

N.B. La parte riguardante gli oncogeni non parla di tutti gli oncogeni, e ne mancano alcuni importanti (tipo fos e jun), ma ritengo di aver detto tutto il possibile su quelli presenti nei seguenti appunti. Info dal Pontieri.

ONCOGENI e ONCOSOPPRESSORI.

Il cancro è causato da alterazioni a carico di oncogeni, geni oncosoppressori e microRNA.

Mutazioni nelle cellule somatiche possono determinare la formazione di tumore nell'individuo stesso, mentre quelle nelle cellule germinali possono conferire alla progenie la predisposizione a sviluppare un tumore.

ONCOGENI.

Sono tutti quei geni che in seguito a mutazione che portano a **guadagno di funzione** favoriscono la trasformazione neoplastica. Dato che si tratta di un guadagno di funzione, i caratteri patologici a essi correlati sono **dominanti**, cioè si manifestano anche negli eterozigoti.

Derivano dai proto-oncogeni, geni altamente conservati essenziali nei processi di proliferazione, sopravvivenza e differenziamento cellulare.

La conversione dei proto-oncogeni può avvenire mediante:

1. Alterazioni qualitative della struttura proteica determinate da mutazioni puntiformi che **alterano la struttura** del prodotto proteico o da alterazioni cromosomiche che portano a **proteine tronche o geni di fusione**.

2. Alterazioni quantitative dovute ad amplificazione dell'espressione genica o a modifiche del controllo trascrizionale.

I prodotti degli oncogeni possono essere classificati in 6 categorie principali:

1. Fattori di crescita.

In particolare PDGF (dimero composto da 2 catene polipeptidiche, alfa e beta, rilasciato dalle piastrine durante la coagulazione che può indurre l'iperproliferazione dei fibroblasti sia per meccanismo paracrino che autocrino, favorendo in tali cellule l'espressione del fattore di crescita e del relativo recettore, WNT (il cui legame al relativo recettore determina la sopravvivenza della beta-catenina che trasloca nel nucleo promuovendo la crescita).

2. Recettori per fattori di crescita.

-RET: definito così perché è stato ritrovato riarrangiato durante la trasfezione in cellule murine di DNA umane (REarranged during Transfection), esiste in tre isoforme, RET9, RET43 e RET51.

Composto da tre domini : extracellulare, con 4 regioni simil-caderina e una ricca di cisterne; una regione idrofobica transmembrana; citoplasmatica ad attività tirosin-chinasica.

Per poter attivare RET i ligandi devono prima formare un complesso col corecettore GFR α (Growth factor receptor α , recettore extracellulare ancorato alla membrana mediante una molecola di glicosil-fosfatidil-inositolo). La formazione del complesso induce dimerizzazione di RET e transfosforilazione dei residui di tiroxina con reclutamento della cascata intracellulare.

Alterazioni di tale oncogene possono riguardare dei riarrangiamenti che avvengono mediante **INVERSIONE cromosomica** del braccio lungo del cromosoma 10 (in cui sono presenti i geni H4 o RFG). In tale inversione si ha la rottura del gene RET tra dominio citoplasmatico e transmembrana, e la fusione con H4 o RFG. Si formano dei geni chimerici **RET/PTC** (PTC sta per *Papillar Thyroid Carcinoma*, di cui sono responsabili; RET/PTC 1 è dato dalla fusione con H4 ed è responsabile della forma classica di PTC, mentre RET/PTC 3 è dato dalla fusione con RFG e causa la variante solida a cellule alte, con maggior potere mitogeno.

L'attività oncogenica dipende dall'attivazione costitutiva dell'attività tirosin-chinasica per dimerizzazione spontanea, senza intervento di ligandi.

Si ritiene che molti riarrangiamenti siano causati da radiazioni ionizzanti, come dimostrato dall'alta incidenza di PTC nelle famiglie esposte alle radiazioni di Chernobyl.

Inoltre, RET può andare incontro a **mutazioni puntiformi**, implicate in alcune sindrome MEN2 che comportano *carcinomi midollari della tiroide*. Le mutazioni possono avvenire sia nel dominio extracellulare, come nelle sindromi MEN2A, associate anche a tumori delle paratiroidi e a feocromocitoma, ed FMTC (se residui di cys sono sostituiti da altri aminoacidi si possono formare ponti intercatenari con dimerizzazione) che in quello intracellulare, come nel caso della sindrome MEN2B (in cui la sostituzione di aminoacidi nel sito catalitico aumenta l'attività tirosin-chinasica).

