

Soluzioni del Capitolo 22

22.1 a. 7; b. 6; c. 8; d. 2; e. 1; f. 9; g. 3; h. 5; i. 4.

22.2 a. Inibizione da contatto: le cellule normali smettono di crescere quando entrano in contatto tra loro. Questa proprietà si osserva principalmente in coltura, dove le cellule normali formano un monostrato dello spessore di una cellula; smettono di crescere quando occupano l'intera superficie della piastra di Petri. Le cellule tumorali non hanno questa proprietà, quindi continuano a crescere dopo essere entrate in contatto tra loro, impilandosi l'una sull'altra e formando dei foci di trasformazione. La perdita dell'inibizione da contatto contribuisce al cancro perché le cellule eludono uno dei controlli sulla loro crescita. Inoltre, più le cellule si dividono, più mutazioni possono essere accumulate, contribuendo ulteriormente all'aggressività del tumore. [Quest'ultimo punto fa parte anche delle risposte alle parti (b)-(e) di questa domanda, ma non sarà ripetuto nelle risposte che seguono.]

b. Stimolazione autocrina: le cellule normali si dividono e crescono solo quando sono stimolate a farlo dal legame di un fattore di crescita, per esempio un ormone, a una proteina recettore sulla superficie cellulare. La maggior parte delle cellule tumorali mostra stimolazione autocrina, il che significa che possono dividersi rapidamente in assenza di un fattore di crescita. La stimolazione autocrina contribuisce al cancro perché l'organismo non può limitare la crescita delle cellule che hanno questa proprietà.

c. Apoptosi: quando il DNA delle cellule normali viene danneggiato al di là della capacità dei sistemi di riparazione di affrontare il danno, le cellule subiscono l'apoptosi (morte cellulare programmata). Di conseguenza, le cellule con DNA danneggiato non possono crescere e replicarsi. Molte cellule tumorali sfuggono l'apoptosi in risposta al danno cellulare. Di conseguenza, le cel-

lule che hanno accumulato (attraverso il danno al DNA) mutazioni in grado di aumentare l'aggressività del cancro possono moltiplicarsi.

d. Espressione della telomerasi: le cellule somatiche normali non esprimono l'enzima telomerasi. Pertanto, i cromosomi di queste cellule si accorciano ogni volta che le cellule si replicano, fornendo alle cellule somatiche un limite superiore al numero di volte in cui possono dividersi prima che venga perso del DNA essenziale. Molte linee di cellule tumorali esprimono la telomerasi, che contrasta l'accorciamento dei telomeri. Di conseguenza, tali cellule tumorali vengono effettivamente immortalizzate e possono continuare a dividersi indefinitamente. Ancora una volta, queste cellule tumorali hanno perso uno dei normali controlli sulla loro divisione e crescita.

e. Senescenza dovuta all'accorciamento dei telomeri: questo è il rovescio della medaglia della parte (d). La senescenza è la proprietà delle normali cellule somatiche che si traduce nella loro incapacità di dividersi ulteriormente una volta che i telomeri si sono accorciati così tanto da perdere il DNA essenziale. Molte cellule tumorali vengono invece immortalizzate perché esprimono la telomerasi; non subiscono senescenza.

f. Stabilità genomica: la normale divisione cellulare mitotica assicura che (con l'eccezione di rari errori) le cellule della progenie abbiano lo stesso genoma della cellula parentale. Il numero di cromosomi rimane lo stesso e non si verificano riarrangiamenti cromosomici. Le cellule tumorali hanno spesso genomi instabili che accumulano molte mutazioni, comprese mutazioni puntiformi, riarrangiamenti cromosomici e cambiamenti nel numero dei cromosomi. Questi cambiamenti possono mutare o alterare l'espressione di oncogeni e geni oncosoppressori, contribuendo al cancro.

g. Angiogenesi: i tumori solidi richiedono nutrimento dal sangue; tumori di grandi dimensioni generano quindi segnali molecolari che stimolano la crescita dei vasi sanguigni nel tumore.

h. Metastasi: le cellule normali crescono all'interno di particolari regioni che sono solitamente delimitate da strutture membranose. Se le cellule tumorali metastatizzano, sovvertono queste strutture e possono iniziare a colonizzare altre parti del corpo, formando nuovi tumori in nuovi siti.

i. Suscettibilità alla sorveglianza immunitaria: il nostro organismo normalmente è in grado di identificare le cellule cancerose e distruggerle mediante varie attività del sistema immunitario. Affinché un tumore si stabilisca nel corpo, le cellule tumorali devono accumulare mutazioni che consentano loro di eludere questa sorveglianza immunitaria.

22.3 È necessario fare studi epidemiologici delineando il profilo del cancro del colon alla ricerca di possibili correlazioni tra dieta o differenze genetiche e l'incidenza del cancro. Per valutare il ruolo della dieta è necessario controllare (nel miglior modo possibile) la composizione genetica della popolazione esaminata e variare la dieta. Si potrebbero avviare studi per confrontare i tassi di cancro tra una popolazione di immigrati recenti dall'India, ora residente negli Stati Uniti, e una popolazione di persone della stessa origine etnica che sono rimaste in India. Se possibile, bisognerebbe anche essere in grado di distinguere, all'interno di ciascun gruppo, le sottopopolazioni che seguono una dieta occidentalizzata o la dieta storica del gruppo etnico in India.

Per valutare il ruolo delle differenze genetiche nell'influenzare i tassi di tumorigenesi, è necessario mantenere gli altri fattori, soprattutto la dieta, il più possibile costanti. Si può quindi confrontare l'incidenza del cancro tra gruppi geneticamente dissimili che hanno diete simili. I ricercatori spesso svolgono questo compito studiando i tassi di cancro tra i diversi gruppi etnici che vivono nella stessa area. Per esempio, le persone di origine indiana che hanno vissuto a Brooklyn per un lungo periodo potrebbero essere paragonate ai brooklyniani di altri gruppi etnici, a condizione che tutti gli individui intervistati seguano diete simili.

22.4 Questi punti di vista apparentemente contrastanti sono facilmente conciliabili. Sappiamo che alcuni degli agenti ambientali implicati nell'aumento del rischio di cancro causano un aumento

della frequenza delle mutazioni, quindi questo fatto è coerente con l'idea che le mutazioni siano necessarie per causare il cancro. Le mutazioni ereditarie che portano a una predisposizione al cancro inattivano un allele di un gene (un gene oncosoppressore) che inibisce la crescita cellulare. Questa mutazione ereditaria è solo una delle numerose mutazioni che devono verificarsi all'interno di una cellula per portare al cancro. I fattori ambientali ed ereditari possono quindi entrambi influenzare geni importanti per la regolazione del ciclo cellulare.

22.5 Lo sviluppo dei tumori dipende da eventi mutazionali casuali che devono "colpire" diversi oncogeni e geni oncosoppressori all'interno di una linea cellulare. Una singola mutazione, anche se colpisce uno di questi geni, raramente è sufficiente da sola a generare una cellula tumorale. Invece, tra i discendenti di quella cellula, possono verificarsi ulteriori mutazioni in altri geni chiave e ci vuole tempo prima che queste mutazioni si accumulino attraverso eventi casuali e rari. In alcuni casi, i tumori non si svilupperanno perché l'agente cancerogeno (presumibilmente un mutageno) non ha causato una mutazione in nessun gene chiave, o perché non si verificano abbastanza mutazioni tra le discendenti di una cellula che ha subito una mutazione in un singolo gene del cancro. I tumori a volte si sviluppano nel sito di applicazione del cancerogeno perché la sostanza chimica induce una mutazione in un gene chiave e questo conferisce alla cellula un "vantaggio" nel diventare tumorale.

