

► Capitolo 22

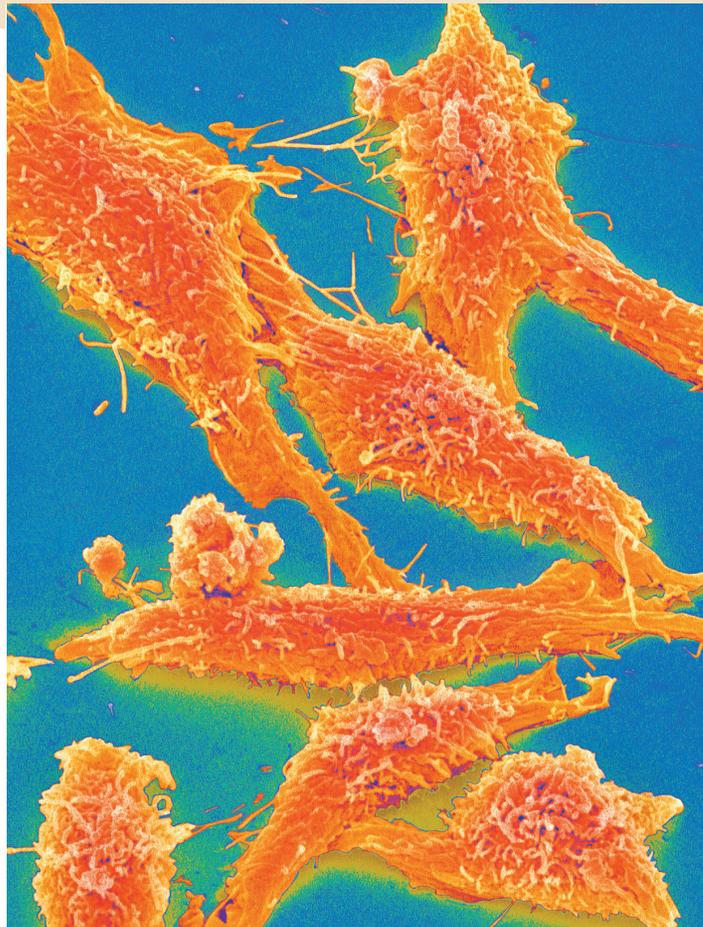
Le basi genetiche del cancro

CONTENUTO DEL CAPITOLO

- **Il cancro: una malattia genetica**
- **Oncogeni**
- **Geni oncosoppressori**
- **Vie genetiche che portano al cancro**

- **La storia molecolare di una famiglia**

Quando Allison Romano cominciò a cercare College e Università voleva trovare una scuola dove avrebbe potuto studiare genetica in maniera approfondita, forse anche intraprendere la carriera di ricercatrice. I suoi progetti erano, in un certo senso, geneticamente motivati. All'età di 12 anni le era stato diagnosticato un tumore in una ghiandola surrenale. Questo tumore era stato rimosso chirurgicamente e, dopo una lunga convalescenza, Allison ritornò sana, felice e motivata a studiare la malattia che l'aveva colpita. Alla scuola superiore i corsi che Allison seguì accentuarono il suo interesse per l'argomento. Ella lesse moltissimo e incontrò numerosi studenti che amavano studiare la biologia. Successivamente apparve un tumore del surrene, non in Allison, ma in suo padre. Il tumore di Louis Romano, della grandezza di una pallina da golf, fu rimosso con successo e Louis si riprese completamente. Dopo questo incidente, l'oncologo ebbe il sospetto che sia Allison sia Louis avessero sviluppato la rara forma di tumore del surrene chiamata feocromocitoma, in quanto portatori di una mutazione del gene *VHL*, localizzato sul braccio corto del cromosoma 3. Alcune ricerche pubblicate avevano infatti dimostrato che mutazioni di questo gene potevano essere talvolta associate a questo tipo di tumore. L'oncologo mandò campioni di DNA di Louis e Allison a un laboratorio di



Fotografia al microscopio elettronico a scansione di una coltura di cellule tumorali del colon.

