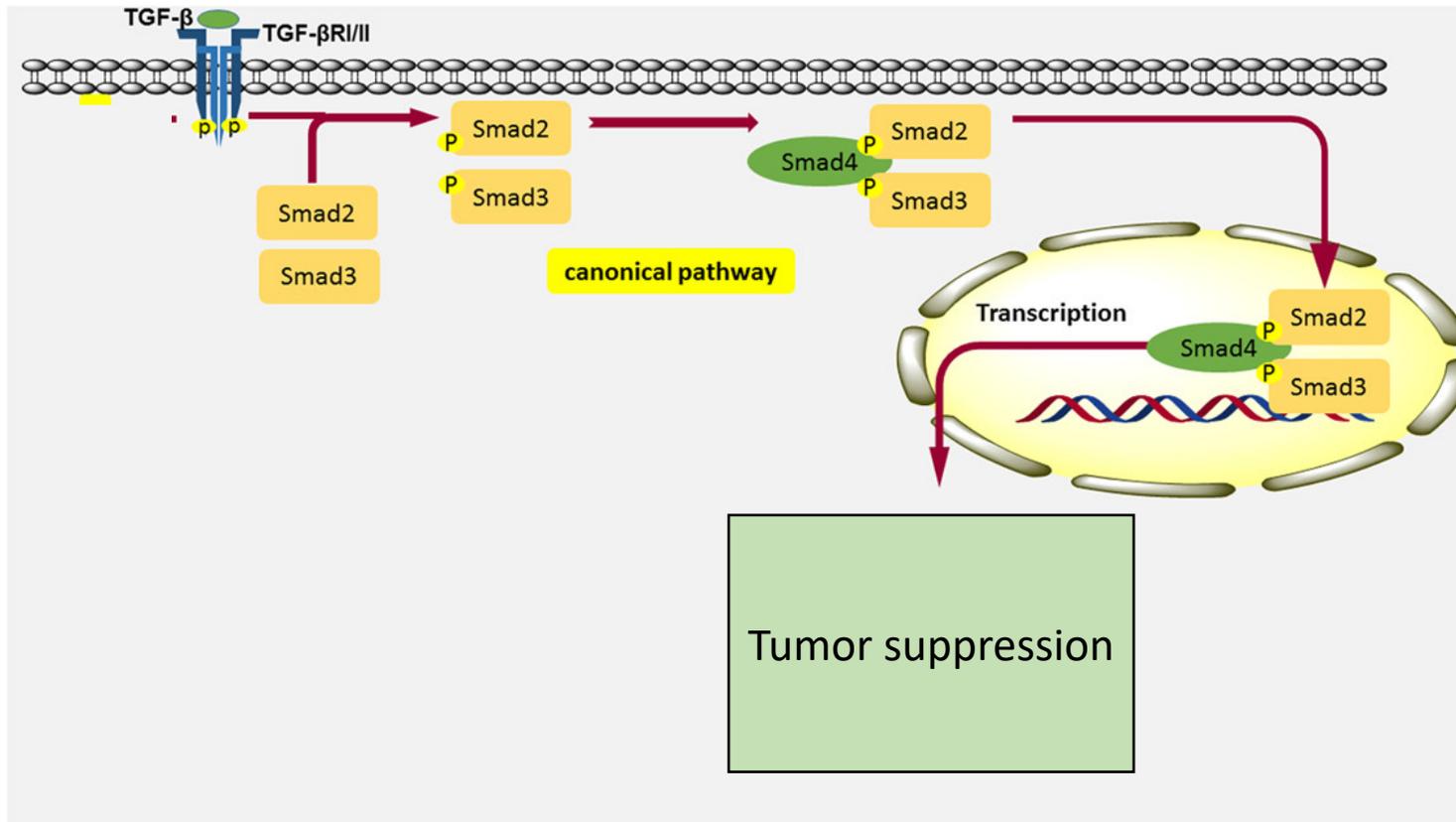


Figure 1. Acquired Capabilities of Cancer

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

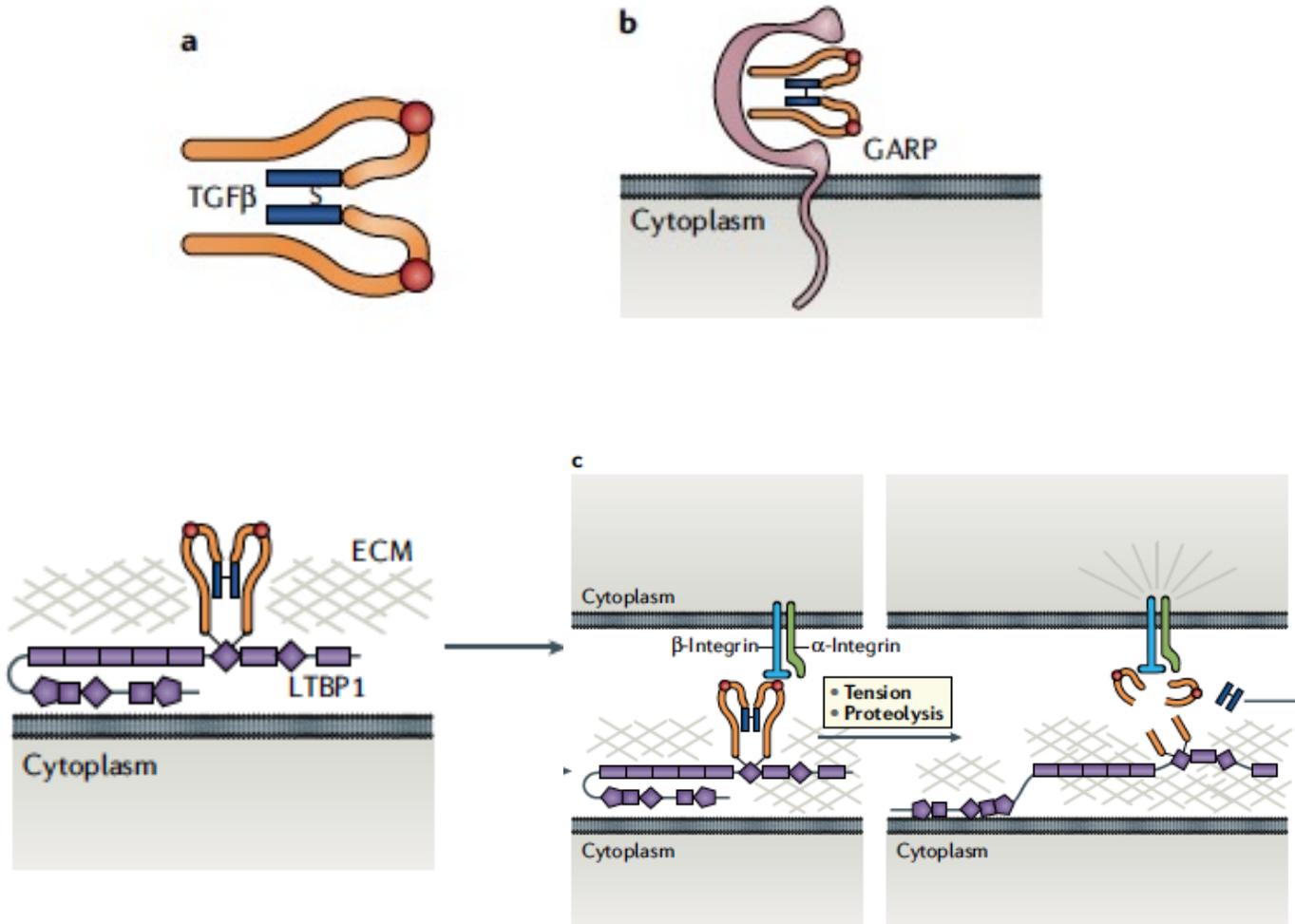
Insensibilità ai segnali di inibizione della crescita



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.

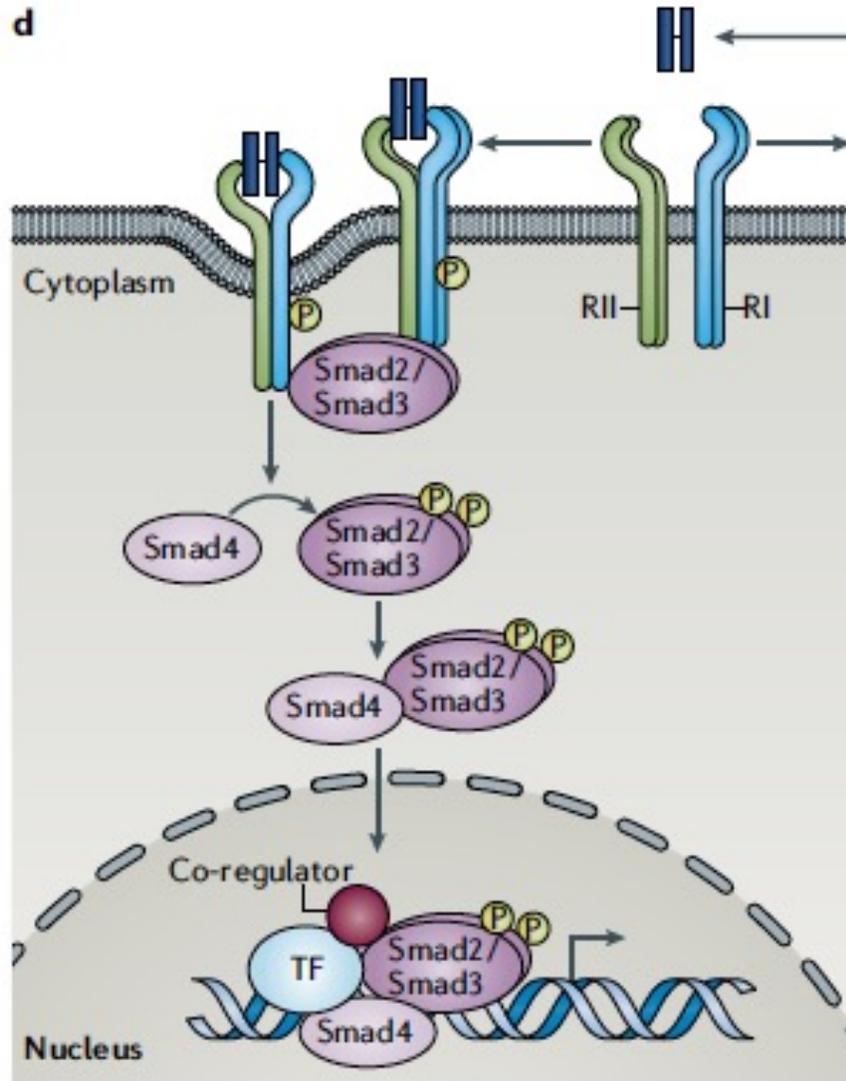
TGF- β



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.

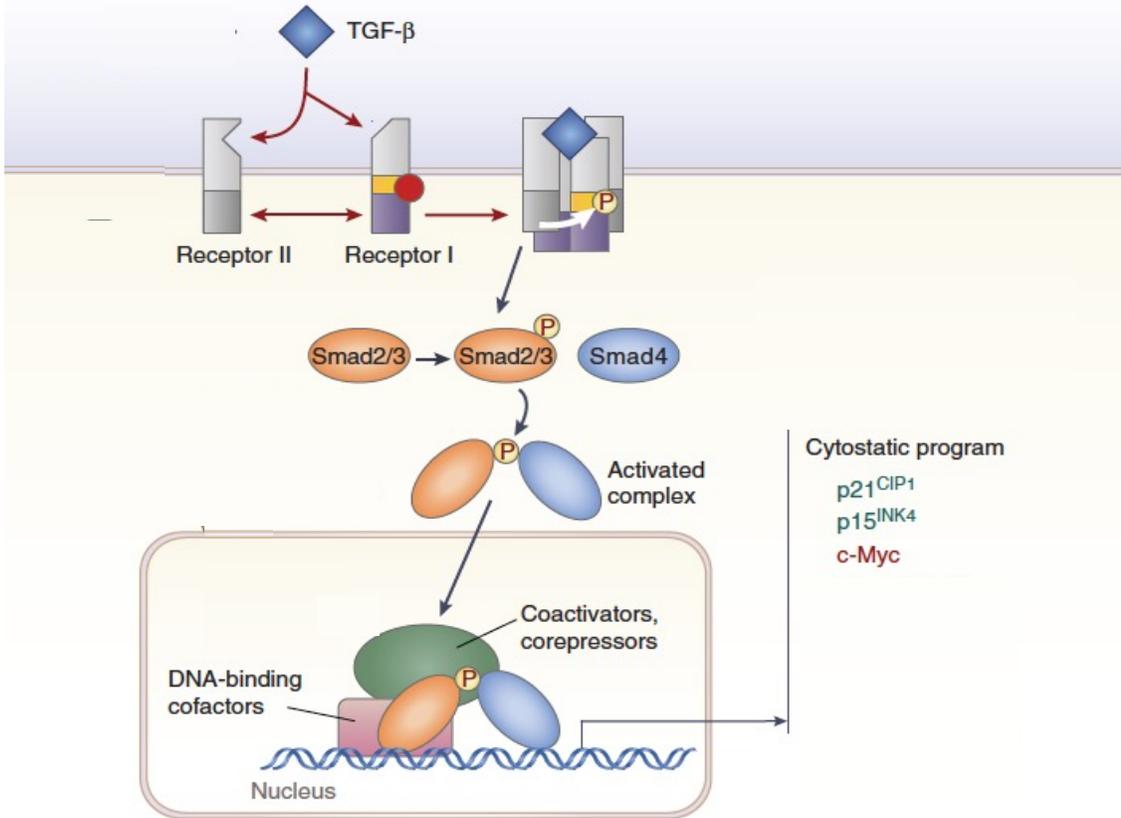
Il TGF- β è prodotto da diversi tipi cellulari inclusi i macrofagi, le cellule di origine ematopoietica (Treg, linfociti B), le cellule stromali.