22.6 a. Il fatto che siano osservati molti individui affetti nell'arco di tre generazioni e che tutti i pazienti sviluppino la malattia in tenera età sono entrambi indizi del fatto che in questa famiglia una mutazione ereditaria è un fattore importante nello sviluppo del cancro del colon. L'esame del pedigree suggerisce che la predisposizione al cancro del colon in questa famiglia potrebbe essere un carattere autosomico dominante. Se questo è vero, allora l'individuo II-2 deve avere la mutazione ma non esprimerla. Esistono due possibilità per quanto riguarda gli individui I-1 e I-2: o uno di loro ha la mutazione ma non la esprime, oppure la mutazione è sorta *de novo* in una delle loro linee germinali.

Sebbene sia forte l'evidenza che la genetica svolga un ruolo importante nello sviluppo del cancro del colon in questo pedigree, i dati non dimostrano che la prevalenza del cancro del colon in questa famiglia sia interamente dovuta

all'ereditarietà. Come discusso nella parte (b), è anche ipotizzabile che alcuni membri della famiglia siano stati esposti a un fattore ambientale che contribuisce allo sviluppo della malattia.

b. Gli individui I-1 e II-2 non sono tra i grandi consumatori di caffè. Forse la predisposizione al cancro del colon è una combinazione di un particolare genotipo e del fattore ambientale di consumo del caffè speciale. Pertanto, l'interazione tra un certo genotipo e un fattore ambientale determina il fenotipo del cancro del colon. In questo scenario, il genotipo da solo non è sufficiente a predisporre al cancro: gli individui I-1 e II-2 potrebbero avere la mutazione cancerogena, ma non sviluppano la malattia perché non bevono caffè. Si noti inoltre che nessuna delle persone che si astengono dal bere caffè ha la malattia, inclusi cinque parenti genetici aggiuntivi di I-1 e I-2 (II-4, II-9, III-13, IV-1, IV-3). D'altra parte, si noti che un numero sostanziale di individui che bevono caffè non ne risente (per esempio, III-8, III-9, III-10, III-11, III-12), quindi il caffè da solo non sembra avere un effetto importante sull'esordio precoce del cancro del colon.

- 22.7 a.** Il motivo per cui il sangue dei pazienti con linfomi a cellule B ha principalmente un tipo di molecola anticorpale riflette il fatto che una singola cellula B (o precursore delle cellule B), i cui geni per gli anticorpi hanno già subito i riarrangiamenti utili per produrre una particolare proteina anticorpale, diventa tumorale e inizia a dividersi senza controllo. Una grande percentuale dei linfociti B nel paziente produrrà questo unico tipo di proteina anticorpale. Al contrario, negli individui normali i linfociti B possono dividersi solo un numero di volte limitato e il sangue conterrà milioni di diversi tipi di proteine anticorpali costituite da milioni di linfociti B diversi; nessuna singola cellula B avrà abbastanza discendenti per far predominare il suo particolare anticorpo.

È interessante notare che l'esistenza dei linfomi a cellule B ha permesso ai ricercatori (che successivamente hanno vinto il Premio Nobel) di studiare la struttura delle molecole degli anticorpi. Ottenendo le proteine anticorpali dal sangue di tali pazienti, i ricercatori hanno iniziato con preparazioni sostanzialmente pure di un singolo tipo di anticorpo. I loro studi sarebbero stati impossibili se fossero partiti con campioni di sangue normale, composti da milioni di tipi diversi di molecole.

b. I linfomi a cellule B forniscono sostegno alla teoria clonale del cancro perché è chiaramente

evidente che le cellule tumorali nel sangue derivano tutte da un singolo linfocita B (i cui geni anticorpali erano stati precedentemente sottoposti a riarrangiamento, per cui la cellula produce un solo tipo di anticorpo). Questa linea cellulare si divide in modo incontrollato, producendo un clone numerosissimo di cellule B che producono tutte la stessa molecola di anticorpo.

- 22.8 a.** Le molecole esterne alla cellula che regolano il ciclo cellulare includono ormoni e fattori di crescita (vedi Figure 22.9 e 22.10). Anche i domini extra-cellulari dei recettori dei fattori di crescita rientrano nella classificazione, sebbene altre parti di questi recettori si trovino incorporate nella membrana cellulare o nel citoplasma.

b. La maggior parte del Paragrafo 22.3 è dedicato alla discussione delle molecole all'interno della cellula che regolano il ciclo cellulare. Queste includono le cicline, le proteinchinasi ciclina-dipendenti, le molecole nelle vie di trasduzione del segnale (cioè, i domini interni dei recettori dei fattori di crescita, gli intermediari come le chinasi Ras e MAP e i fattori di trascrizione attivati dal pathway) e le proteine che intervengono nei diversi checkpoint del ciclo cellulare.

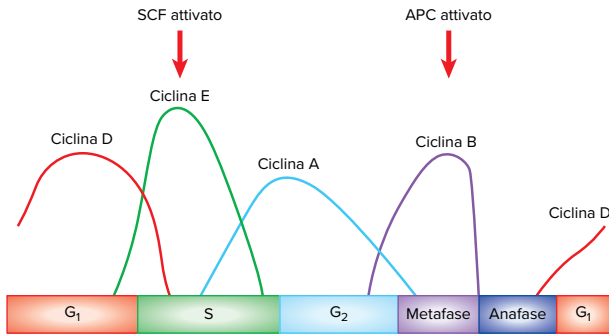
- 22.9 c, e, a, b, d.** (Vedi Figure 22.10 e 22.11.)

- 22.10 a.** Ras è inattivo quando è legato a GDP (Ras-GDP; vedi Figura 22.11). Quando RAS è legato a GTP, viene attivato e a sua volta attiva tre proteinchinasi (la cascata delle chinasi MAP). Questa cascata attiva un fattore di trascrizione che provoca la divisione cellulare. Pertanto, una proteina mutante Ras che permane nello stato legato al GTP è costitutivamente attiva e indurrà la cellula a dividersi continuamente.

b. Questa seconda proteina mutante Ras è bloccata nella forma Ras-GDP alla temperatura restrittiva. Pertanto, nelle condizioni restrittive le cellule non si divideranno.

- 22.11 a.** La Figura 22.13 è riprodotta qui sotto, con due frecce rosse aggiuntive che indicano quando l'SCF e l'APC vengono attivati. Il complesso SCF lega l'ubiquitina alla ciclina E (e forse alla ciclina D) perché queste sono le cicline presenti durante la fase S. L'APC lega l'ubiquitina alla ciclina B (e forse alla ciclina A) perché queste sono le cicline presenti durante la fase M. Legando l'ubiquitina alle cicline, destinandole alla degradazione, l'SCF e l'APC assicurano rispettivamente la fine della fase S e della fase M.

b. L'ipotesi più semplice per l'attivazione dell'SCF e dell'APC al momento opportuno è che questa attivazione dipenda dalle chinasi ciclina-



dipendenti (CDK) presenti durante una particolare fase del ciclo cellulare. Pertanto, CDK contenenti cicline D ed E attiverebbero SCF (probabilmente aggiungendo gruppi fosfato ai componenti proteici di SCF) e SCF a sua volta causerebbe la degradazione delle cicline, la perdita di attività di queste CDK e l'uscita dalla fase S. CDK contenenti cicline A e B attiverebbero l'APC (sempre attraverso la fosforilazione delle subunità APC) e l'APC a sua volta causerebbe la degradazione delle cicline, la perdita di attività di queste CDK e l'uscita dalla fase M (cioè il inizio dell'anafase).

