fattore trascrizionale aumentando la trascrizione di specifici geni.

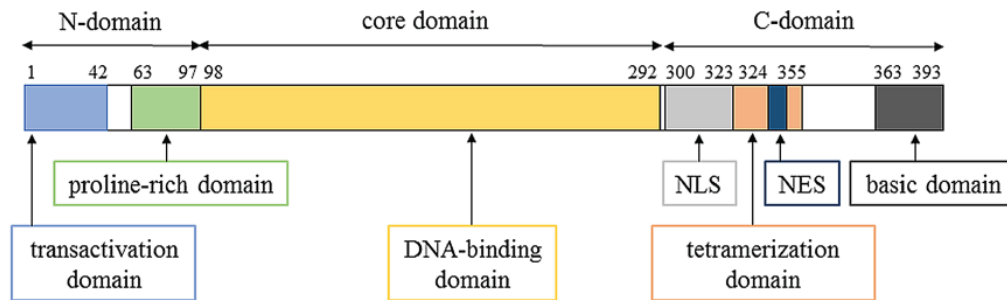
p53 è costituita da 393 aa e presenta 4 domini funzionali. All'NH terminale presenta un dominio di attivazione trascrizionale, seguito da un dominio ricco di proline; nella regione centrale un dominio di legame al DNA e nella regione C-terminale un dominio di oligomerizzazione e uno regolatorio.

p53 forma dei tetrameri e si lega in maniera sequenza specifica al DNA in siti che presentano motivi RRRCWWGYYY (R = A, G; W = A, T; Y = C, T) separati da 0–13 basi.

I geni regolati da p53 includono i geni codificanti per la proteina CIP/KIP p21, per le proteine appartenenti alla famiglia BCL2 come bax, noxa, puma e altri geni coinvolti nella apoptosi.

p53

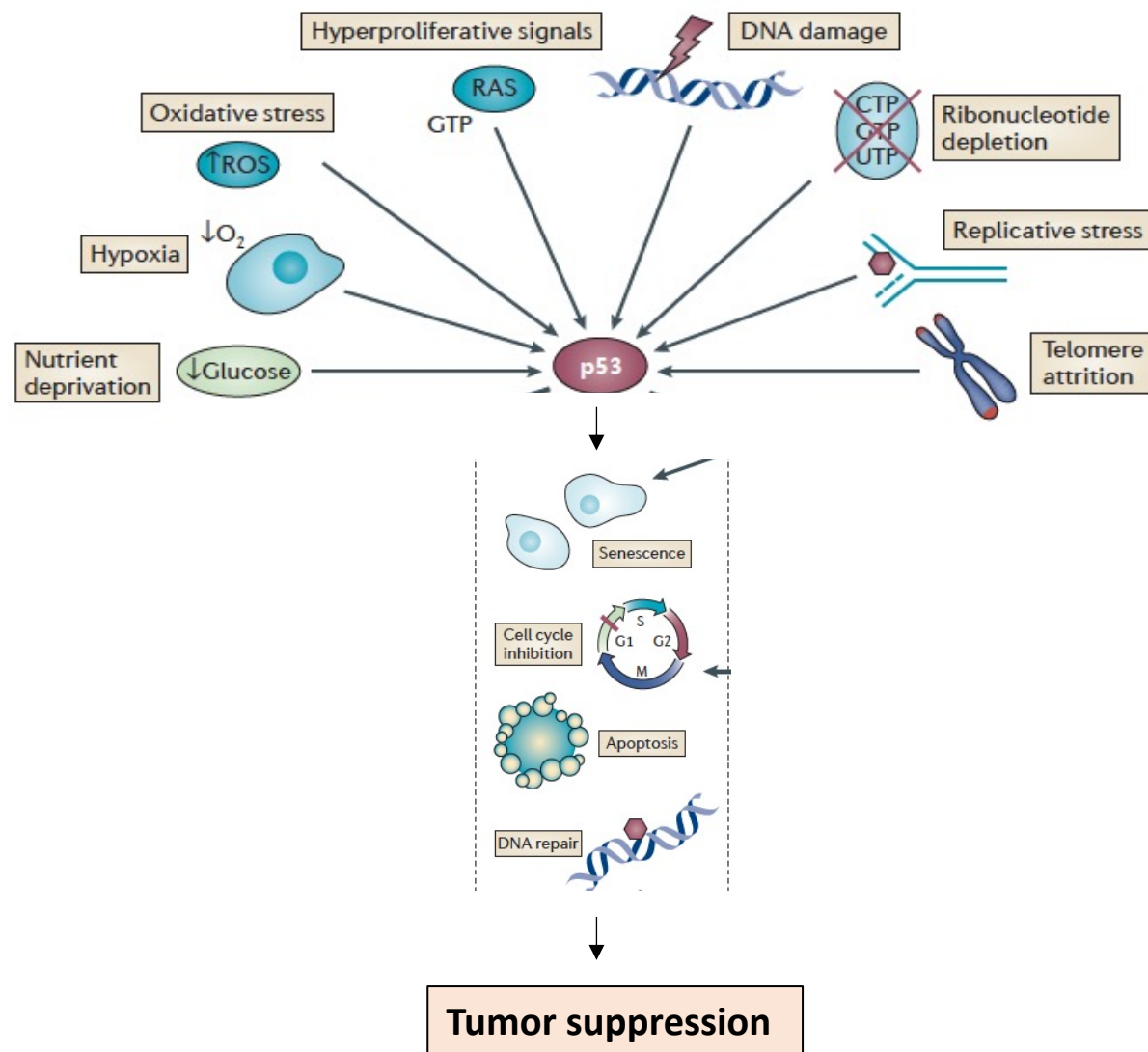
(a)



Il dominio di attivazione della trascrizione permette il legame di p53 con diversi cofattori ed è anche la regione che lega il regolatore negativo di p53, MDM2.

Il dominio ricco in proline è importante per la stabilizzazione di p53 e l'assenza di questo dominio causa l'esporto di p53 dal nucleo e la degradazione ubiquitina proteasoma mediata da MDM2.

Segnali attivanti p53

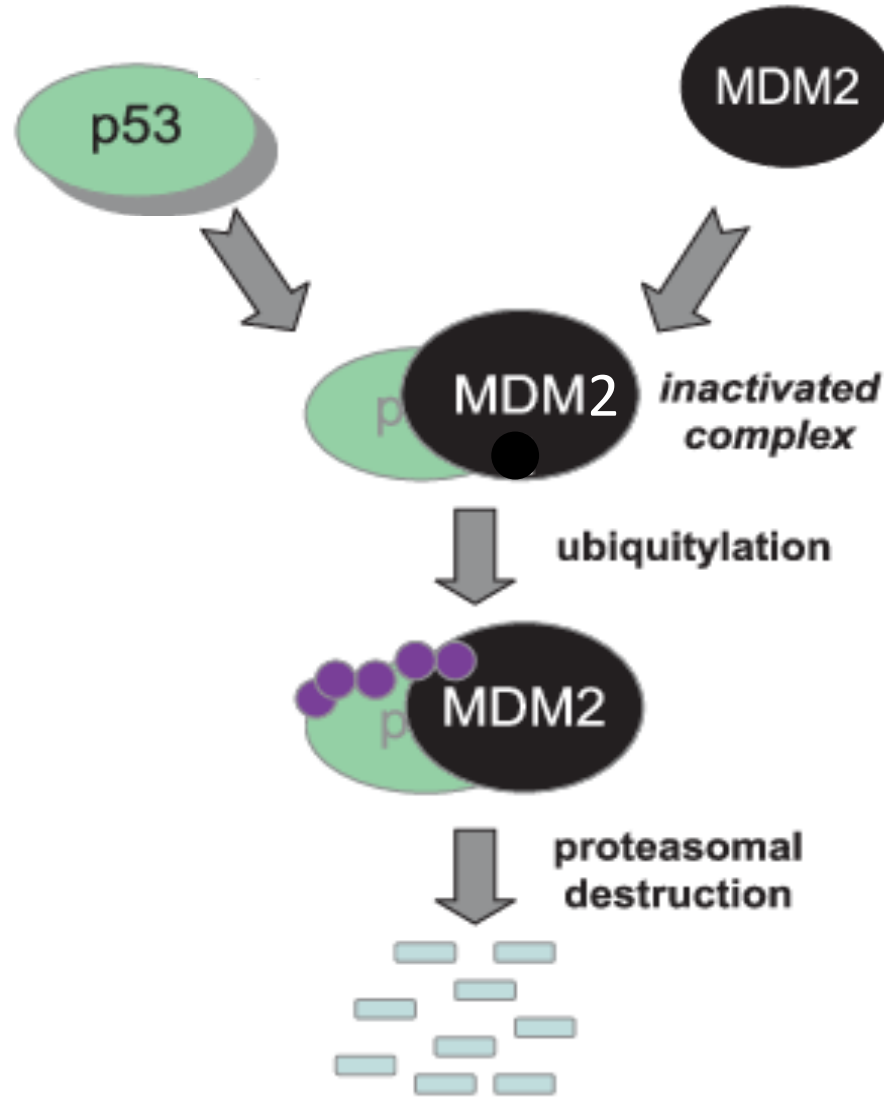
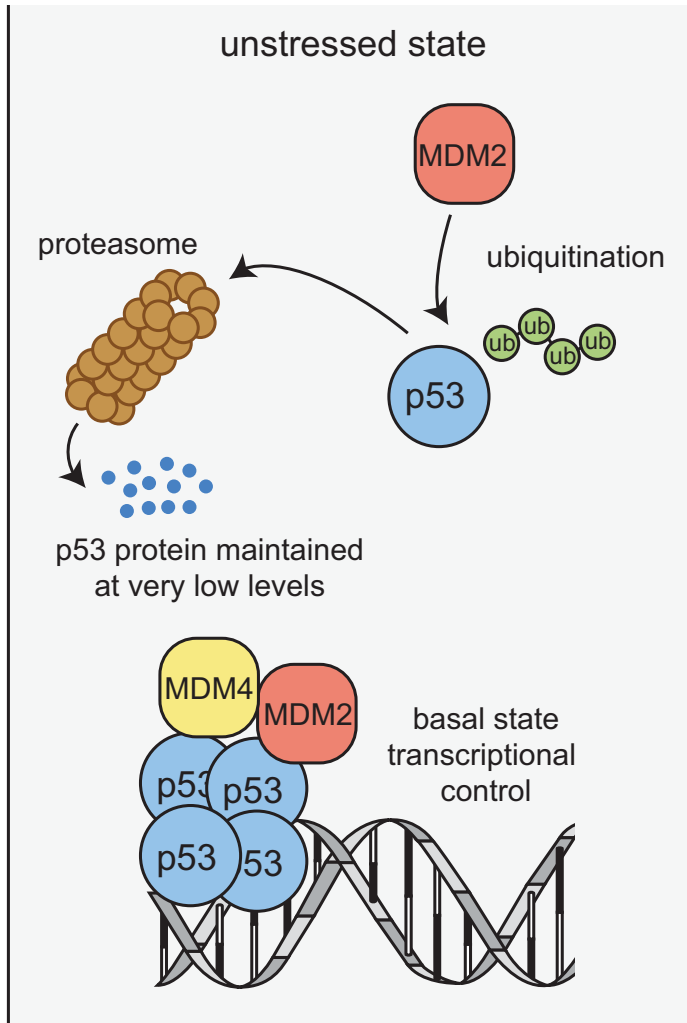


Diversi stress sono in grado di attivare p53 nel contesto dell'inizio o della progressione tumorale.

Gli stress includono: stress ossidativo, segnali iperproliferativi, danno al DNA.