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

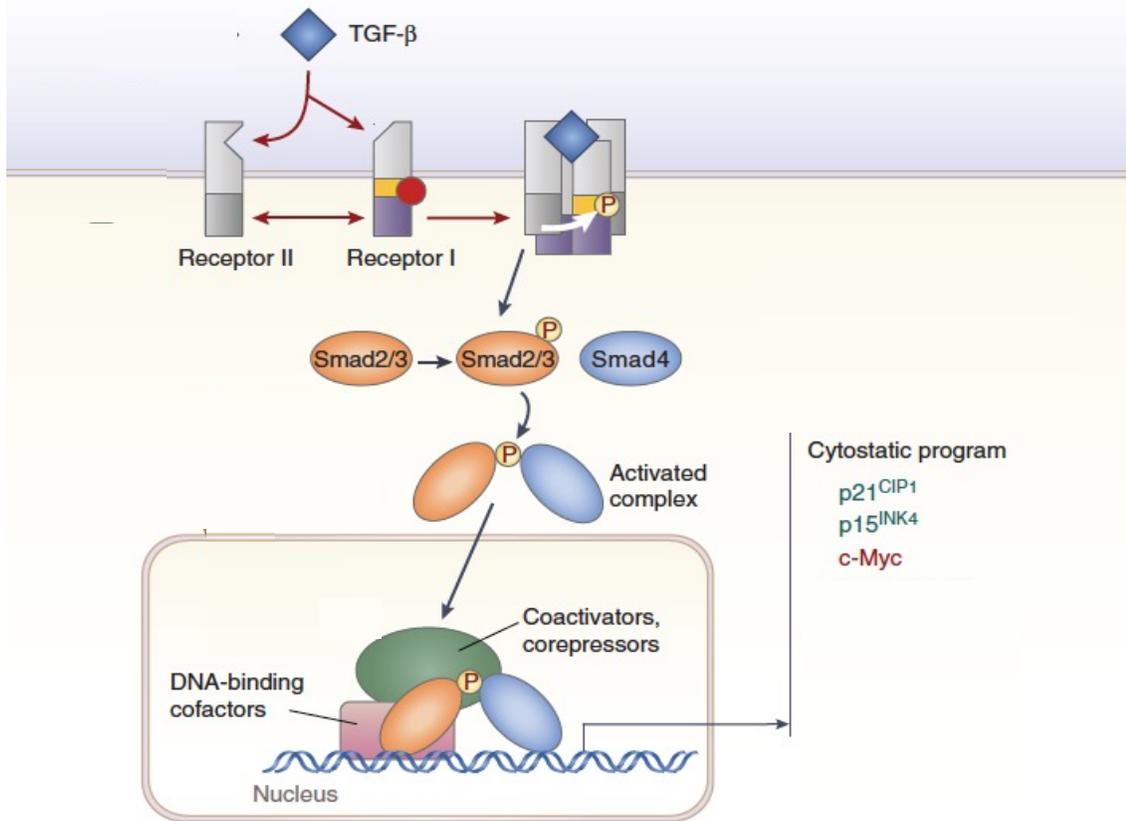


Il TGF- β svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi dei tessuti.

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}.

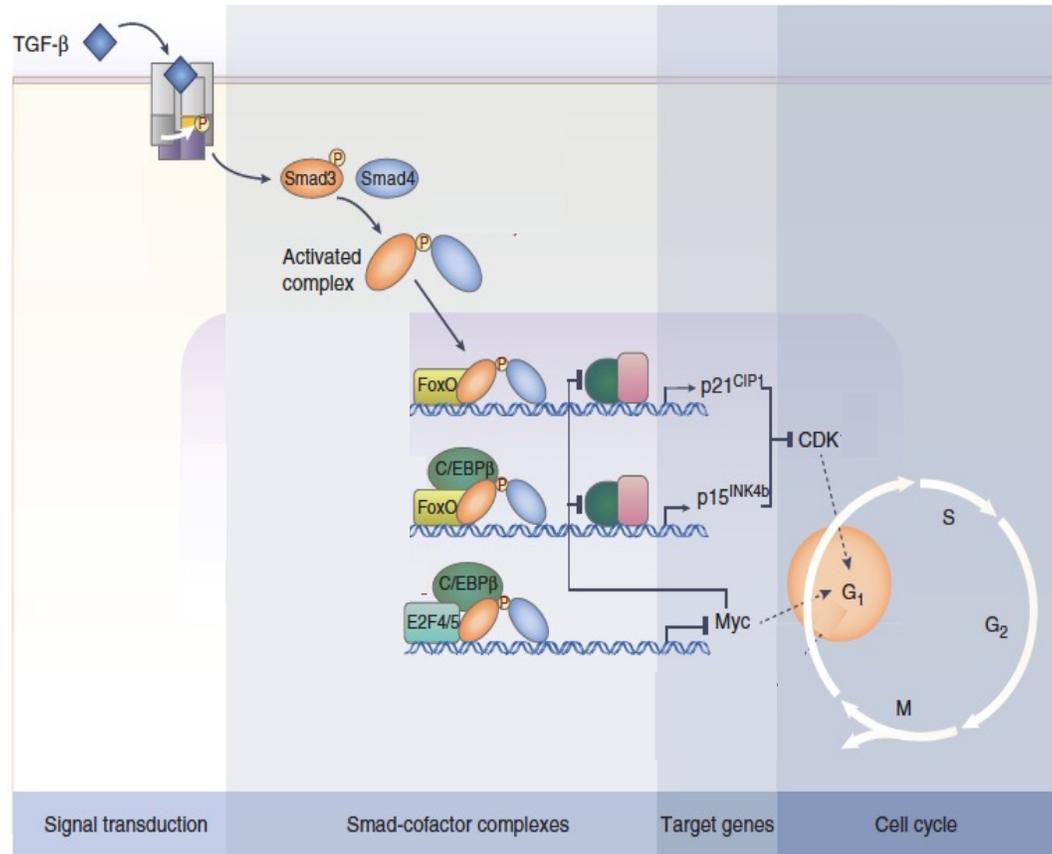


I complessi Smad sono in grado di legare il DNA.

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



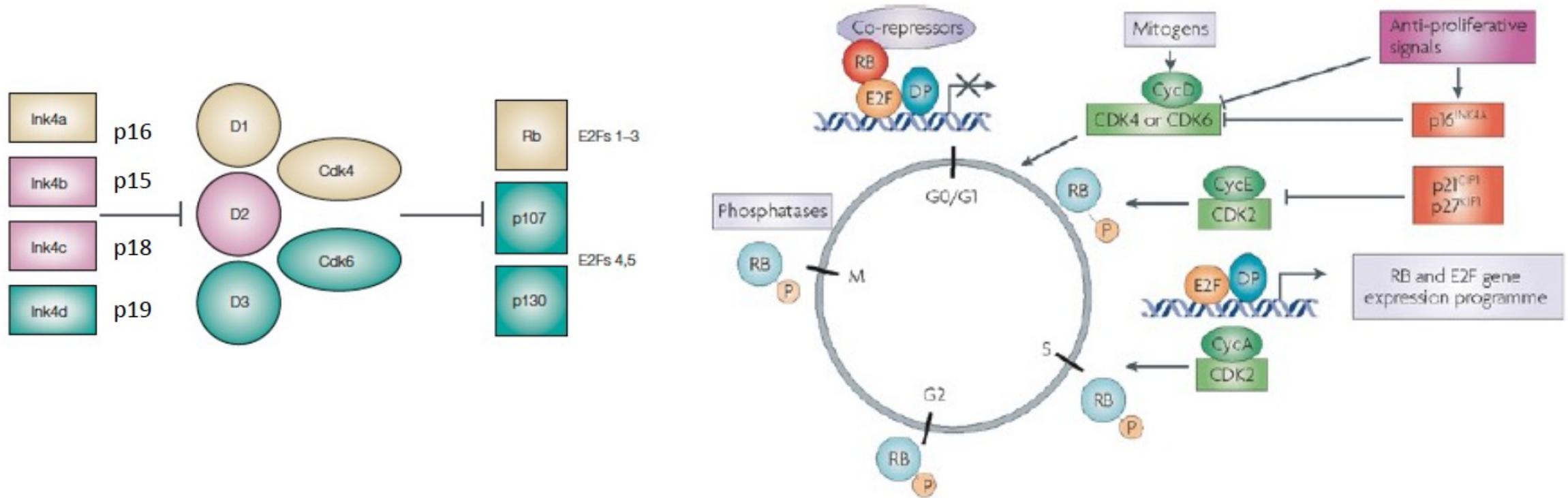
p15^{INK4b} inibisce la formazione dei complessi CDK4/CDK6 ciclina D mentre p21^{CIP1} la formazione dei complessi CDK2 ciclina E o A.

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

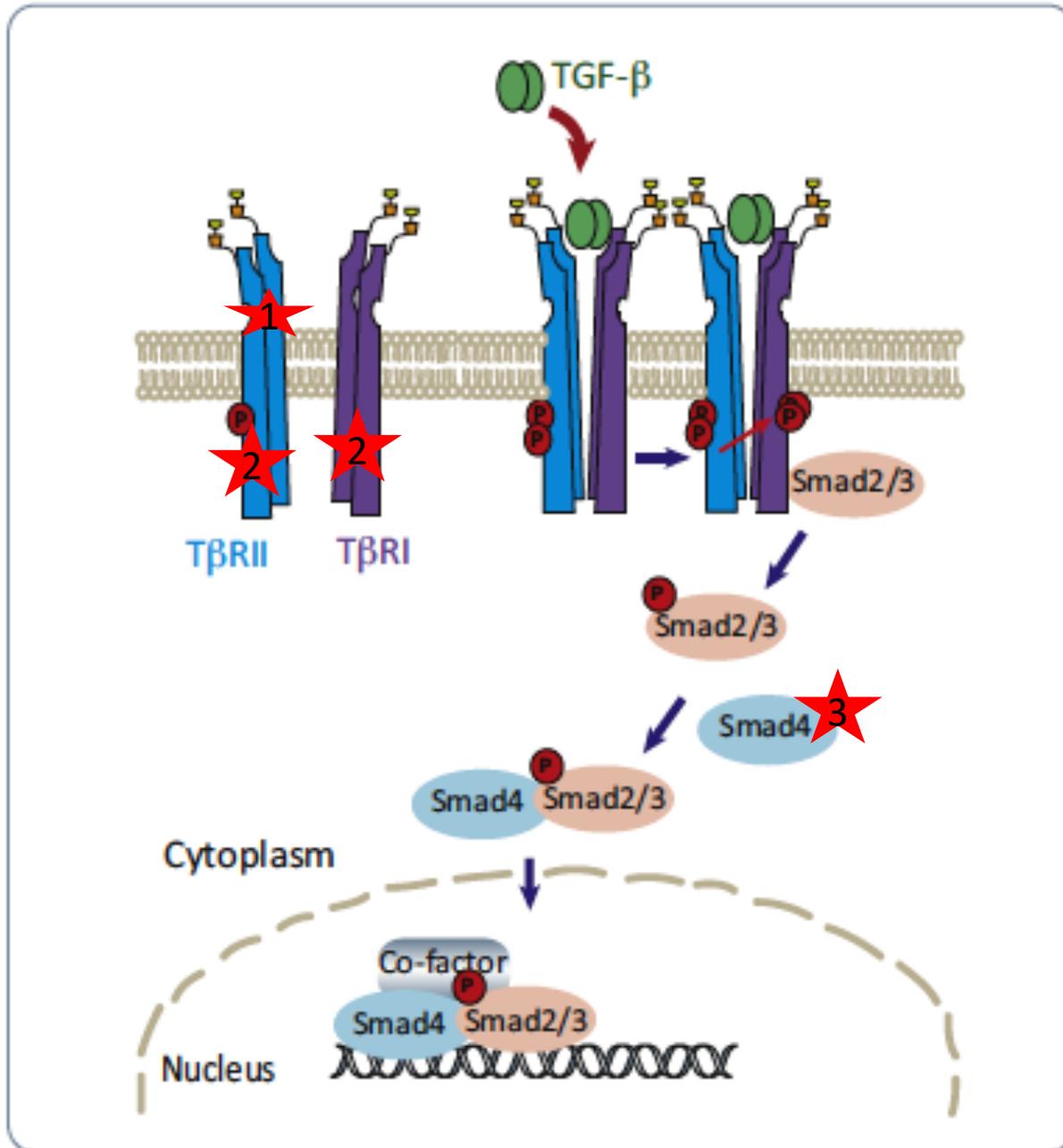
Il TGF- β down regola l'espressione di c-Myc nei cheratinociti e nelle cellule epiteliali mammarie.