Questo meccanismo per la progressione del ciclo cellulare è fondamentalmente semplice ed economico. La trascrizione e la traduzione di particolari cicline avviano il processo. Queste cicline, nel contesto dei CDK, promuovono gli eventi che devono ripetersi a ogni fase del ciclo cellulare. In aggiunta, tuttavia, le cicline assicurano anche che lo stadio finisca, perché attivano i complessi enzimatici (SCF e APC) che portano alla degradazione delle cicline stesse.

22.12 Come spiegato nei Capitoli 3 e 12, i cinetocori non correttamente attaccati alle fibre del fuso generano segnali di checkpoint molecolare che impediscono l'innesco dell'anafase. Il checkpoint della fase M assicura che le coesine non vengano degradate fino a quando tutti i cromosomi non sono attaccati al fuso. Nel checkpoint della fase M le molecole prodotte da cinetocori non attaccati impediscono l'attivazione del complesso promotore dell'anafase (APC). Se l'APC non è attivo, le cicline della fase M rimangono a livelli elevati e le coesine non vengono rimosse. In altre parole, le cellule rimangono in prometafase o metafase mentre sono presenti cinetocori non attaccati, segnalati dal checkpoint.

Come visto nel Problema 11, l'APC deve attivarsi all'inizio dell'anafase per distruggere la ciclina della fase M, consentendo alle cellule di uscire dalla fase M. L'APC attivato aggiunge ubi-

quitina ai substrati proteici. Quando ciò accade, le proteine ubiquitinate vengono rapidamente distrutte dal proteasoma. Una semplice ipotesi è che anche le coesine siano prese di mira dall'APC, poiché devono essere distrutte all'inizio dell'anafase, permettendo così che ai cromatidi fratelli di separarsi all'inizio dell'anafase.

L'APC attivato porta infatti alla degradazione delle coesine e quindi alla separazione dei cromatidi fratelli, ma la situazione in realtà è leggermente più complicata di quanto è possibile desumere dalle informazioni fornite. La degradazione delle coesine regolata da APC risulta essere indiretta. L'APC attivo aggiunge l'ubiquitina a un'altra proteina chiamata "securina" che, durante la fase M, è associata in un complesso con un enzima proteolitico chiamato "separasi". Quando securina e separasi sono insieme nel complesso, la separasi non è funzionale. Quando la securina viene degradata, la separasi scinde le coesine e separa i cromatidi fratelli.

22.13 a. Si può trattare una coltura di cellule di lievito aploidi con un mutageno, quindi si piastra il lievito in modo che le singole cellule formino colonie. Si fa crescere la piastra Petri principale alla temperatura più bassa (temperatura permissiva) in modo che le colonie crescano indipendentemente dal fatto che abbiano o meno una mutazione *ts* in un gene necessario per la sopravvivenza. Successivamente, si fa una replica di questa piastra e si fanno crescere le cellule ad alta temperatura (restrittiva). Se le cellule di una colonia hanno una mutazione *ts* in un gene essenziale, allora quella colonia non crescerà sulla piastra di replica. Alla fine, si recupera la colonia con la mutazione *ts* dalla piastra master originale.

b. Dapprima si fanno crescere le cellule della colonia a una temperatura bassa (permissiva), quindi si sposta la coltura alla temperatura alta (restrittiva). Si osservano le cellule per rilevare se la loro crescita si arresta in un punto particolare del ciclo cellulare. Le cellule smettono tutte di crescere quando hanno un'unica grande gemma, come mostra la Figura B del riquadro "Gli strumenti della Genetica"? Non formano affatto gemme? Hanno gemme di una dimensione particolare? I mutanti del ciclo cellulare si arresteranno in un momento particolare del ciclo cellulare, mentre i mutanti in altri geni essenziali moriranno o smetteranno di crescere in fasi casuali del ciclo cellulare.

Si può andare oltre e osservare strutture come il fuso e i cromosomi per verificare se tutte le cel-

lule si arrestano alla fase M con fusi simili o con cromosomi contratti. In effetti, utilizzando la nuova tecnologia basata sulla GFP si possono persino realizzare filmati di queste strutture in cellule viventi per vedere quando si verifica l'arresto.

c. Una volta ottenuta una raccolta di mutanti *ts* nei geni del ciclo cellulare, si può determinare quali mutanti sono allelici mediante un test di complementazione. Supponendo che le mutazioni siano recessive e rappresentino una perdita di funzione, si producono cellule diploidi di lievito che combinano due diverse mutazioni *ts*. Se le cellule diploidi mostrano ancora una crescita sensibile alla temperatura, si conclude che le mutazioni non complementano e quindi sono nello stesso gene. Se le cellule diploidi possono crescere normalmente alla temperatura restrittiva (alta), si conclude che le mutazioni complementano e quindi si trovano in geni diversi.

Si noti che per creare cellule di lievito diploidi, è necessario far accoppiare cellule aploidi di mating type opposti. Questo può essere fatto se si sono trovate mutazioni in cellule aploidi di mating type *a* e altre in cellule aploidi di tipo α . Esistono altri metodi per convertire le cellule di un mating type in un altro, ma questi non sono stati spiegati nel testo.

d. Si noti che le cellule con gemme grandi appena prima dello sbalzo di temperatura si arrestano come due cellule con gemme grandi dopo lo sbalzo. Ciò indica che la proteina codificata da questo allele *ts* non è richiesta per alcun processo che si verifica dopo una fase di formazione di gemme grandi, né per l'inizio del ciclo cellulare (poiché nuove gemme possono ancora formarsi alla temperatura restrittiva). Pertanto, la proteina prodotta dal gene è essenziale per alcuni processi che si verificano dopo l'inizio del ciclo cellulare (dopo la formazione di nuove gemme) ma prima della citochinesi (poiché le cellule con gemme grandi che erano già oltre il punto di arresto al momento dello spostamento di temperatura possono produrre due figlie). Le cellule in cui la sintesi del DNA è interrotta durante la fase S possono arrestarsi con gemme grandi, ma lo stesso vale per le cellule che hanno difetti nella fase M.

Per distinguere tra queste possibilità, si dovrebbero esaminare più attentamente le cellule bloccate. Per esempio, se le cellule avessero solo una ma non due copie di tutti i loro cromosomi, il prodotto genico sarebbe necessario per la fase S. Se le cellule avessero due copie di tutti i loro cromosomi ma non avessero formato fusi, il pro-

dotto genico sarebbe necessario per una fase iniziale della fase M.

e. Si prendono le cellule di lievito che hanno una mutazione *ts* nel gene che codifica per il CDK1 di lievito, e poi si aggiunge a queste cellule un gene umano corrispondente. Un modo per farlo è sfruttare il fatto che si conoscono plasmidi di lievito. Si costruisce una molecola di DNA ricombinante in un vettore plasmidico di lievito che contiene il cDNA per la chinasi CDK1 umana di tipo selvatico. Idealmente, si deve collocare questa sequenza di cDNA a valle della sequenza del promotore per il gene CDK1 del lievito (in modo che le cellule producano approssimativamente la stessa quantità di proteina umana CDK1 che si troverebbe in una cellula di lievito normale e secondo lo stesso pattern temporale lungo il ciclo cellulare. Quindi si trasformano con questo plasmide le cellule di lievito. Se la crescita delle cellule risulta normale anche a temperatura restrittiva (alta), vuol dire che il gene umano è in grado di sostituire la funzione del gene omologo di lievito. Storicamente, questo esperimento ha dimostrato che tutte le cellule eucariotiche condividono importanti regolatori del ciclo cellulare.