--C-KIT. Il proto-oncogene è un recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica che è importante nella differenziazione delle cellule staminali dell'emopoiesi. Il suo ligando è CSF, una molecola solubile e dimerica che lega contemporaneamente due recettori inattivi. La dimerizzazione porta ad autofosforilazione dei monomeri attivando i processi di traduzione del segnale mediante la via RAS/MAPK e PI3K/AKT che promuovono la proliferazione e l'apoptosi.

Le alterazioni sono diffuse nelle leucemie e nei tumori stromali gastro-intestinali.

-recettori della famiglia di EGF. Famiglia recettoriale composta da 4 elementi (da HER1 a HER4) proteici transmembrana ad attività tirosin-chinasica intrinseca che sono importanti nel differenziamento, nella proliferazione e nella migrazione cellulare. I ligandi come l'EGF possono causare eterodimerizzazione, conseguente transfosforilazione dei domini tirosinici e innesco delle vie di traduzione che inibiscono l'apoptosi (via PI3K/AKT) e la proliferazione (via MAPK).

Alterazioni recettoriali sono dovute a iperespressione, che favorisce la proliferazione delle cellule tumorali e la diffusione metastatica a causa della produzione di metalloproteinasi che degradano la matrice extracellulare(l'iperespressione di HER2 è associato ad un aumento di metastasi del **carcinoma mammario**).

4. TRASDUTTORI DEL SEGNALE.

Possono essere divisi in 2 grosse classi: protein-chinasi di tipo non recettoriale e proteine leganti GTP. I principali proto-oncogeni di tale classe sono:

-RAS. La famiglia dei geni RAS(che comprende 3 membri: H-Ras e K-Ras, identificati nel sarcoma rispettivamente di Harvey e Kirsten, e N-Ras, identificato nel retinoblastoma) codifica per delle GTPasi che aderiscono alla membrana plasmatica(prima si forma la sequenza CAAX box, la cui cisteina è legata alla membrana del RE tramite un geranyl-geranyl fosfato, dopodiché viene eliminato il tripeptide AAX e la cisteina è mutilata, in modo che possa agganciarsi alla membrana plasmatica; nel caso di H-RAS viene aggiunto anche un residuo di palpitato, mentre k-RAS lega 2 amminoacidi positivi per attrazione elettrostatica).

Essi fungono da mediatori tra i recettori per i fattori di crescita e le proteine attivate a valle, e possono trovarsi in uno stato attivo(legato a GTP) e inattivo(legato a GDP). In questa funzione sono coadiuvate da 4 classi di proteine:

GAP, GTPase Activating Protein, che favorisce l'idrolisi di GTP mantenendo le proteine ras allo stato inattivo.

GIP, GTPase Inhibitory Protein, impedisce idrolisi GTP mantenendo le proteine allo stato attivo.

GNRF, Guanine Nucleotide Releasing Factor, favorisce distacco GDP e legame GTP(favorisce passaggio a stato attivo)

GDF, GDP Dissociation Factor, impedisce distacco di GDP(mantiene stato inattivo).

Quando le cellule ricevono uno stimolo da un fattore di crescita, GRB2 lega con i suoi domini SH3 ricchi di prolina i residui tirosinici fosforilati, e così recluta SOS, uno scambiatore GDP-GTP, che attiva RAS.

RAS attiva la serin-treonina chinasi RAF, che fosforila e attiva MAPKK o MEK, la quale fosforila e attiva MAPK, o ERK, che trasloca nel nucleo. Qui essa attiva diversi fattori coinvolti nella proliferazione cellulare.

Alterazioni nella proteina RAS possono causare un'attivazione costitutiva di tale via, possono essere a livello del sito catalitico(che blocca l'attività GTPasica) o nei siti di legame con GAP, o a livello delle proteine che la regolano(come mutazione del gene NF-1, che codifica per GAP, coinvolta nella **neurofibromatosi 1**).

N.B. Esperimenti su topi transgenici hanno dimostrato che le mutazioni di RAS sono un evento precoce ma non sufficiente nella trasformazione cellulare neoplastica; è

l'alterazione più comune nei proto-oncogeni umani----- (K-RAS associato a tumore pancreas e colon, H-RAS associato a tumore vescica, N-RAS associato a tumori sistema emopoietico.)

-RAF. Questa famiglia (comprendente più geni: A, B, C) è implicata nella trascrizione del segnale mediato da 6 proteine come RAS(come abbiamo visto).

L'isoforma B-RAF è maggiormente coinvolta nella genesi di **nevi** e **melanomi**.