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 TGFBR2 sono comuni nei tumori gastrici, colon retto e nei carcinomi polmonari.

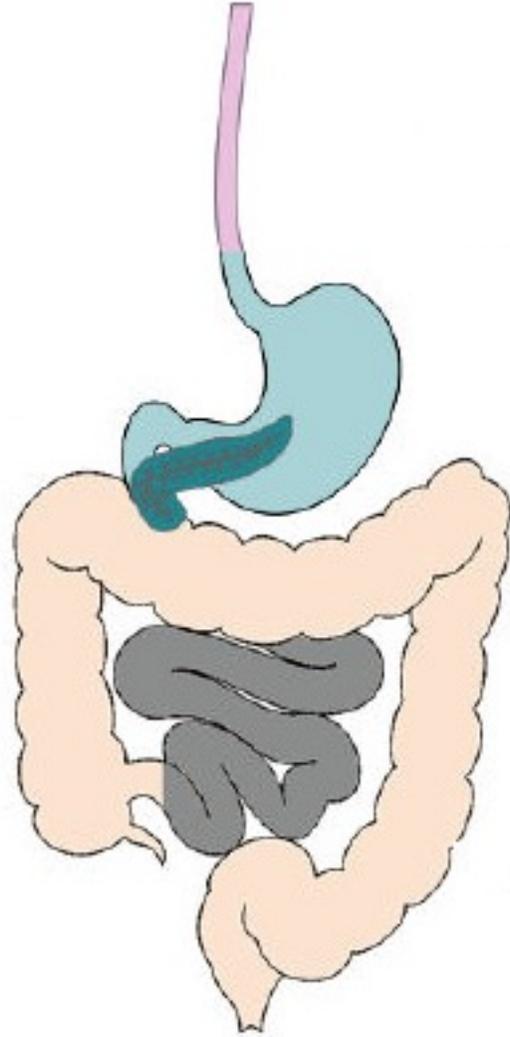
2

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.

Oncosoppressore APC

APC

 Associated Syndrome	Familial adenomatous polyposis (FAP) / Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP)
 Core Cancer Risk(s)	Colorectal cancer (colorectal polyps), small bowel cancer, stomach
 Inheritance	Autosomal dominant
 Prevalence	Estimated: 1 in 31,000 to 1 in 43,000 1% of all colon cancers

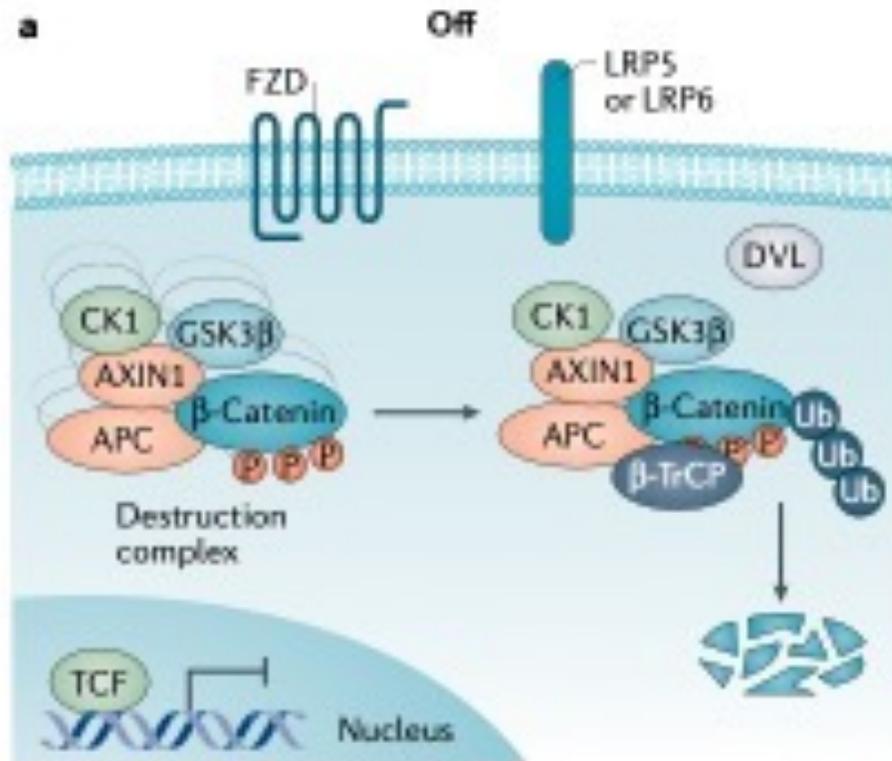
La poliposi edematosa del colon (APC) è una rara malattia ereditaria caratterizzata dallo sviluppo di numerosi polipi del colon che hanno una incidenza molto elevata di trasformazione in tumori del colon.

Questa malattia è dovuta a perdita del gene oncosoppressore APC che codifica per una proteina citoplasmatica che ha la funzione di regolare i livelli cellulari della β -catenina.

La β -catenina è un co-attivatore trascrizionale che è attivato della via di segnalazione mediata dal recettore delle proteine Wnt.

Le proteine Wnt regolano diversi processi quali l'organogenesi, la motilità, la polarità e il rinnovamento di diversi tessuti come l'epitelio intestinale.

Via di segnalazione di Wnt nella cellula non stimolata

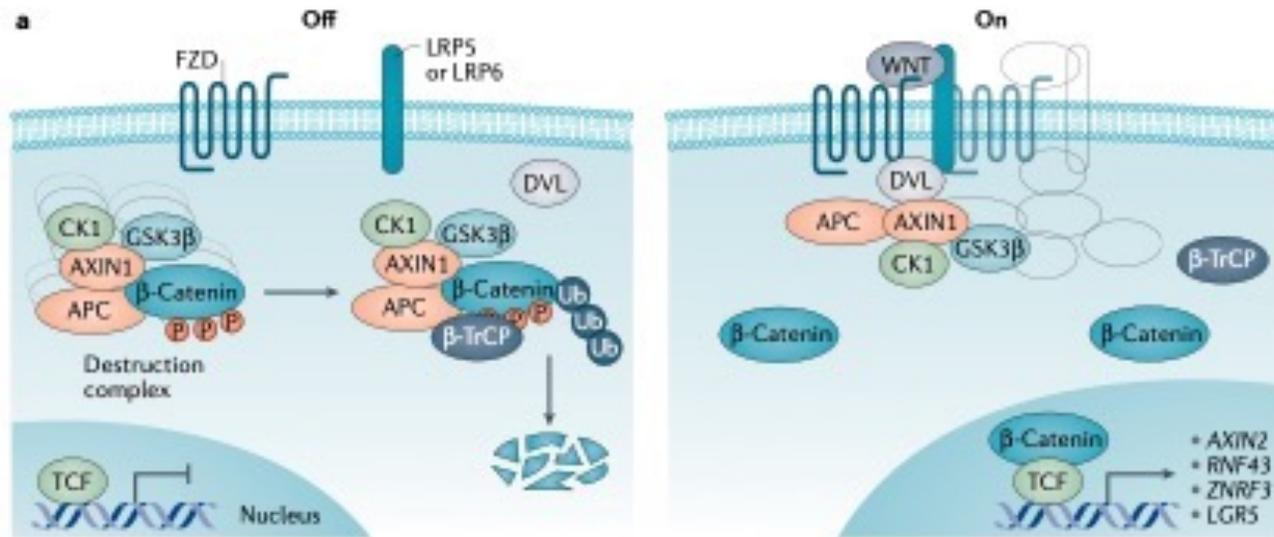


La β -catenina agisce da regolatore della trascrizione e da adattatore per l'adesione cellulare.

In condizioni di equilibrio i livelli citoplasmatici di β -catenina sono mantenuti bassi attraverso la degradazione della β -catenina da parte di un complesso di proteine denominato «destruction complex». Il destruction complex include le molecole «scaffold» Axin e APC, le chinasi, glicogeno sintetasi chinasi 3 (GSK3) e la casein chinasi 1 (CK1) e la β -catenina.

La β -catenina è fosforilata da GSK3 e CK1 permettendone il riconoscimento da parte della E3 ubiquitin ligasi β -Trcp con conseguente degradazione da parte del proteasoma.

Risposta della cellula alla stimolazione con Wnt



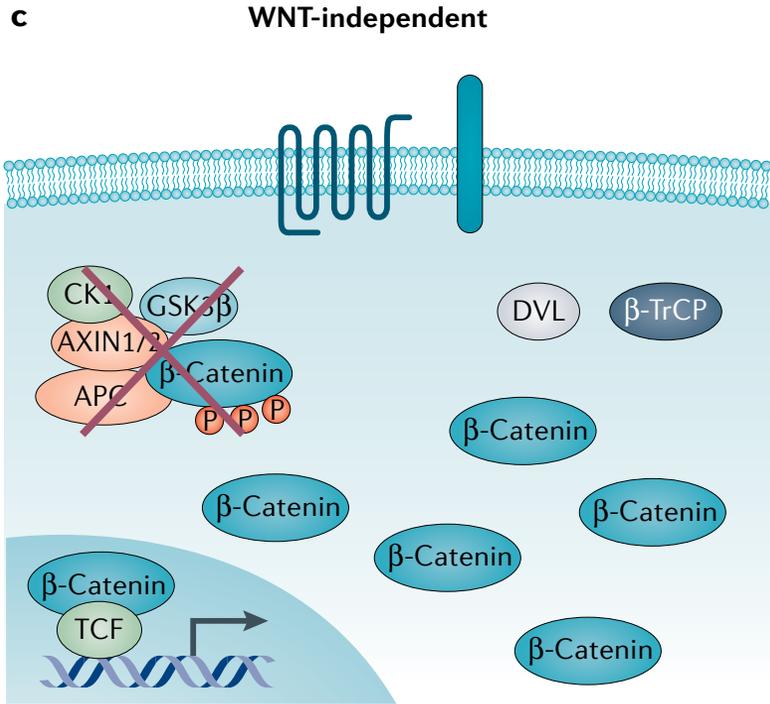
La stimolazione delle cellule da parte di Wnt ha inizio con la formazione di un complesso trimerico costituito da Wnt, il recettore Frizzled e il corecettore LRP (LRP5/6) sulla superficie della cellula. Questo recluta la proteina effettrice Dishevelled (DVL).

Questo determina il reclutamento di AXIN1 e di altre componenti del complesso alla membrana plasmatica con conseguente inibizione della degradazione della β -catenina.

La β -catenina stabilizzata trasloca nel nucleo dove forma un complesso con altre molecole attivando la trascrizione di geni quali le cicline D e MYC.

L'over espressione di APC induce l'arresto in fase G1 di linee cellulari di cancro del colon. Questo è stato attribuito alla regolazione negativa della trascrizione mediata dalla catenina.

Mutazioni di APC



Mutazioni inattivanti APC aboliscono la formazione del destruction box con conseguente stabilizzazione della β -catenina che nel nucleo induce l'eccessiva attivazione degli effettori a valle di Wnt promuovendo la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali.