22.14 Le instabilità del genoma e del cariotipo sono sia cause sia conseguenze del cancro a causa dell'intima relazione tra mutazione e divisione cellulare. Si consideri per esempio il caso delle mutazioni in un gene oncosoppressore che codifica per un enzima che interviene nella riparazione del danno al DNA. La mancanza dell'enzima di riparazione del DNA provoca instabilità del genoma (perché causa l'accumulo di nuove mutazioni in altri geni) e alcune di queste nuove mutazioni promuovono la crescita delle cellule tumorali. D'altra parte, la crescita illimitata delle cellule tumorali crea nuove opportunità di mutazione, cioè più instabilità del genoma.

22.15 I proto-oncogeni sono geni che codificano per proteine che stimolano la divisione cellulare. Pertanto, le mutazioni oncogeniche in tali geni di solito aumentano il livello di espressione del prodotto genico. L'aumento del livello di espressione del proto-oncogene genera cellule che si dividono troppo frequentemente o nel momento sbagliato, aumentando la probabilità di cancro. Una delezione di un proto-oncogene diminuirà il livello di espressione, non lo aumenterà. Pertanto, l'opzione (c) non sarà associata al cancro. Tutti gli altri cambiamenti aumenteranno la probabilità che la cellula colpita, o i suoi discendenti mitotici, diventino tumorali.

22.16 Nelle cellule che subiscono molte divisioni durante la vita di un individuo, è probabile che alcune cellule eterozigoti per una qualsiasi mutazione diventino omozigoti. In molti casi, la cellula mutante omozigote morirà; in altri casi, non risulterà alcun fenotipo mutante evidente. Tuttavia, nel caso di mutazioni degli oncosoppressori, il risultato può essere il fenotipo opposto, la crescita eccessiva delle cellule. Il motivo è che i geni oncosoppressori codificano per proteine che frenano la divisione cellulare o riparano il DNA. La perdita di un sistema di riparazione del DNA può portare a ulteriori mutazioni che alla fine si traducono in una perdita di controllo sulla divisione cellulare. In sostanza, l'omozigosi per la maggior parte delle mutazioni a perdita di funzione non risulterà in un fenotipo visibile nell'intero organismo, mentre l'omozigosi per mutazioni a perdita di funzione dei geni oncosoppressori porta a un grande clone di cellule con un fenotipo tumorale che può essere visibile in tutto l'organismo.

È ipotizzabile che malattie a trasmissione dominante diverse dal cancro possano essere causate da una perdita di eterozigosi nelle cellule somatiche. Questo scenario richiederebbe (I) che l'individuo erediti un allele a perdita di funzione, (II) che un "secondo colpo" si verifichi all'inizio della crescita di un tessuto, (III) che le cellule prive della funzione del gene in questione siano in grado di crescere e dividersi formando un grande clone e (IV) che il clone risultante di cellule possa produrre un fenotipo riconoscibile. Le situazioni in cui tutte queste condizioni vengono soddisfatte sono rare, ma recentemente mutazioni somatiche di "secondo colpo" che portano a una perdita di eterozigosi sono state implicate come cause della malattia del fegato policistico nell'uomo.

22.17 I riarrangiamenti cromosomici dovuti alla cromotripsia potrebbero generare oncogeni riunendo regioni regolatorie e regioni codificanti di geni diversi o fondendo le regioni codificanti di geni diversi in modo da generare proteine di fusione. Mutazioni a perdita di funzione nei soppressori tumorali potrebbero anch'esse essere generate nei punti di rottura del riarrangiamento o dalle delezioni. In sostanza, la cromotripsia crea una situazione che porta a un'alta frequenza di eventi mutageni lungo il cromosoma "frantumato", e abbiamo visto che le mutazioni sono intimamente associate al cancro.

22.18 Questa domanda richiede di speculare sui meccanismi che portano alla traslocazione del cromo-

soma Philadelphia; infatti, gli scienziati non comprendono ancora completamente il processo. Sulla base di ciò che si è appreso in questo libro, tuttavia, si possono citare due ipotesi ragionevoli. In primo luogo, come si è visto nel Capitolo 13 (vedi Figura 13.2), uno dei meccanismi per produrre riarrangiamenti cromosomici è il crossing-over illegittimo. Infatti, i due introni in cui si verifica il punto di rottura della traslocazione hanno ciascuno la stessa sequenza di elementi trasponibili (una SINE, come mostrato nella Tabella 13.1). In secondo luogo, si è visto che la ricombinazione inizia con una rottura a doppio filamento del DNA (per esempio, vedi Figura 5.21), quindi forse un introne in *bcr* o in *abl* contiene un hotspot per la ricombinazione in cui si formano rotture a doppio filamento con alta frequenza. Entrambi questi meccanismi sono probabilmente coinvolti nella genesi dei cromosomi Philadelphia.

22.19 Nota: nei Problemi 19 e 20, assumiamo che gli omologhi normali (non traslocati) dei cromosomi coinvolti nella traslocazione non abbiano alcuna mutazione in nessun gene correlato al cancro vicino ai punti di rottura della traslocazione. **a.** Falso. Si noti che le cellule leucemiche del paziente sono eterozigoti per la traslocazione. Ciò significa che le proprietà cancerogene della traslocazione devono essere dominanti a livello della cellula. Questo fatto non è quindi coerente con le caratteristiche di un gene oncosoppressore, ma ha più senso se si è verificata una sorta di mutazione dominante a guadagno di funzione che coinvolge un proto-oncogene vicino al punto di rottura della traslocazione, che viene convertito in un oncogene dalla traslocazione.

La situazione reale della leucemia mieloide cronica (CML) è presentata nella didascalia della Figura 13.15. La mutazione dominante a guadagno di funzione associata alla traslocazione converte il proto-oncogene *c-abl* in un oncogene con fusione *bcr/c-abl*. La proteina codificata dal proto-oncogene *c-abl* è una chinasi che partecipa a una via di trasduzione del segnale; la chinasi è regolata in modo che sia attiva solo quando è necessaria. La proteina codificata dall'oncogene fuso *bcr/c-abl* opera sempre come chinasi, ma la sua attività non si arresta. Di conseguenza, la via di trasduzione del segnale che porta alla proliferazione cellulare è costitutiva: è sempre attiva (on), anche quando dovrebbe essere inattiva (off).

b. Falso. Come appena affermato nella parte (a), la mutazione deve comportare un guadagno di funzione, non una perdita di funzione, di un pro-

to-oncogene, in modo che così viene convertito in un oncogene.

c. Falso. Le cellule germinali del paziente sono ancora normali e non hanno la traslocazione. L'evento che ha prodotto la traslocazione deve essersi verificato in qualche cellula somatica nella linea dei globuli bianchi.

d. Vero. La maggior parte delle cellule in questo individuo ha un cariotipo normale e non è tumorale, mentre le cellule leucemiche sono eterozigoti per la traslocazione.