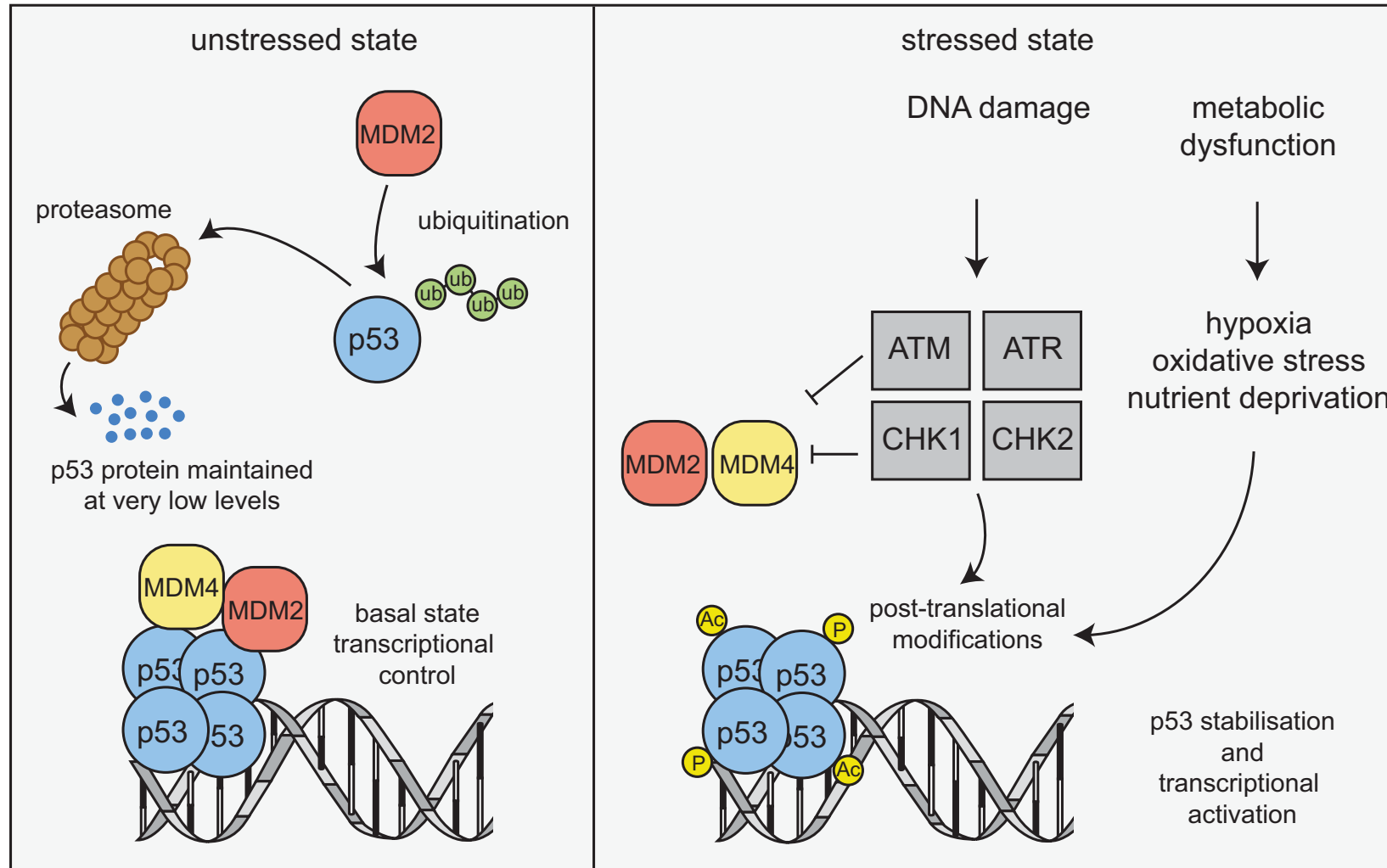
Il ruolo più studiato di p53 riguarda l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione di apoptosi in risposta al danno del DNA.

I livelli di P53 sono bassi nelle cellule in assenza di stress



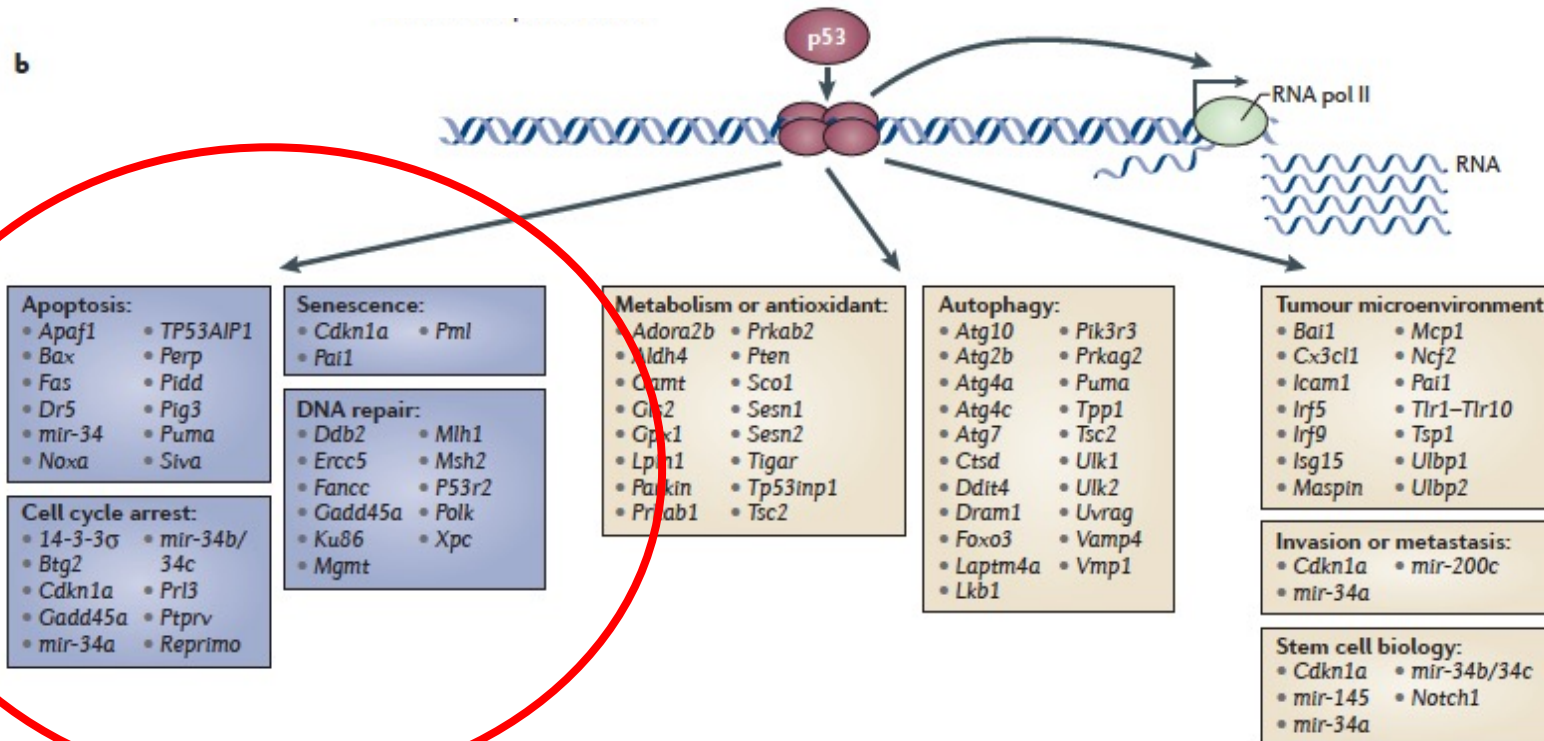
Nelle cellule in assenza di segnali di stress p53 è presente a bassi livelli. P53 è legata alla proteina MDM2 nel dominio di attivazione della trascrizione e inoltre MDM2 agisce da ubiquitina ligasi mediando la degradazione di p53. In risposta a diversi stress p53 è dissociata dal suo regolatore MDM2 permettendo la sua stabilizzazione e attivazione.

I livelli cellulari di p53 aumentano in risposta a stress



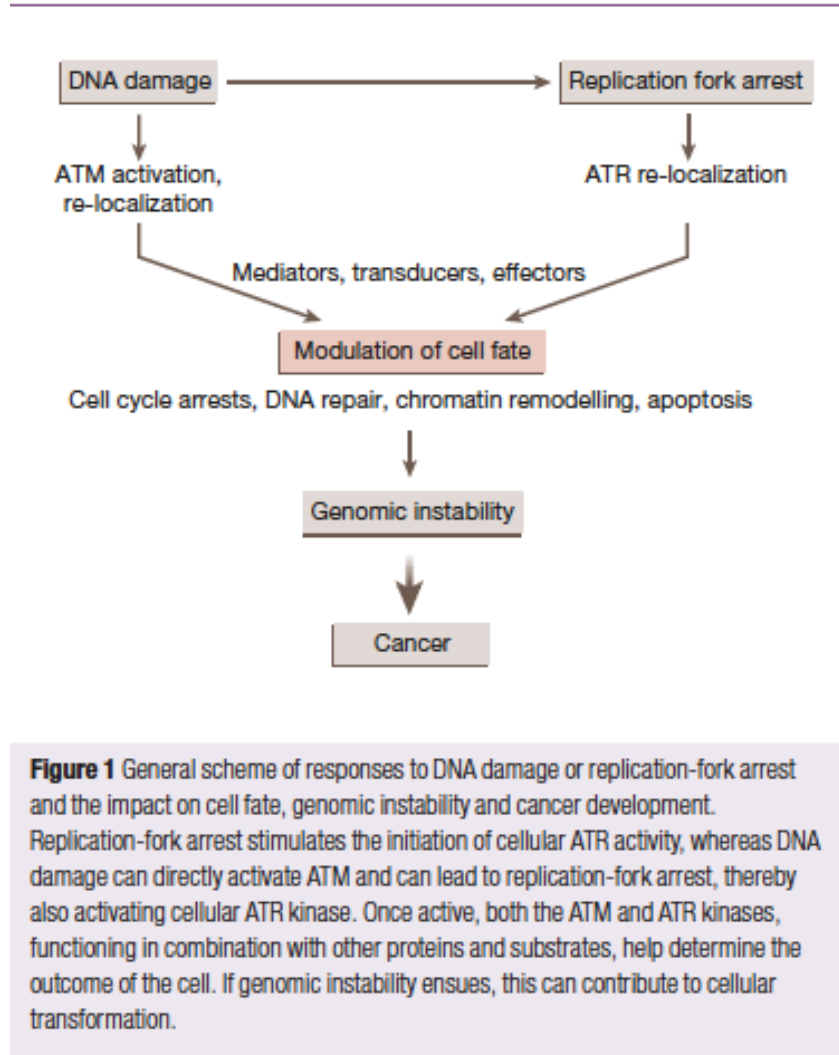
In risposta a diversi stimoli di stress i livelli cellulari di p53 aumentano. Le vie che portano all'aumento di p53 includono oltre alla inibizione di MDM2, anche modificazioni post-traduzionali di p53 come la fosforilazione o l'acetilazione. Le modificazioni post-traduzionali favoriscono il passaggio di p53 dalla forma inattiva a quella attiva che permette al dominio che lega il DNA di legare le regioni di DNA specifiche.

Processi e geni regolati da p53



P53 regola la trascrizione di circa 500 geni e in questo modo controlla diversi processi biologici. I geni regolati da p53 sono coinvolti nella apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare, il riparo del DNA, la senescenza.

