

➤ **Apoptosi: barriera della progressione tumorale**
meccanismi molecolari

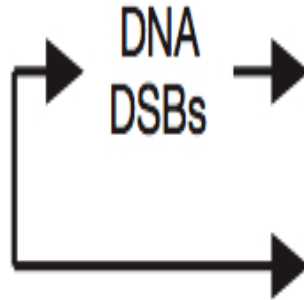
Attivazione di oncogeni



Precancerous lesion

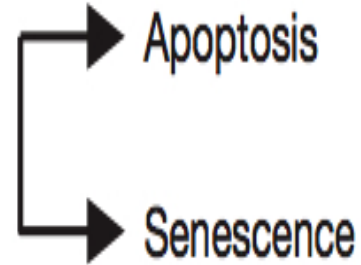


DNA replication stress



DNA DSBs

DNA damage response



Apoptosis

Senescence

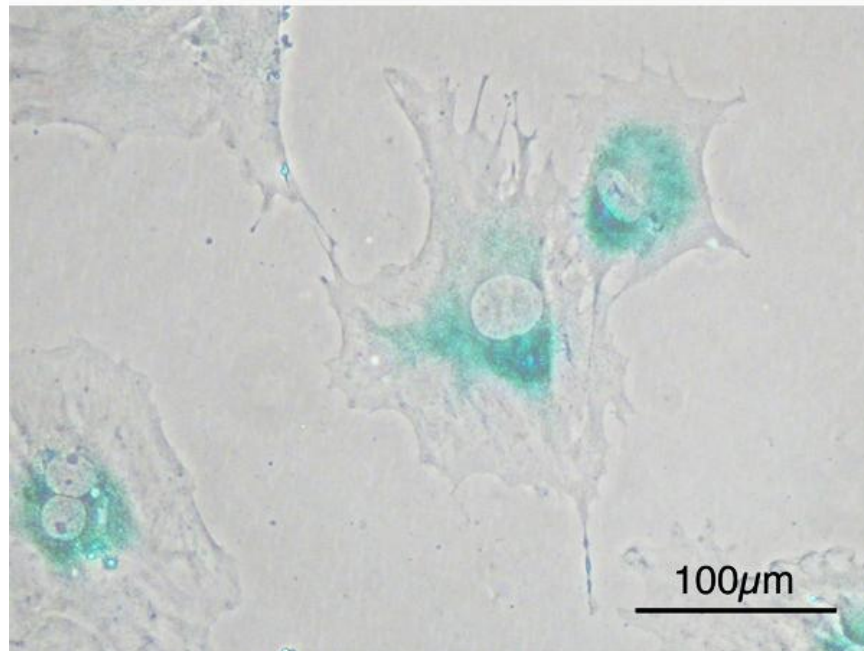
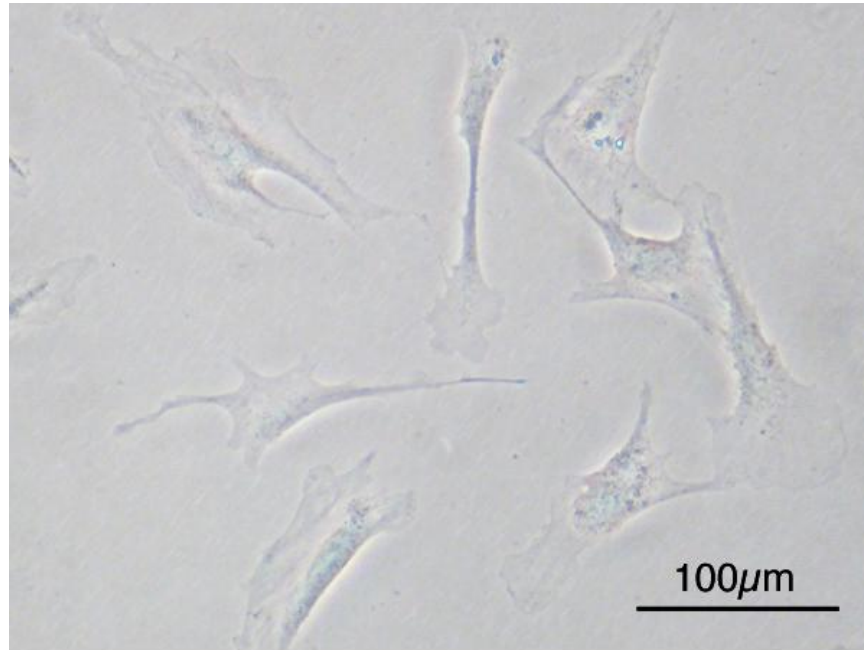


Rottura della barriera

Tumorigenesis barriers



Progressione tumorale



Apoptosi

- È una modalità di morte cellulare “attiva”, tipica di cellule di organismi pluricellulari
- È una forma di “suicidio altruista”: la cellula “si sacrifica” per il bene dell’intero organismo
- Le modalità della morte sono finalizzate a evitare l’instaurarsi di fenomeni di INFIAMMAZIONE e di AUTOIMMUNITÀ
- Il fatto che non dia luogo a fenomeni di infiammazione fa sì che la morte cellulare non sia avvertita dall’organismo (morte indolore)

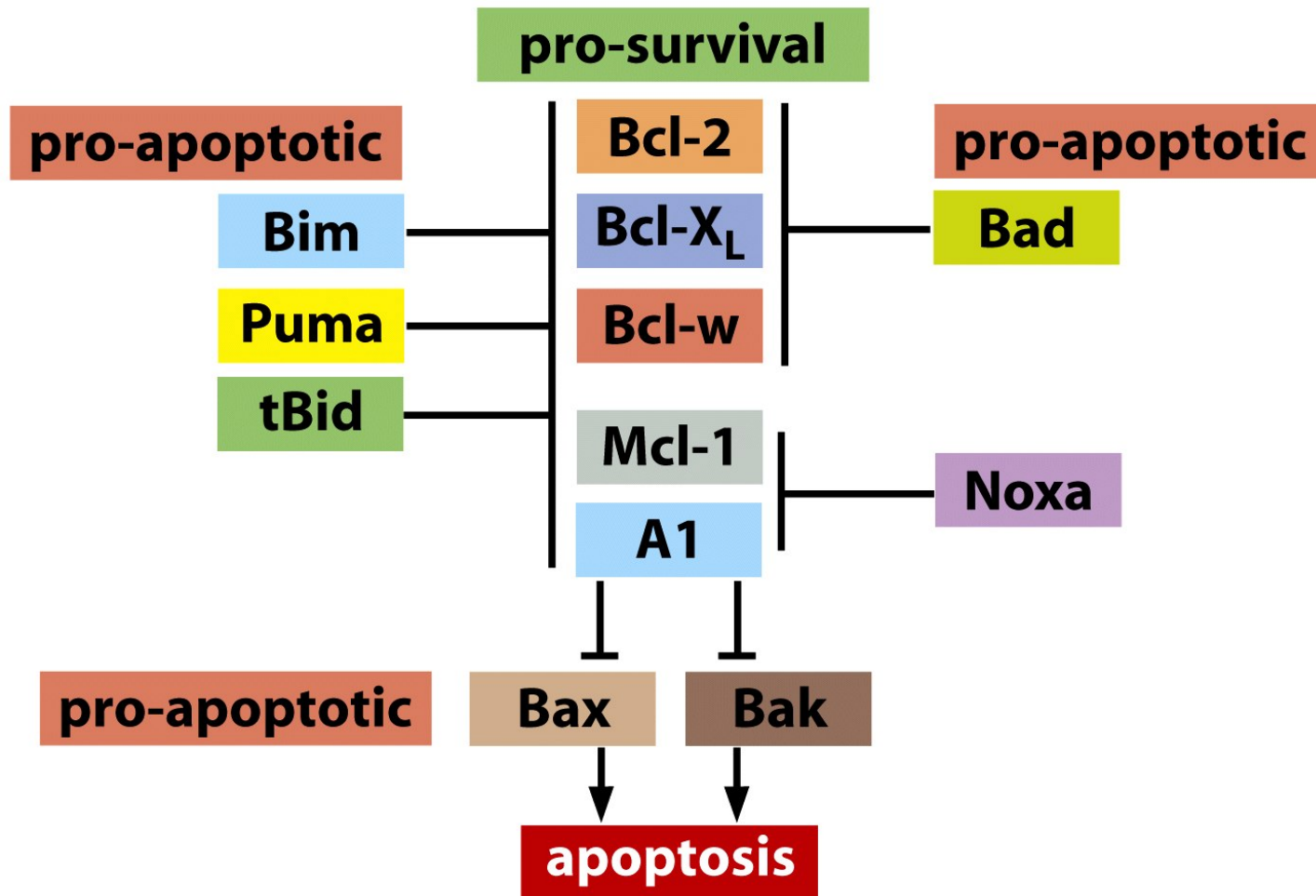
Apoptosi

- Morte cellulare programmata
- Richiede la sintesi di RNA e proteine da parte della cellula che è commissionata a morire
- Attivata da appropriati stimoli (fisiologici e patologici)

...perché si parla di programma apoptotico?

- Viene portato avanti attivamente, cioè con dispendio di energia
- È innescato da induttori specifici
- Richiede l'azione dei prodotti specifici di alcuni geni

Geni coinvolti nel controllo dell'apoptosi



MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

➤ NECROSI

- ✓ Evento accidentale
- ✓ Passivamente subito dalle cellule
- ✓ Interessa gruppi di cellule
- ✓ Dovuto a trauma, veleno, anossia, ecc
- ✓ La lisi della cellula causa fenomeni di infiammazione e di autoimmunità

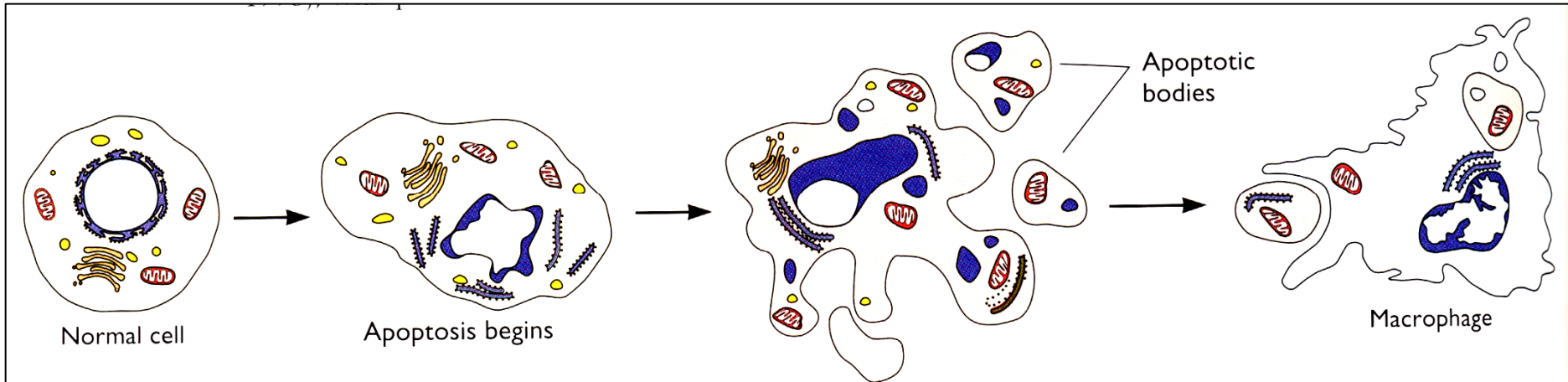
➤ APOPTOSI

- ✓ Evento programmato
- ✓ Attivamente realizzato dalle cellule
- ✓ Interessa cellule singole
- ✓ Realizzato di norma in condizioni fisiologiche
- ✓ La frammentazione della cellula e le modificazioni di superficie favoriscono la fagocitosi