Strutturalmente è composta da 3 domini(CR1 ,che lega RAS; CR2, sito di fosforilazione; CR3, sito catalitico).

Una mutazione che sostituisce una valina con un acido glutammico elimina l'interazione idrofobica che impedisce a B-RAF di legare l'ATP(il quale lo inattiva) con conseguente attivazione costitutiva.

-ABL. Appartiene alla sottoclasse delle tirosin-chinasi non recettoriali, che normalmente agisce come una chinasi nucleare coinvolta in funzioni oncosoppressive del ciclo cellulare(bloccandolo a seguito di danni genotossici).

Frequentemente può andare incontro a una traslocazione reciproca col gene BCR: il punto di rottura di ABL, sul cromosoma 9, è presente a livello del primo introne, mentre quello del gene BCR porta sul cromosoma 22, può esser situato sia nella *major breakpoint cluster region*(in tal caso la traslocazione si associa di più alla **leucemia mieloide cronica**) che nella *minor breakpoint cluster region*(più spesso associato con la **leucemia linfoide acuta**). Il prodotto di tale traslocazione è un gene chimerico **BCR/ABL** che codifica una proteina di fusione in cui l'estremità N-terminale di BCR è sostituita con ABL. Questa, a localizzazione citoplasmatica, può mediare l'espressione di molte vie di segnalazione cellulare, come RAS e JAK-STAT, determinando progressione nel ciclo cellulare, favorendo la trasformazione delle cellule emopoietiche.

Oltre che a formare il **cromosoma philadelphia**(chiamato così per la prima città in cui è stato osservato), in alcuni casi ABL è stato trovato riarrangiato anche con la proteina TEL.

5. FATTORI DI TRASCRIZIONE

Sono proteine a localizzazione nucleare che regolano l'espressione genica legandosi a specifiche sequenze del DNA e formando complessi con altri elementi proteici.

-C-MYC: Il proto-oncogene C-MYC è l'omologo umano di V-MYC(sono stati anche classificati N-myc ed L-myc, coinvolti nella genesi del neuroblastoma e del microcitoma).

Strutturalmente i membri della famiglia MYC sono fattori di trascrizione nucleare che legano il DNA solo in associazione con le proteine MAX.

In seguito a segnali mitogenici come WNT o EGF, la concentrazione di c-myc aumenta, ed essi consentono l'acquisizione dell'attività trascrizionale, con effetti però anche opposti per la presenza di due isoforme di C-MYC: C-MYC1, che favorisce proliferazione e inibisce apoptosi, e C-MYC2, che ha effetti opposti.

Tale proto-oncogene risulta iperespresso nel **linfoma di Burkitt**; l'iperespressione può essere causata da 3 possibili traslocazioni del gene, che si va a porre vicino al promoter o enhancer dei geni delle catene pesanti(8-14), delle catene leggere tipo k(8-2) e tipo lambda(8-22), quando sono costitutivamente espressi dai linfociti B.

In Africa la malaria o le infezioni del virus di Epstein-Barr inducono risposta immunitaria con iperespressione delle regioni delle immunoglobuline nei linfociti B...Durante i processi di riarrangiamento dei geni(durante switch isotipico, ipermutazione somatica o anche maturazione dei linfociti) se i linfociti B presentano il cromosoma philadelphia, ci sarà iperproduzione anche di c-myc e conseguente linfoma. (vedi come fa EBV a indurre stimolazione della proliferazione)

Il proto-oncogene c-myc è coinvolto anche nella leucemia linfoide acuta a cellule T, nella quale si ha traslocazione 8-14 che determina trasferimento del locus che codifica per la catena alfa del TCR dal suo sito originario al cromosoma dove è presente c-myc.

-PML. Codifica per un fattore di trascrizione la cui attività dipende dall'acido retinoico ed è antitumorale: infatti stimola trascrizione del gene p21.

Traslocazioni cromosomiche ne possono causare la fusione con il gene RARA, che codifica un recettore nucleare che lega l'acido retinoico e il DNA con proprietà transattivanti. Il gene chimerico **PML/RARA** produce una proteina aberrante composta da splicing alternativi di PML e porzioni recettoriali di RARA che sono state evidenziate nel 100% di casi di **leucemia promielocitica acuta** e che possono essere usate come dei marker tumore-specifici.

-AML. Un fattore trascrizionale espresso nelle cellule del midollo osseo dove è importante per il differenziamento delle cellule staminali.

Può insorgere una traslocazione con il gene ETO, anch'esso espresso in maniera specifica dalle cellule midollari staminali, con formazione gene chimerico **AML/ETO**. La proteina aberrante conterrà l'intera sequenza di ETO e parte di AML; in particolare sarà assente il dominio di transattivazione.