APC	Colorectal adenocarcinoma	66.55%
	Uterine corpus endometrial carcinoma	14.34%
	Skin cutaneous melanoma	14.25%
	Stomach adenocarcinoma	13.38%
	Bladder urothelial carcinoma	7.04%

AXIN1	Liver hepatocellular carcinoma	7.77%
	Uterine corpus endometrial carcinoma	6.42%
AXIN2	Uterine corpus endometrial carcinoma	7.36%
	Colorectal adenocarcinoma	5.04%
CTNNB1	Liver hepatocellular carcinoma	25.47%
	Uterine corpus endometrial carcinoma	25.47%
	Adenocortical carcinoma	15.05%
	Skin cutaneous melanoma	6.68%
	Stomach adenocarcinoma	6.68%
Colorectal adenocarcinoma	5.71%	

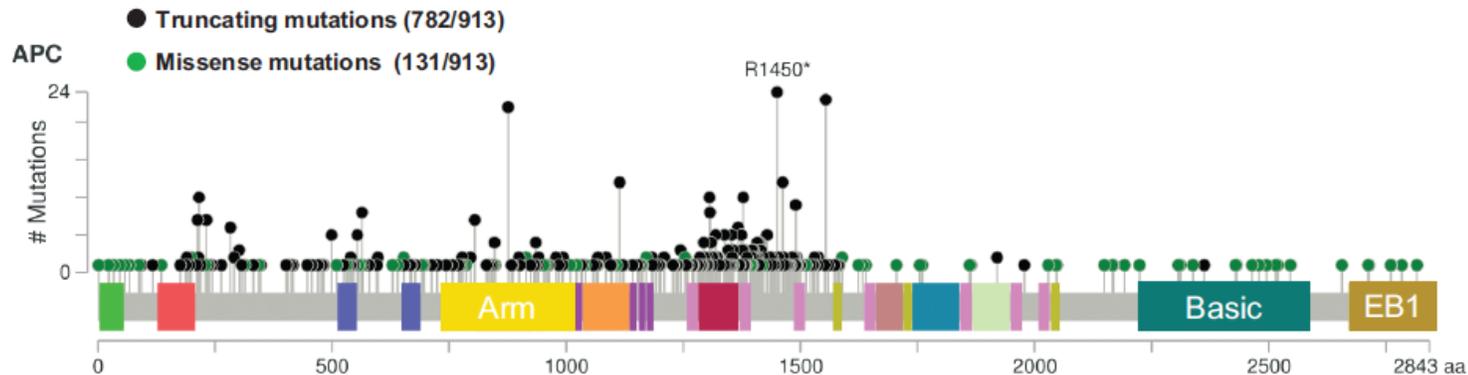
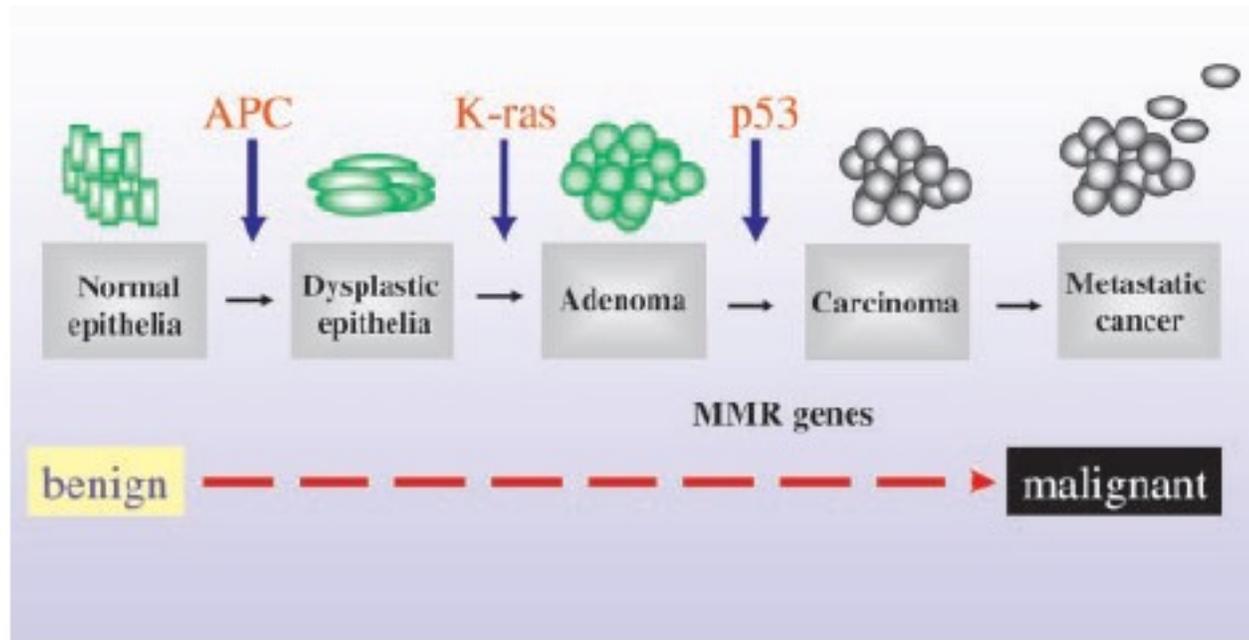


Figure 2. Lollipop plot showing the distribution and classes of mutations in APC across colorectal cancer datasets in The Cancer Genome Atlas. Plot originally generated using the cBioPortal (103). Light circles indicate missense mutations and dark circles indicate truncating mutations (including nonsense, nonstop (mutation occurring within a stop codon), frameshift deletion, frameshift insertion and splice site mutations). Arm=armadillo.

Stadi nello sviluppo del cancro del colon



Generalmente il cancro del colon retto ha inizio con la trasformazione dell'epitelio del colon normale in un adenoma benigno. Successivamente l'accumulo di alterazioni genetiche e epigenetiche determinano la transizione a tumore maligno.

Il modello genetico multi-step dello sviluppo del cancro del colon proposto da Fearon and Vogelstein prevede che l'inattivazione di APC rappresenti il primo evento, seguito dalla mutazione oncogenica di RAS, e poi dalla inattivazione di p53 sul cromosoma 17. Questo processo può interessare decenni.

Fig. 1. A model of the genetic changes required for progression from adenoma to carcinoma in the development of colorectal cancer (6). The proposed order of mutations in APC, K-ras, p53, and the DNA MMR genes is illustrated.

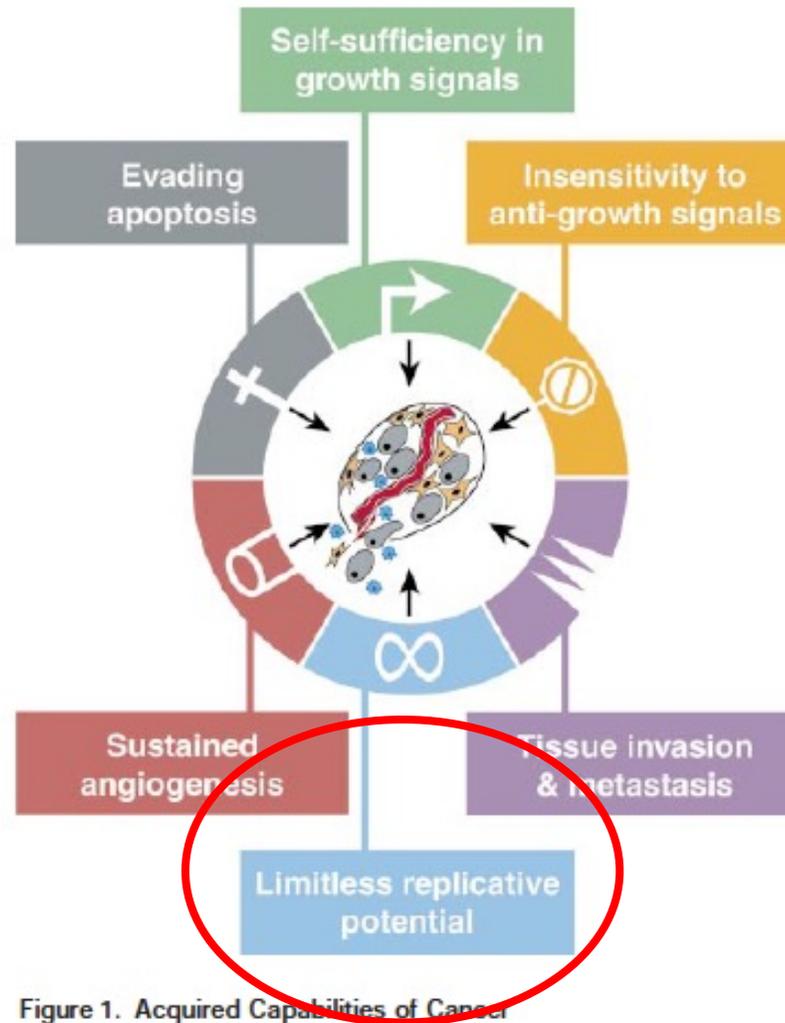
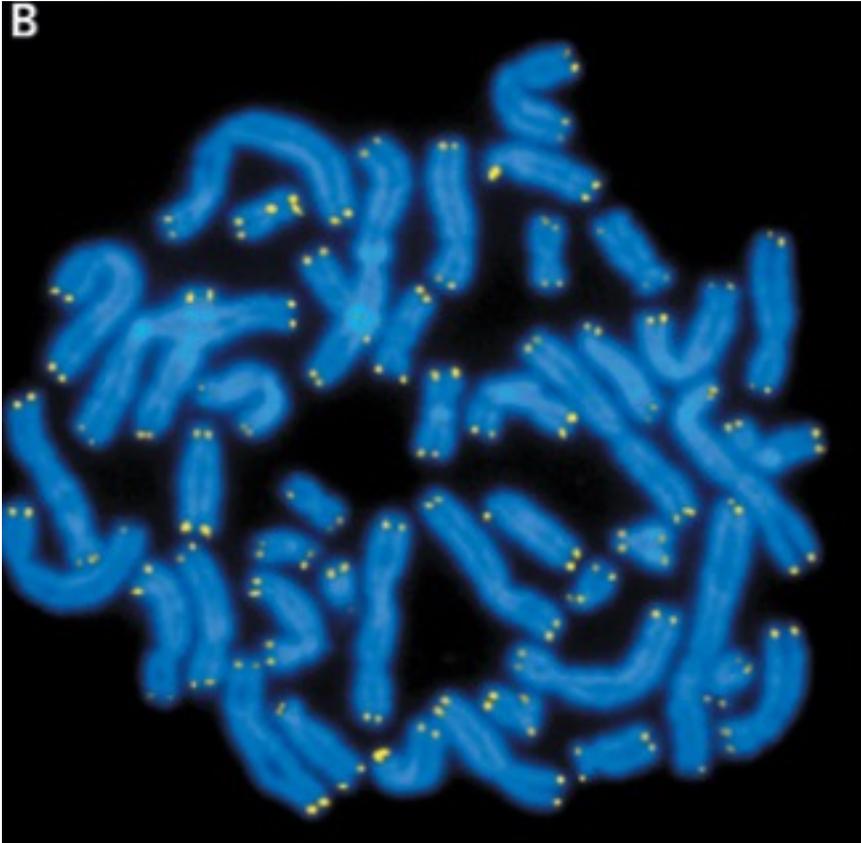


Figure 1. Acquired Capabilities of Cancer

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

Potenziale replicativo illimitato



Le cellule normali hanno una limitata capacità replicativa. Dopo un determinato numero di cicli cellulari, la cellula si arresta in uno stato in cui cessa di dividersi detto senescenza cellulare.

Nelle cellule umane la senescenza replicativa è causata dall'accorciamento progressivo dei telomeri. L'accorciamento dei telomeri è dovuto alla incompleta replicazione del DNA lineare da parte delle polimerasi convenzionali. I telomeri e la telomerasi hanno la funzione di proteggere i cromosomi dall'erosione.

I telomeri

I telomeri sono strutture complesse costituite da DNA e proteine.

Il DNA telomerico è costituito da sequenze ripetute (5'-TTAGGG-3') che terminano con 30-400 nucleotidi a singolo filamento di DNA denominato 3' overhang di 50-300 nt.

Questa estremità overhang invade le sequenze ripetute a doppio filamento per formare una struttura T-loop.

Il DNA telomerico è protetto dall'associazione con le proteine del complesso shelterin.