genetica e il test del DNA mostrò che entrambi erano eterozigoti per una mutazione di un allele *VHL*. Nel gene *VHL*, la coppia di basi CG in posizione 490, era sostituita con AT, causando il cambiamento della glicina con la serina nella posizione 93 della catena polipeptidica codificata. Appena Allison venne a conoscenza di questo risultato, decise di studiare genetica. La sorella maggiore di Allison, che non mostrava segni di feocromocitoma, fece il test, che risultò positivo per l'allele mutato. Il suo medico le consigliò di fare test periodici regolari per poter rivelare gli eventuali segni della patologia. I fra-

telli di Louis Romano, entrambi asintomatici, furono anch'essi informati riguardo alla mutazione *VHL*, ma nessuno dei due volle fare il test. Allison successivamente si laureò in biologia in una importante Università e lavorò per due semestri in un laboratorio di genetica dei tumori. Il suo progetto sull'identificazione dei geni correlati ai tumori nei topi fu presentato come poster al congresso annuale dei laureati di quella Università. Partecipando a questo congresso, suo padre e sua sorella poterono constatare che Allison aveva trovato uno scopo di vita nella storia molecolare della sua famiglia.

► Il cancro: una malattia genetica

Le mutazioni in geni che controllano la crescita e la divisione cellulare sono responsabili del cancro.

I tumori maligni uccidono diverse centinaia di migliaia di americani ogni anno. Quali sono le cause che determinano la formazione di un tumore e quali quelle che determinano la diffusione di alcuni di essi? Perché alcuni tipi di tumore presentano segni di familiarità? La tendenza a sviluppare il cancro è ereditaria? I fattori ambientali contribuiscono allo sviluppo del cancro? Negli ultimi anni, queste e altre domande hanno stimolato un gran numero di ricerche sulle basi biologiche del cancro. Sebbene ancora non siano chiari molti dettagli, la scoperta fondamentale è stata che il cancro deriva da anomalie genetiche. In vari casi, queste anomalie possono essere indotte o accentuate da fattori ambientali come l'alimentazione, l'eccessiva esposizione al sole o a inquinanti chimici. Il cancro insorge in seguito a mutazioni di geni critici che modificano processi biochimici e portano alla proliferazione incontrollata delle cellule. Senza regolazione, le cellule cancerose si dividono continuamente, crescendo l'una sull'altra fino a formare i tumori. Quando le cellule cancerose si allontanano dal tessuto di origine e invadono i tessuti circostanti, il tumore è detto *maligno*. Quando le cellule non invadono i tessuti circostanti, il tumore è detto *benigno*. I tumori maligni possono invadere altre regioni del corpo, formando tumori secondari chiamati **metastasi**, dalla parola greca che significa "cambiamento di stato". Sia nei tumori benigni sia in quelli maligni si è verificato qualche errore nei sistemi di controllo della divisione cellulare. I ricercatori hanno stabilito definitivamente che questa perdita di controllo è dovuta ad anomalie genetiche.

LE MOLTEPLICI FORME DI CANCRO

Il cancro non è una malattia singola, ma piuttosto un insieme di patologie. I tumori si originano in molti tessuti differenti. Alcuni crescono in modo più aggressivo di altri. Alcuni tipi di cancro possono essere fermati con appropriati trattamenti medici, altri no. La **FIGURA 22.1** mostra le frequenze di nuovi

casi di differenti tipi di cancro negli Stati Uniti e il relativo numero di decessi. Il tumore al polmone è il tipo più comune di cancro, in larga misura dovuto al fumo di sigarette. Il tumore alla prostata e quello alla mammella sono anch'essi piuttosto comuni.

I tipi più comuni di tumori derivano da cellule che si dividono attivamente, per esempio dalle cellule epiteliali dell'intestino, del polmone o della ghiandola prostatica. Forme più rare di cancro si sviluppano da popolazioni cellulari che non si dividono, per esempio dalle cellule differenziate dei muscoli o del sistema nervoso.

Nonostante il tasso di mortalità sia ancora elevato, sono stati fatti enormi progressi nell'identificazione e nel trattamento di vari tipi di tumori. Con le tecniche di genetica molecolare gli scienziati sono stati capaci di caratterizzare i tumori con modalità prima impensate e hanno consentito lo sviluppo di nuove strategie per la terapia. Ci sono pochi dubbi che gli enormi investimenti fatti sulla ricerca di base per il cancro stiano dando buoni frutti.