La trasformazione tumorale e la manifestazione di una **leucemia mieloide acuta** è legata all'effetto dominante negativo esercitato dalla proteina chimerica, che blocca l'espressione di geni importanti per il differenziamento mieloide, come GM-CSF, o all'iperespressione di ETO, che va sotto il controllo trascrizionale del promotore di AML.

5. MODELLATORI DELLA CROMATINA

Le modifiche del grado di compattezza della cromatina sono fondamentali nella regolazione dell'espressione genica e sono mediate da 2 classi di enzimi che agiscono rispettivamente modificando la posizione dei nucleosomi e la porzione N-terminale degli istoni.

Ricordiamo il gene **ALL1**, che fa parte di un complesso multiproteico ampio comprendente fattori coinvolti nella modificazione degli istoni. Esso, in seguito a traslocazione, può formare svariati geni di fusione responsabili di leucemia acuta linfoblastica e leucemia mieloidea cuta.

Importanti le proteine della famiglia **HMGA**(High Mobility Group A) che sono proteine cromatiniche che possono interagire sia con il DNA sia con altre proteine e in particolare fattori di trascrizione, modulando in tal modo l'espressione genica.

La loro espressione è elevata a livello embrionale e si riduce gradualmente sino ad azzerarsi nelle cellule completamente differenziate dell'adulto.

HMGA1 è coinvolto nello sviluppo del tessuto cardiaco e del recettore dell'insulina, HMGA2, nello sviluppo del tessuto adipocitario e della statura.

I geni HMGA sono coinvolti sia in tumori benigni che maligni.

In tumori benigni di origine mesenchimale è frequente la rottura di HMGA2, che perde la porzione del gene sottoposta a inibizione trascrizionale da parte di microRNA silenziatori, ne risulta così una iperespressione della molecola.

L'iperespressione è tipica anche di prolattinomi e adenomi ipofisari.

6. REGOLATORI DELL'APOPTOSI

Molti tumori iperesprimono proteine in grado di garantire l'evasione dall'apoptosi. Tra queste sono importanti le proteine BCL2 che ha funzioni anti-apoptotiche sulla via mitocondriale.

L'apoptosi può essere causata anche per via recettoriale mediante il legame di TNFbeta ai propri recettori che reclutano e attivano le caspasi(vedi BOX sul capitolo delle citochine dell'Abbas per saperne di più).

GENI DELLA FAMIGLIA SONIC HEDGEHOG.

La famiglia Hedgehog comprende tre geni(DHH, Desert HedgeHog; IHH, sta per Indian HedgeHog, e SHH, Sonic HedgeHog), chiamati così perché il gene omologo(hh) fu trovato mutato in un embrione di Drosophila Melanogaster che presentava piccole estroflessioni simili ad aculei.

Dei tre omologhi di hh, SHH è considerato quello con il ruolo più critico nello sviluppo embrionale e nell'organogenesi.

Il suo prodotto è un precursore che dev'essere processato prima di essere secreto: esso perde la sua sequenza segnale al RER, poi si autoprocessa grazie al suo dominio carbossi-terminale, che agisce da inteina(sequenza peptidica in grado di autotagliarsi), infine catalizza l'aggiunta di una molecola di colesterolo e di palmitato.

La trasduzione del segnale è mediata da un recettore di membrana comune (Patched, PTCH). Quando legano il recettore, le proteine hedgehog causano la fine dell'inibizione della proteina Smoothened(SMO), successivamente iperfosforilata. Il tutto termina con l'attivazione dei fattori di trascrizione Gli.

La presenza di mutazioni nei geni della via di trasduzione di SHH durante lo sviluppo embrionale causa vari difetti e malformazioni....durante la vita adulta una mutazione che la colpisce può causare invece proliferazione incontrollata e cancro, dato che SHH controlla l'attività delle cellule staminali adulte.

SHH è coinvolto anche nel processo di angiogenesi dato che è capace di indurre formazione di vasi in cellule endoteliali ed è capace di indurre espressione di angiopoietina I e II e VEGF in cellule mesenchimali.

Si è visto che le "pancreatic cancer stem cells" esprimono alti livelli di SHH. Sue mutazioni sono associate a vari altri tumori...

ONCOSOPPRESSORI

Nel caso degli oncogeni, le mutazioni determinano **un'acquisizione di funzione**, e per questo sono in genere **dominanti**.