Le sequenze ripetute sono riconosciute da 6 diverse molecole che formano lo sheltering complex. Le proteine shelterin che ricoprono le estremità dei telomeri impediscono che la cellula attivi i meccanismi di risposta al danno del DNA riconoscendo i telomeri come zone di rottura del DNA.

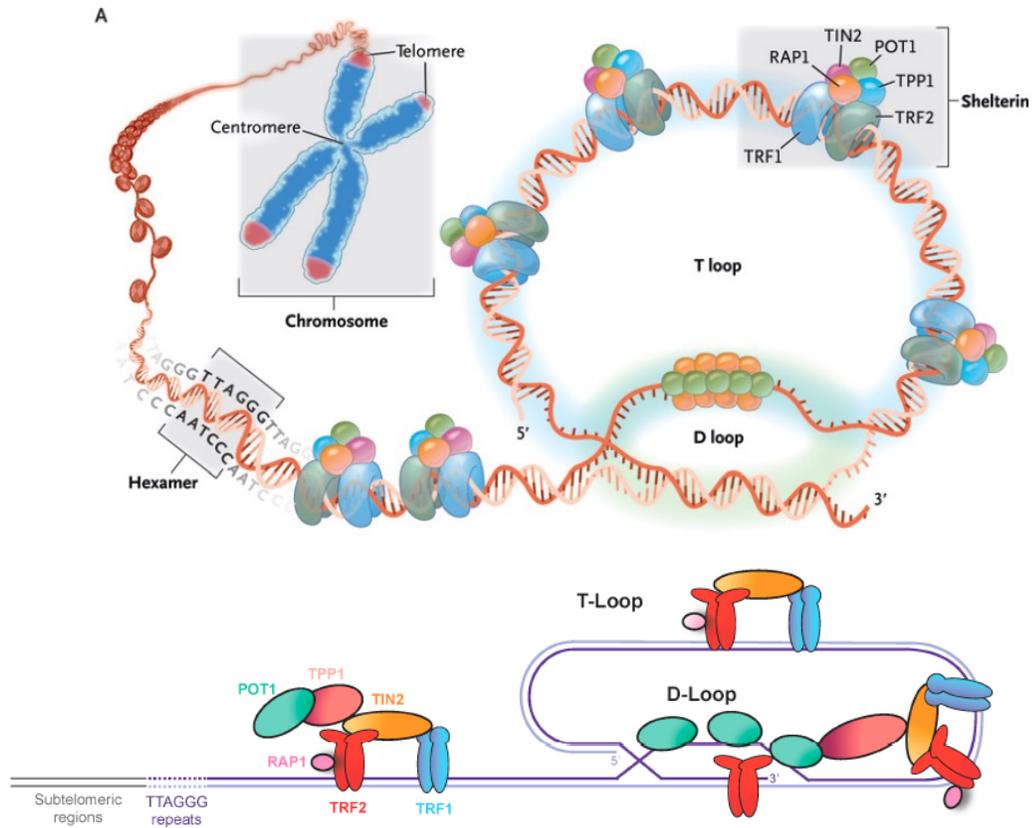
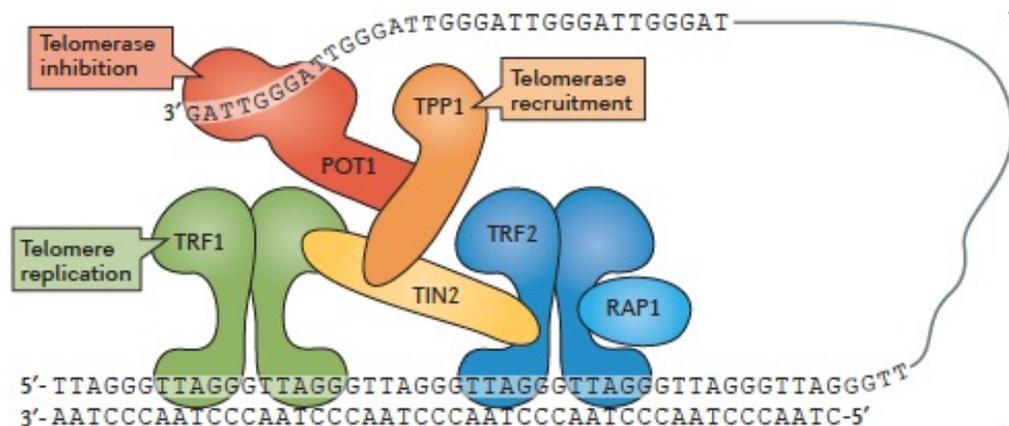


Figure 1. The vertebrate shelterin complex. Telomeric repeat binding factors 1 and 2 (TRF1 and TRF2) bind to double-stranded telomeric DNA and recruit other components of shelterin: TRF1-interacting nuclear protein 2 (TIN2), the human ortholog of the yeast repressor/activator protein 1 (RAP1), and tripeptidyl peptidase 1 (TPP1). Protection of telomeres 1 (POT1) protein binds to the telomeric single-stranded DNA. Shelterin promotes the fold-back of telomeric DNA into a T-loop structure through formation of a D-loop.

Complesso Shelterin



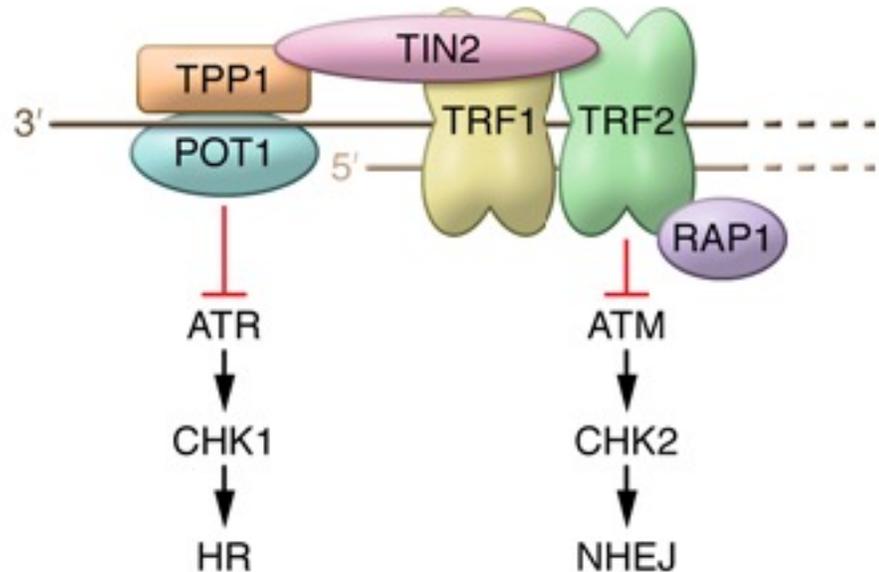
Le proteine shelterin comprendono TRF1, TRF2 (telomeric repeat-binding factor), RAP1 (repressor activator protein), TIN2 (TRF1 interacting nuclear factor 2), TPP1 e POT1.

Il complesso shelterin è reclutato ai telomeri attraverso TRF1 e TRF2 che si legano al DNA a doppio filamento e a TIN2. POT1 si lega al DNA telomerico a singolo filamento e si associa a TRF1 e TRF2 attraverso TPP1 che si associa a TIN2.

Il complesso shelterin mantiene la lunghezza dei telomeri e preserva l'integrità del genoma attraverso:

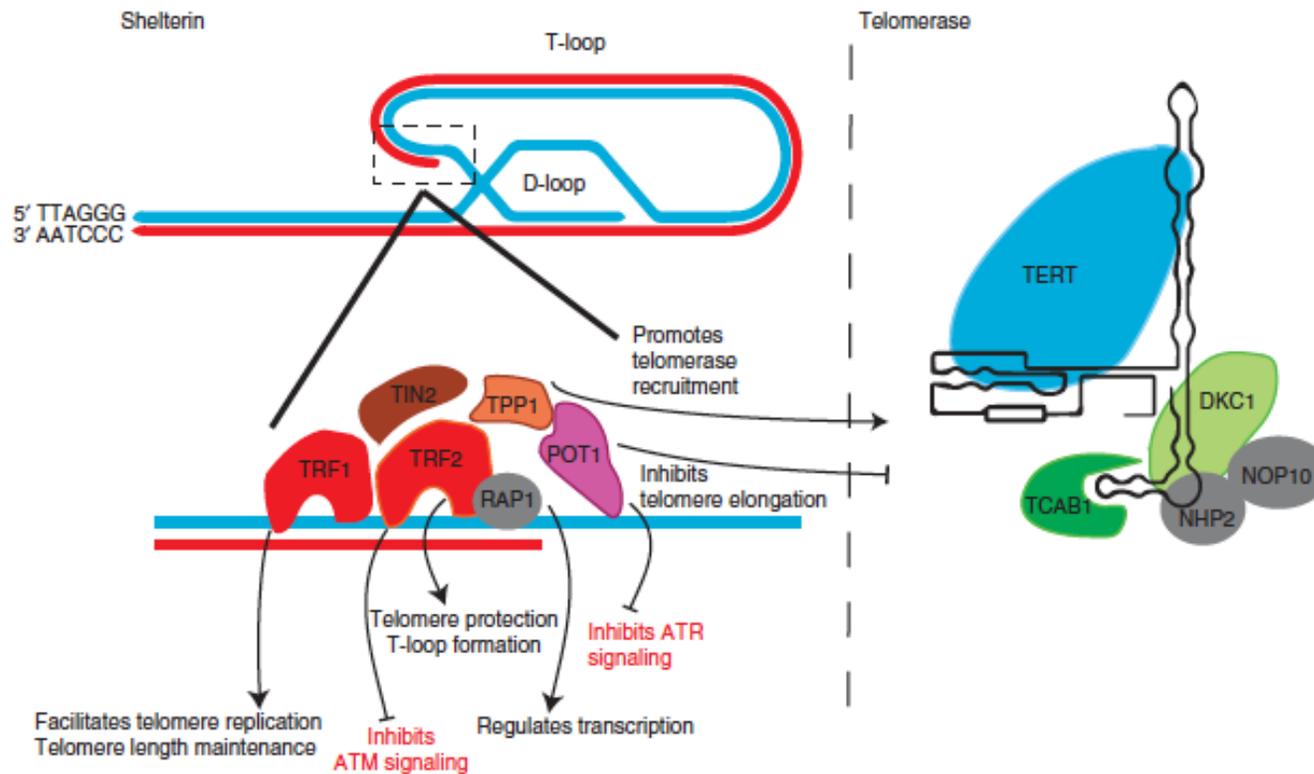
- mascheramento del DNA telomerico dalla risposta ai danni del DNA; TRF2 attraverso la formazione del T-loop nasconde l'estremità del cromosoma. POT1 blocca l'attivazione di ATR.
- controllo del reclutamento della telomerasi

Le proteine shelterin bloccano la risposta cellulare al danno al DNA



Le proteine shelterin che ricoprono le estremità dei telomeri impediscono che la cellula attivi i meccanismi di risposta al danno del DNA riconoscendo i telomeri come zone di rottura del DNA. La protezione dei telomeri è compromessa quando i telomeri diventano troppo corti per legare il complesso shelterin.

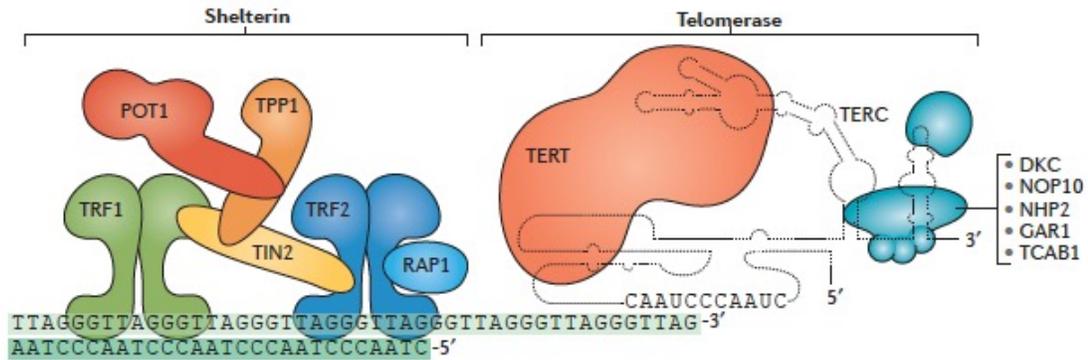
Funzione delle proteine del complesso Shelterin



Ogni componente del complesso Shelterin svolge una funzione specifica :
TRF2 e Pot1 sopprimono la risposta al danno del DNA;
TFR1 facilita la replicazione dei telomeri;
Tpp1 promuove il reclutamento della telomerasi;
 La telomerasi è una ribonucleoproteina, con attività di trascrittasi inversa che sintetizza il DNA telomerico utilizzando come stampo un RNA interno.