Le cellule cancerose necessarie per gli studi sperimentali si possono ottenere prelevando il tessuto tumorale e disgregandolo. In presenza di sostanze nutritive appropriate, queste cellule tumorali possono essere messe in coltura *in vitro*, a volte per un tempo indefinito. Le cellule cancerose possono anche derivare da cellule normali in coltura trattate con agenti che inducono tumori, quali radiazioni, mutageni chimici e alcuni tipi di virus che trasformano in modo irreversibile le cellule normali in cancerose. Gli agenti che causano questo tipo di trasformazione sono detti **cancerogeni**.

La caratteristica costante di tutte le cellule cancerose consiste nella loro crescita deregolata. Quando le cellule normali sono messe in coltura *in vitro*, formano un singolo strato cellulare (monostrato) sulla superficie del mezzo di coltura. Al contrario, le cellule cancerose crescono l'una sull'altra formando delle masse, in quanto non rispondono ai

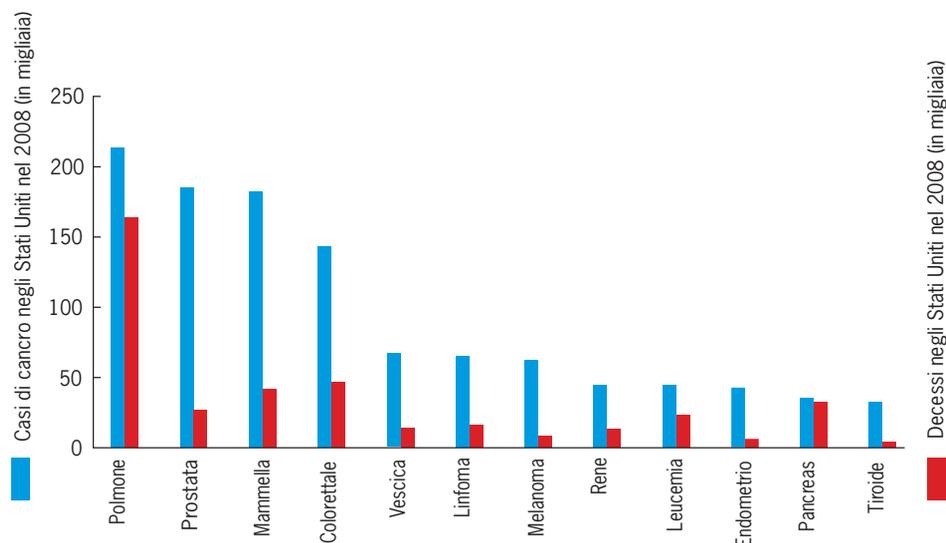


Figura 22.1 ► Numero stimato di nuovi casi e di decessi dovuti a tipi specifici di tumore negli Stati Uniti nel 2008.

segnali chimici che inibiscono la divisione cellulare e non formano associazioni stabili con le cellule vicine.

Le anomalie visibili di una coltura di cellule cancerose sono correlate con le numerose anomalie intracellulari. Le cellule cancerose hanno spesso un citoscheletro disorganizzato, sintetizzano proteine di membrana anomale e hanno frequentemente un numero cromosomico anormale, cioè sono aneuploidi.

CANCRO E CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare è composto da periodi di crescita, di sintesi di DNA e di divisione. La lunghezza del ciclo e la durata di ciascuna fase sono controllate da segnali chimici esterni e interni. La transizione da ciascuna fase del ciclo richiede l'integrazione di segnali chimici specifici e risposte precise a questi segnali. Se i segnali non sono interpretati correttamente o la cellula non è preparata a rispondere, essa può diventare cancerosa.

L'attuale visione del controllo del ciclo cellulare implica che le transizioni tra le diverse fasi del ciclo (G_1 , S, G_2 e M; vedi Capitolo 2) siano regolate da "punti di controllo" (**checkpoint**). Un checkpoint è costituito da un insieme di eventi che bloccano l'avanzamento della cellula nel ciclo fino a quando un processo critico, come per esempio la sintesi del DNA, non sia completato o fin quando il DNA danneggiato non sia riparato. Una volta effettuato il controllo, il ciclo cellulare può riprendere. Due tipi di proteine hanno un ruolo importante nella progressione del ciclo: le *ciclina* e le *chinasi ciclina-dipendenti*, abbreviate spesso come CDK. I complessi formati tra le ciclina e le CDK inducono la progressione del ciclo cellulare.