Al contrario, le mutazioni inattivanti, con **perdita di funzione** dei geni oncosoppressori possono essere molto eterogenee, e nella maggior parte dei casi, **recessive**.

Esistono due categorie di oncosoppressori:

CARE-TAKER.

Mantengono l'integrità dell'informazione genetica, orchestrando riparo dei danni subiti da DNA. L'alterazione di questi geni è coinvolta in due sindromi tumorali familiari:

-Il **cancro del colon ereditario non poliposico**, detto anche **sindrome di Lynch**, che interessa il colon ascendente e non è preceduta da polipi ateromatosi.

I geni care-taker colpiti sono coinvolti nei meccanismi di riparo dei mismatch, che correggono difetti di replicazione del DNA che possono avvenire in seguito alla replicazione dei microsatelliti(sequenze ripetute di DNA).

Il difetto in tale sistema di riparazione, e in particolare dei geni MSH2 ed MSH5, può causare mutazioni che alterano la funzione di importanti oncogeni e oncosoppressori.

-Il **carcinoma familiare della mammella**. Esso è causato da mutazioni inattivanti nei geni **BRCA1**(localizzato sul cromosoma 17) e **BRCA2**,(localizzato sul cromosoma 13).

Tali geni seguono il modello a 2 hit di Knudson(ne parleremo insieme alla proteina del

retinoblastoma) e sono responsabili del 50% dei casi di carcinoma di tal tipo: tuttavia, un loro silenziamento è coinvolto anche nei carcinomi sporadici.

I prodotti proteici sono coinvolti nel processo di riparazione omologa del DNA (questo usa come riferimento una sequenza di DNA non mutata per riparare quella danneggiata) che interviene per riparare rotture nel doppio filamento. In particolare BRCA2 recluta RAD51, che avvia il processo riparativo, e BRCA1 attiva BRCA2 e altri processi.

Cellule in cui la funzione di questi geni è compromessa, quando c'è una rottura del doppio filamento, saranno riparate con la ricombinazione non omologa, che può causare mutazioni in oncogeni e oncosoppressori, e trasformazione neoplastica.

Nei carcinomi mammari associati a mutazioni di BRCA1 le cellule presentano un fenotipo triplo negativo perché sono negative ai recettori per gli estrogeni, i progestinici e HER2/erb2. Altro carattere differenziale coi carcinomi sporadici è la presenza di mutazioni in p53 (che infatti mappa sullo stesso cromosoma di BRCA1 e per questo mutazioni che causano la perdita di eterozigotità di BRCA1 potrebbero inattivare entrambi i geni).

GATE- KEEPER

Sono geni "custodi" che possono contrastare direttamente l'acquisizione di alcune caratteristiche fenotipiche fondamentali. In base ad esse si possono classificare tali oncosoppressori:

La proteina del retinoblastoma.

Espressa da tumori maligni delle cellule pigmentate della retina ed è stato il primo oncosoppressore identificato.

La p110RB strutturalmente è una proteina nucleare che interagisce con fattori trascrizionali e con enzimi in grado di rimodellare la cromatina.

In particolare legandosi nella forma non fosforilata a E2F/DP1 impedisce la progressione del ciclo cellulare, perché richiama deacetilasi che aumentano il compattamento della cromatina e inibiscono la trascrizione. Se però essa è ipofosforilata dai complessi CDK 4/6-ciclina D, essa si stacca da E2F insieme alla deacetilasi, e la cromatina riassume uno stato più srotolato. In tal modo possono essere trascritti geni per il passaggio alla fase S del ciclo cellulare, tra cui ciclina E e CDK2, i quali permettono il passaggio di pRB alla forma iperfosforilata. Vengono trascritti ancora più geni per l'ulteriore srotolamento dovuto all'allontanamento di pRB. Inoltre, ha un effetto pro-apoptotico, mediato da p53 (vedi dopo).

Alterazioni dei meccanismi regolatori di pRB sono frequenti in numerosi tumori come il retinoblastoma e il microcitoma polmonare.

Esse possono riguardare innanzitutto il locus genico **CDKN2A** che può produrre **p14ARF** (essa stabilizza p53 bloccando l'ubiquitina-ligasi MDM2), oppure **p16INK4A** (che inibisce CDK4-6). Tali mutazioni possono compromettere la funzione di pRB con l'iperattivazione del complesso ciclina D/CDK4-6.