Attivazione di p53 in risposta al danno al DNA



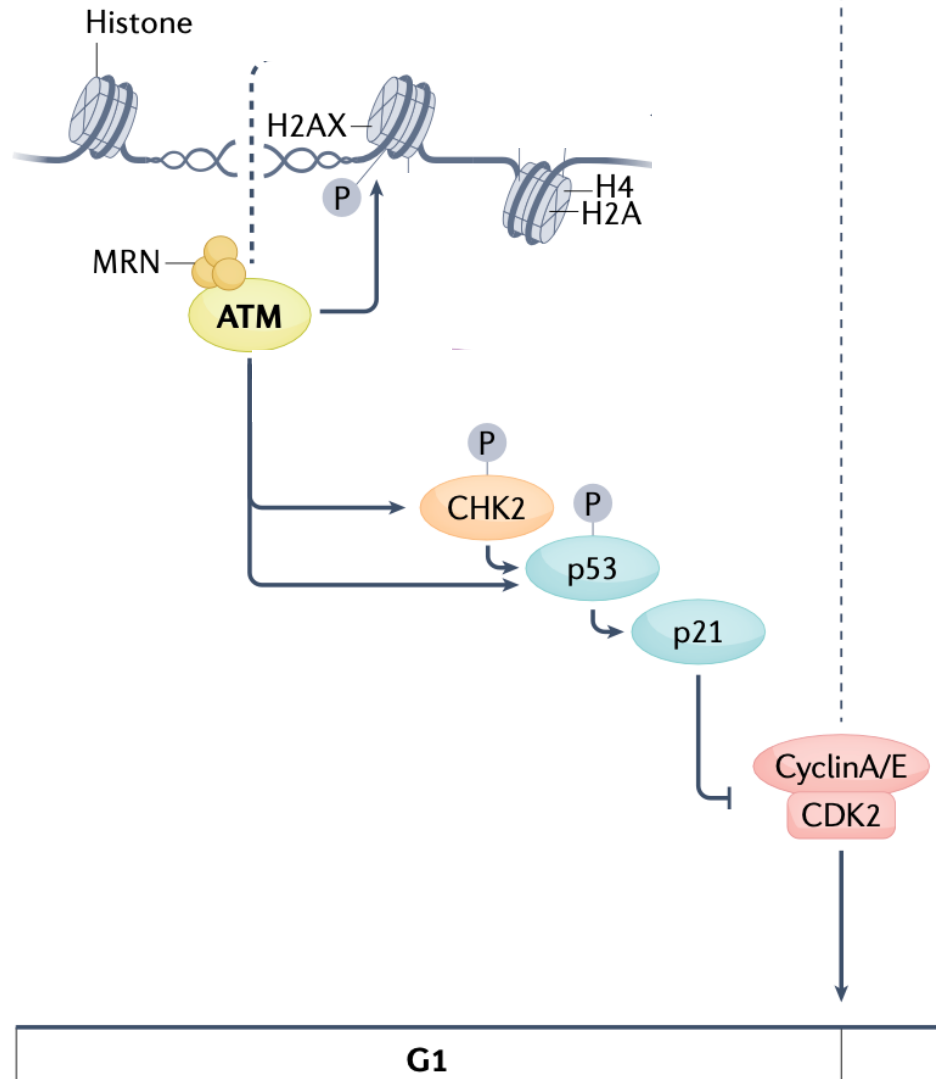
Il ruolo più studiato e compreso di p53 riguarda l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione di apoptosi in risposta al danno del DNA.

In risposta ad un danno al DNA è avviata una cascata di segnalazione che determina l'arresto del ciclo cellulare favorendo il riparo del danno al DNA. p53 viene indotta in risposta al danno al DNA quando le rotture del doppio o del singolo filamento di DNA reclutano rispettivamente le chinasi ATM, ATR, CHK2 e CHK1.

Queste chinasi fosforilano p53 promuovendone la stabilizzazione.

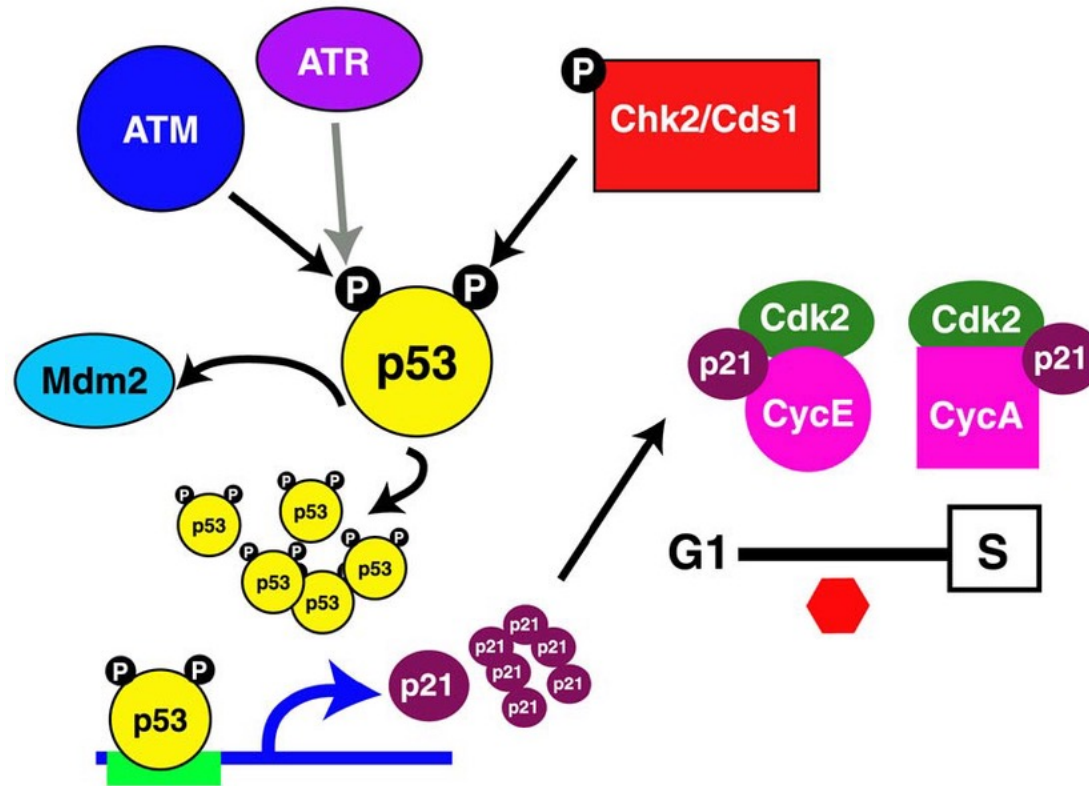
p53 è un substrato per ATM, ATR, CHK1 e CHK2 che fosforilando p53 abrogano la sua interazione con MDM2.

Ruolo di p53 nell'arresto del ciclo cellulare in risposta alle rotture del doppio filamento di DNA



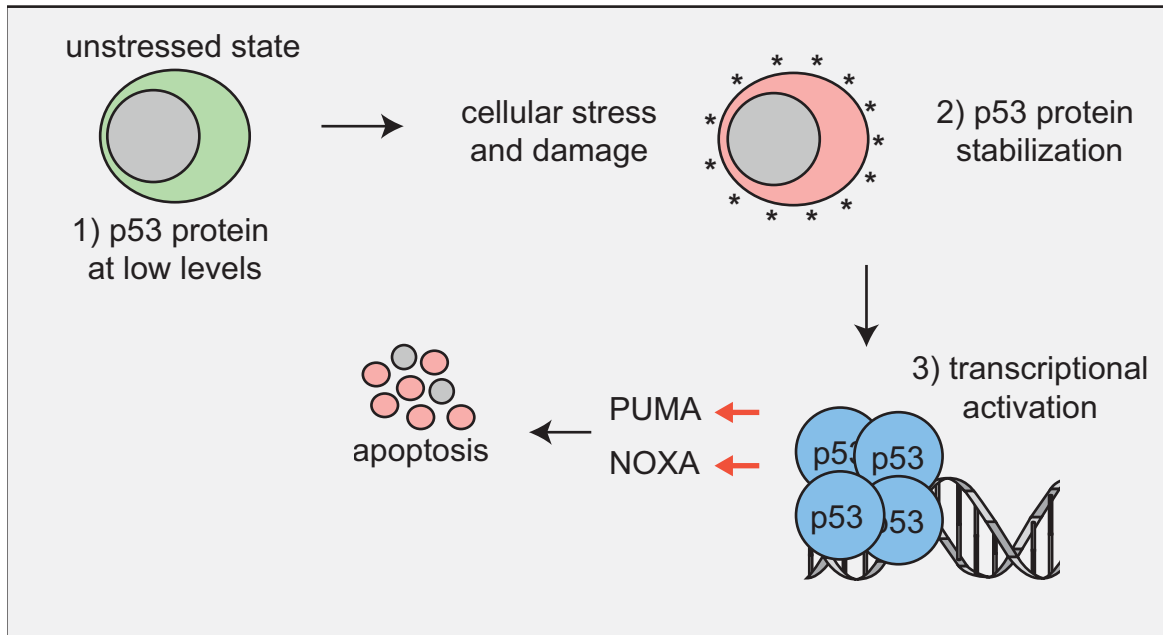
In risposta alle rotture del doppio filamento del DNA viene reclutata la chinasi ATM che fosforila la chinasi CHK2. CHK2 fosforila p53. p53 fosforilata si dissocia da MDM2 e si stabilizza. p53 agisce attivando la trascrizione del gene codificante p21^{CIP/WAF1}. p21 è un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti CDK1 e CDK2 e il suo aumento blocca i complessi CDK2/A CDK2/E arrestando le cellule in fase G1.

Arresto del ciclo cellulare mediato dal checkpoint di fase G1



B. G1 DNA damage checkpoint mediated cell cycle arrest

Induzione di apoptosi mediata da p53 in risposta a stress

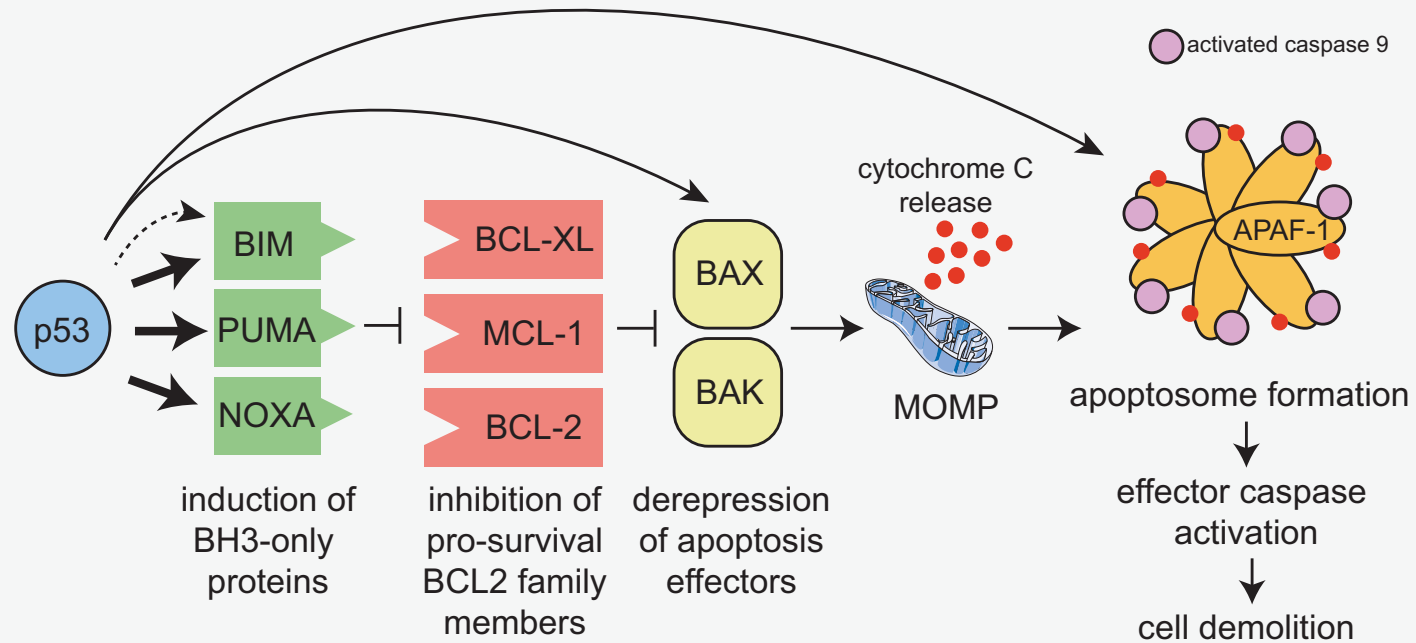


Esperimenti *in vitro* avevano dimostrato che l'espressione di p53 in seguito a trasfezione in cellule tumorali induceva la morte per apoptosi.

Studi effettuati su topi *Trp53* knockout avevano dimostrato che i timociti e le cellule T di questi animali erano resistenti alla morte cellulare in seguito a danno al DNA indotto dal trattamento con radiazioni ionizzanti o chemioterapici (ciclofosfamide, cisplatino) confermato la capacità di p53 di indurre la morte cellulare.