e. Vero. Frammenti di DNA delle cellule leucemiche includeranno la regione intorno al punto di rottura che contiene l'oncogene mutante. Quando le cellule normali di una coltura di tessuto di topo vengono trasformate con questo DNA, formano focolai trasformati perché l'effetto dell'oncogene mutante è dominante. (Cioè, le cellule del topo avranno due copie del proto-oncogene normale, ma se viene aggiunta una copia dell'oncogene umano mutante, ciò può far sì che le cellule acquisiscano proprietà tumorali.) Se le cellule dei foci trasformati vengono iniettate in topi, i topi possono a loro volta sviluppare tumori. Questo tipo di esperimento è stato mostrato in Figura 22.20.

f. Falso. Come affermato nella parte (a), il gene vicino al punto di rottura della traslocazione deve essere un proto-oncogene. I proto-oncogeni codificano prodotti genici che fanno avanzare il ciclo cellulare piuttosto che prodotti genici che frenano il ciclo cellulare (come fanno i geni oncosoppressori).

g. Falso. Un evento mutazionale (guadagno di funzione) che converte un proto-oncogene in un oncogene è sufficiente per promuovere il cancro. Per promuovere il cancro sono necessari "due colpi" mutazionali con perdita di funzione in un gene oncosoppressore, ma il gene nel punto di rottura è chiaramente un proto-oncogene piuttosto che un gene oncosoppressore.

h. Falso. Un trattamento del cancro dovrebbe disattivare l'attività dell'oncogene situato nel punto di rottura della traslocazione. Un farmaco che attiva ancora di più l'attività dell'oncogene avrebbe l'effetto sbagliato: promuoverebbe il cancro piuttosto che alleviare la patologia.

22.20 La genesi della leucemia mieloide cronica (CML) nel Problema 19 è una traslocazione reciproca tra cromosomi non omologhi che si trova nelle cellule tumorali del paziente, mentre le cellule normali non contengono questo riarrangiamento. Si può verificare se il sangue del paziente è privo di cellule leucemiche eseguendo una PCR che am-

plifica solo il DNA dalla traslocazione. Se un primer PCR si lega a uno dei cromosomi su un lato della traslocazione mentre l'altro primer si lega all'altro cromosoma sull'altro lato del punto di rottura, i primer PCR comprenderanno la traslocazione. (La Figura 13.4 mostra la collocazione dei primer PCR necessari rispetto ai cromosomi traslocati). Un vantaggio di questo metodo è la sua sensibilità, perché la PCR potrebbe rilevare solo una o poche cellule leucemiche che rimangono dopo il trattamento fra una vasta popolazione di cellule normali.

22.21 a. Tutti questi geni (I-V) sono potenziali oncogeni perché la loro normale funzione è quella di promuovere la divisione cellulare e la crescita. Nessuno di loro potrebbe essere un gene oncosoppressore.

b. Se l'aggiunta di un fosfato inibisse la fosfatasi, tutte le azioni della chinasi A assicurerebbero l'attivazione del fattore di trascrizione. Cioè, la chinasi A renderebbe attivo il fattore di trascrizione sia fosforilando il fattore di trascrizione, sia impedendo alla fosfatasi di rimuovere la fosforilazione attivante. Al contrario, se l'aggiunta di un fosfato attivasse la fosfatasi, la chinasi A aggiungerebbe e rimuoverebbe simultaneamente i fosfati dal fattore di trascrizione; in tale circostanza, le funzioni della chinasi A si annullerebbero a vicenda.

c. È probabile che il gene della fosfatasi sia un oncosoppressore perché il suo prodotto proteico inibisce la produzione di fattori di crescita. La fosfatasi manterrebbe inattivo il fattore di trascrizione. In assenza di fattore di trascrizione attivo, i fattori che promuovono la mitosi non sarebbero sintetizzati.

d. Nella tabella che segue, omozigote significa omozigote per la particolare mutazione di quella riga, eterozigote significa un allele mutante e un allele di tipo selvatico, E = crescita cellulare eccessiva, D = crescita cellulare ridotta, N = crescita cellulare normale.

Mutazione	Omozigote	Eterozigote
I	E	N
II	D	N
III	D	N
IV	D	N
V	E	E
VI	E	E
VII	E	E
VIII	D	D
IX	E	N

22.22 a. Un gene oncosoppressore; la maggior parte dei tumori ereditari è dovuta all'eredità di un allele inattivo di un gene oncosoppressore. L'eredità è dominante perché è altamente probabile che l'allele wild-type del gene oncosoppressore ottenuto dal genitore non affetto venga inattivato o perso in una o più cellule della progenie.

b. Come implicito nella parte (a), l'allele ereditato dal genitore affetto è una mutazione con perdita di funzione che inattiva il gene *NF1*.

c. Ras-GDP. Se la neurofibromina è una proteina soppressore del tumore, la sua presenza rallenterebbe o limiterebbe il ciclo cellulare. Ciò potrebbe essere ottenuto se la neurofibromina favorisce la formazione della forma inattiva di Ras, Ras-GDP.

d. II, IV, V e VI potrebbero essere tutti "secondi colpi" che inattivano o causano la perdita dell'allele funzionale *NF1* ereditato dal genitore normale. L'allele del genitore affetto è già inattivato o deletato, quindi ulteriori mutazioni in quell'allele non avrebbero alcun effetto. La non disgiunzione del cromosoma durante la mitosi o la perdita del cromosoma (V) potrebbero produrre una cellula aneuploide senza una copia funzionale del gene *NF1*. La ricombinazione mitotica in un eterozigote potrebbe produrre una cellula omozigote per la mutazione di *NF1* ereditaria, ma l'evento di ricombinazione dovrebbe verificarsi tra il gene *NF1* e il centromero del cromosoma che lo porta.

e. I neurofibromi in questi pazienti sono sporadici. In altre parole, questi pazienti ereditano gli alleli wild-type di *NF1* da entrambi i genitori. Quindi deve esserci un clone di cellule in cui una delle copie di *NF1* è inattivata da qualche evento raro e dove, in un secondo evento successivo, l'altro allele di *NF1* viene inattivato o perso. Questi tumori spontanei sono estremamente rari perché devono verificarsi due eventi rari nella stessa linea cellulare. Al contrario, la malattia ereditaria richiede un solo evento raro poiché il paziente nasce con un allele difettoso. I tumori sporadici sono limitati a una parte del corpo perché questi cloni di cellule senza funzione di *NF1* sono così rari; inoltre, è probabile che il secondo evento inattivante si verifichi tardi nella vita del paziente e solo in un tessuto. I pazienti con la forma ereditaria di neurofibromatosi presentano invece numerose escrescenze precancerose (vedi Figura 11.17).