Differenze morfologiche tra apoptosi e necrosi

	Apoptosi	vs	Necrosi
Nucleo	<i>Condensazione della cromatina</i>		<i>Cromatina agglomerata irregolare</i>
Organelli citoplasmatici	<i>intatti</i>		<i>distrutti</i>
Membrana cellulare	<i>Corpi apoptotici, blebbing</i>		<i>Blebbing e perdita dell'integrità</i>
Volume cellulare	<i>Le cellule si frammentano</i>		<i>Le cellule si gonfiano</i>
Tessuti	<i>Singole cellule coinvolte</i>		<i>Gruppi di cellule coinvolte</i>
Risposta tissutale	<i>nessuna</i>		<i>Infiammazione</i>

Schema delle fasi di una cellula in apoptosi



La cellula in apoptosi subisce modificazioni morfologiche e biochimiche che portano alla sua frammentazione e ne favoriscono la fagocitosi

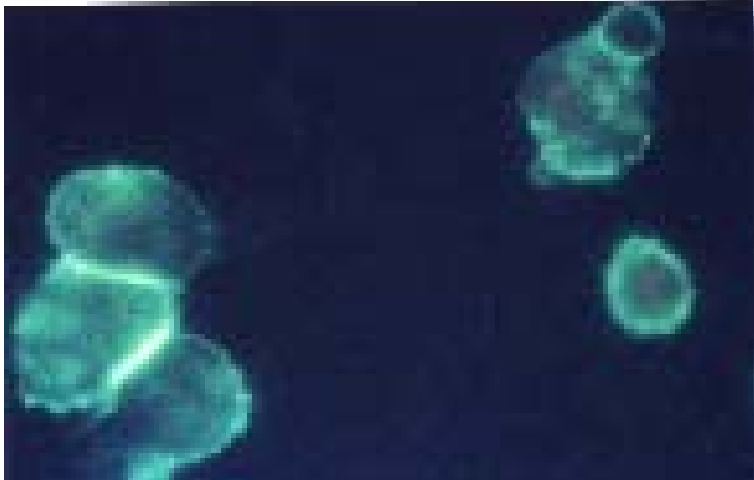
CARATTERISTICHE PRINCIPALI DEI GENI DELL'APOPTOSI

- SONO CONSERVATI NEL CORSO DELL'EVOLUZIONE
- RISPONDONO A PIÙ STIMOLI
- APPARTENGONO A UNA DELLE SEGUENTI CATEGORIE:
 - ✓ recettori di membrana (Fas/APO1/CD95, TNF, TRAIL)
 - ✓ adattatori (FADD, APAF-1, ced-4)
 - ✓ modulatori (anti-apoptotici, come Bcl-2 e ced-9, pro-apoptotici come Bax e egl-1)
 - ✓ effettori (caspasi, endonucleasi, ced-3)
 - ✓ inibitori (CrmA, cFLIP, survivin...)
 - ✓ *induttori (p53, c-myc, reaper) della fagocitosi (flippasi)*

Table 9.5 Examples of anti-apoptotic alterations found in human tumor cells

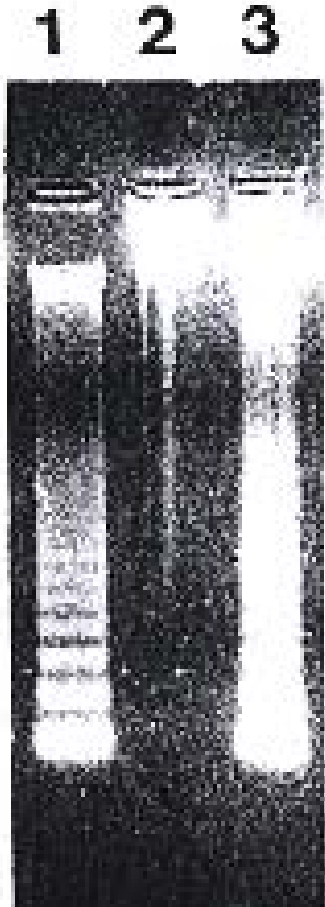
Alteration	Mechanism of anti-apoptotic action	Types of tumors
→ <i>CASP8</i> promoter methylation <i>CASP3</i> repression Survivin overexpression ^a	inactivation of extrinsic cascade inactivation of executioner caspase caspase inhibitor	SCLC, pediatric tumors breast carcinomas mesotheliomas, melanomas, many carcinomas
ERK activation ERK activation Raf activation	repression of caspase-8 expression protection of Bcl-2 from degradation sequestration of Bad by 14-3-3 proteins	many types many types many types
→ <i>PI3K</i> mutation/activation NF-κB constitutive activation ^b	activation of Akt/PKB induction of anti-apoptotic genes	gastrointestinal many types
→ <i>p53</i> mutation	loss of ability to induce pro-apoptotic genes	many types
→ <i>p14^{ARF}</i> gene inactivation Mdm2 overexpression	suppression of <i>p53</i> levels suppression of <i>p53</i> levels	many types sarcomas
→ <i>IAP-1</i> gene amplification	antagonist of caspases-3 and 7	esophageal, cervical
→ <i>APAF1</i> methylation	loss of caspase-9 activation by cytochrome <i>c</i>	melanomas
→ <i>BAX</i> mutation	loss of pro-apoptotic protein	colon carcinomas
→ <i>Bcl-2</i> overexpression	closes mitochondrial channel	~ 1/2 of human tumors
→ <i>PTEN</i> inactivation	hyperactivity of Akt/PKB kinase	glioblastoma, prostate carcinoma, endometrial carcinoma
IGF-1/2 overexpression <i>IGFBP</i> repression <i>Casein kinase II</i>	activates PI3K loss of anti-apoptotic IGF-1/2 antagonist activation of NF-κB	many types many types many types
→ <i>TNFR1</i> methylation FLIP overexpression	repressed expression of death receptor inhibition of caspase-8 activation by death receptors	Wilms tumor melanomas, many others
Akt/PKB activation	phosphorylation and inactivation of pro-apoptotic Bcl-2-like proteins	many types
Stat3 activation <i>TRAIL-R1</i> repression <i>FAP-1</i> overexpression <i>XAF1</i> methylation ^c <i>Wip1</i> overexpression ^d	induces expression of Bcl-X _L loss of responsiveness to death ligand inhibition of Fas receptor signaling loss of inhibition of anti-apoptotic XIAP suppression of <i>p53</i> activation	several types small-cell lung carcinoma pancreatic carcinoma gastric carcinoma breast and ovarian carcinomas, neuroblastoma
→ Beclin-1 hemizygous inactivation	haploinsufficient, suppression of autophagy	many types

H33342 – FITC EC



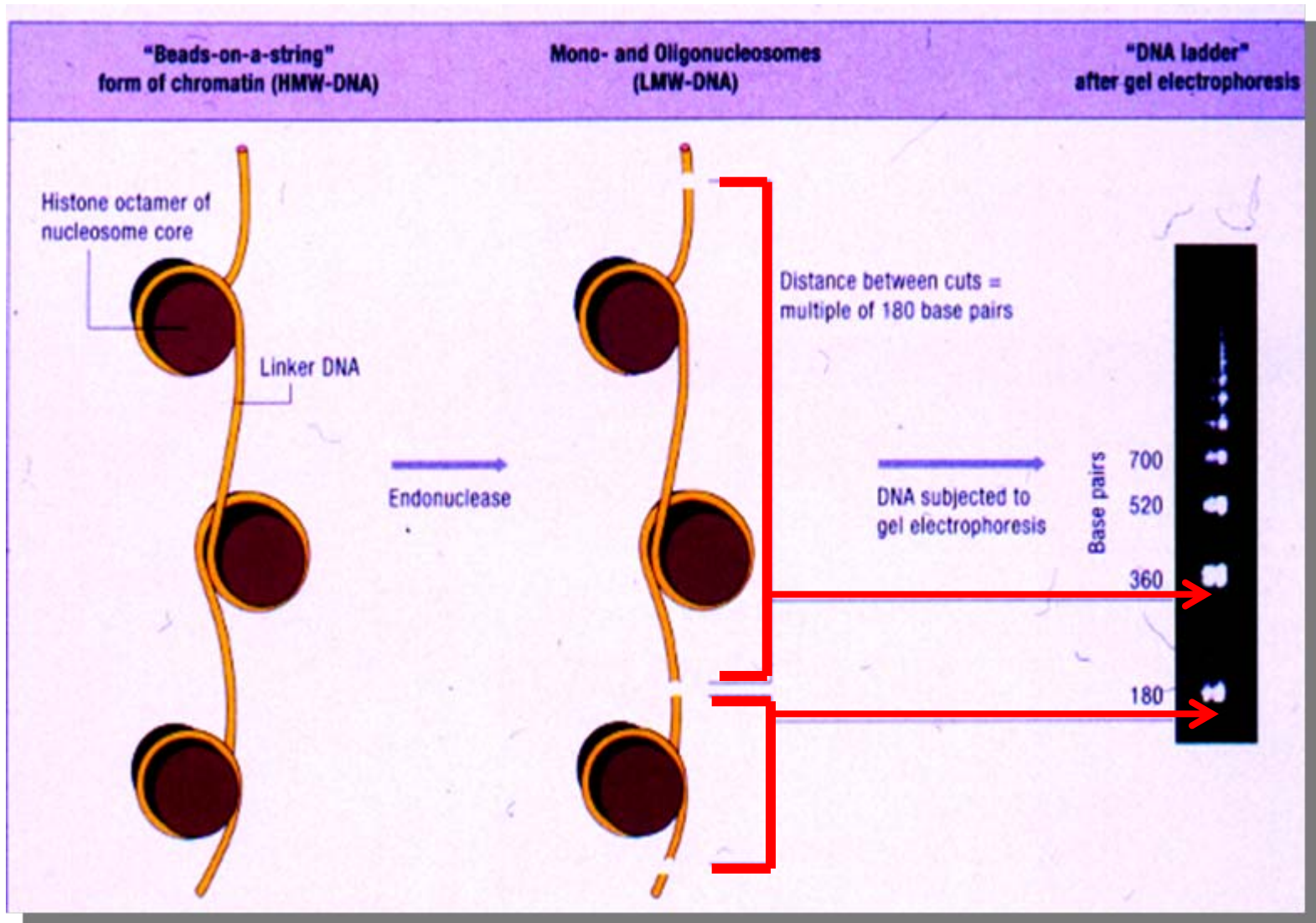
- 3 linfociti normali a sinistra e 2 apoptotici a destra.
- In alto: un colorante fluorescente che si lega al DNA evidenzia la cromatina condensata tipica delle cellule in apoptosi
- In basso: un colorante fluorescente che si lega alla membrana plasmatica ed evidenzia la presenza di un'estroflessione (*bleb*) della membrana di una cellula apoptotica