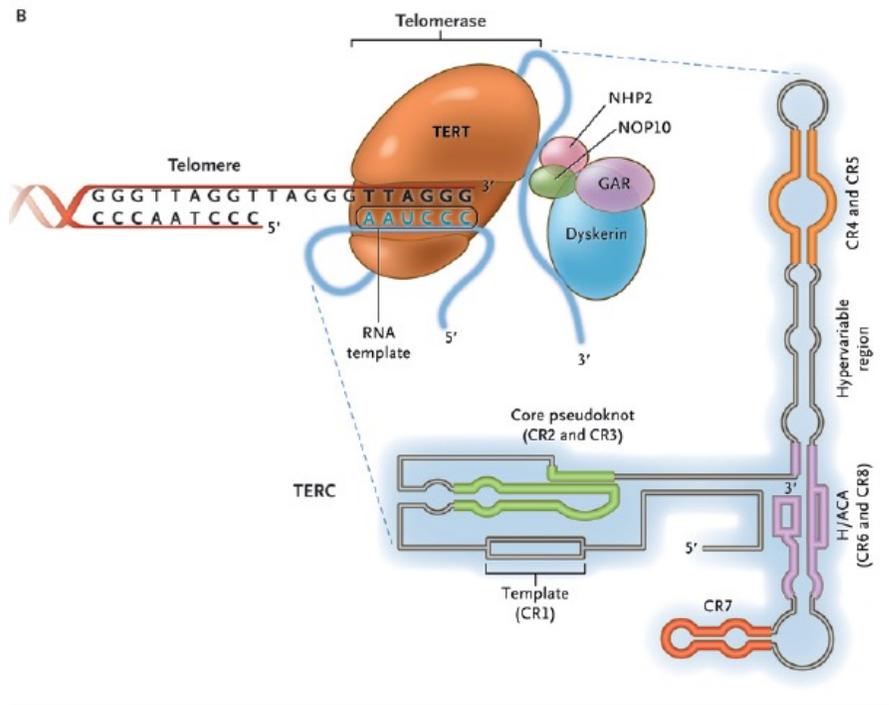
Figure 2. Shelterin, the telomere-binding complex, protects chromosome ends and controls telomerase function. Telomeric DNA is bound by the double-stranded DNA-binding proteins TRF1 and TRF2 and by the single-stranded DNA-binding protein Pot1. Rap1 binds to TRF2 and functions as a transcriptional regulator. TIN2 nucleates the complex by connecting TRF1 and TRF2 to the Tpp1/Pot1 subcomplex. Each component of shelterin serves a specialized function in telomere maintenance, with TRF2 and Pot1 involved in suppression of DNA-damage signaling, and TRF1 involved in facilitating replication through difficult to replicate telomeric sequences. Telomerase is recruited to the complex through its interaction with Tpp1; once at the telomere, its action is negatively regulated by Pot1. Telomerase is a ribonucleoprotein composed of a noncoding RNA TERC that serves as a scaffold for protein components TERT, TCAB, dyskerin, NOP10, and NHP2. Dyskerin and its associated proteins promote TERC biogenesis and stability, whereas TCAB facilitates trafficking of telomerase to the telomere. TERT is the catalytic subunit and TERC encodes the template for reverse transcription.

Shelterin controlla il reclutamento della telomerasi



Le proteine TPP1 e TIN2 reclutano la telomerasi che sintetizza il DNA telomerico *de novo* utilizzando come template l'RNA e come primer l'estremità 3' del DNA del cromosoma.

La telomerasi



La telomerasi è un enzima specializzato che aggiunge sequenze ripetute alle estremità dei cromosomi durante la replicazione. La telomerasi è costituita da una subunità proteica TERT (telomerase reverse transcriptase) e da RNA (TERC) che formano il core catalitico.

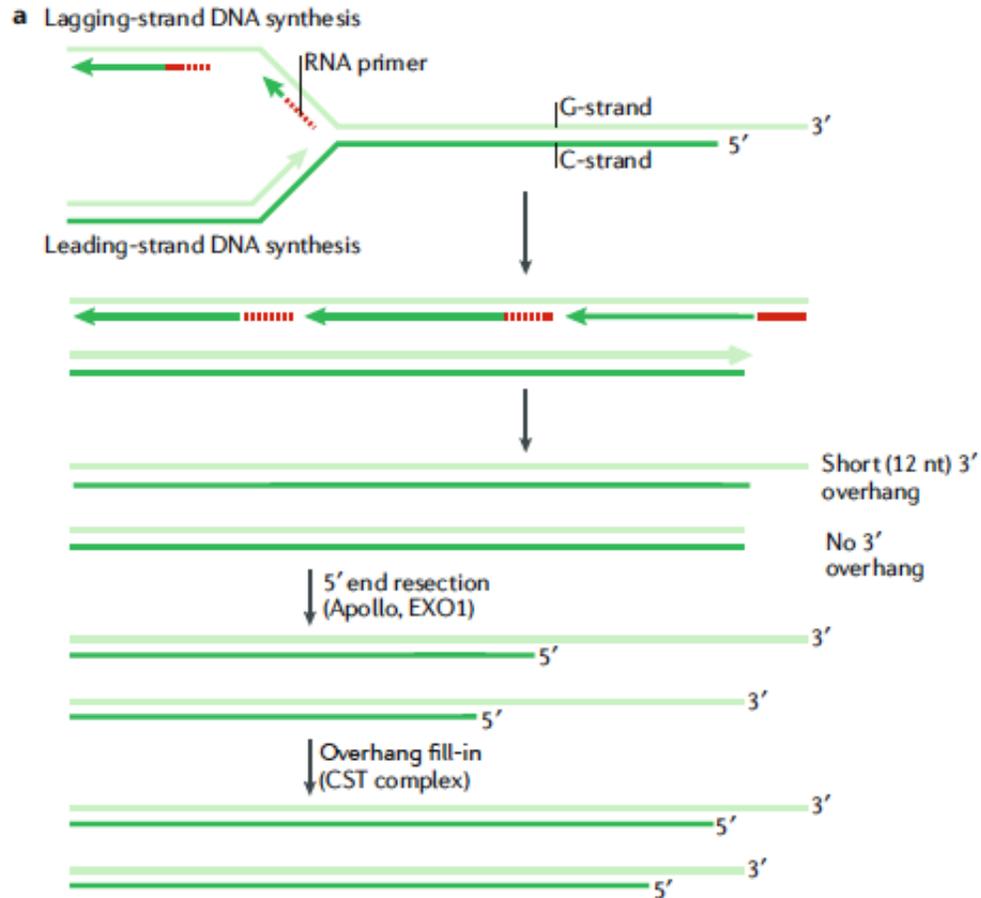
TERC fornisce il template per la sintesi delle nuove sequenze ripetute mentre TERT funziona da trascrittasi inversa.

La necessità di aggiungere sequenze ripetute di DNA alle estremità dei telomeri è dovuto alla incapacità delle cellule di riempire il gap dovuto alla rimozione del primer di RNA per la sintesi del DNA del filamento ritardato e al processamento delle estremità del filamento leading.

Per questa ragione ad ogni ciclo di replicazione si ha perdita di DNA in assenza di attività della telomerasi.

Nelle cellule che proliferano a lungo la lunghezza dei telomeri è mantenuta dalla telomerasi.

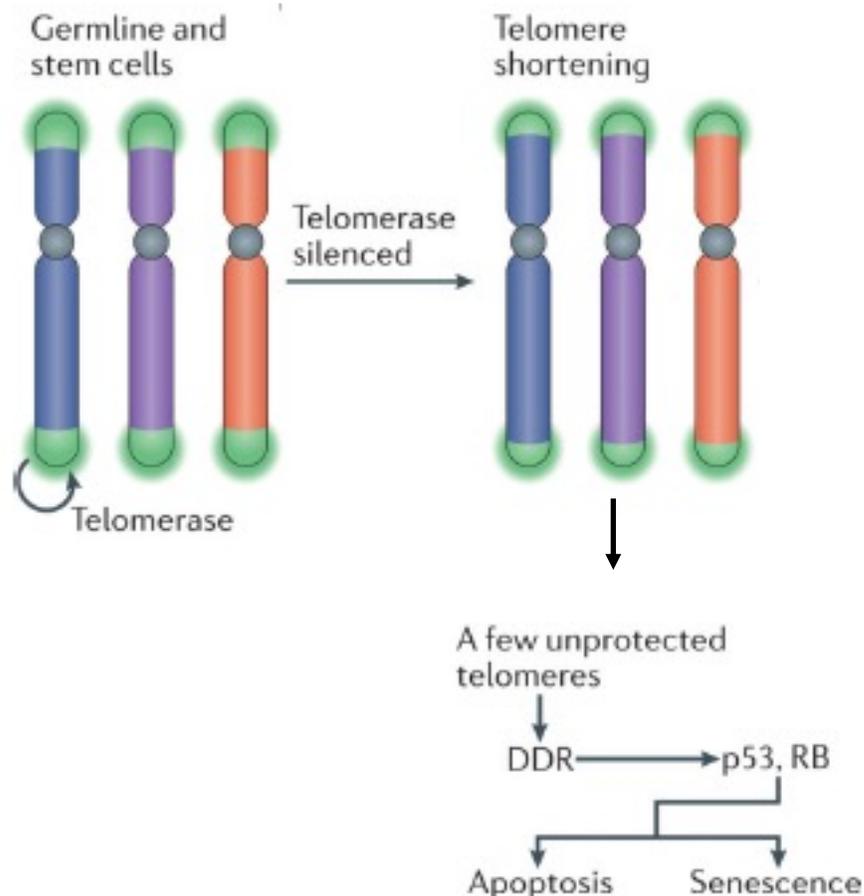
L'accorciamento dei telomeri



L'accorciamento dei telomeri è dovuto alla

- incompleta sintesi del DNA all'estremità del filamento lagging (ritardato) che genera delle corte estremità overhangs.
- Il processamento delle estremità del leading strand per generare il 3' overhang.

Accorciamento dei telomeri



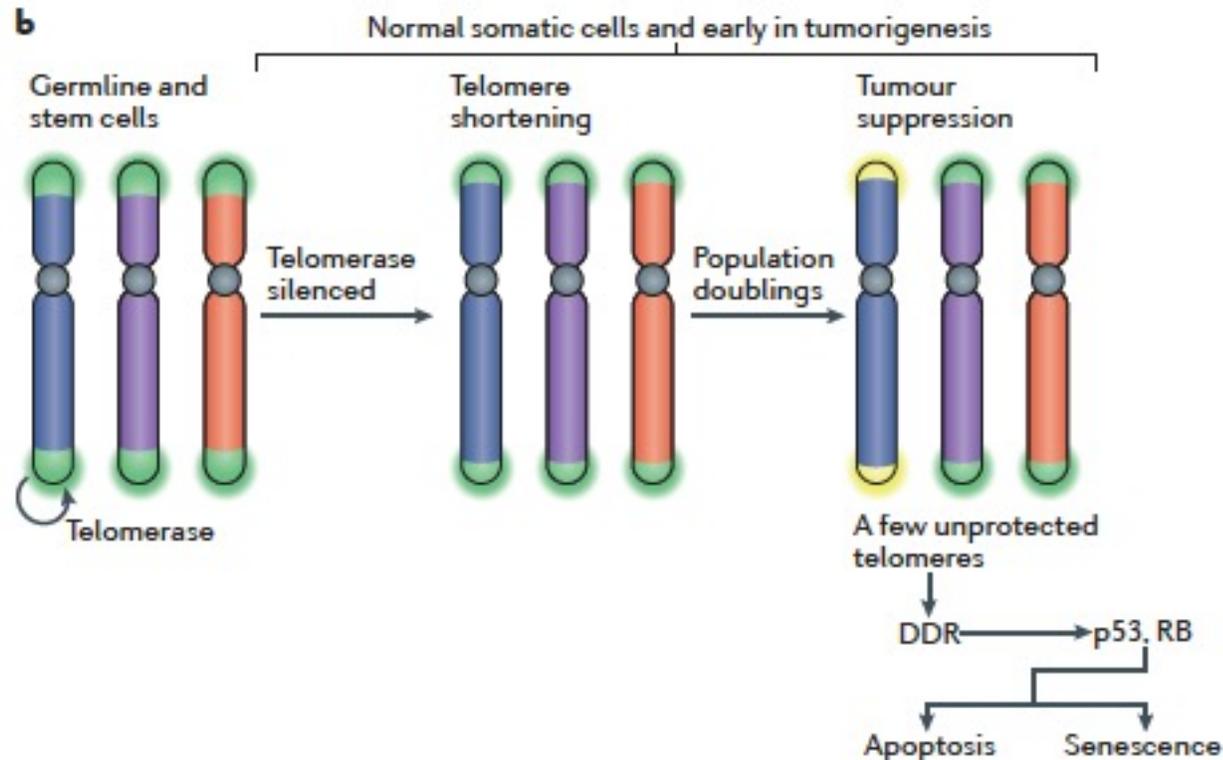
La maggior parte delle cellule somatiche non esprime la telomerasi e per questo i telomeri si accorciano ad ogni divisione fino a raggiungere una dimensione che è insufficiente a garantire la protezione delle estremità dei cromosomi.