Anche alterazioni della via di segnalazione del **TGFbeta** possono interferire nell'attività di pRB: normalmente il TGFbeta si lega con TGFRI che a sua volta attiva TGFRII dotato di attività tirosin-chinasica. Esso fosforila SMAD2-3 che formano un complesso con SMAD4, e a livello nucleare favoriscono la trascrizione di **p15INK4B**, il quale inibisce l'attività del complesso ciclina D/CDK4-6. Alterazioni di TGFRII o SMAD4 inattivano tale via e indirettamente la funzione di pRB.

Anche **C-MYC** può indurre trasformazione neoplastica favorendo l'espressione del complesso ciclina D/CDK4-6.

Infine, alcune **oncoproteine virali** quali E1A di adenovirus, e Large T di SV40 possono legarsi inibendola la forma ipofosforilata di pRB, mentre E7 di Papillomavirus, ne stimola la degradazione.

Modello dei 2 hit di Knudson.

L'identificazione di pRB come oncosoppressore ha anche contribuito all'elaborazione di questo modello. Knudson, studiando il retinoblastoma, nota che la **forma familiare** (bilaterale, a insorgenza precoce) si manifestava nel corso degli anni con una cinetica compatibile con la probabilità di sviluppare una singola mutazione, mentre la **forma sporadica** (monolaterale e ad insorgenza tardiva) si manifestava con una probabilità compatibile all'accumulo di almeno due mutazioni all'interno della stessa cellula.

Da tale osservazione Knudson postulò che in entrambe le forme la cellula per sviluppare una trasformazione neoplastica necessitava sempre di due mutazioni solo che **nella forma familiare** una mutazione era germinale (presente nelle cellule di tutto il corpo) e l'altra somatica (presente solo nelle cellule colpite), mentre **nella forma sporadica** entrambe le mutazioni erano somatiche.

La probabilità che due mutazioni possano accumularsi in due diversi alleli di uno stesso locus è estremamente bassa anche se può essere aumentata da meccanismi di PERDITA DI ETEROZIGOSITÀ,

in particolare il **crossing-over mitotico** può causare lo scambio di materiale genetico, come il gene mutato RB tra due cromosomi omologhi: la successiva mitosi può generare sia cellule che mantengono l'eterozigotità che cellule che la perdono.

Altro meccanismo è la **conversione genica** in cui, durante la replicazione del DNA, un tratto di cromosoma normale è copiato usando come stampo il cromosoma omologo contenente la mutazione.

Il modello di Knudson spiega sia la trasmissione "dominante" (poiché la presenza di una mutazione favorisce il verificarsi della seconda) sia il legame eziologico delle malattie tumorali familiari con geni oncosoppressori (infatti le malattie legate a geni

oncosoppressori necessitando di 2 mutazioni sono tollerate e silenti a livello embrionale mentre quelle legate a oncogeni si manifesterebbero con una singola mutazione, fin dall'inizio dello sviluppo dunque).

P53

Oncosoppressore localizzato sul cromosoma 17 che codifica un prodotto genico del peso di 53 KDa la cui inattivazione è presente nel 50% dei tumori sporadici dell'uomo, e in alcune sindromi tumorali ereditarie come la **sindrome di Li-Fraumeni**.

Strutturalmente p53 è una fosfoproteina che agisce come fattore di trascrizione e che presenta all'estremità N-terminale 2 domini di transattivazione seguiti da un dominio ricco di proline importante per la stabilizzazione della proteina; poi c'è un dominio di legame al DNA e all'estremità C-terminale uno per la **tetramerizzazione**. Questo spiega l'effetto dominante negativo di p53 che **non segue il modello di Knudson**. Infatti per potersi legare al DNA p53 deve essere espresso in forma tetramericata e quindi una singola mutazione in eterozigoti può impedire il corretto assemblaggio del tetramero.

Tra le principali funzioni di p53, rientra la stimolazione dell'espressione di p21, che può promuovere quiescenza o **senescenza cellulare**, e **l'induzione dell'apoptosi** sia per via intrinseca che estrinseca. La scelta tra quiescenza e apoptosi è influenzata dall'entità del danno al DNA ed è mediata da proteine come MYC, che possono inibire l'espressione di p21 favorendo quella di proteine pro-apoptotiche.

Inoltre, p53 può anche reprimere la trascrizione genica agendo su E2F indirettamente tramite p21 che inibisce i complessi CDK-ciclina, **favorendo l'azione di pRB**.

P53 stimola anche produzione della **proteina SCO2**, un trasportatore del rame necessario al funzionamento della citocromo ossidasi e per la fosforilazione ossidativa.

La regolazione di p53 si esercita soprattutto a livello della sua emivita mediante l'azione della proteina MDM2, indotta da p53 stesso. Essa favorisce la degradazione di p53 mediante ubiquitinazione e mascheramento del dominio transattivante.