22.23 a. Le mutazioni con perdita di funzione di *BRCA1* e *BRCA2* sono recessive a livello cellulare ma dominanti a livello dell'individuo. Il motivo

è che quando una persona è eterozigote per una mutazione a perdita di funzione di *BRCA1* o *BRCA2*, è molto probabile che una dei miliardi di cellule mammarie od ovariche diventi mutante omozigote (vedi Figura 22.23). Poiché quella cellula avrà un macchinario di riparazione del DNA difettoso, è probabile che acquisisca altre mutazioni che alla fine la rendono tumorale.

b. L'HBOC non mostra penetranza completa poiché solo una di una coppia di gemelle mono- zigoti ha il cancro, mentre queste gemelle possiedono genomi identici. Bisogna comunque tenere presente che l'altra gemella potrebbe non aver ancora avuto il cancro, ma svilupparlo in futuro. In questo caso, la differenza tra le gemelle rappresenterebbe una questione di espressività (che riflette tempi diversi di comparsa del cancro), non di penetranza.

c. Sì; differenze di espressività appaiono evidenti dal pedigree. Una delle gemelle ha avuto un cancro sia al seno sia alle ovaie mentre altre femmine, presumibilmente con lo stesso allele mutante, hanno avuto solo un tipo di cancro o l'altro. Inoltre, come discusso nella parte (b), una delle gemelle MZ (che, ovviamente, ha la stessa età della gemella) non aveva nessuna delle due forme di cancro al momento in cui è stato realizzato l'albero genealogico. Se questa donna alla fine sviluppasse HBOC, la differenza nei tempi della malattia nei due gemelli MZ rappresenterebbe una differenza di espressività.

d. Gli eventi casuali determinano se e quando una cellula eterozigote diventa omozigote e quindi accumula un numero sufficiente di altre mutazioni per diventare tumorale.

22.24 L'HPV provoca il cancro esprimendo proteine (E6 ed E7) che inibiscono la funzione di due diversi oncosoppressori (p53 e Rb). Pertanto, le cellule infettate da HPV hanno una funzione di p53 ridotta per proteggere i loro genomi e una funzione di Rb ridotta per bloccare la loro entrata non desiderata nella fase S. E6 ed E7 sono simili alle mutazioni degli oncosoppressori in quanto inibiscono la funzione dei geni oncosoppressori di tipo selvatico. E6 ed E7 sono simili agli oncogeni in quanto agiscono in modo dominante. Tuttavia, E6 ed E7 sono anche distinti da entrambe le classi di geni tumorali in quanto sono i loro alleli normali che causano il cancro. Al contrario, gli alleli degli oncosoppressori che causano il cancro sono alleli a perdita di funzione e i proto-oncogeni diventano oncogeni attraverso mutazioni a guadagno di funzione.

22.25 a. Le mutazioni nelle cellule somatiche causano il cancro. Il fatto che gli elefanti siano grandi significa che sono necessarie molte divisioni cellulari per creare e mantenere un elefante. La causa ultima di tutte le mutazioni è la replicazione di tratti di DNA danneggiato o con errori. Pertanto, ci si aspetterebbe che le cellule degli elefanti abbiano almeno tante opportunità di acquisire mutazioni quante ne hanno le cellule umane. Inoltre, il fatto che gli elefanti e gli esseri umani abbiano una durata di vita simile significa che le cellule degli elefanti hanno tanto tempo (tante replicazioni), quanto le cellule umane per accumulare mutazioni casuali nei geni oncosoppressori e nei proto-oncogeni. Il cancro è considerato una malattia della vecchiaia perché di solito le cellule impiegano tempo ad accumulare un numero di tali mutazioni sufficiente per diventare tumorali.

b. Circa la metà di tutti i tumori umani sono omozigoti per mutazioni a perdita di funzione nel gene soppressore tumorale *p53*. Gli esseri umani hanno solo una copia di *p53*. Il fatto che gli elefanti abbiano più copie significa che sarebbe molto più difficile per le cellule perdere tutta l'attività di *p53* attraverso la mutazione che se avessero una sola copia del gene *p53* come gli esseri umani.

22.26 Nota: in tutto questo problema, non è possibile distinguere l'identità delle tre mutazioni puntiformi VI, VII e VIII.

a. III (trisomia), IV (duplicazione di una regione cromosomica) e [VI, VII o VIII] (una rara mutazione puntiforme ipermorfa o neomorfa). Le alterazioni genetiche che potrebbero convertire i proto-oncogeni in oncogeni che promuovono il tumore sono mutazioni a guadagno di funzione (VI, VII o VIII) o aumenti del dosaggio genico (III e IV).

b. I (ricombinazione mitotica), II (delezione di una regione cromosomica), V (disomia uniparentale) e [VI, VII o VIII] (una mutazione puntiforme nulla o ipomorfa). [Se una mutazione puntiforme è stata assegnata in precedenza nella parte (a) come mutazione a guadagno di funzione, non può essere una mutazione a guadagno di funzione anche nella parte (b).] Alterazioni genetiche dei geni oncosoppressori che promuovono il cancro sono mutazioni a perdita di funzione (VI, VII o VIII) o diminuzioni del dosaggio genico (II). Negli eterozigoti per una mutazione a perdita di funzione di un gene oncosoppressore, la ricombinazione mitotica (I) o la disomia uniparentale (V) possono comportare la perdita della copia wild-type superstita del gene.

c. I (ricombinazione mitotica) e V (disomia uniparentale). L'idea qui è che prima dell'evento elencato una cellula ha due copie di un gene oncosoppressore, ma una copia è inattiva (cioè, la cellula è eterozigote per una mutazione a perdita di funzione, ma non una delezione, in un gene oncosoppressore). La ricombinazione mitotica (I) o la disomia uniparentale (V) renderebbe la cellula omozigote per l'allele mutante, quindi ci sarebbero ancora due copie del gene ma entrambe sarebbero mutanti.

Una nuova mutazione puntiforme nulla (VI, VII o VIII) nella copia precedentemente di tipo selvatico del gene oncosoppressore, allo stesso modo darebbe luogo a una cellula con due copie del gene, ma entrambe inattive. Questa situazione tecnicamente non è una perdita di eterozigosi (perché la cellula sarebbe eterozigote per due mutazioni a perdita di funzione diverse), ma si è ancora essenzialmente nel giusto rispondendo anche VII.

Per le parti (d)-(h) bisogna prima capire la differenza tra la rappresentazione di un locus e un allele specifico. Ogni colonna è un locus specifico (coppia nucleotidica) lungo il cromosoma; ogni riga rappresenta i possibili alleli di quel locus (cioè A, G, C e T). È quindi fondamentale prestare attenzione al numero di copie di ciascuno SNP analizzato nel microarray. Bianco significa nessuna copia dell'allele indicato, arancione significa una copia e rosso significa due copie. Quindi si somma il numero di copie di tutti gli alleli di un locus nel campione; per esempio, il tumore ha 3 copie totali del locus *a* sul cromosoma 15 (1 A e 2 Gs).

d.

I (ricombinazione mitotica)	II (delezione)	III (trisomia)	IV (duplicazione)	V (disomia uniparentale)
16 a-g	16 s-x	15 a-z	14 n-t	17 a-z

Non si chiede di individuare alcuna mutazione puntiforme (VI-VIII) perché ciò è impossibile [con un'eccezione speciale annotata nella parte (f) di seguito]. La possibilità che uno qualsiasi dei polimorfismi SNP esaminati sul microarray contribuisca al cancro è estremamente remota dato che questi costituiscono solo un campione molto piccolo di tutti i possibili polimorfismi su questi cromosomi. Gli SNP esaminati sono invece anonimi nel senso che non avrebbero alcun effetto sui fenotipi incluso il cancro.

e. L'evento di ricombinazione mitotica deve avvenire nell'intervallo tra gli SNP *g* e *h* sul cromosoma 16. Si noti che nel tessuto tumorale, le sequenze distali al sito di ricombinazione mitotica (cioè più lontane dal centromero) diventano omozigoti, mentre quelle prossimali al sito di ricombinazione mitotica rimangono eterozigoti come nel tessuto normale.