Induzione delle via intrinseca della apoptosi

1) induction of the intrinsic apoptotic pathway



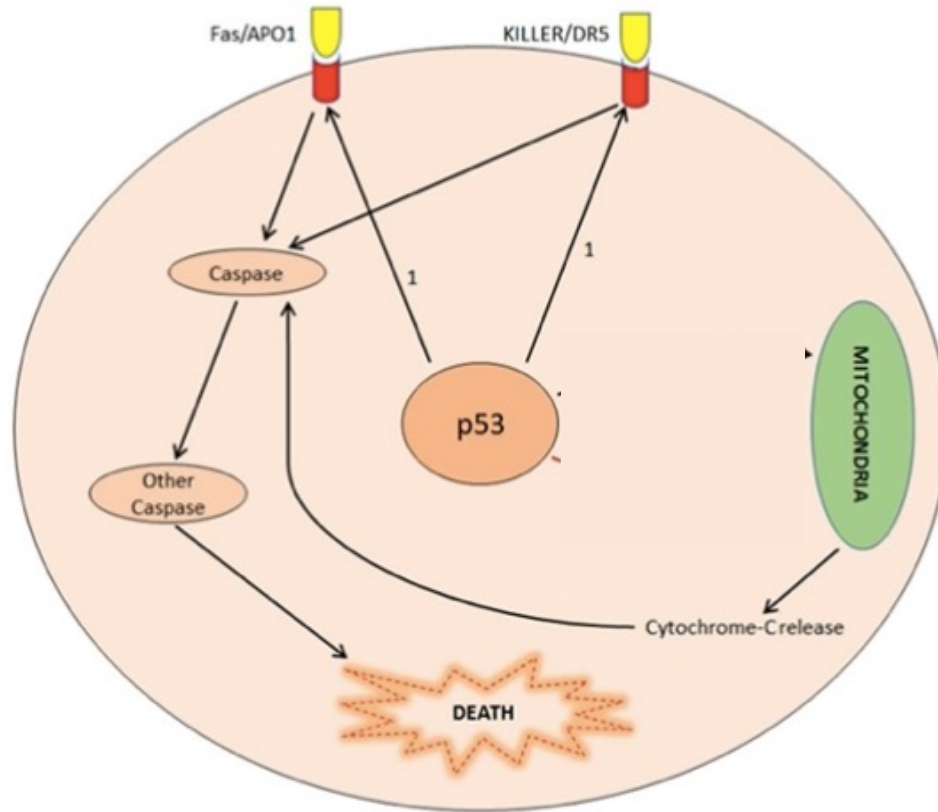
La ricerca dei geni coinvolti nella apoptosi mediata da p53 ha portato alla identificazione di *Noxa* e *Puma*.

Attraverso l'induzione dei geni codificanti per le proteine BH3 only PUMA e NOXA p53 media l'apoptosi indotta dalle radiazioni γ in diversi tipi cellulari.

Le proteine BH3 inducono l'apoptosi in seguito al legame e alla inibizione delle molecole anti-apoptotiche della famiglia BCL-2 che permette l'azione dei membri pro-apoptotici BAX e BAK o attraverso l'interazione diretta con BAX e BAK.

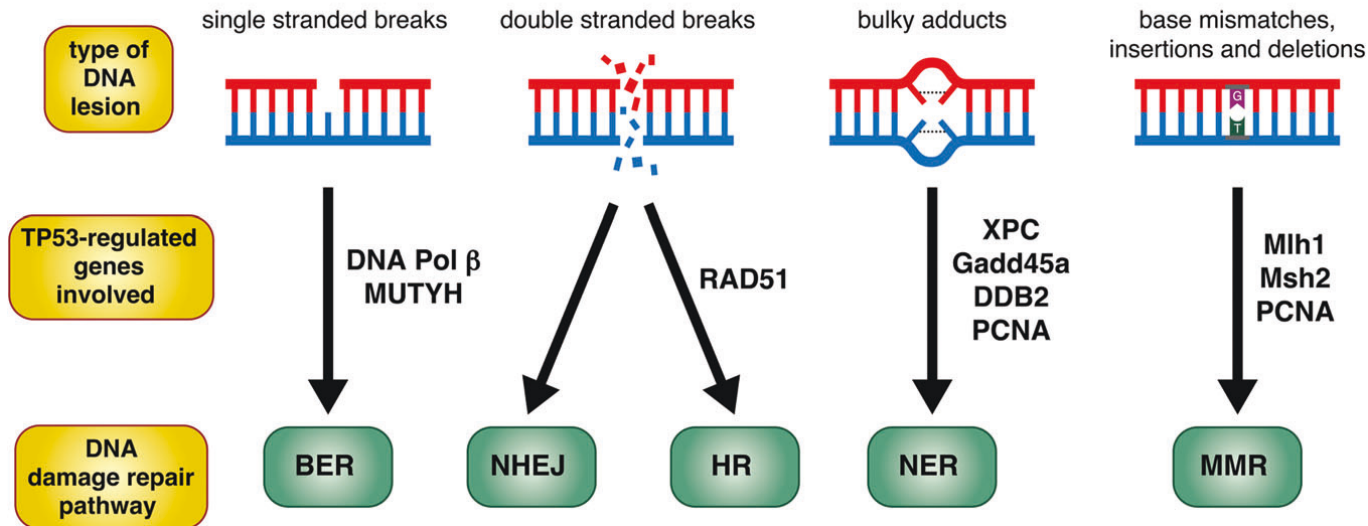
L'attivazione di BAX e BAK determina la loro oligomerizzazione che causa la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna (MOMP) con rilascio del citocromo c nel citoplasma. Il citocromo si lega alla proteina APAF (Apoptosis activating factor 1) formando l'apoptosoma che lega la caspasi 9 avviando la morte della cellula.

P53 regola l'espressione di componenti della via estrinseca dell'apoptosi

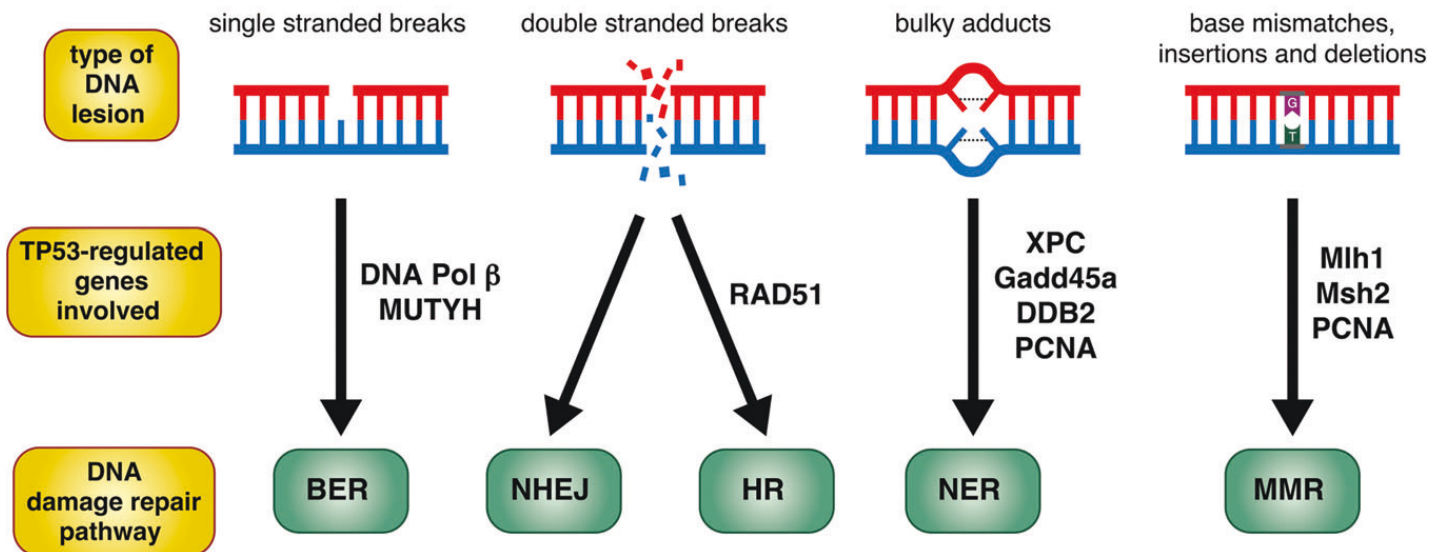


P53 regola anche l'espressione di molecole coinvolte nella via estrinseca dell'apoptosi. p53 induce i geni Fas/APO1 e KILLER/DR5 che portano all'espressione di due recettori di membrana, attivando la cascata delle caspasi e la morte cellulare.

P53 regola l'espressione di componenti dei processi di riparo del DNA

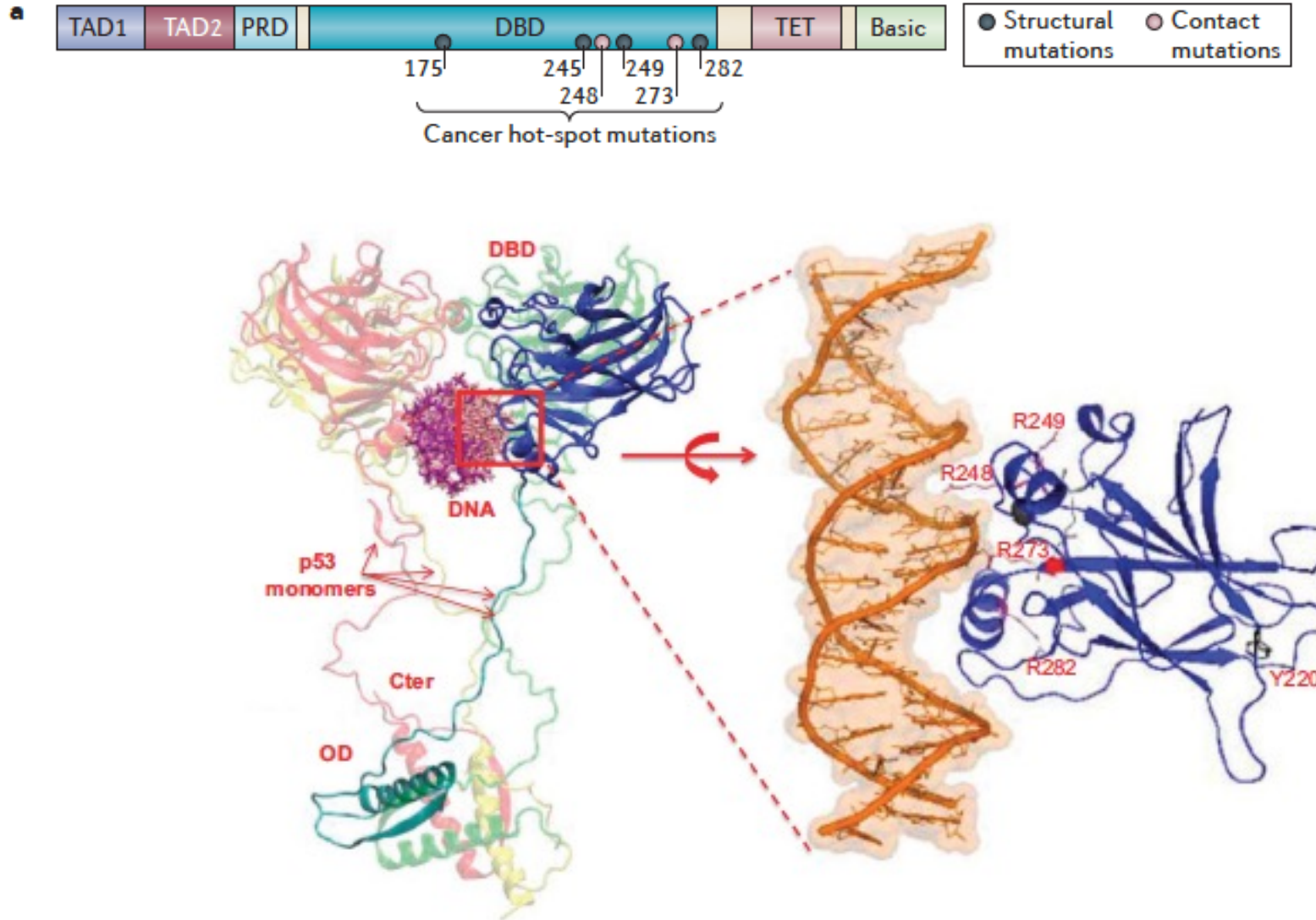


P53 regola l'espressione di geni coinvolti in diverse vie di riparo del DNA. Il nucleotide excision repair (NER) rimuove le lesioni che distorcono l'elica causate per esempio dai raggi UV. Il base excision repair (BER) rimuove le basi ossidate o alchilate che sono modificate dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) o da altri agenti. Le rotture del doppio filamento di DNA che sono causate dalle radiazioni ionizzanti sono riparate attraverso i meccanismi di ricombinazione omologa o non-omologa. Il meccanismo di mismatch repair corregge l'eventuale inserzione errata di nucleotidi durante la duplicazione del DNA.