In questo caso i cromosomi non protetti attivano la risposta al danno del DNA (DDR) che determina l'arresto della replicazione e la senescenza.

Il DDR è mediato dall'attivazione di ATM e ATR e conseguente stabilizzazione di p53 che induce l'espressione dell'inibitore delle CDK p21.

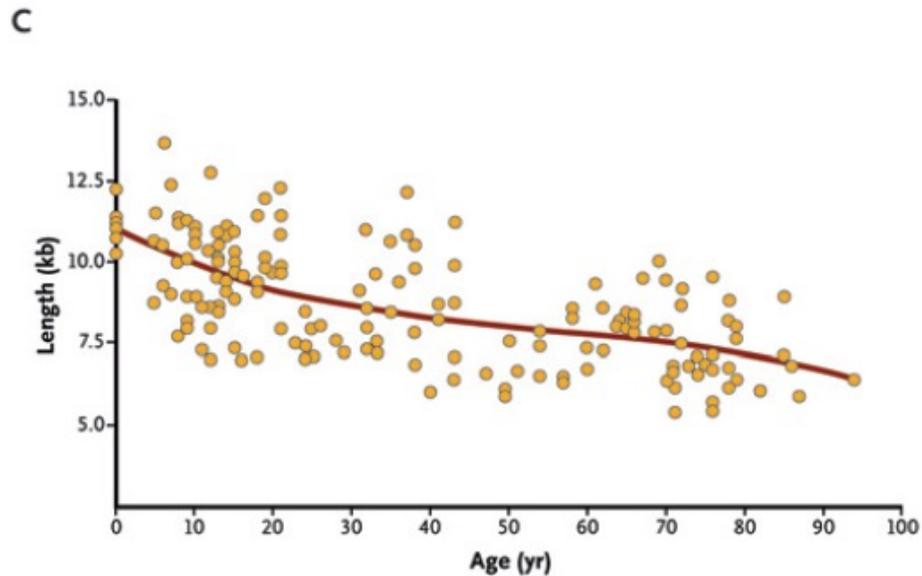
Le cellule senescenti sono bloccate nella fase G1 e presentano anche livelli aumentati di p16^{INK} che inibisce pRB.

Erosione dei telomeri e soppressione dei tumori



L'erosione dei telomeri rappresenta una importante barriera allo sviluppo dei tumori. L'incrocio di topi telomerasi deficienti con modelli murini di tumore hanno dimostrato che i telomeri corti limitano la formazione di tumori quando p53 è funzionale.

Riattivazione della telomerasi nelle cellule tumorali



Nelle cellule normali ad ogni divisione cellulare si verifica un accorciamento dei telomeri di circa 50-100 bp.

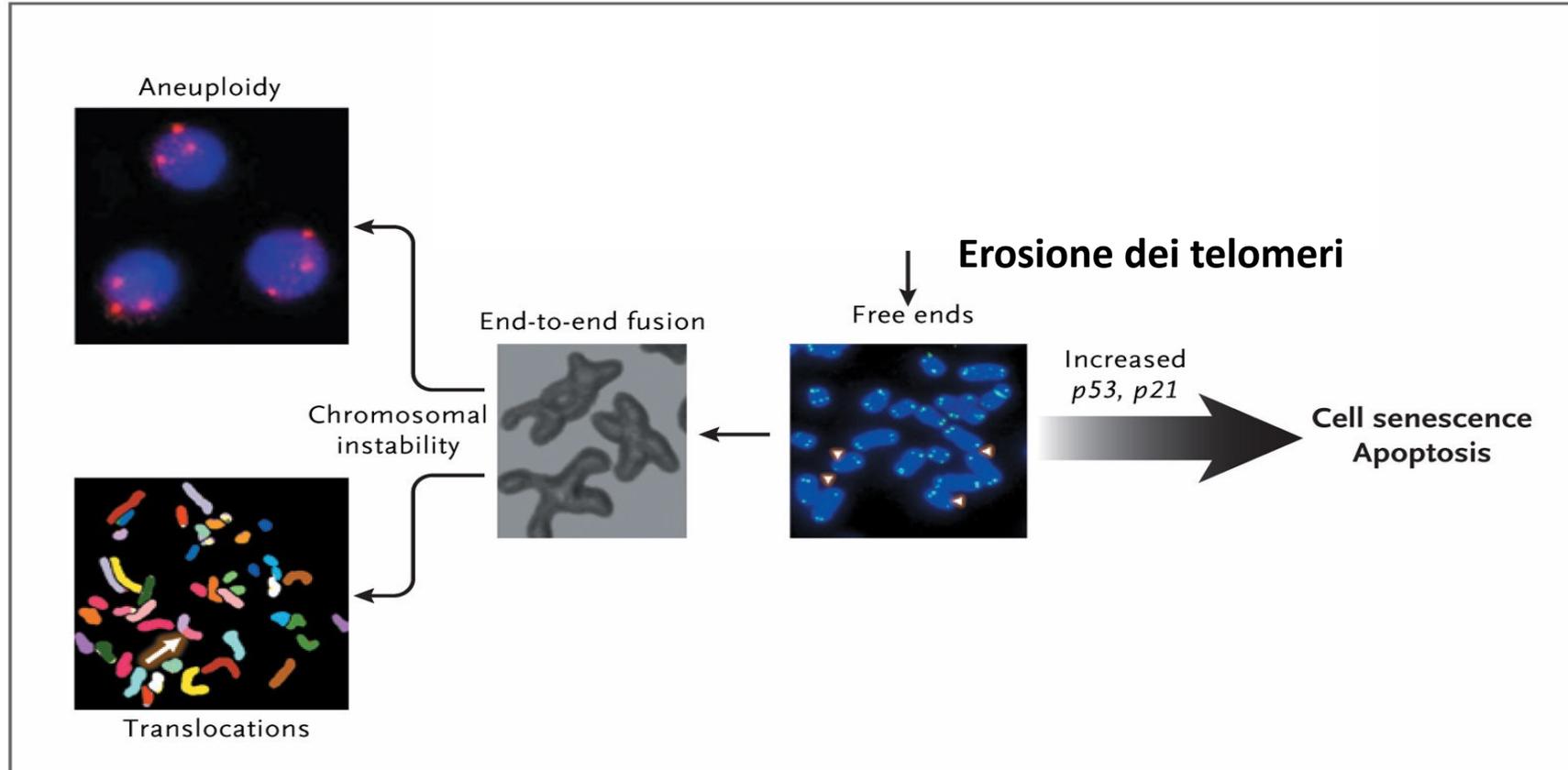
Una volta che i telomeri si sono accorciati oltre un certo limite, la perdita della funzione telomerica induce l'attivazione dei checkpoint del ciclo cellulare causando l'arresto della proliferazione e la senescenza cellulare. Il potenziale replicativo limitato prende il nome di «Hayflick limit».

Nelle cellule germinali, l'accorciamento dei telomeri è prevenuto dall'enzima telomerasi che conferisce a queste cellule la capacità di proliferare illimitatamente. Le cellule somatiche non esprimono la telomerasi.

Le cellule tumorali acquisiscono la capacità di proliferare in modo illimitato attraverso la riattivazione della telomerasi.

L'attività telomerasica è stata riscontrata nel 90% dei tumori umani.

Conseguenze dell'erosione dei telomeri nelle cellule normali



Quando l'erosione dei telomeri raggiunge un livello critico la cellula entra in uno stato di senescenza. La senescenza è caratterizzata dall'arresto non reversibile della cellula nella fase G1 del ciclo cellulare. Se la cellula sfugge alla senescenza (a causa della inattivazione di p53 e Rb) e continua a proliferare i telomeri possono andare incontro a fusione delle estremità causando instabilità genomica e morte della cellula (crisi).

Via che determina l'attivazione di p53 in seguito a accorciamento dei telomeri

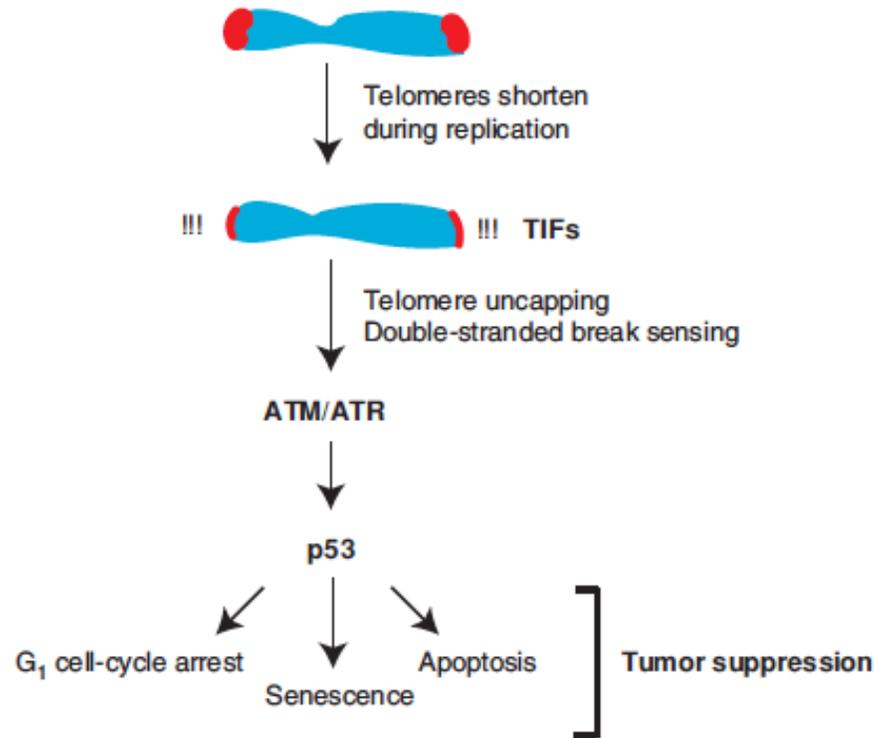


Figure 3. Pathways connecting telomeres and p53. Telomeres shorten with aging or with extended passage in culture, leading to eventual telomere uncapping. Uncapped telomeres lose their protective function, and telomere-dysfunction-induced foci, or TIFs, composed of DNA-damage proteins, are recruited to uncapped telomeres. Dysfunction telomeres can signal through the ATM and ATR kinases to phosphorylate p53. Phosphorylation stabilizes p53 by inhibiting its interaction with MDM2, and p53 then transcriptionally up-regulates target genes mediating G₁ checkpoint arrest, senescence, and apoptosis.

L'accorciamento dei telomeri determina la perdita della protezione da parte delle proteine del complesso Shelterin attivando la risposta al danno del DNA.

L'accorciamento dei telomeri attiva le chinasi ATM e ATR con conseguente stabilizzazione di p53.

La stabilizzazione di p53 determina blocco del ciclo cellulare e senescenza. Oltre alla via p53-p21 anche l'attivazione della via p16^{INK4a}-Rb è necessaria per il blocco del ciclo cellulare e la senescenza.