f. Sebbene nessuno dei polimorfismi SNP esaminati sul microarray possa promuovere il cancro, i dati suggeriscono che ci sono tre punti nel genoma in cui il paziente potrebbe aver ereditato una mutazione puntiforme in un gene oncosoppressore o sviluppato una mutazione puntiforme somatica in una cellula del fegato. Una posizione è la regione *a-h* del cromosoma 16. (Il gene oncosoppressore potrebbe trovarsi nella regione *g-h* perché non sappiamo dove si trovi il punto di rottura in questo intervallo.) Se esistesse una mutazione puntiforme in un gene oncosoppressore in questa regione, la ricombinazione mitotica nella regione *g-h* di questo cromosoma potrebbe generare una cellula omozigote per questa mutazione puntiforme. Una seconda possibilità è sul cromosoma 17 (regione *a-z*), dove la disomia uniparentale potrebbe generare una cellula omozigote per una mutazione puntiforme in un gene oncosoppressore. La terza regione è la regione *r-y* del cromosoma 16, dove il paziente ha ereditato una delezione in un gene oncosoppressore, e una mutazione puntiforme potrebbe essersi sviluppata successivamente in una cellula del fegato. (Il gene di interesse potrebbe essere nell'intervallo tra il passaggio da due copie a una copia o nell'intervallo tra il passaggio da una copia a due copie del cromosoma.)

g. Alterazione II. L'evidenza più chiara che il paziente abbia ereditato una mutazione che potrebbe promuovere il cancro è che l'intervallo *s-w* contenente lo SNP sul cromosoma 16 è deleto (il tessuto normale ha solo una copia di questi loci). Su un cromosoma normale, questa regione contiene presumibilmente un gene oncosoppressore, quindi il paziente inizia (come zigote) con una sola copia di questo gene.

Come appena discusso nella parte (f), esiste la possibilità che il paziente possa aver ereditato una mutazione puntiforme nella regione *g-h* del cromosoma 16 e/o da qualche parte sul cromosoma 17 (*a-z*), ma le evidenze dell'esistenza di tali mutazioni puntiformi sono solo indirette.

h. Coerentemente con le risposte alle parti (f) e (g), i tre scenari sono i seguenti. Le tre mutazioni puntiformi (VI-VIII) sono intercambiabili.

Scenario 1: Il primo colpo (II) è rappresentato dalla delezione, ereditata da un genitore, di un gene oncosoppressore nella regione *s-w* del cromosoma 16. Il secondo colpo (VI) è una mutazione puntiforme nella copia wild type del gene oncosoppressore.

Scenario 2: Il primo colpo è rappresentato da una mutazione puntiforme a perdita di funzione, ereditata da un genitore, in un gene oncosoppressore che si trova nella regione *a-g* del cromosoma 16 (VII). (Questa mutazione potrebbe essersi verificata anche in una cellula somatica epatica; i dati non chiariscono questo punto.) Il secondo colpo sarebbe l'evento di ricombinazione mitotica (I) che si è verificato nella regione *g-h* in una cellula epatica originariamente eterozigote per la mutazione puntiforme. La ricombinazione mitotica rende una cellula figlia omozigote per la mutazione puntiforme.

Scenario 3: Il primo colpo è rappresentato da una mutazione puntiforme a perdita di funzione, ereditata da un genitore, in un gene oncosoppressore che si trova da qualche parte sul cromosoma 17 (VIII). (Questa mutazione potrebbe essersi verificata anche somaticamente in una cellula epatica; i dati non chiariscono questo punto.) Il secondo colpo è rappresentato dalla disomia uniparentale (V) in una cellula epatica originariamente eterozigote per la mutazione puntiforme. Il risultato è una cellula epatica omozigote per la mutazione puntiforme.

22.27 Le alterazioni I-V sarebbero relativamente facili da trovare con il sequenziamento dell'intero genoma. Per le alterazioni che cambiano il numero di copie di una regione [l'eliminazione (II), la trisomia (III) e la duplicazione di una regione (IV)], si dovrebbero cercare un difetto (II) o un eccesso (III e IV) di read della regione corrispondente rispetto alle read di altre regioni del genoma in cui il tessuto normale e tumorale presentano solo due copie. Per le alterazioni che producono una perdita di eterozigosi che non altera il numero di copie [ricombinazione mitotica (I) e disomia uniparentale (V)], si confronteranno le read del tessuto normale e del tessuto tumorale. Nelle regioni di interesse, il tessuto normale dovrebbe mostrare due alleli di molti dei loci SNP polimorfici, mentre il tessuto tumorale mostrerà un solo tipo di allele anche se il numero di read indica la presenza di due copie di questo allele.

Le mutazioni puntiformi che contribuiscono al cancro sarebbero molto più difficili da trovare e potrebbero passare inosservate anche sequen-

ziando l'intero genoma. Si potrebbe guardare in modo specifico le regioni discusse nei tre scenari della risposta al Problema 26, parte (h), per le alterazioni in geni soppressori del tumore noti. Si potrebbero anche cercare mutazioni puntiformi a carico di oncogeni noti per causare a mutazioni a guadagno di funzione. Ma è anche possibile che il tumore contenga mutazioni puntiformi che colpiscono geni correlati al cancro che sono sconosciuti o scarsamente caratterizzati. Qui, bisognerebbe cercare le mutazioni che hanno interrotto i registri di lettura aperti dei geni (come le mutazioni non senso o frameshift) o le mutazioni di senso che influenzano amminoacidi altamente conservati all'interno delle proteine. Sarebbe ancora più difficile identificare le mutazioni al di fuori delle sequenze codificanti che influenzano la regolazione dei proto-oncogeni o dei geni oncosoppressori.

22.28 Il sequenziamento ad alta risoluzione (RNA-Seq) potrebbe rivelare l'identità di mRNA o altri trascritti i cui livelli sono più alti (per gli oncogeni) o più bassi (per i geni oncosoppressori) nel tessuto tumorale rispetto a cellule normali dello stesso tipo di tessuto. Cioè, la proporzione di read per questi geni nell'mRNA totale delle cellule tumorali sarebbe molto diversa da quella delle cellule normali. Come appena discusso nel Problema 27, se un gene correlato al cancro avesse un qualche tipo di mutazione in una regione regolativa che influenza la quantità di trascritto, un tale cambiamento sarebbe difficile da trovare semplicemente osservando la sequenza del DNA genomico. L'RNA-Seq ha quindi il potenziale per fornire ai ricercatori nuove informazioni rilevanti circa il cancro di un paziente.

Naturalmente, il solo trovare un'alterazione nei livelli di un trascritto non significa che debba esserci una mutazione nel gene corrispondente o vicino a esso; il problema potrebbe essere nel gene che codifica per un fattore *trans-acting*. Inoltre, i cambiamenti nei livelli di mRNA potrebbero non guidare la progressione del tumore, ma potrebbero invece essere una risposta ad altre alterazioni genomiche che sono alla base del cancro. Quindi, questo tipo di analisi può certamente fornire indizi importanti sulla base genetica di un particolare cancro, ma sarebbe necessario molto lavoro aggiuntivo per comprendere il significato di un qualsiasi cambiamento che si osservasse nel livello di trascritto.