Elettroforesi del DNA di cellule in apoptosi



- DNA di cellule in apoptosi: si può osservare il *ladder (scaletta)*, formato da frammenti di peso molecolare discreto (multipli di nucleosomi)
- DNA ad alto peso molecolare di cellule integre
- DNA di cellule in necrosi: i frammenti sono di peso molecolare vario, nella maggior parte più piccolo

Nucleosomi

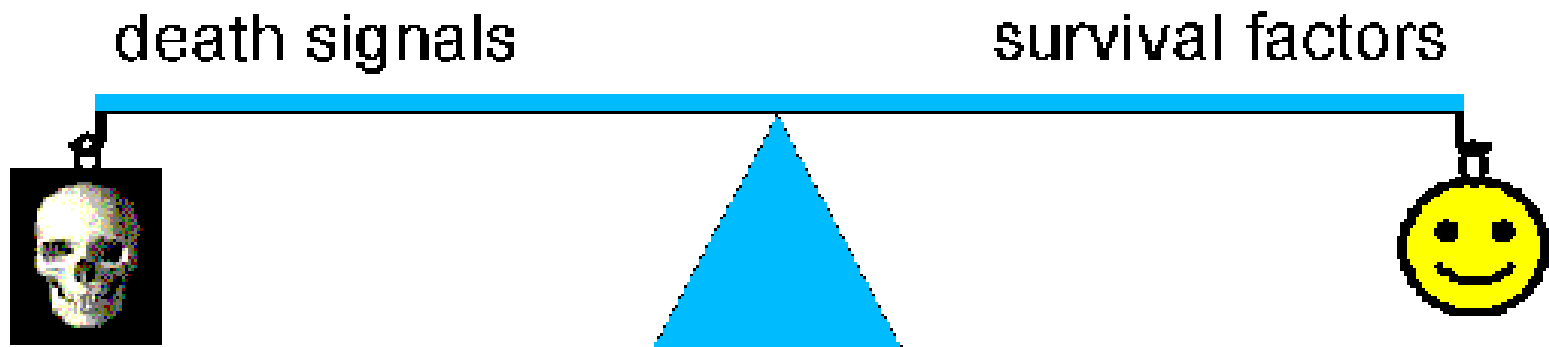


...cosa induce la cellula al suicidio?

Il bilancio tra :

- segnali pro-apoptotici
- segnali anti-apoptotici

Control Stage



FASI DELL'APOPTOSI

FASE DI INDUZIONE

- I diversi stimoli ed eventi apoptogeni seguono due (o forse più) distinte pathways: una attivata dai "segnali di morte" che giungono ai recettori di superficie, l'altra attivata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio.
- Si ritiene che tali pathways siano regolabili e reversibili fino al momento in cui convergono nell'attivazione delle **caspasi**.
- La segnalazione **specific**a dell'apoptosi si avvale per lo più di interazioni tra domini omeotipici e non richiede attivazione genica né sintesi proteica *de novo*.

FASI DELL'APOPTOSI

FASE DI ESECUZIONE

- L'attivazione delle caspasi è determinata da un evento proteolitico e determina a sua volta un'ulteriore cascata di eventi proteolitici e nucleolitici preordinati, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi.
- La finalità è quella di predisporre la cellula ad essere facilmente fagocitata in assenza di fuoriuscita di materiale potenzialmente pro-infiammatorio o immunostimolante; questa finalità viene perseguita in modo metabolicamente attivo.

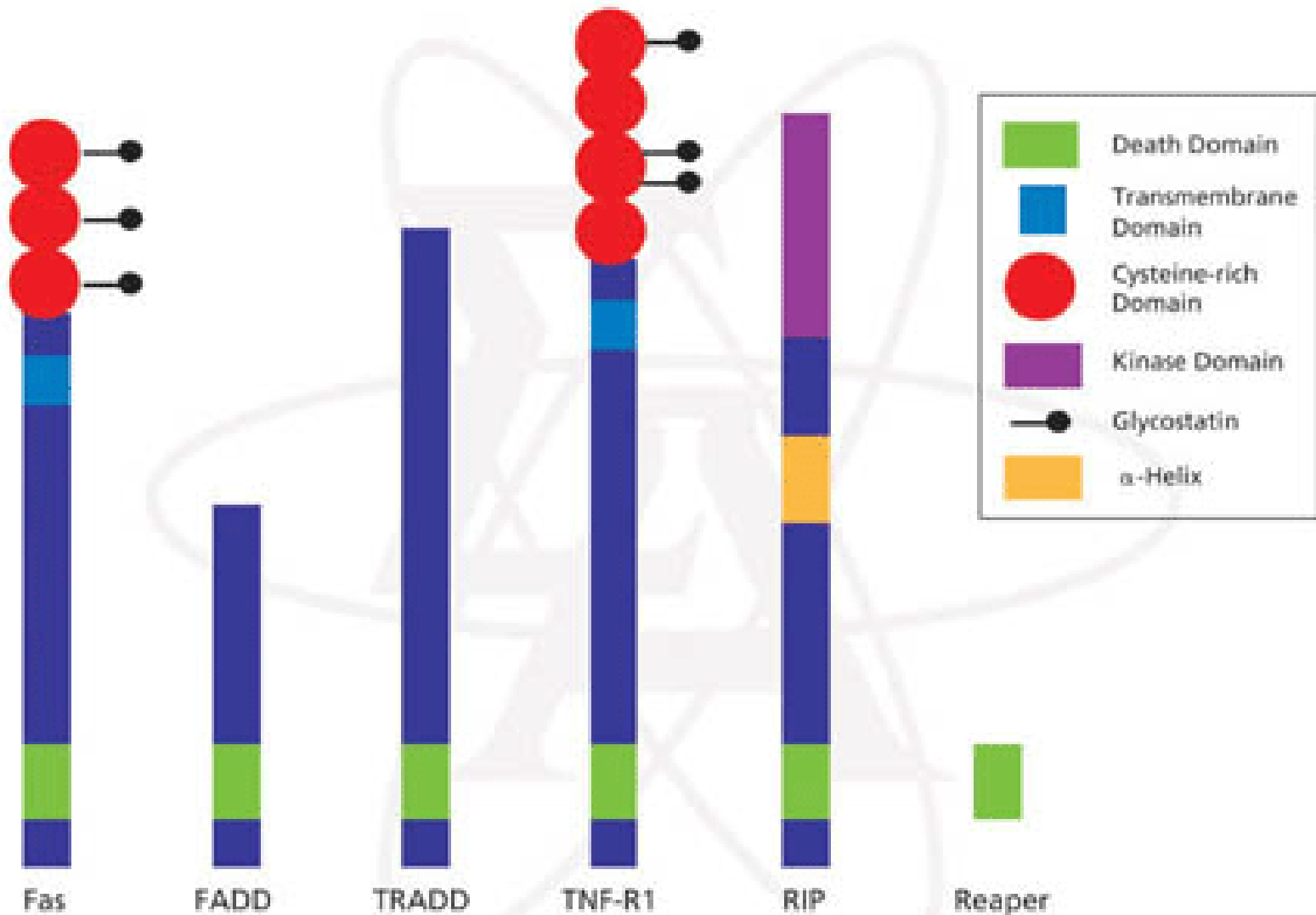
RECETTORI DI MEMBRANA CHE INDUCONO

L' APOPTOSI

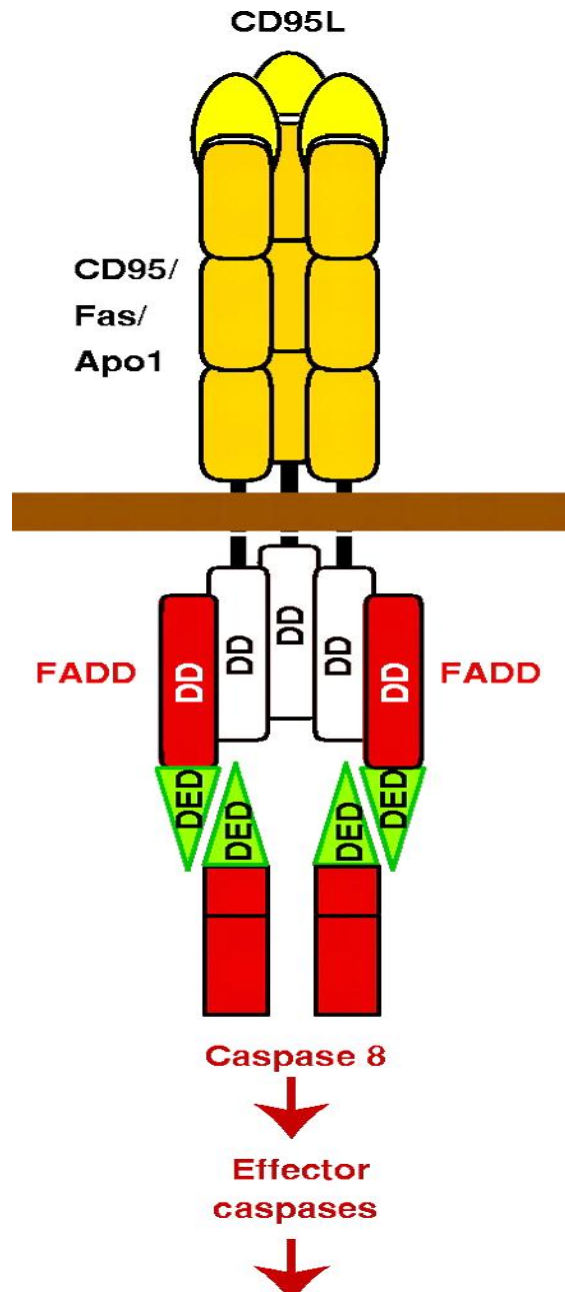
- Ne sono noti almeno cinque, tra cui il recettore per il TNF e il Fas/Apo1/CD95
- Rispondono a segnali di tipo omeostatico, generati da altre cellule dello stesso organismo
- Quando il ligando (TNF o FasL) si è associato alla porzione extracellulare del recettore, questo trimerizza e la porzione intracellulare* dirige la formazione di un complesso proteico, contenente i prodotti di geni “*adattatori*”
- I segnali generano una “cascata di attivazione” di enzimi proteolitici specifici, detti *caspasi*

*La porzione intracellulare è caratterizzata da un dominio DD (Death Domain)

Struttura di alcuni recettori di membrana che inducono apoptosi



Il pathway di morte dei recettori



- fattori di morte e.g. TNF, ligando di Fas (CD95) si legano a recettori della superfamiglia dei recettori di morte e.g. Fas and TNFR-1.
- il legame al recettore induce cluster e trimerizzazione del recettore
- il recettore trimetrico recluta mediante il dominio di morte DD una proteina adattatrice: FADD (Fas associated death domain protein) anch'essa dotata nella porzione C-terminale di un DD.
- FADD recluta mediante il dominio DED (death effector domain) la pro-caspase 8 che viene attivata in seguito a un taglio proteolitico..
- caspase-8 attivata è rilasciata nel citoplasma dove funziona come una caspasi iniziatrice, attivando a valle caspasi esecutrici.