Oltre a favorire il riparo del DNA attraverso il blocco della progressione del ciclo cellulare p53 attiva trascrizionalmente i geni coinvolti in diversi pathway di riparazione del DNA.

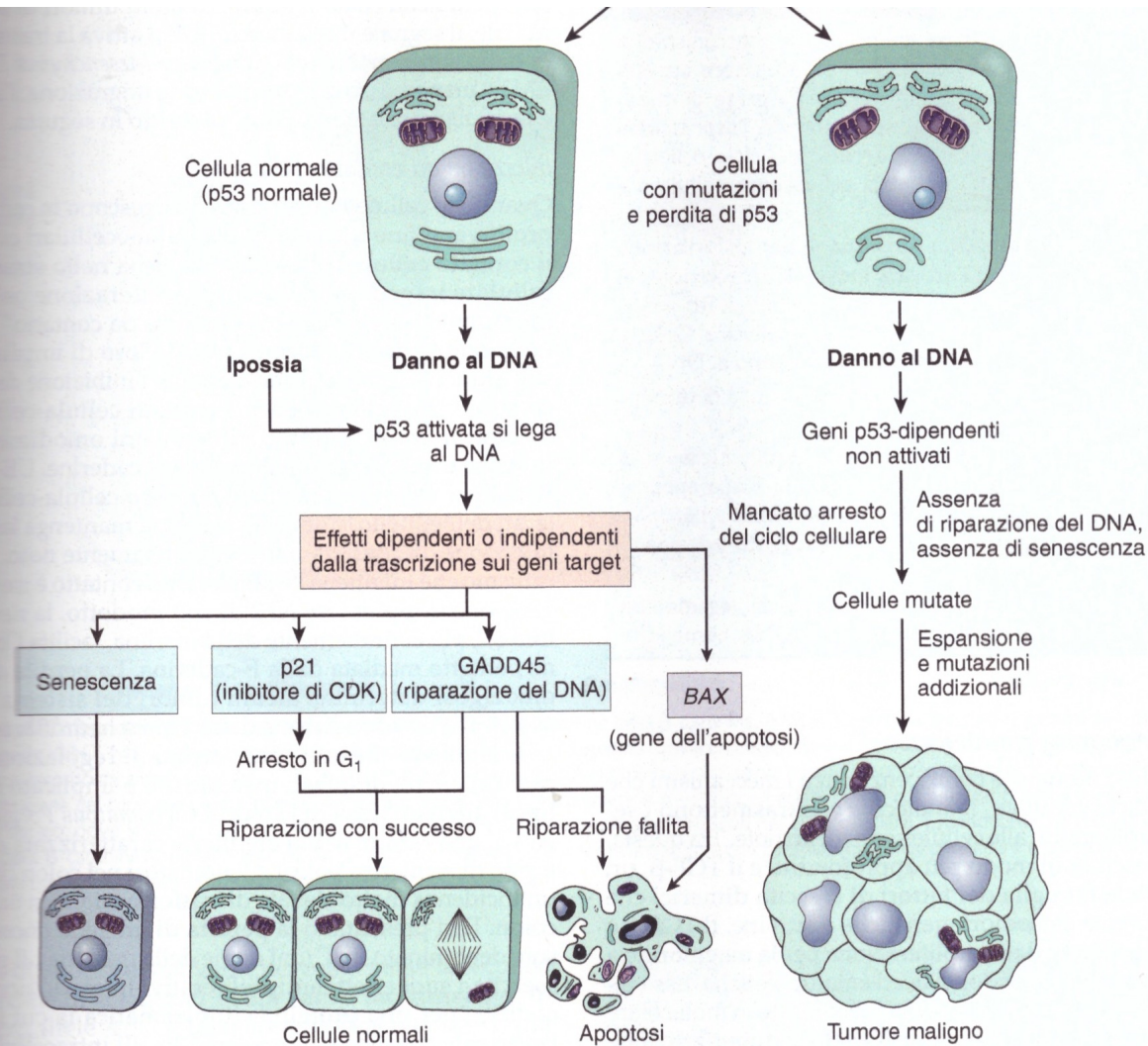
Mutazioni hot spot nella p53



Più dell'80% delle mutazioni di p53 nei tumori umani sono localizzate nel dominio di legame con il DNA suggerendo che l'attività di fattore di trascrizione di p53 è fondamentale per la funzione di oncosoppressore. Sono state identificate posizioni aa in cui sono spesso presenti mutazioni che inattivano la proteina nei tumori umani.

Queste mutazioni alterano l'interazione proteina DNA. Le mutazioni che interferiscono con il legame al DNA sono definite «contact mutations» mentre quelle che alterano la struttura «structural mutations».

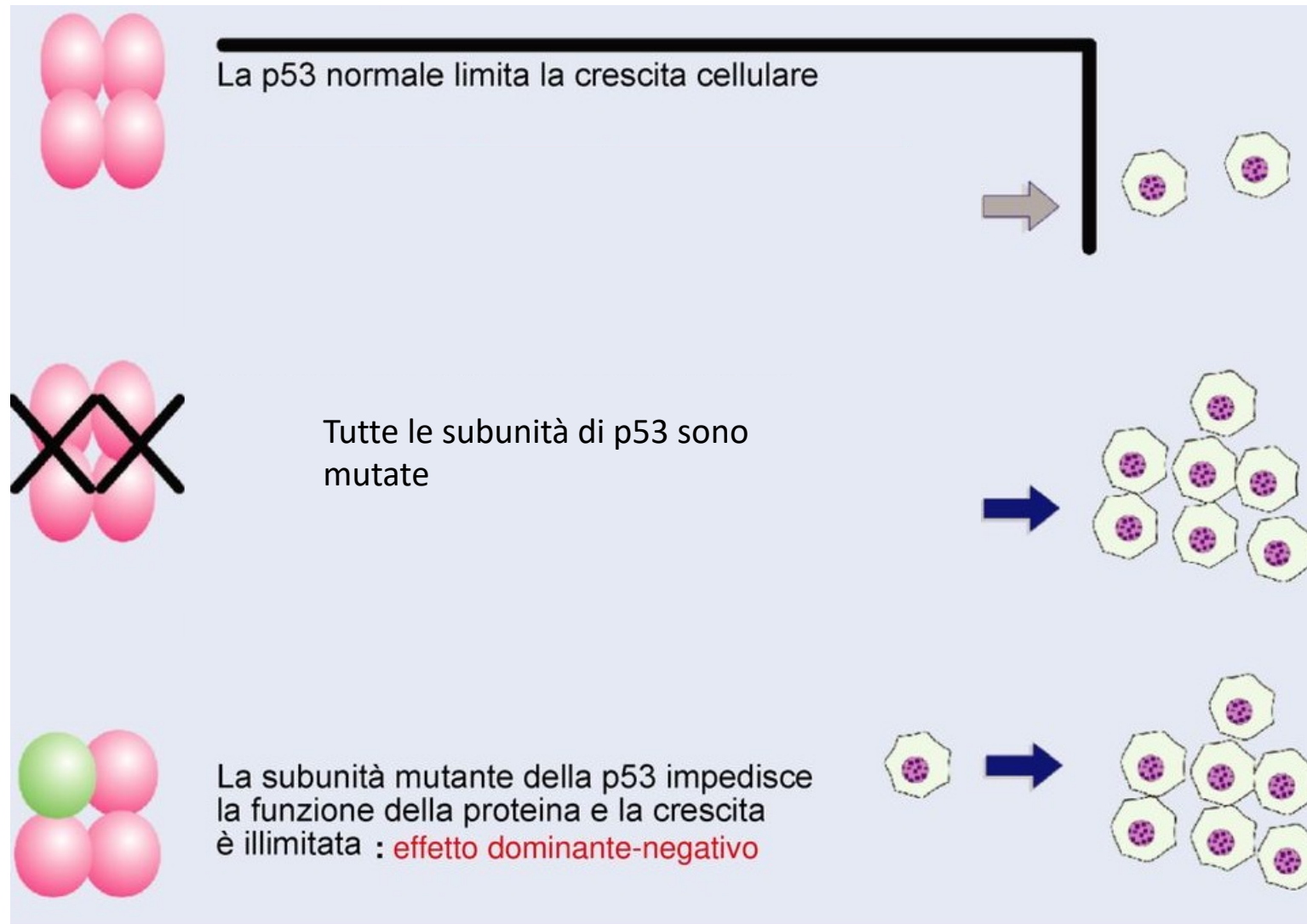
Ruolo di p53 nel mantenimento dell'integrità del genoma



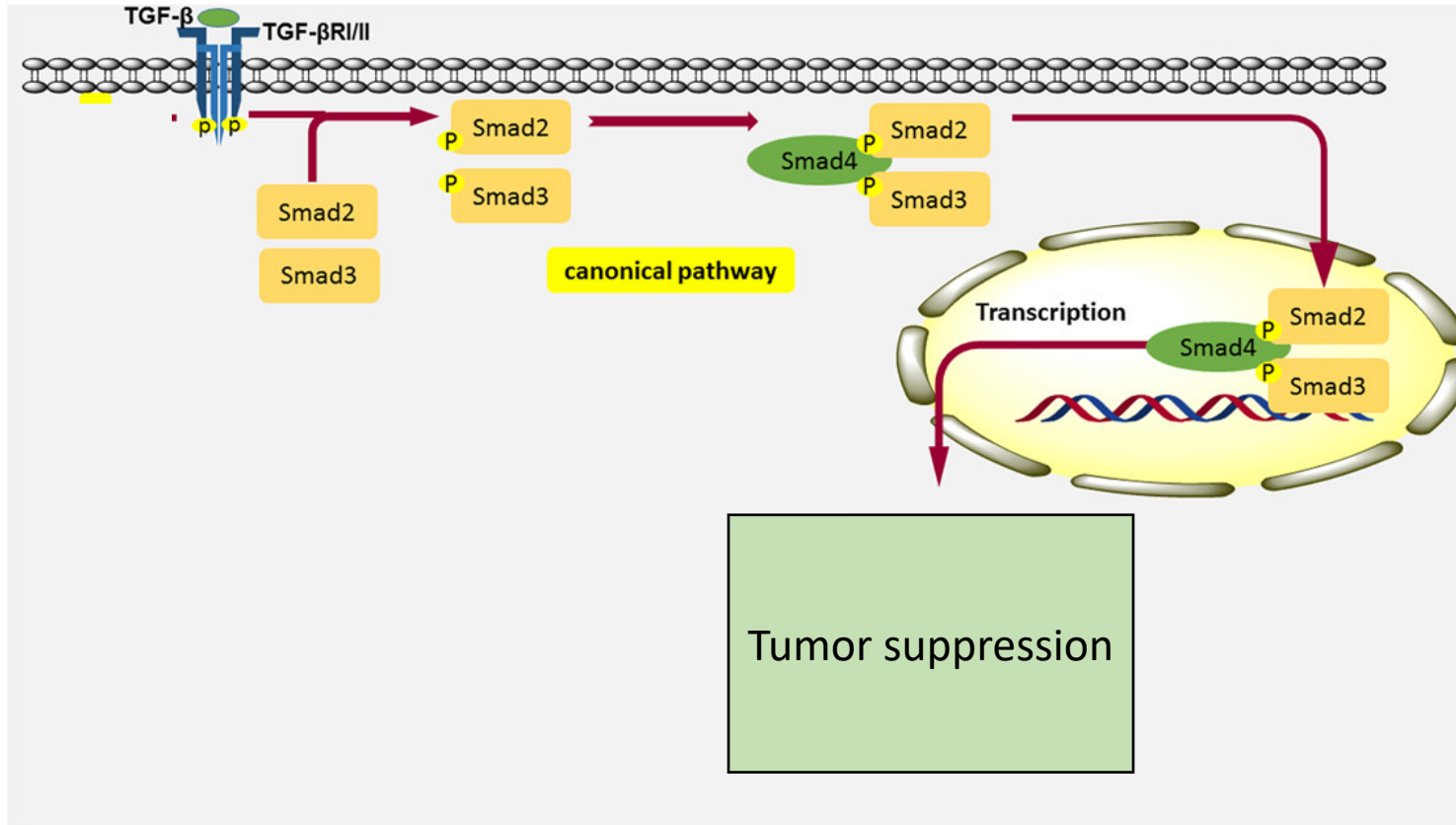
La perdita o mutazioni di p53 DNA impediscono alla cellula che ha subito un danno al DNA di arrestare il ciclo cellulare e di riparare il DNA. La proliferazione delle cellule geneticamente danneggiate favorisce la trasformazione neoplastica.