A sua volta MDM2 è inibita da p14ARF indotta da E2F, che è inibito da pRB.

N.B. Quindi, quando pRB è inattivato, E2F aumenta tramite p14ARF l'emivita di p53.

L'aumento di p53 intracellulare è causato da danni al DNA, i quali sono percepiti da molecole sensore come ATM, che attiva CHK(Checkpoint Kinase)2, capace di fosforilare p53 in modo da proteggerlo dall'azione di MDM2;

anche agenti oncogeni, a causa dell'eccessiva proliferazione ed espressione di p14ARF, possono portare all'aumento di concentrazione di p53;

infine, stress metabolici e ipossia possono attivare la p53 tramite la chinasi AMPK(vedi via della mTOR).

Alterazioni strutturali dei cromosomi e mutazioni puntiformi che interessano il dominio di legame al DNA impediscono la funzione di p53, e intervengono nelle fasi più avanzate della progressione neoplastica.

Vi sono anche alterazioni però a livello delle proteine regolatrici: ad esempio, l'iperespressione di MDM2 o l'inattivazione di p14ARF facilitano la degradazione di p53, mentre deficit di proteine ATM e CHK2 (nella **sindrome di Li-Fraumeni 2**) ne inibiscono l'attivazione.

Anche oncoproteine virali come E6 di HPV favoriscono il riconoscimento di p53 da parte di MDM2.

APC

L'oncosoppressore è coinvolto sia in sindromi tumorali familiari come la **POLIPOSI FAMILIARE DEL COLON** che in tumori sporadici del colon, del pancreas e dello stomaco. Tale gene è un importante regolatore della via di segnalazione WNT-caderina.

In condizione di riposo le cellule della mucosa del colon sono adese tra loro mediante giunzioni comunicanti formate da **E-caderina** che si associano all'alfa-catenina e all'actina citoscheletrica mediante la **beta-catenina**. Dunque l'E-caderina controlla i livelli di beta-catenina libera nel citosol (mutazioni del suo gene, **CDH1**, possono causare cancro familiare dello stomaco e della mammella).

Questa in condizioni di ridotta stimolazione è rapidamente degradata dall'azione di un complesso proteico in cui è compresa la GSK3beta (Glicogeno Sintetasi Kinasi 3-beta), l'axina e la **proteina APC**, che funge da collante tra le varie subunità. In particolare la GSK3beta fosforila la beta-catenina favorendone l'ubiquitinazione e la successiva degradazione proteasomica.

Quando le cellule sono stimulate dal fattore di crescita WNT, esso lega un recettore detto "Frizzled" associato a LRP6. Ciò induce l'attivazione della proteina dishevelled, che si lega a GSK3beta impedendogli di funzionare nel complesso di degradazione. Di conseguenza, la beta-catenina è stabilizzata. Essa trasloca nel nucleo e attiva il fattore **TCF/LEF**, il quale permette la trascrizione di ciclina D, **MYC**, ed urochinasi.

Inattivazioni del gene APC con produzione di proteine tronche causeranno incontrollata stimolazione proliferativa e trasformazione neoplastica (poliposi familiare del colon).

Alterazioni del gene per l'E-caderina, (**CDH1**) che controlla i livelli di beta-catenina libera nel citosol, possono causare cancro familiare dello stomaco e della mammella.

Un importante ruolo di APC ultimamente è emerso nel controllo della mitosi, e della corretta segregazione dei cromosomi durante l'anafase. Dunque, l'**APC avrebbe anche una funzione care-taker**, nella prevenzione della aneuploidia.

Cancerogenesi multi-step nei tumori del colon

Dagli studi sul cancro del colon ereditario non poliposico e sulla poliposi familiare del colon, è stato scoperto che la trasformazione neoplastica progredisce da un carattere benigno a uno sempre più maligno grazie a una sequenza di mutazioni consecutive in determinati geni con l'inattivazione di specifici pathways. Ovviamente non si tratta di una regola fissa, ma spesso l'evoluzione in carcinoma avviene attraverso questi percorsi.

Per quanto riguarda la POLIPOSIS FAMILIARE DEL COLON:

La mutazione iniziale colpisce APC, poi KRAS (che è un oncogene), SMAD4, e infine mutazioni in P53, con la trasformazione definitiva in carcinoma.

Per quanto riguarda il CANCRO DEL COLON EREDITARIO NON POLIPOSICO:

La mutazione iniziale riguarda l'axina, poi BRAF (che come KRAS determina attivazione della via delle MAPK), poi CDC4 (un oncosoppressore che fa da ubiquitino-ligasi per molte oncoproteine), e infine si osservano mutazioni di BAX, una proteina pro-apoptotica la cui produzione è aumentata da p53.