ADATTATOR

- Sono proteine che mediano i segnali pro-apototici provenienti dai recettori di membrana o dai mitocondri lesionati
- Il loro compito è quello di innescare una “cascata di caspasi”
- Gli adattatori che riconoscono i recettori di membrana sono caratterizzati da un dominio DD che si lega al corrispondente dominio DD dei recettori e da un dominio DED che riconosce il corrispondente dominio delle caspasi 1, 4, 8, 10
- Gli adattatori della “via mitocondriale” sono caratterizzati da un dominio CARD, che riconosce il corrispondente dominio delle caspasi 2, 3, 9

MODULATORI DELL'APOPTOSI

- Localizzandosi sulla membrana esterna del mitocondrio, favoriscono (se pro-apoptotici) o rendono meno facile (se anti-apoptotici) la formazione di megacanalini e la conseguente fuoriuscita di molecole pro-apoptotiche
- Sono strutturalmente simili tra loro (domini BH1-4 + dominio transmembrana)
- Anti-apoptotici: Bcl-2, Bcl_{XL}, **ced-9**
- Pro-apoptotici: Bad, Bax, Bak, **egl-1**
- Stimoli endogeni ed esogeni agiscono sulla propensione all'apoptosi della cellula alterando la loro quantità, localizzazione e stato di attività

EFFETTORI DELL'APOPTOSI: CASPASI

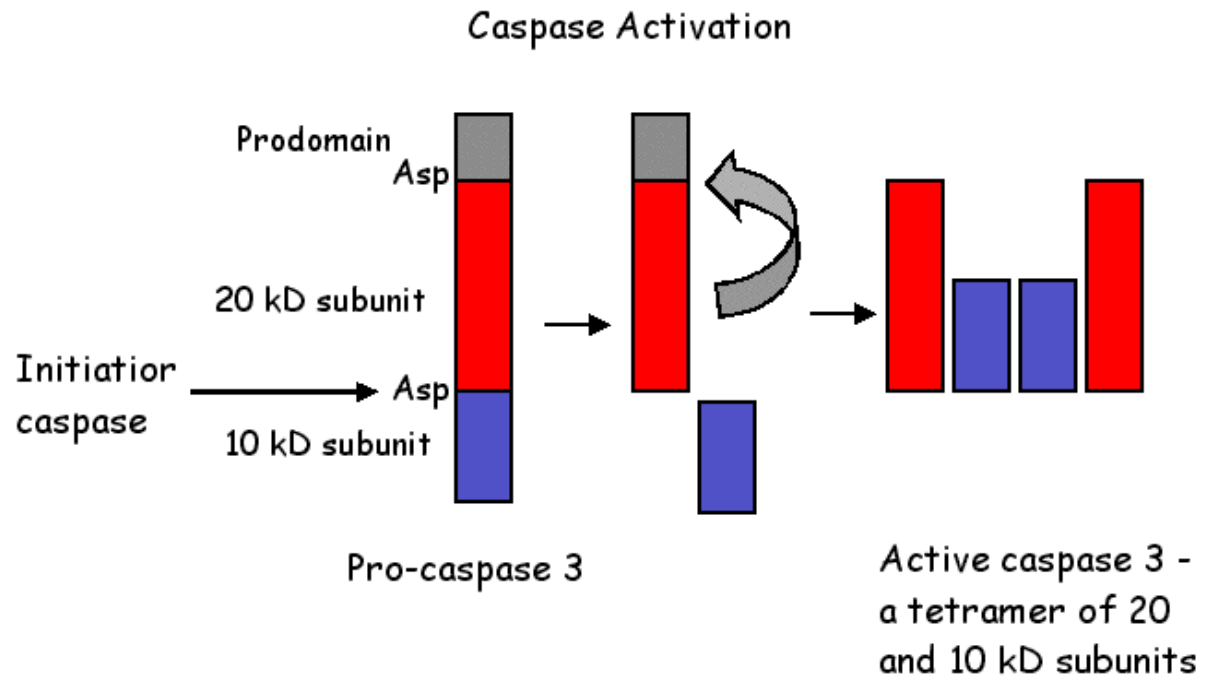
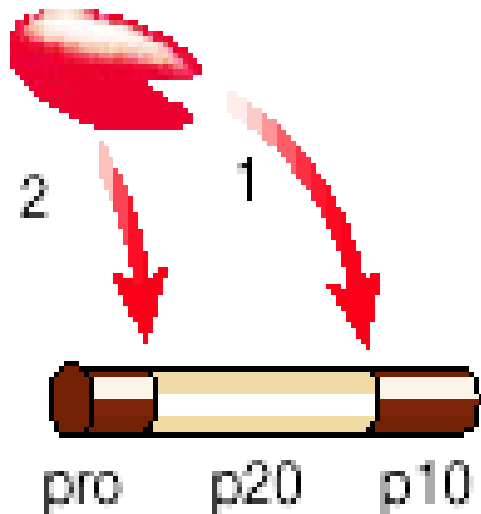
- C = cisteina nel centro reattivo; ASP = riconoscono un residuo di acido aspartico nell'ambito di una sequenza di 4 amminoacidi; ASI = sono enzimi proteolitici
- I substrati da essi tagliati sono enzimi della riparazione del DNA, proteine strutturali del nucleo, proteine del citoscheletro, I-CAD
- Le caspasi “iniziatrici” (2, 8, 9, 10) sono attivate dagli “adattatori”; a loro volta attivano le caspasi “effettrici” (3, 6, 7). (La caspasi 1, 4, 5 sono coinvolte nella maturazione di citochine)
- L'attivazione consiste nel taglio proteolitico, con formazione di due frammenti; i 2 frammenti brevi e i 2 frammenti lunghi di due caspasi uguali formano un tetramero
- Il gene ced-3 è il gene prototipo di *C. elegans*

Caspasi

Cytosolic (or Cysteine-dependent) Aspartate-Specific Proteases CASPasi

➤ **Proteasi cisteiniche** che tagliano proteine all'altezza di un acido **Aspartico**

a



EFFETTORI DELL'APOPTOSI: ENDONUCLEASI

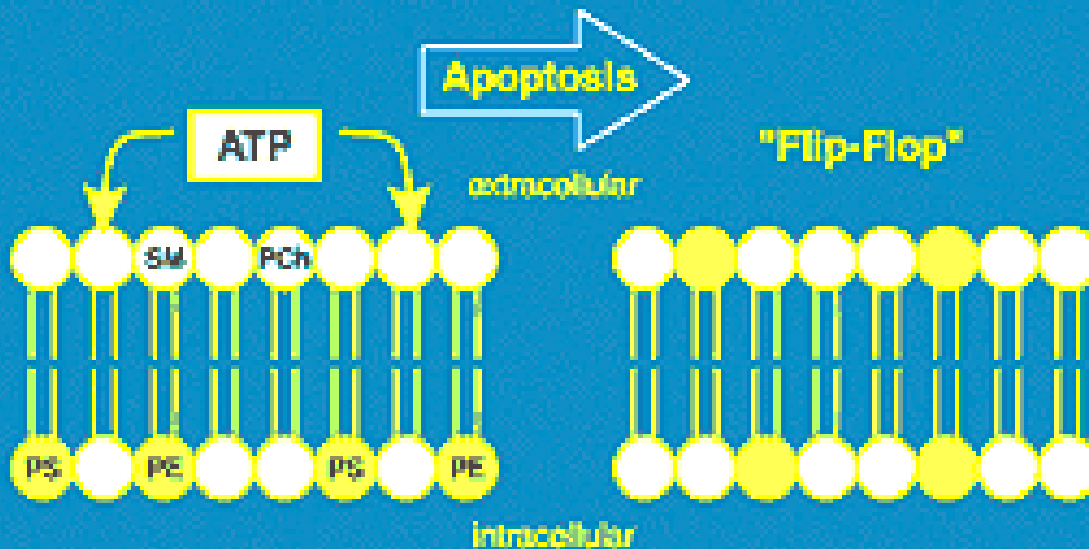
- **CAD.** Legato all'inibitore I-CAD, viene attivato quando l'inibitore viene tagliato dalle caspasi. Tipicamente responsabile dei tagli inter-nucleosomici. È localizzato nel nucleo.
- **AIF.** Liberato dai mitocondri quando si forma il megacanal, determina la formazione di frammenti ad alto peso molecolare.
- **Endo-G.** Liberato dai mitocondri quando si forma il megacanal, determina tagli a singolo filamento.

INDUTTORI DELL'APOPTOSI

- Alcuni induttori si attivano in base ad un “orologio interno” (es. *reaper* di *Drosophila*)
- Altri si attivano quando la cellula percepisce uno scompenso tra segnali di proliferazione e momento in cui tali segnali vengono inviati (es. *myc*)
- Altri ancora quando la cellula non riesce a compiere correttamente le tappe del ciclo cellulare a causa di danni al DNA (es. *p53*)
- Agiscono determinando uno sbilanciamento tra modulatori anti- e pro-apototici a favore dei secondi.

Modificazioni superficie cellulare

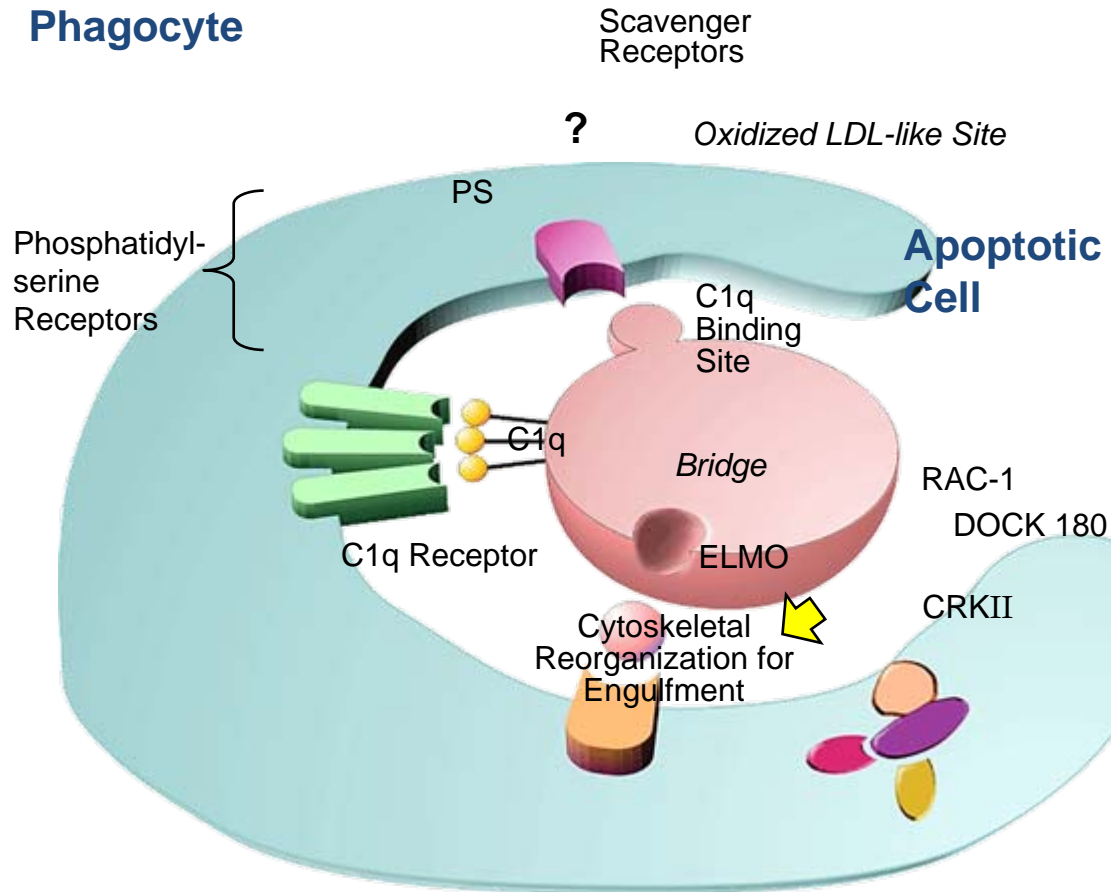
The Flip-Flop Mechanism



- PS = phosphatidylserine
- PE = phosphatidylethanolamine
- SM = sphingomyelin
- PCh = phosphatidylcholine

...cosa

succede?