La senescenza e la crisi della cellula conseguenti alla erosione dei telomeri rappresentano due barriere che controllano la durata della vita della cellula

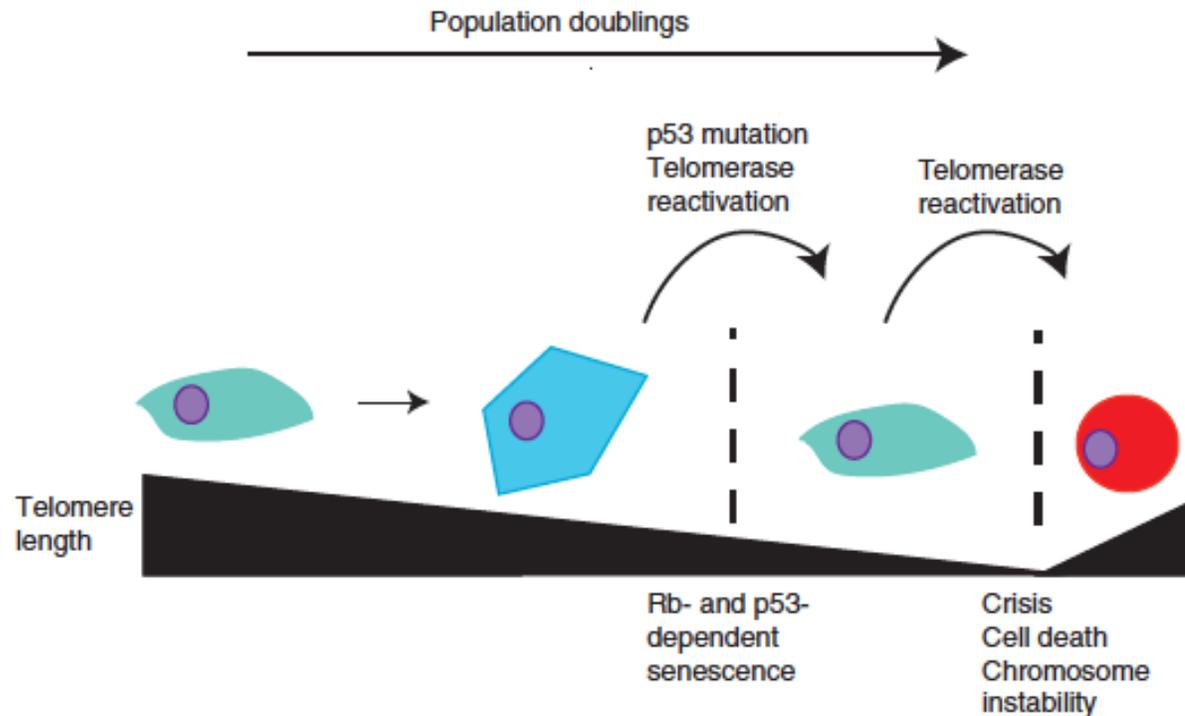


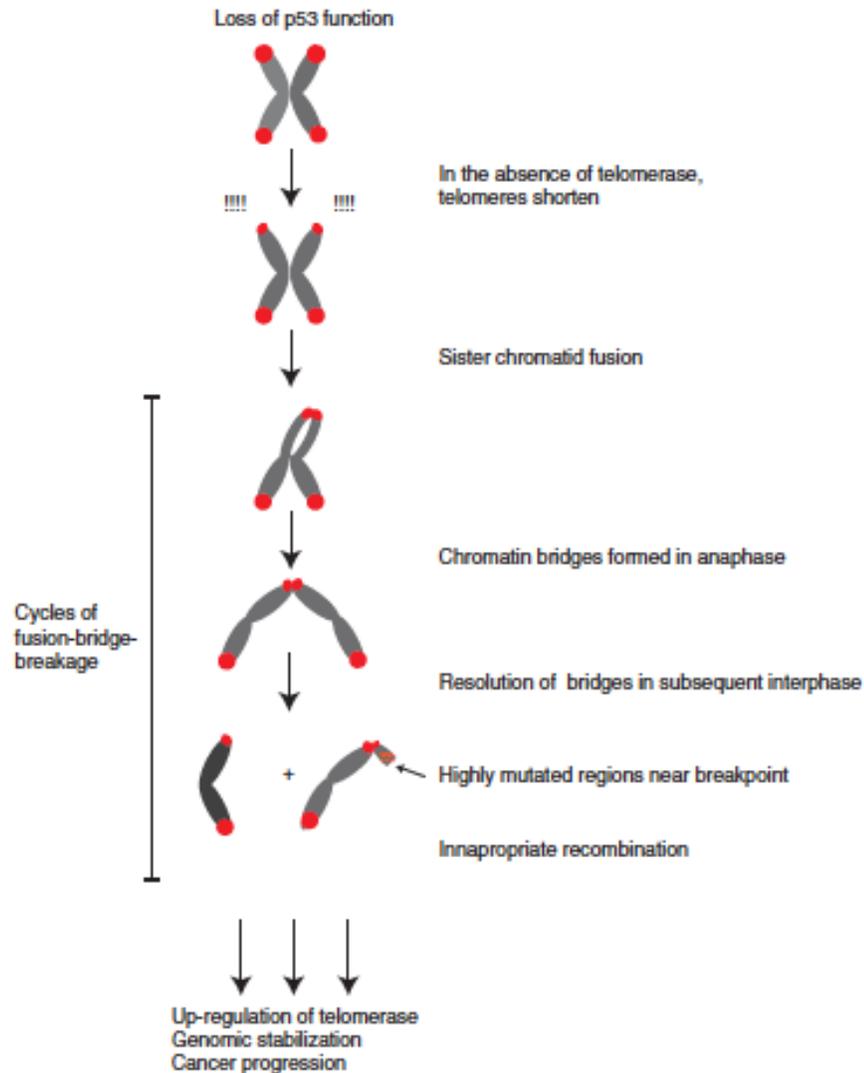
Figure 1. Telomere shortening in cell culture limits the proliferation of primary cells. After a defined number of population doublings in culture, short telomeres in fibroblasts trigger a DNA-damage response that acts through p53 to cause cellular senescence and a halt on proliferation. To proceed past senescence, cells must inactivate p53 and Rb, or up-regulate telomerase to achieve telomere maintenance. Once cells escape senescence, continued telomere shortening will lead to a period of genomic instability termed crisis, which is characterized by cell death and chromosomal instability. Expression of telomerase will stabilize the genome and allow continued proliferation of the culture.

In seguito alla inattivazione di p53 e di Rb la cellula può sfuggire alla senescenza indotta dall'accorciamento dei telomeri.

L'ulteriore accorciamento dei telomeri in assenza di senescenza genera un periodo di instabilità del genoma caratterizzato da instabilità dei cromosomi e morte cellulare. I telomeri diventano soggetti alle attività di riparo del DNA andando incontro a fusione con altri telomeri o altre zone di rottura del doppio filamento di DNA.

Questa seconda barriera alla proliferazione cellulare indotta dall'accorciamento dei telomeri prende il nome di crisi. Le cellule in crisi replicativa vanno incontro a morte.

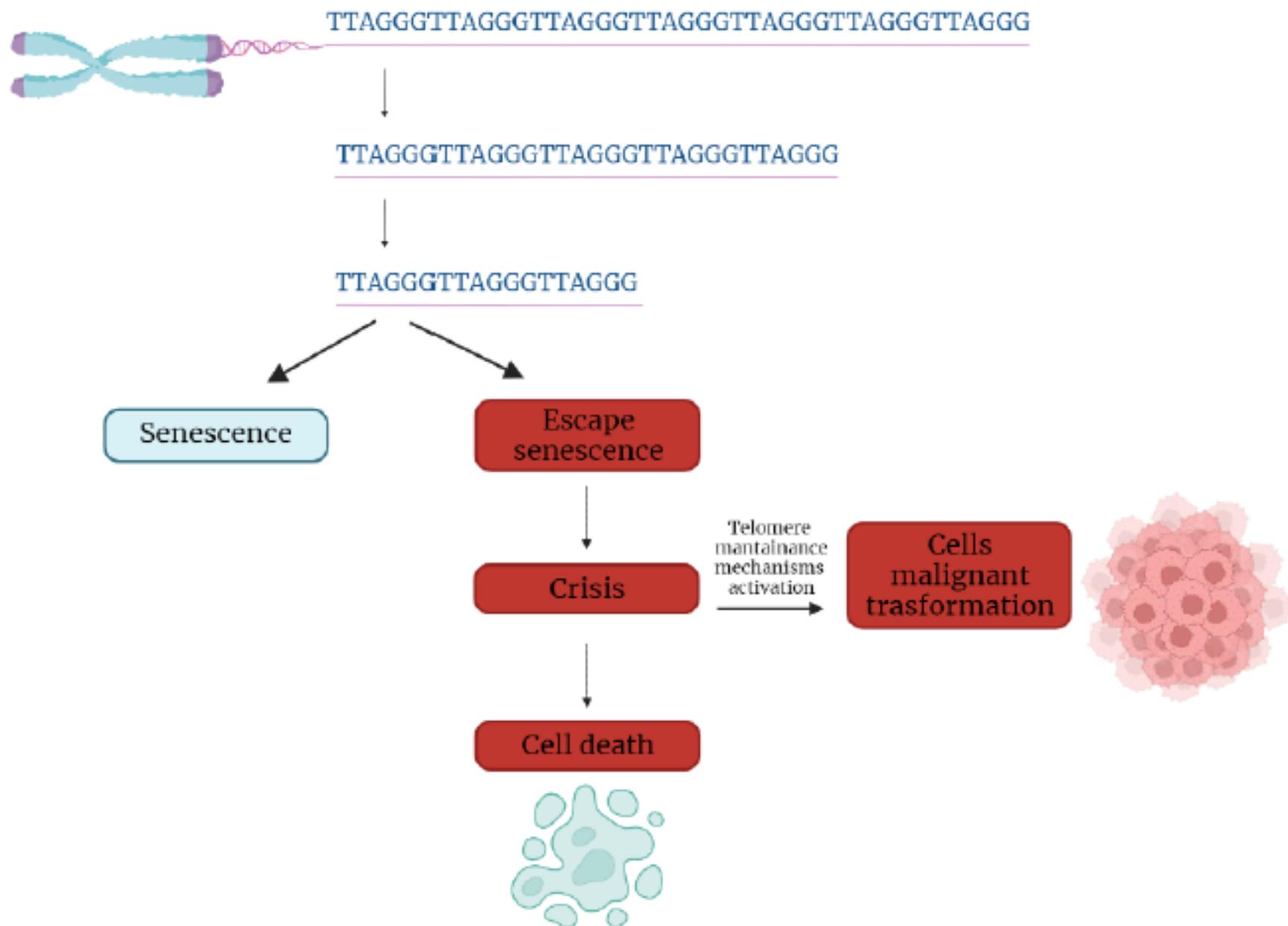
La disfunzione dei telomeri promuove lo sviluppo di tumori



Nelle cellule in cui p53 e pRb sono assenti in assenza di telomerasi i telomeri vanno incontro ad accorciamento senza causare la senescenza.

Quando si raggiunge una lunghezza critica i telomeri non sono più protetti e vanno incontro a fusioni. Durante la mitosi la migrazione dei cromatidi ai poli opposti causa rottura del DNA.

Dopo diversi cicli l'upregolazione della telomerasi da parte delle cellule maligne permette la stabilizzazione del cariotipo del tumore.



Attivazione della telomerasi

Table 1. Frequency of *TERT* promoter mutations

Tumor type*	No. tumors	No. tumors mutated (%)
Chondrosarcoma	2	1 (50)
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	3	1 (33.3)
Endometrial cancer	19	2 (10.5)
Ependymoma	36	1 (2.7)
Fibrosarcoma	3	1 (33.3)
Glioma [†]	223	114 (51.1)
Hepatocellular carcinoma	61	27 (44.2)
Medulloblastoma	91	19 (20.8)
Myxofibrosarcoma	10	1 (10.0)
Myxoid liposarcoma	24	19 (79.1)
Neuroblastoma	22	2 (9)
Osteosarcoma	23	1 (4.3)
Ovarian, clear cell carcinoma	12	2 (16.6)
Ovarian, low grade serous	8	1 (12.5)
Solitary fibrous tumor (SFT)	10	2 (20.0)
Squamous cell carcinoma of head and neck	70	12 (17.1)
Squamous cell carcinoma of the cervix	22	1 (4.5)
Squamous cell carcinoma of the skin	5	1 (20)
Urothelial carcinoma of bladder	21	14 (66.6)
Urothelial carcinoma of upper urinary epithelium	19	9 (47.3)

La ri-attivazione della telomerasi è stata osservata nel 90% dei tumori umani.

Mutazioni nel promotore di TERT sono frequenti in diversi tipi di tumore.

Queste mutazioni sono associate con un aumento dell'espressione di TERT, aumento dell'attività della telomerasi e aumento della lunghezza dei telomeri.