MENINA.

La menina è il gene responsabile della MEN1, sindrome da Neoplasia Endocrina Multipla, trasmessa con carattere autosomico dominante. Si tratta di un classico oncosoppressore che risponde al modello dei due hit di Knudson.

La proteina codificata è una proteina nucleare che probabilmente agisce come fattore di trascrizione, stimolando l'espressione di **inibitori** del ciclo cellulare, e di **rimodellatori** della cromatina, come un complesso metiltrasferasi che contiene la proteina MLL (Mixed Lineage Leukemia), un gene riarrangiato in leucemie; inoltre **inibisce fattori di trascrizione oncogenici** come JUND e NFkB; è coinvolta nel processo di apoptosi (stimola espressione di caspasi-8); potrebbe avere anche funzioni di **care-taker** nel legare proteine di riparazione del DNA.

Sue mutazioni causano la sindrome MEN1, che predispone allo sviluppo di tumori in pancreas, adenoipofisi e paratiroidi, di adenomi.

Mutazioni di menina sono presenti anche in tumori endocrini sporadici.

PTEN.

PTEN (Phosphatase and tensin homologue) codifica per una fosfatasi a doppia specificità che defosforila sia substrati proteici che PIP3, che è generato da PI3K. In questo modo essa inibisce la via di attivazione di AKT, qui esplicitata:

-PI3K converte il PIP2 in PIP3. --PIP3 lega i domini PH(Pleckstrin Homology) delle chinasi AKT e PDK1. ---PDK1 fosforila AKT, attivandola.

----AKT svolge svariate funzioni:

1. Stimola proliferazione; 2. Stimola sopravvivenza cellulare inducendo trascrizione di MDM2 e inibendo quella di fattori proapoptotici; 3. Stimola sintesi di proteine e ipertrofia cellulare; 4. Attiva una chinasi chiamata **mTOR(mammalian Target Of Rapamicin)**, che è inibita dalla rapamicina, un prodotto di un batterio originario dell'isola Rapa Nui.

Ecco come fa ad attivarla:

AKT va a inibire un fattore GTPasico composto da TSC1 e TSC2. Questo quando è attivo va a inibire la proteina G RHEB, che attiva mTOR. Quindi se TSC1 sono inibiti, RHEB può attivare mTOR!! Questa poi va a formare due complessi proteici, mTOR C1 e C2 ;il primo va a stimolare la **sintesi di ciclina D e di MYC**.

mTOR C1 viene inibito dal prodotto dell'oncosoppressore CDC4.

Le mutazioni di PTEN nei tumori sono spesso monoalleliche, quindi sono **un'eccezione al modello di Knudson!**

La perdita di funzione di esso predispone a un gruppo di malattie definite "**sindromi tumorali amartomatose associate a PTEN**", tra cui la **sindrome di Cowden**, che predispone a carcinoma di tiroide, mammella, cervello, endometrio e polipi amartomatosi del tratto gastro-intestinale.

VHL

Questo gene è responsabile della sindrome di **Von Hippel Lindau** e di carcinomi renali sporadici.

Il prodotto è parte di un complesso ad attività ubiquitino-ligasica per HIFalfa, un fattore di trascrizione che, stimolato da condizioni di ipossia, consente la trascrizione di fattori angiogenici invasivi e di eritropoietina. L'ipossia infatti va a inibire una prolidrossilasi che è necessaria per rendere HIFalfa riconoscibile da VHL.

Inoltre VHL può promuovere degradazione del fattore trascrizionale oncogenico JUNB.

Mutazioni inattivanti VHL causano aumento angiogenesi, invasività neoplastica e metastatizzazione.

MODULATORI NEGATIVI VIE RAS

Essi possono dare origine a **sindromi neuro-cardio-faciali-cutanee**, tra cui è inclusa la **NEUROFIBROMATOSI TIPO I**.

Il gene NF-1 codifica la neurofibronina 1, una potente GAP che aumenta l'attività GTPasica delle proteine G favorendone l'inattivazione.

La perdita di attività di tale *GAP*, che segue il modello a due hit, predispone a una proliferazione cellulare incontrollata alla base dei tumori.

MICRO- RNA

Esistono geni che codificano per miRNA i quali possono bloccare l'espressione di proteine con funzione antioncogenica(**oncomiRNA**), oppure di proteine oncogeniche(in questo caso sono **oncosoppressori**).