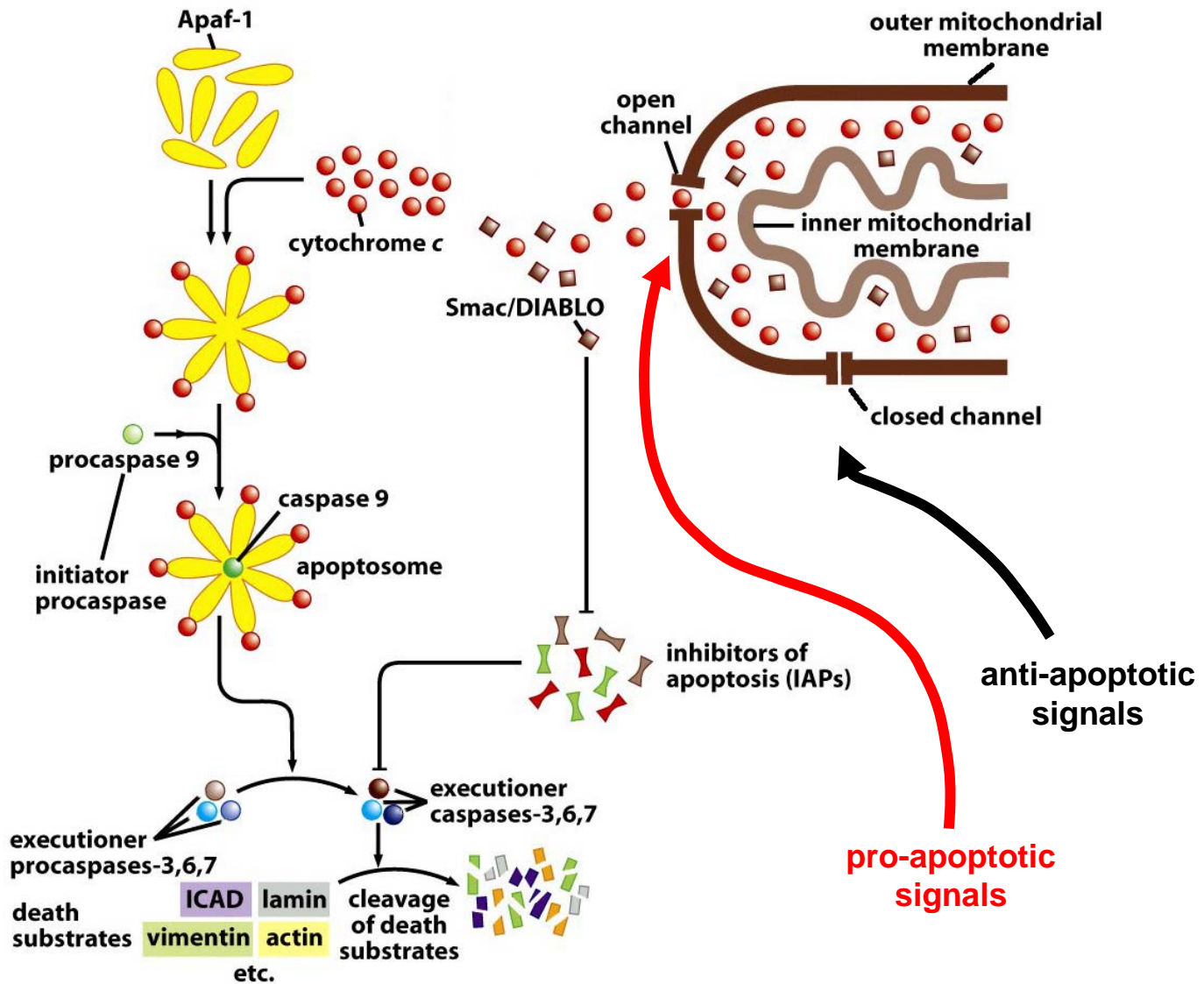
- Traslocazione della fosfatidilserina nel foglietto esterno della membrana plasmatica nei corpi apoptotici.
- Fosfatidilserina esposta sulla superficie cellulare ed il recettore della fosfatidilserina sulla superficie dei fagociti sono essenziali per la

Meccanismi molecolari dell'apoptosi

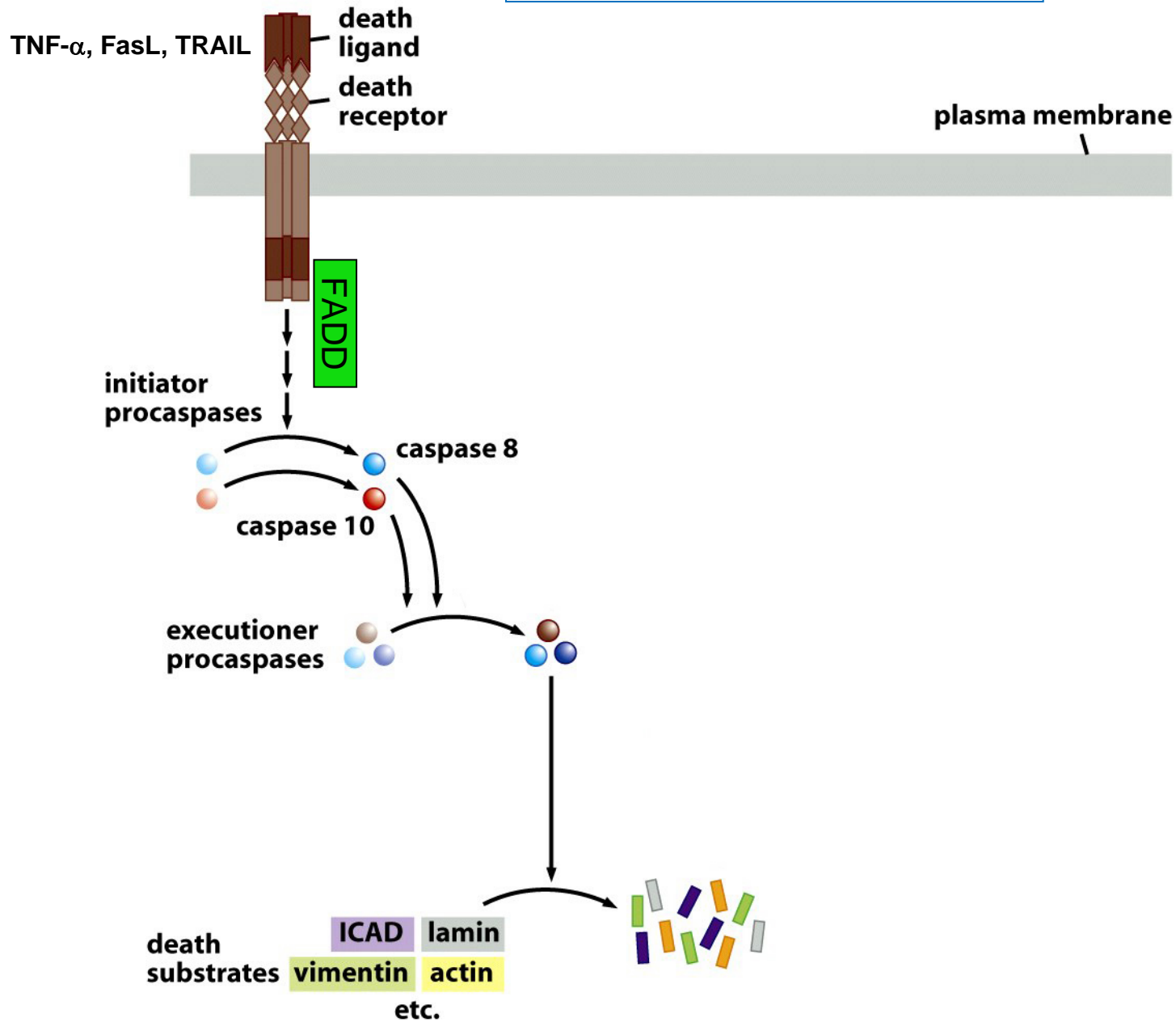
L'apoptosi può essere innescata con due vie alternative:

- Una via innescata dall'attivazione di recettori di membrana (via intrinseca) **Death receptor pathway**
- Una via innescata da segnali che si generano all'interno della cellula (via estrinseca) **Mitochondrial pathway**