Figura 5.23 Ruolo di p53 nel mantenimento dell'integrità del genoma. L'attivazione di p53 normale da parte di agenti che danneggiano il DNA o per effetto dell'ipossia determina l'arresto del ciclo cellulare in G₁ e l'induzione della riparazione del DNA, tramite regolazione trascrizionale positiva dei geni GADD45 e dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente CDKN1A (p21). La riparazione efficace del DNA consente alle cellule di procedere con il ciclo cellulare; se la riparazione fallisce, p53 induce l'apoptosi o la senescenza. Nelle cellule con perdita o mutazione di TP53, il danno al DNA non induce l'arresto del ciclo cellulare o la riparazione del DNA e le cellule geneticamente danneggiate proliferano, dando origine, alla fine, a una neoplasia maligna.

Meccanismi di inattivazione di p53



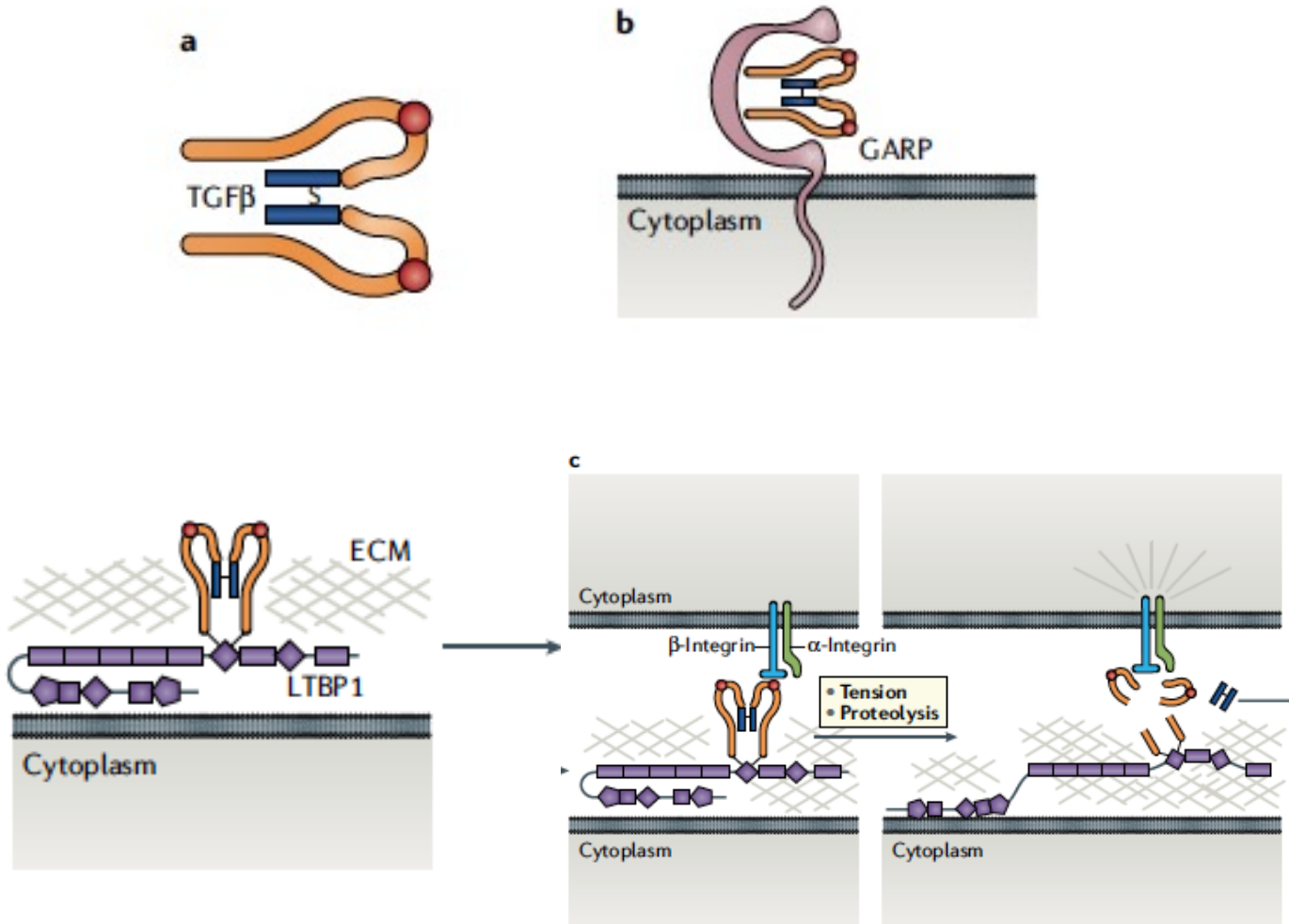
Insensibilità ai segnali di inibizione della crescita



L'inibizione della crescita può essere mediata dall'azione di molecole in grado di trasmettere segnali anti-proliferativi alle cellule.

Il TGF- β è una citochina che svolge un ruolo importante nella embriogenesi e nel mantenimento dell'equilibrio tissutale. Il TGF- β è un potente inibitore della proliferazione delle cellule epiteliali e ematopoietiche e in molte forme di cancro gli effetti inibenti del TGF- β sono modificati da mutazioni che interferiscono con il segnale trasmesso dal TGF- β . Mutazioni nei recettori o nella segnalazione del TGF- β sono state osservate nei tumori del colon, del seno e del pancreas.

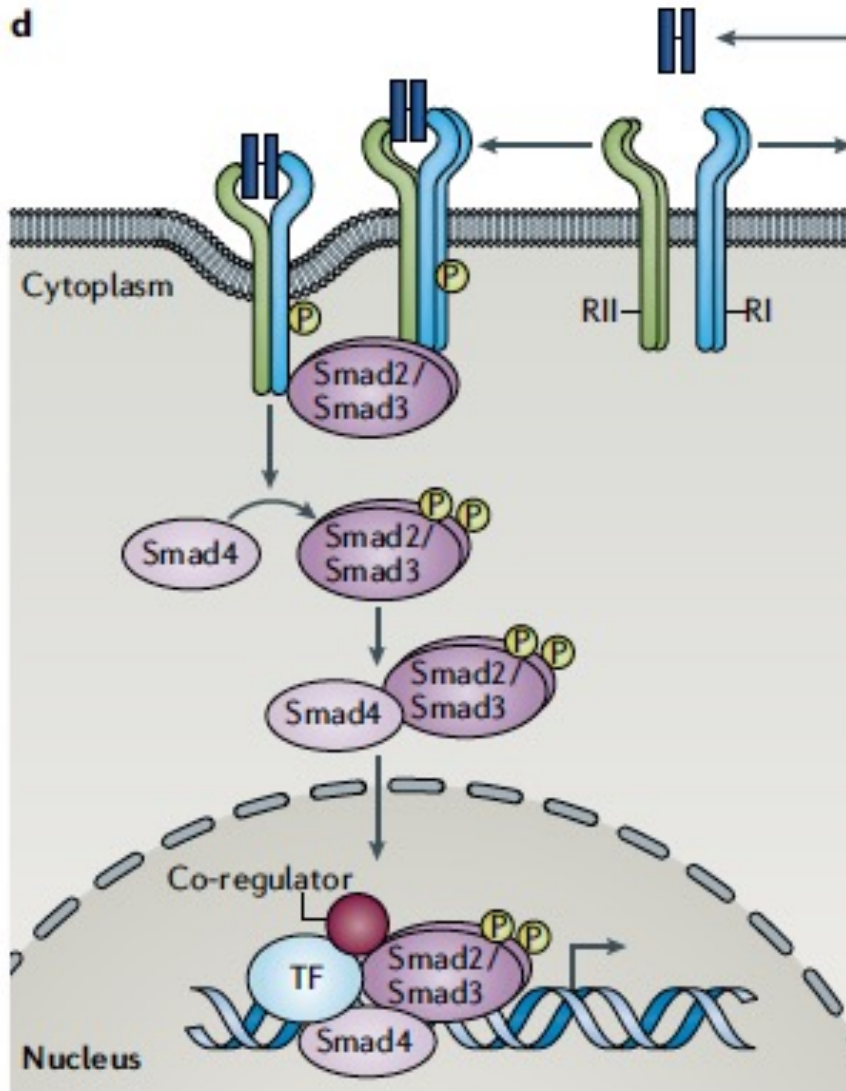
TGF- β



I mammiferi presentano tre tipi di TGF- β (TGF- β 1, - β 2, - β 3). La molecola è secreta come dimero inattivo associato attraverso legami non covalenti con 2 pro-segmenti. La molecola inattiva si lega a proteine della matrice extracellulare o a proteine cellulari. Il dimero maturo viene rilasciato in seguito a scissione proteolitica.

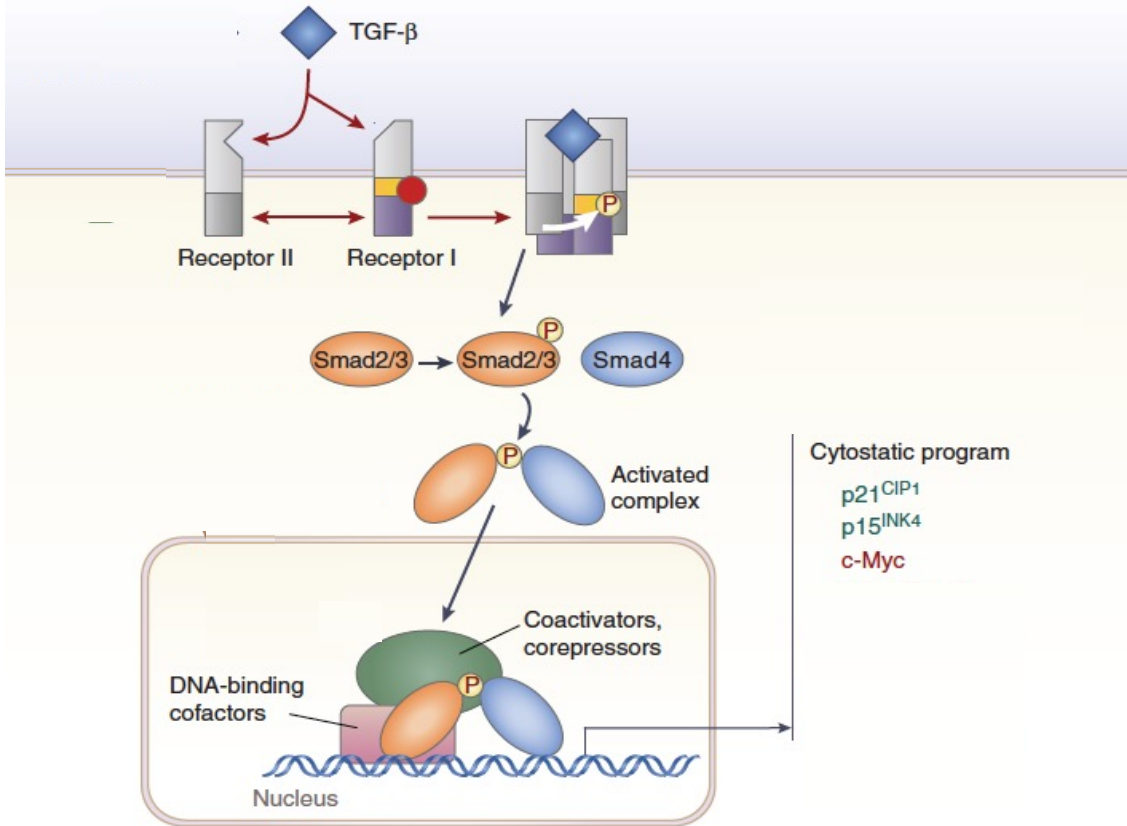
Il TGF- β è prodotto da diversi tipi cellulari inclusi i macrofagi, le cellule di origine ematopoietica (Treg, linfociti B), le cellule stromali.