22.29 a. Supponendo che la presenza di EGFRvIII (la variante mutazionale della proteina recettore del

fattore di crescita epidermico) contribuisca al fenotipo tumorale, allora si può classificare il gene che codifica per EGFR come proto-oncogene. Il motivo è che le cellule tumorali esprimono sia EGFRvIII sia EGFR wild-type. Ciò significa che la mutazione EGFRvIII ha effetti dominanti. Mutazioni dominanti a guadagno di funzione che trasformano i proto-oncogeni in oncogeni contribuiscono al cancro. Al contrario, gli alleli di perdita di funzione dei geni oncosoppressori sono recessivi nella promozione del cancro.

b. Si dovrebbero trattare i pazienti che esprimono EGFRvIII con una dose di raggi X superiore al normale. Si ricordi che l'apoptosi è un processo cellulare che consente alle cellule con danni al DNA di autodistruggersi. L'apoptosi è necessaria affinché il corpo si liberi delle cellule che sarebbero pericolose perché hanno accumulato una grande quantità di danni al DNA. Se le cellule tumorali non vanno facilmente incontro all'apoptosi, saranno relativamente resistenti ai raggi X e non moriranno. Si devono trattare le cellule con livelli molto alti di raggi X per uccidere direttamente le cellule. In effetti, trattare tali pazienti con la dose abituale di raggi X sarebbe molto pericoloso, perché i raggi X farebbero accumulare in queste cellule mutazioni, alcune delle quali negli oncogeni e nei geni oncosoppressori.

c. L'allele wild-type del gene EGFR è un proto-oncogene il cui prodotto promuove la divisione cellulare fungendo da recettore per il fattore di crescita epidermico. Il dominio N-terminale è extracellulare e lega il fattore di crescita, mentre la parte C-terminale della proteina è una chinasi. La funzione della chinasi (aggiungere gruppi fosfato ad altre proteine) è necessaria per promuovere la divisione cellulare in presenza del fattore di crescita. La proteina EGFRvIII ha il dominio chinasico ma non ha gli amminoacidi da 6 a 273 del dominio N-terminale. Pertanto, la spiegazione più probabile è che la delezione del dominio N-terminale crei una forma del recettore dell'EGFR che può essere costitutivamente attivo, anche in assenza del fattore di crescita dell'EGF.

d. IressaTM sarebbe un eccellente farmaco candidato per il trattamento dei glioblastomi che esprimono EGFRvIII. Il farmaco dovrebbe bloccare l'attività chinasica dell'EGFR, per esempio occupando il sito in cui l'ATP si lega all'enzima per il trasferimento di un fosfato dell'ATP alle proteine bersaglio. Questo farmaco dovrebbe interrompere la segnalazione costitutiva dalla proteina EGFRvIII perché interferirebbe con la sua fun-

zione chinasica; in questo modo, impedirebbe la proliferazione cellulare indesiderata. Un problema con questo farmaco è ovviamente che impedirebbe anche la funzione del normale recettore EGFR in tutte le cellule, producendo effetti collaterali indesiderati.

Sebbene Iressa™ abbia teoricamente molto senso per il trattamento dei glioblastomi, sfortunatamente non si è dimostrato molto efficace negli studi clinici reali. Le ragioni non sono chiare; forse troppo poco farmaco attraversa la barriera ematoencefalica per raggiungere i tumori nel cervello. Un'altra possibilità è che molti glioblastomi possano avere ulteriori mutazioni che generano segnali costitutivi da parte di altri recettori del fattore di crescita che non sono inibiti da questo farmaco.

e. Si dovrebbero trattare i pazienti con glioblastomi che hanno livelli più alti del normale di trascrizione di ERCC1 e del relativo prodotto genico con dosi di cisplatino superiori al normale. Il motivo è che queste cellule possono rimuovere facilmente il danno al DNA prodotto dal cisplatino perché la proteina ERCC1 aiuta a riparare il danno al DNA. Pertanto, si dovrebbe usare più cisplatino per ottenere la quantità di danno al DNA necessaria affinché le cellule vadano incontro ad apoptosi.

Il trattamento con cisplatino può essere una cattiva idea per i pazienti con difetti nel gene oncosoppressore *p53* o nei geni che partecipano alla via dell'apoptosi. In questi casi, le cellule potrebbero accumulare molto danno al DNA ma non verrebbero rimosse dall'apoptosi; tali cellule potrebbero contribuire alla progressione del cancro.

- 22.30 a.** È più probabile che le colonne in cui la percentuale di individui con una mutazione è alta e in cui molte voci sono in blu (mutazioni non senso) o in verde (mutazioni frameshift) rappresentino geni oncosoppressori. I più ovvi in Figura 22.29 sono *TP53*, *MLL2*, *CDKN2A* e *PTEN*. L'alta frequenza implica un'associazione con il cancro ed è probabile che le voci in blu o in verde siano mutazioni a perdita di funzione come ci si aspetterebbe nel caso dei geni oncosoppressori. (Si dovrebbe comunque tenere presente che mutazioni non senso o frameshift potrebbero, sebbene più raramente, causare un guadagno di funzione rimuovendo una parte del prodotto proteico di un gene che altrimenti inibirebbe la sua funzione. Tuttavia, se il non senso/frameshift si ve-

rifica all'inizio del registro di lettura, la perdita di funzione è molto più probabile.)

PIK3CA e *NFE2L2* sono probabilmente oncogeni perché molti pazienti hanno una mutazione in questi geni ma nessuna di queste mutazioni è non senso o frameshift, mentre tutte le mutazioni in questi geni in questo campione sono di senso (in viola). Questo fatto è coerente con la natura di oncogeni di questi geni, ma da solo non costituisce una prova. Ulteriori prove che questi geni sono oncogeni emergerebbero se si scoprisse che molti pazienti hanno un'amplificazione di tali geni (più di due copie) sotto forma di HSR o *double minute* (vedi Figura 22.21b). Questa informazione non è fornita nella Figura 22.29, ma molti studi sul cancro catalogano in effetti tali amplificazioni geniche. Altri tipi di prove dimostrerebbero biochimicamente che le mutazioni di questi geni, nei tumori dei pazienti, si traducono in effetti in un guadagno di funzione.

b. Le mutazioni sinonime mostrate in giallo sono probabilmente mutazioni *passenger* che non contribuiscono al cancro perché i prodotti proteici del gene non cambiano. Si noti, per esempio, che diversi pazienti nella parte inferiore della colonna *TP53* hanno tali mutazioni sinonime. Anche se *TP53* è chiaramente un gene oncosoppressore basato sui dati di altri pazienti, è improbabile che queste particolari mutazioni nel gene contribuiscano alla cancerogenesi.

- 22.31 a.** La delezione del gene *PD-1* nelle cellule T di un paziente impedirà che tali cellule vengano disattivate dalle cellule tumorali che hanno PDL-1 sulla loro superficie. Anche se non tutte le cellule T hanno i loro geni *PD-1* deleti, quelle che li hanno saranno in grado di uccidere le cellule tumorali.

b. Il trattamento con anticorpi bloccherà l'attività della proteina PD-1 in più cellule rispetto alla delezione di *PD-1* nelle cellule T in coltura. Un vantaggio della delezione del gene *PD-1* rispetto al trattamento con anticorpi PD-1 è che le cellule T prive di *PD-1* possono uccidere anche le cellule normali oltre a quelle tumorali. Avere una certa frazione di cellule T presenti che esprimono ancora la proteina PD-1 diminuirà il livello di soppressione delle cellule normali. Uno svantaggio della delezione del gene *PD-1* rispetto al trattamento con anticorpi PD-1 è che sono presenti meno cellule T in grado di attaccare le cellule tumorali.