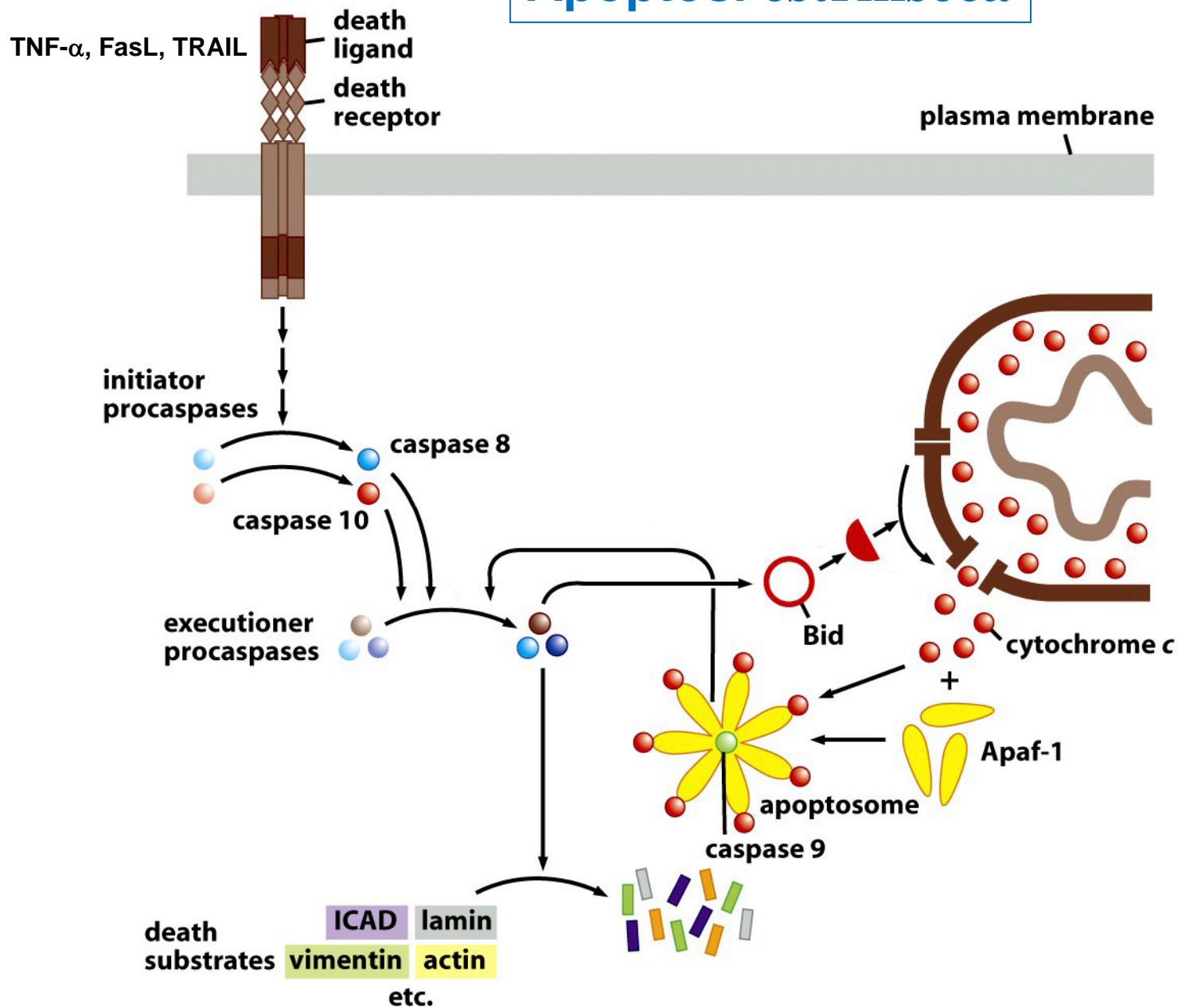
Apoptosi intrinseca



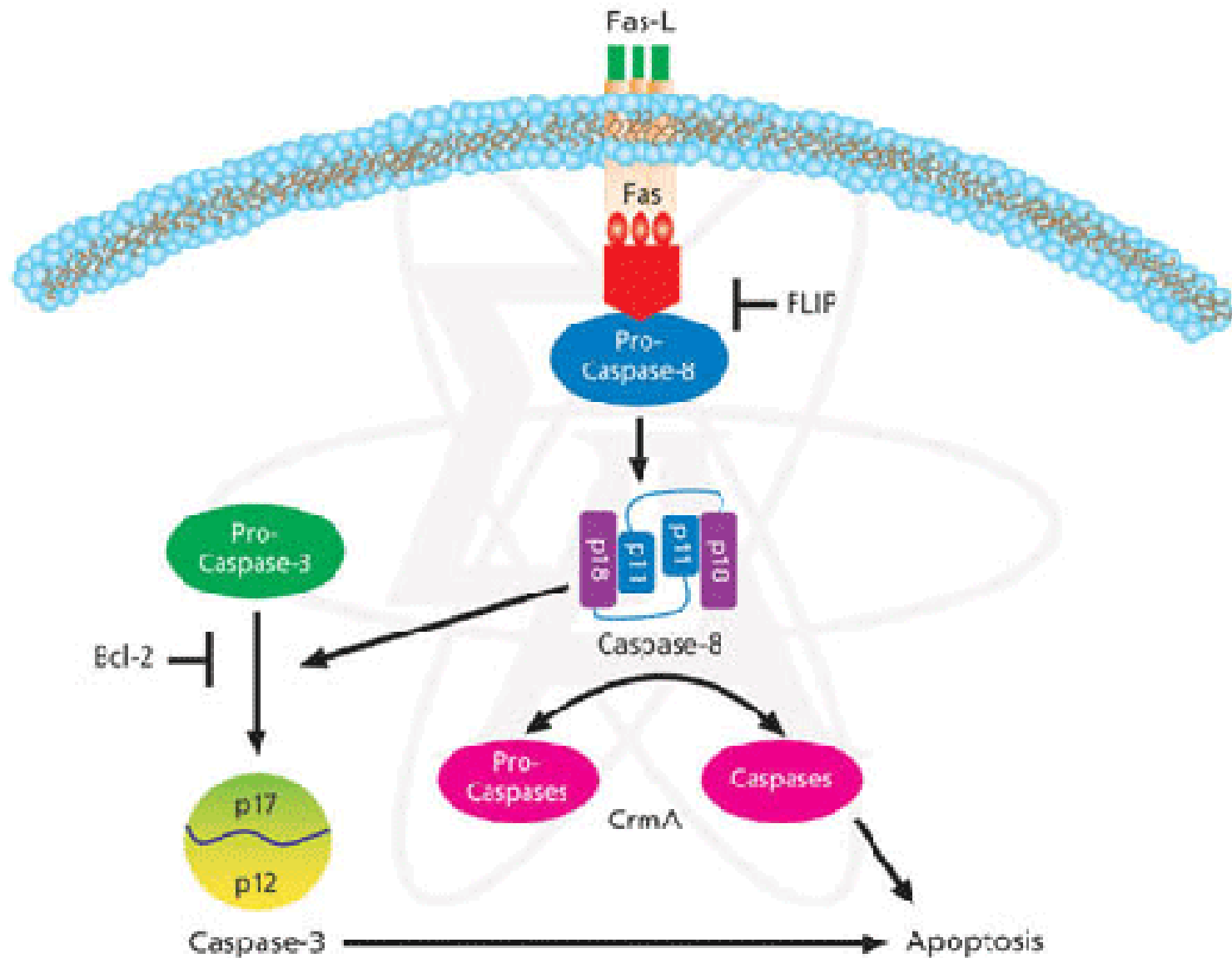
Apoptosi estrinseca



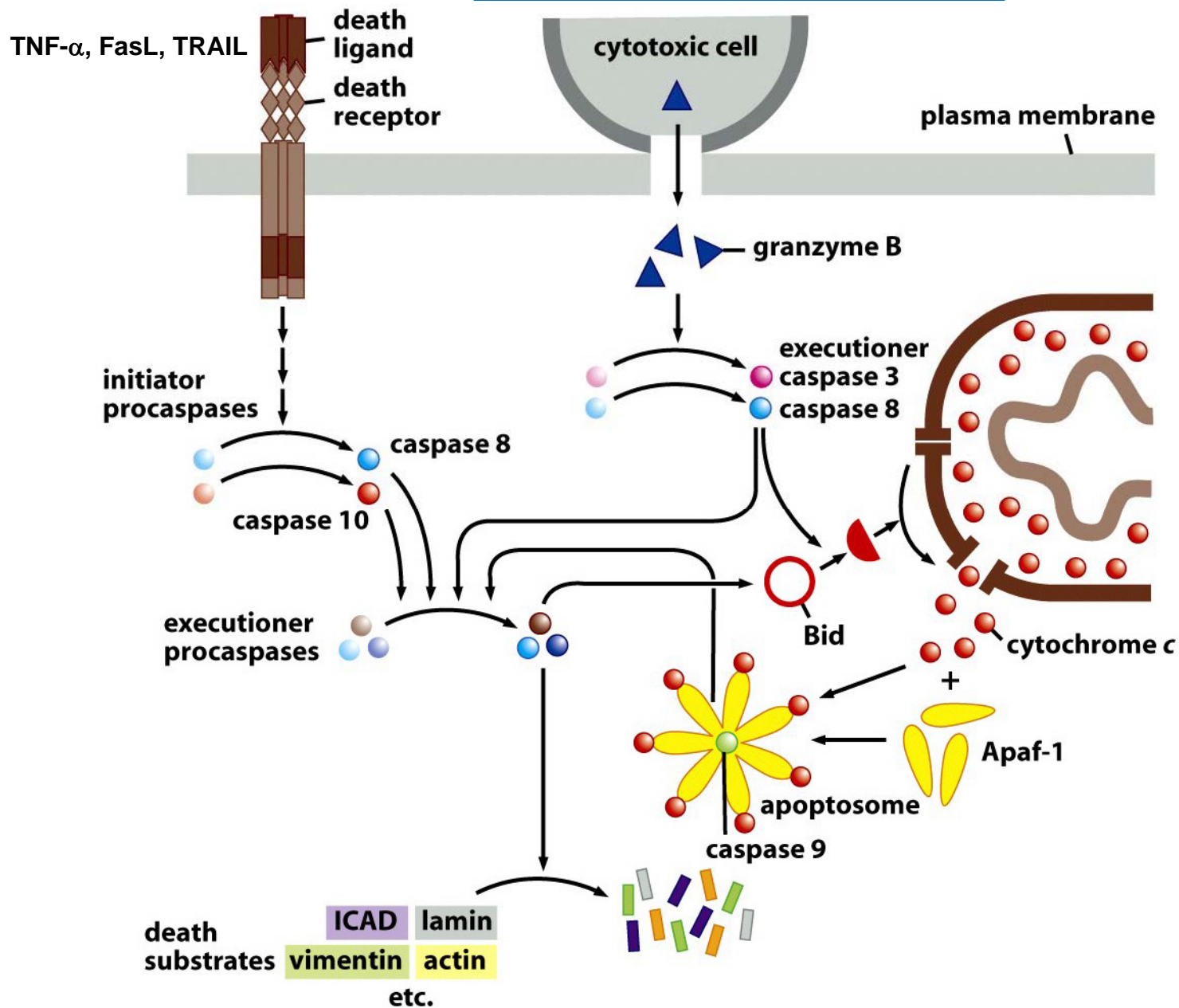
Apoptosi estrinseca



Segnalazione Fas-dipendente



Apoptosi estrinseca



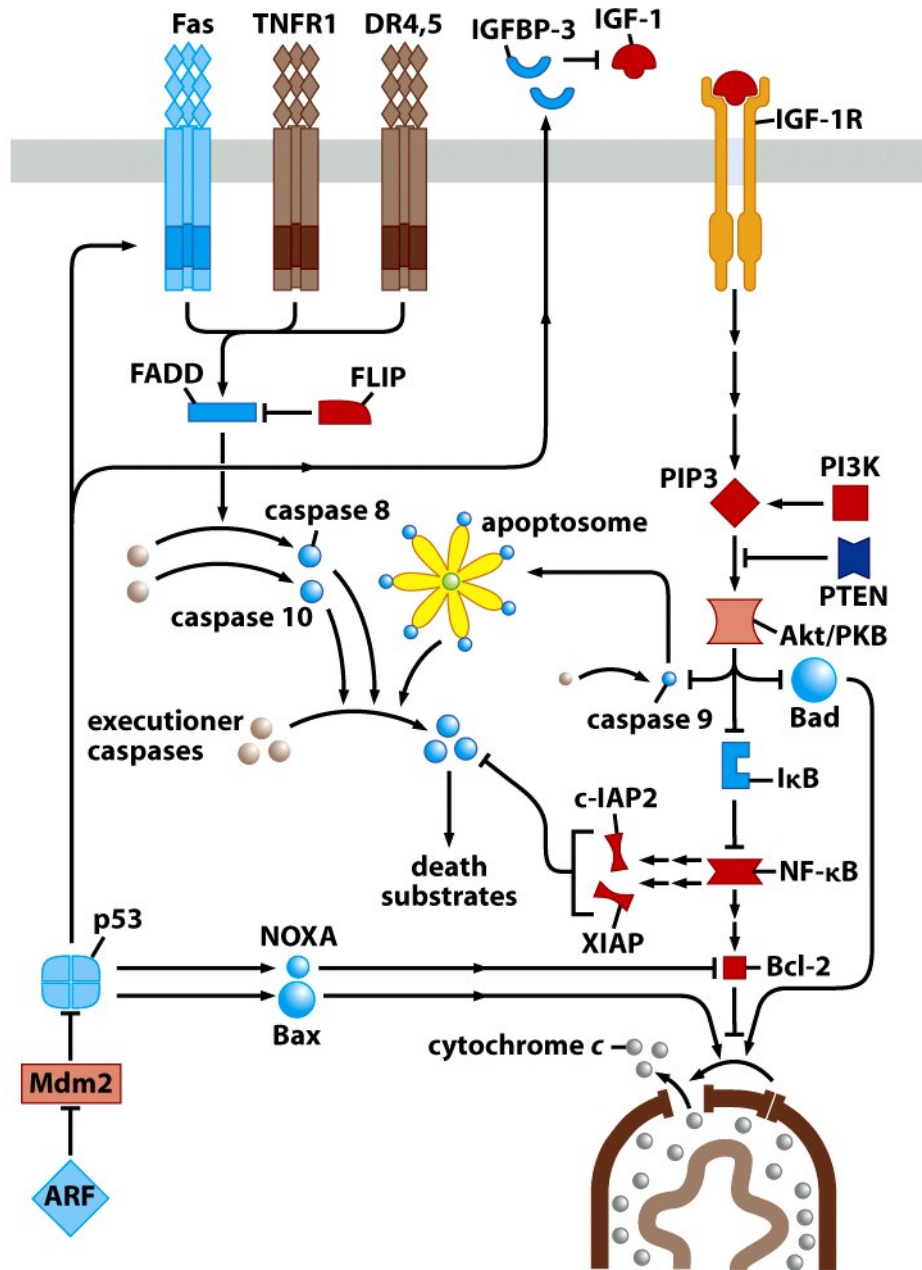


Figure 9-34 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

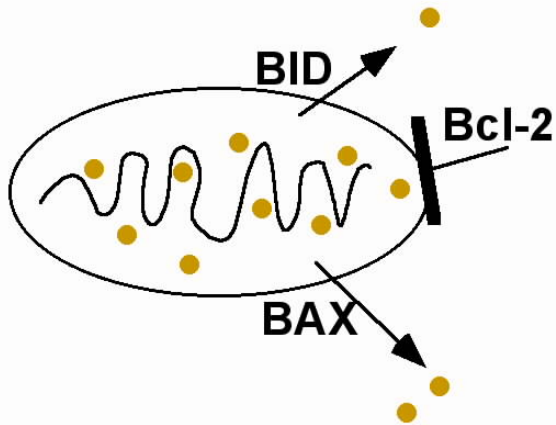
Famiglia di Proteine Bcl-2

- Bcl-2 inizialmente identificato come una translocazione cromosomica t(14;18) nello 80% di pazienti con linfoma follicolare B
- Omologo funzionale of ced9 *C. elegans*
- translocazione Bcl-2 sopprime l'apoptosi nei linfociti

Famiglia BCL-2

BCL-2 e BCL-X sono geni che inibiscono l'apoptosi prevenendo il rilascio del citocromo C dai mitocondri o sequestrando la proteina adattatrice APAF necessaria per l'attivazione delle caspasi

BAX, BID si legano alla membrana mitocondriale promuovendo il rilascio del Citocromo C