Segnalazione del TGF- β



Il TGF- β si lega al recettore costituito da un tetramero di due tipi di molecole di membrana ad attività chinasi: il recettore di tipo I (T β RI) e il recettore di tipo II (T β RII). Il TGF- β lega il T β RII e recluta il T β RI che viene fosforilato nei residui di serina e treonina intracitoplasmatici e attivato da T β RII. Il T β RI, fosforila e attiva le molecole Smad (Smad2 and Smad3) mediando il rilascio delle molecole dal complesso nel citoplasma. Le molecole Smad si combinano con Smad4 per formare dei complessi trimerici che migrano nel nucleo dove regolano la trascrizione genica interagendo con fattori trascrizionali e co-regolatori.

Azione tumore soppressiva del TGF- β

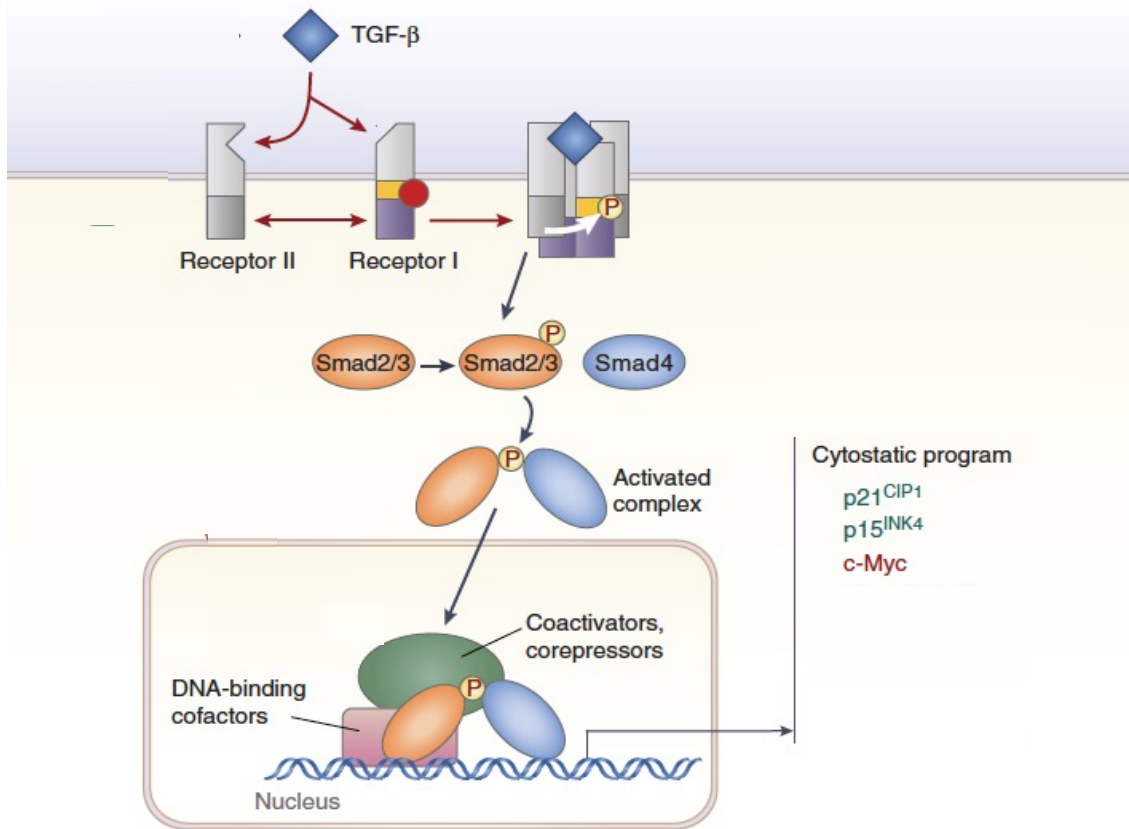


Il TGF- β svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi dei tessuti.

Nelle cellule epiteliali normali ha un forte effetto anti-proliferativo e questo rende il TGF- β un fattore soppressore del tumore nelle fasi precoci del suo sviluppo. Il TGF- β svolge una azione anti-oncogenica bloccando la progressione del ciclo cellulare attraverso due eventi:

- l'induzione dell'espressione degli inibitori delle CDK
- la soppressione di c-MYC

Nelle cellule epiteliali il TGF- β induce l'espressione degli inibitori delle CDK p15^{INK4b} e p21^{CIP1}.

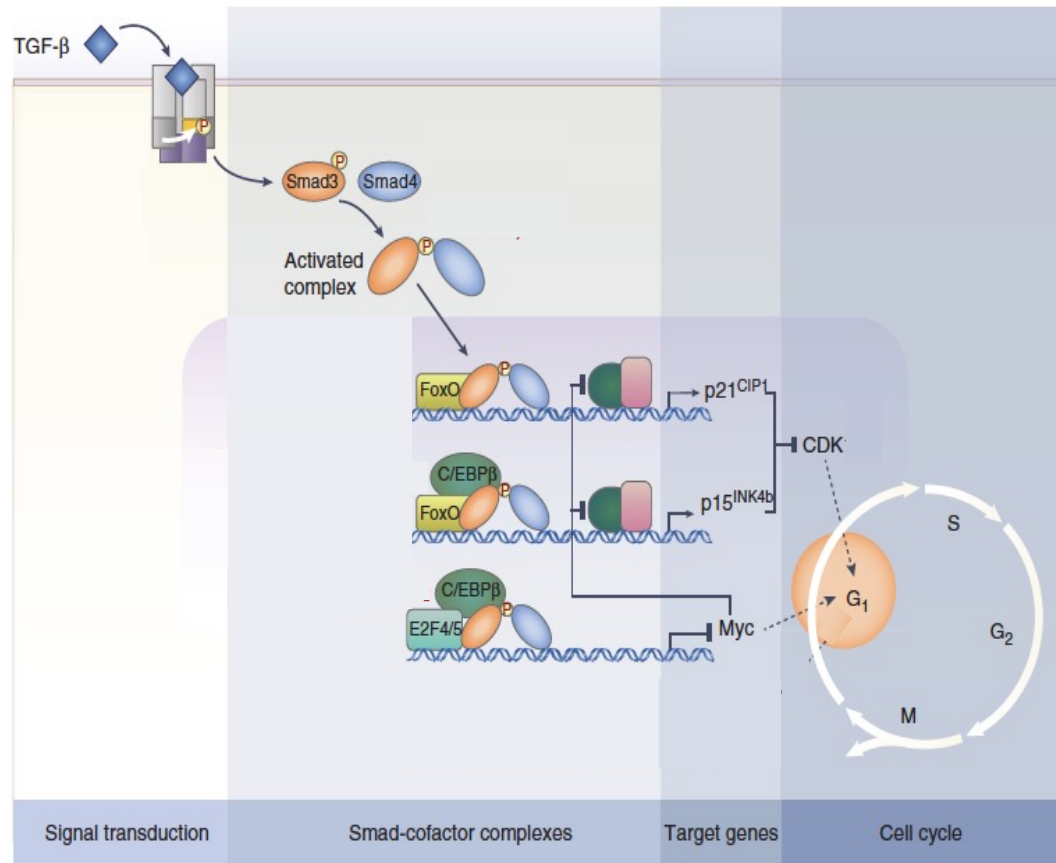


I complessi Smad sono in grado di legare il DNA.

L'interazione dei complessi Smad con cofattori ne aumenta l'affinità e la selettività per il DNA.

I complessi Smad attivati interagiscono con coattivatori e repressori mediando l'attivazione o la repressione di diversi geni.

Azione tumore soppressiva del TGF- β



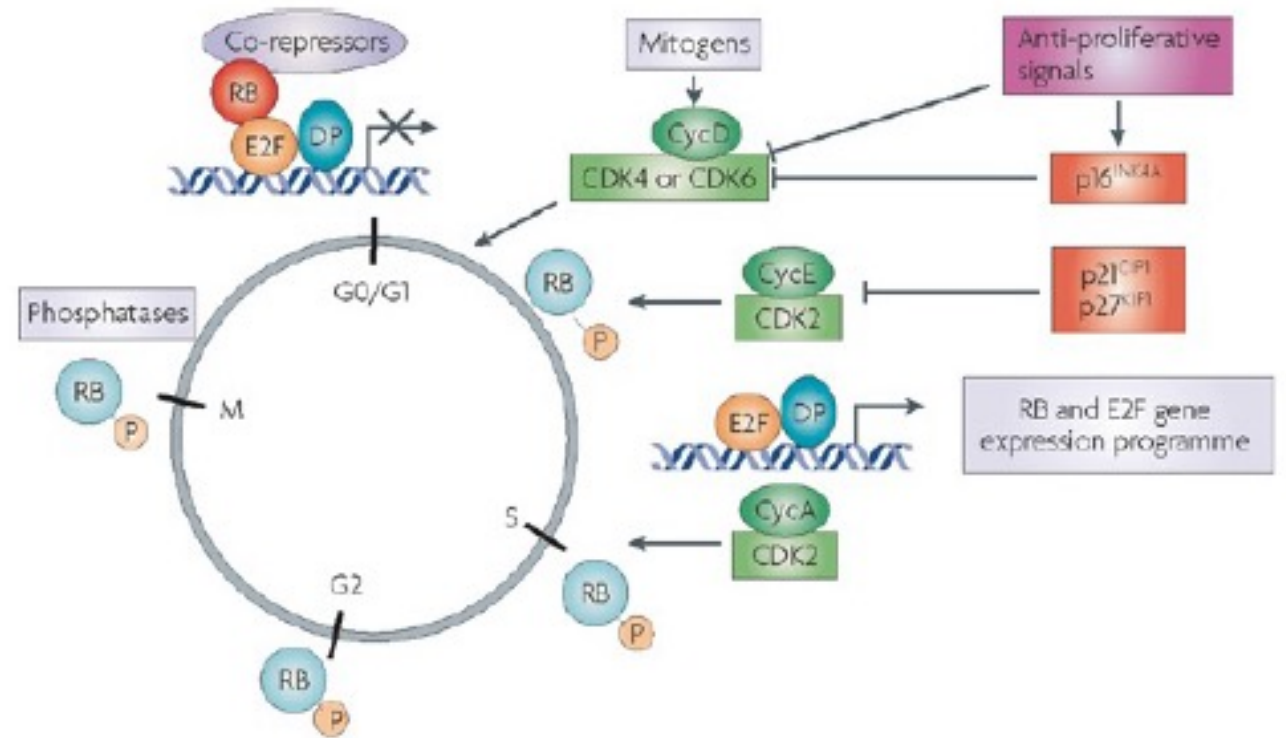
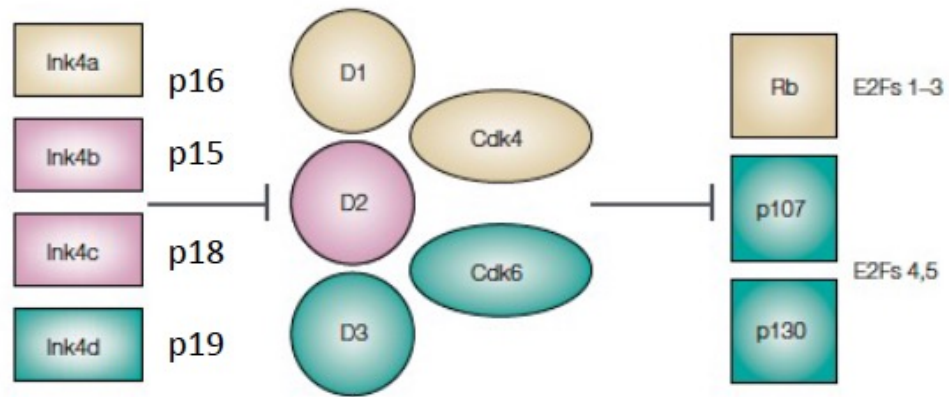
p15^{INK4b} inibisce la formazione dei complessi CDK4/CDK6 ciclina D mentre p21^{CIP1} la formazione dei complessi CDK2 ciclina E o A.

I complessi Smad si associano con il fattore di trascrizione FoxO attivando la trascrizione dei geni CDKN2B (p15^{INK}) e CDKN1A (p21^{CIP}).