Bcl-2 Family Proteins

Anti-Apoptotic



Bcl-2
Bcl-X_L
Mcl-1
Bcl-w
CED-9



A1/Bfl-1
Bcl-X_LΔTM

Pro-Apoptotic



Bax
Bak
Bok/Mtd



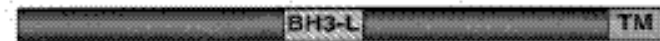
Diva



Bcl-X_s



Bik/Nbk
Hrk/Dp5
Bim/Bod
Blk

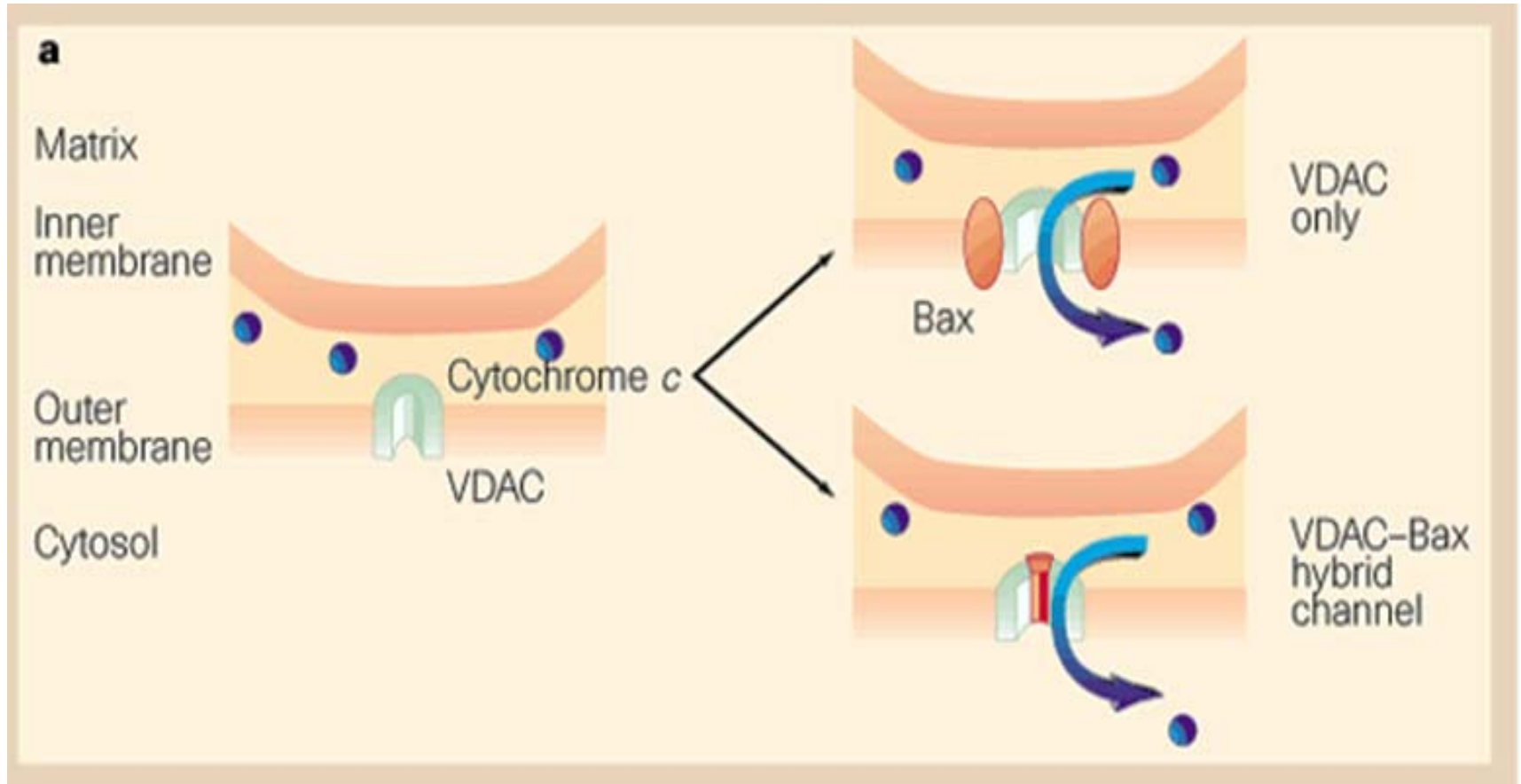


Nip3
Nix/
Bnip3L

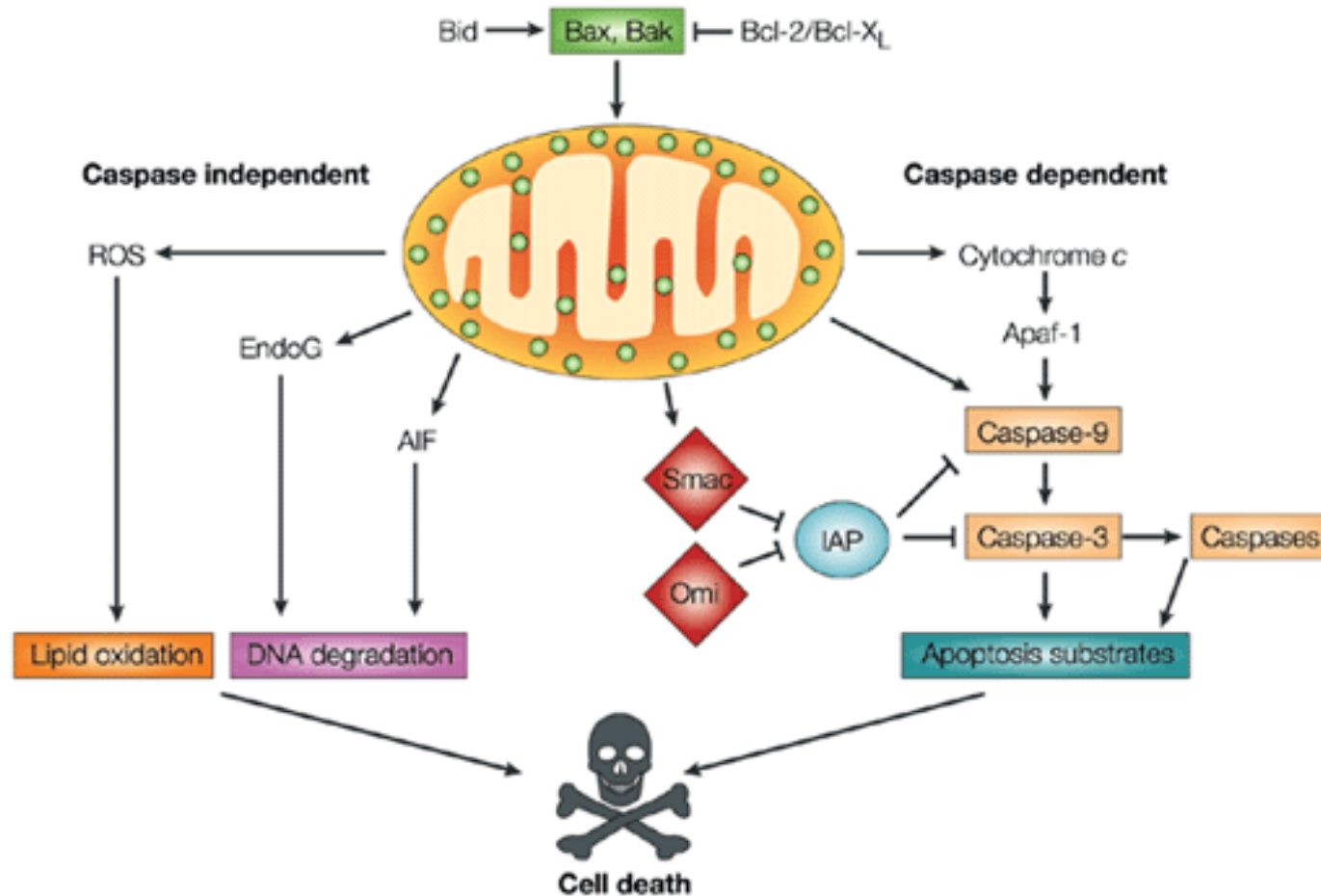


Bad
Bid
EGL-1

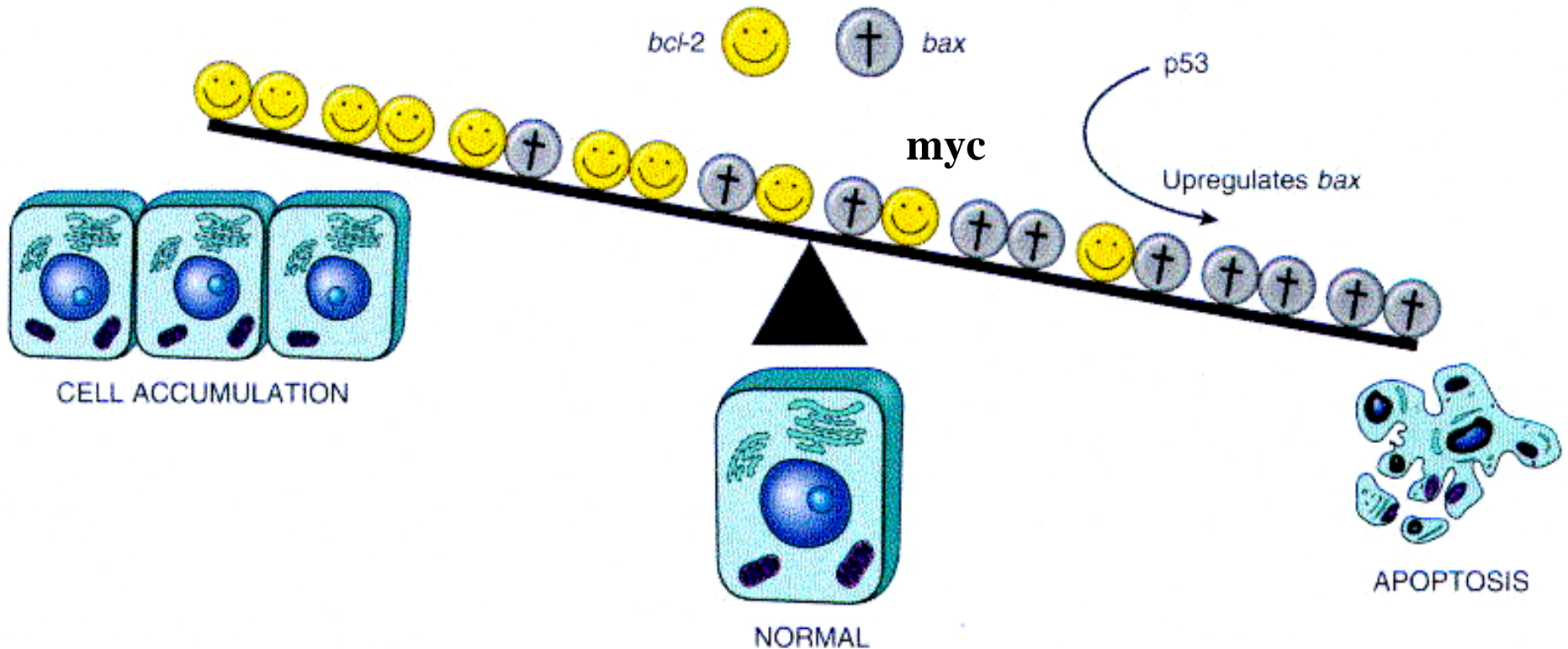
Apertura del poro mitocondriale



La via di segnalazione mitocondriale



Controllo dell'apoptosi

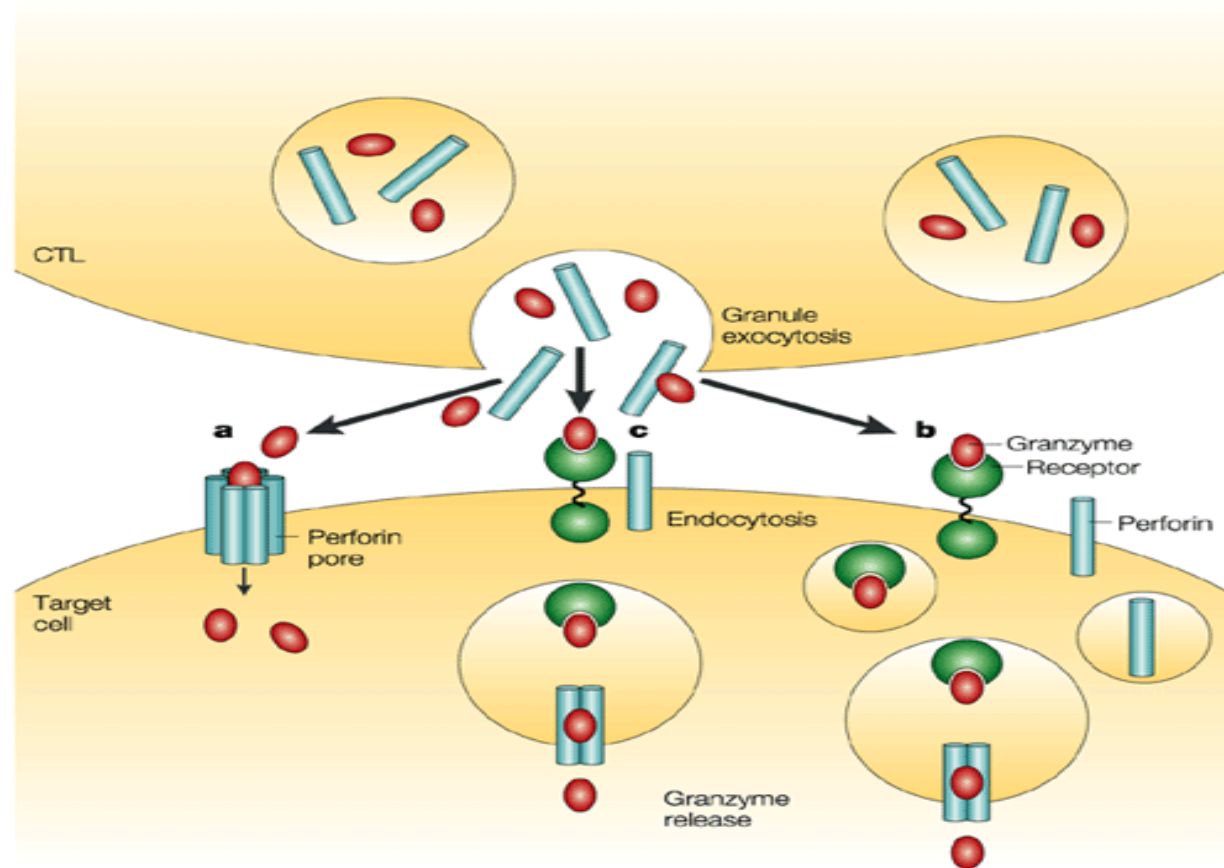


L' accumulo anomalo di cellule mutate a causa della perdita del controllo dell'apoptosi (vale a dire, l'aumento di *bcl-2* o *p53* mutati o la perdita di controllo del fattore di trascrizione *myc*) porta alla trasformazione tumorale

INIBITORI DELL'APOPTOSI

- Possono essere di origine virale (CrmA)
- Possono essere presenti naturalmente (c-FLIP) o essere indotti in cellule tumorali. Spesso si tratta di molecole “esca”: possiedono un dominio, es. DD, ma mancano dell'altro, es. DED e quindi competono con gli adattatori completi.
- Altri inibitori (IAP, survivin) si legano alle caspasi, impedendone l'attivazione; sono a loro volta inattivati da un fattore di origine mitocondriale (Smac/DIABLO)

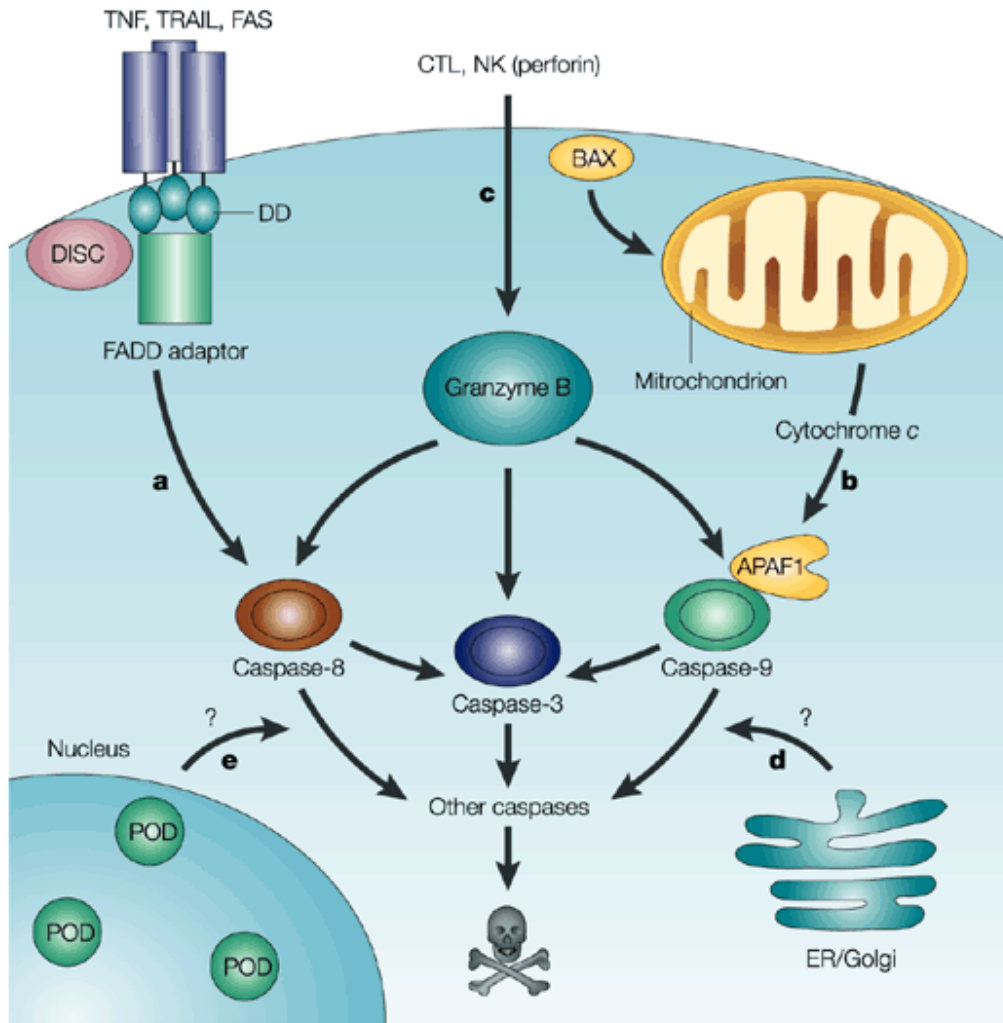
Il granzyme B



Nature Reviews | Immunology

Il granzyme B, una caspasi già attiva, viene inserita da linfociti citotossici nella cellula bersaglio, inducendone l'apoptosi

Apoptotic pathways – 1



Schema che comprende le principali vie di induzione dell'apoptosi