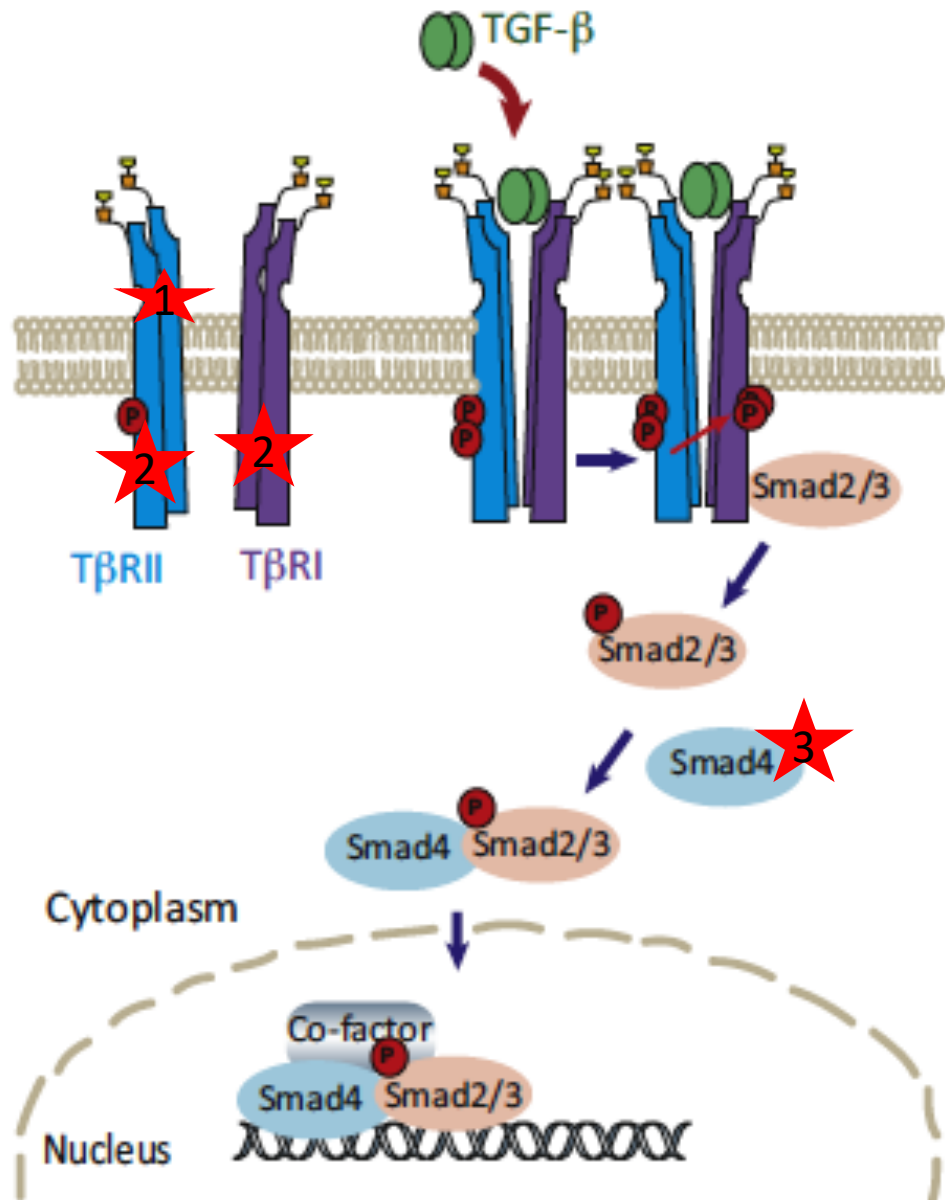
Il TGF- β down regola l'espressione di c-Myc nei cheratinociti e nelle cellule epiteliali mammarie.

La downregolazione di c-Myc è mediata dai complessi costituiti da Smad3-Smad4 e i fattori E2F4/5 che riconoscono sequenze prossime al promotore di MYC mentre p107 recluta i corepressori.

Funzioni degli inibitori della famiglia INK4 e CIP/KIP



Alterazioni nelle componenti del TGF- β nei tumori



1

Inserzioni o delezioni del TGFB β 2 sono comuni nei tumori gastrici, colon retto e nei carcinomi polmonari.

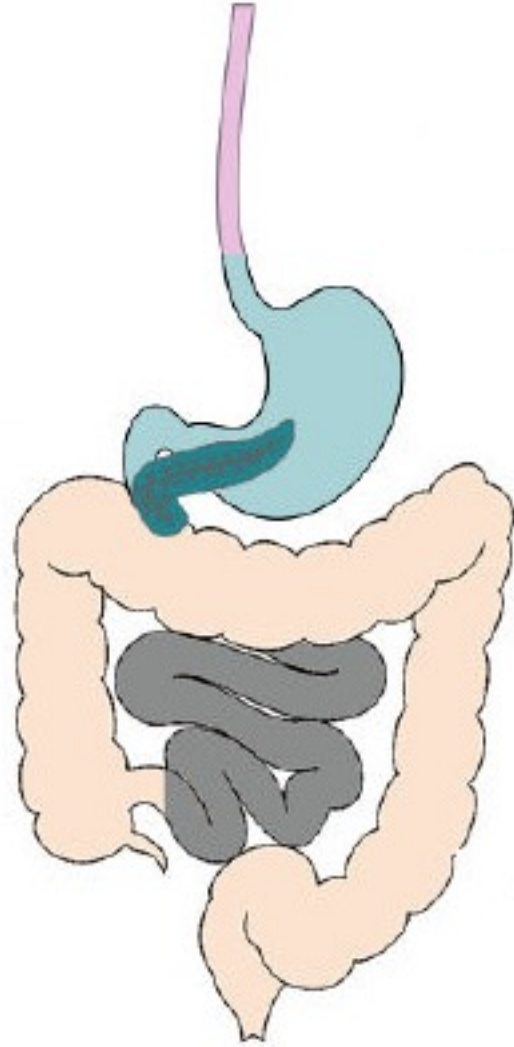
2

Ridotta espressione di T β RII e T β RI è stata riportata in tumori del polmone, prostata e dello stomaco.

3

Delezioni in SMAD4 su un cromosoma e mutazioni nel secondo sono frequentemente osservate nei tumori del pancreas. Mutazioni in SMAD4 sono ricorrenti nel tumore del colon retto. Le alterazioni di SMAD4 sono considerate un evento tardivo nella progressione tumorale.

Inattivazione della via del TGF- β nei tumori

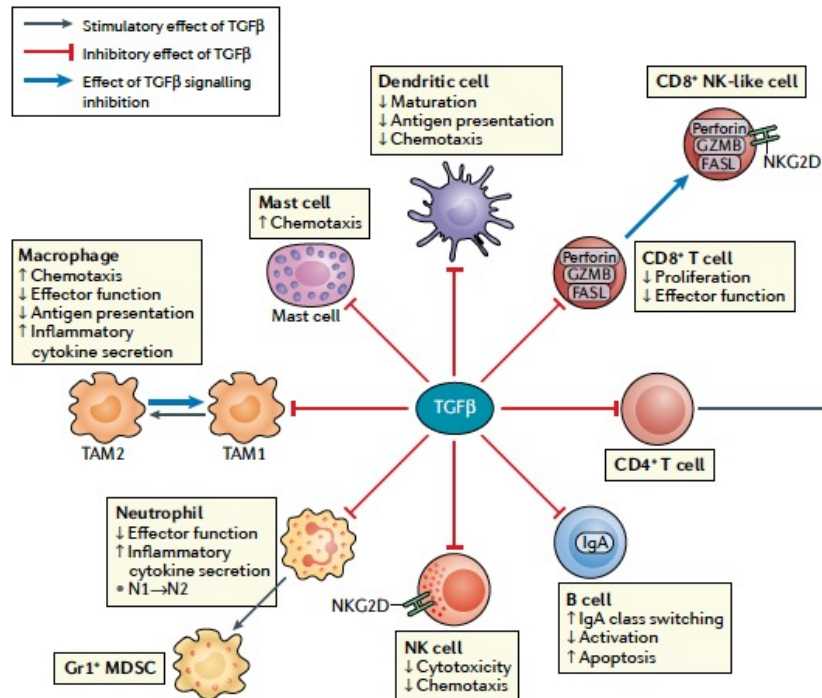


Mutazioni inattivanti la via del TGF- β (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD2*, *SMAD3*, and *SMAD4*) sono state riportate in circa il 30% dei cancro coloretali non ipermutati e 90% dei cancro ipermutati.

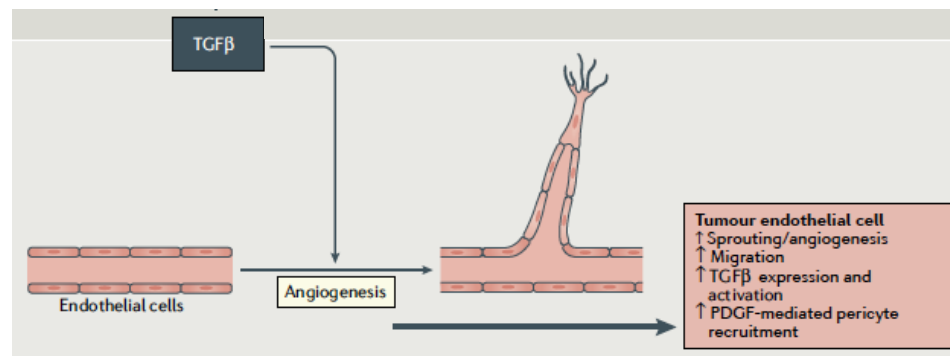
Mutazioni o delezioni di *SMAD4* sono state osservate in circa il 50% dei tumori del pancreas e il 15% dei cancro del colon.

Un gruppo di tumori del colon sono caratterizzati da un elevato numero di mutazioni nelle sequenze microsatelliti. Il fenotipo microsatellite instability (MSI) è causato da perdita del meccanismo di mismatch repair del DNA.

Il TGF- β promuove la progressione tumorale

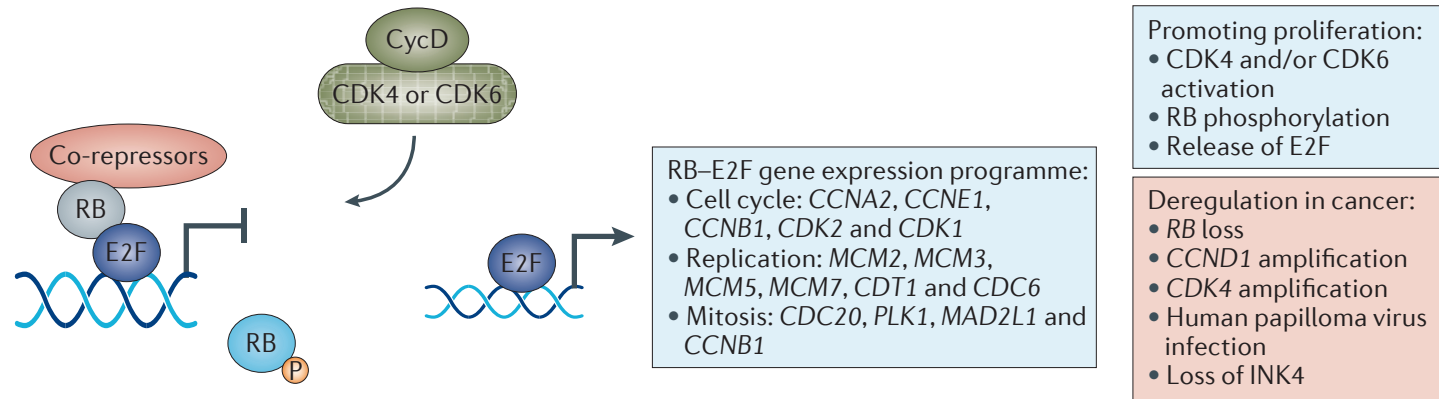


- Il TGF- β ha un effetto immunosoppressorio nel microambiente tumorale.
- Il TGF- β promuove l'angiogenesi
- promuove la riprogrammazione dell'espressione genica nelle cellule tumorali epiteliali favorendo la capacità delle cellule di migrare e invadere i tessuti circostanti.



Molecole della fase G1-S disregolate nei tumori

b



c