Le CDK sono le componenti cataliticamente attive del ciclo cellulare. Queste proteine regolano le attività di altre proteine, trasferendo loro gruppi fosfato. Tuttavia, l'attività fosforilativa delle CDK dipende dalla presenza delle ciclina, che rendono le CDK capaci di svolgere la loro funzione formando complessi ciclina-CDK. Quando le ciclina sono assenti, questi complessi non si possono formare e le CDK sono inattive. L'avanzamento del ciclo cellulare richiede quindi la formazione e la degradazione alternate dei complessi ciclina-CDK.

Uno dei più importanti punti di controllo del ciclo cellulare, detto *START*, si trova alla metà della fase G_1 (FIGURA 22.2). In questo punto, la cellula riceve segnali esterni e interni per stabilire quando è opportuno avanzare nella fase S. Lo *START* è regolato dalle ciclina di tipo D unite alla CDK4. Se la cellula supera il punto di controllo *START* a opera del complesso ciclina D-CDK4, viene irreversibilmente programmata per un altro ciclo di replicazione del DNA. Proteine inibitorie con la capacità di percepire problemi nella fase G_1 tardiva, come livelli bassi di nutrienti o danni al DNA, possono frenare il complesso ciclina-CDK e impedire che la cellula entri nella fase S. In assenza di questi problemi, il complesso ciclina D-CDK4 guida la cellula verso la fine della fase G_1 e verso la fase S, dando inizio alla replicazione del DNA che prelude alla divisione cellulare.

Nelle cellule tumorali, i punti di controllo del ciclo cellulare sono spesso deregolati a causa di difetti genetici nel macchinario che innalza e abbassa i livelli dei complessi ciclina-CDK in modo alternato. Possono essere mutati, per esempio, i geni che codificano le ciclina o le CDK, oppure i geni che codifica-

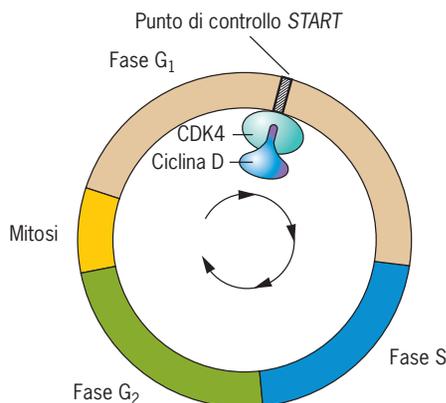


Figura 22.2 ▶ Visione schematica del punto di controllo *START* nel ciclo cellulare di mammifero. Il passaggio attraverso il punto di controllo dipende dall'attività del complesso ciclina D-CDK4.

no le proteine che rispondono a uno specifico complesso ciclina-CDK o che regolano la quantità di questi complessi. Numerosi tipi di difetti genetici possono deregolare il ciclo cellulare e hanno come conseguenza finale la trasformazione della cellula normale in cellula cancerosa.

Le cellule nelle quali non funziona il punto di controllo *START* sono particolarmente predisposte alla trasformazione tumorale. Il punto di controllo *START* sorveglia l'ingresso nella fase S del ciclo cellulare. Se il DNA di una cellula è stato danneggiato, è importante che l'ingresso nella fase S sia ritardato, per consentire la sua riparazione. Altrimenti il DNA danneggiato verrebbe replicato e trasmesso a tutta la discendenza cellulare. Le cellule normali sono programmate per fermarsi nel punto di controllo *START* e consentire il completamento della riparazione prima dell'inizio della replicazione del DNA. Al contrario, le cellule nelle quali il punto di controllo *START* non è funzionale entrano in fase S senza aver riparato il DNA danneggiato. Dopo una serie di cicli cellulari, si accumulano mutazioni derivanti dalla replicazione del DNA non riparato che possono causare un'ulteriore deregolazione del ciclo cellulare. Un clone di cellule con il punto di controllo *START* non funzionale può, quindi, diventare aggressivamente canceroso.

CANCRO E MORTE CELLULARE PROGRAMMATA

Ogni tipo di cancro è caratterizzato dall'accumulo di cellule non desiderate. In molti animali, le cellule superflue possono essere eliminate mediante processi programmati al loro interno. La morte cellulare programmata fu originariamente descritta in *Caenorhabditis elegans*. Questo piccolo verme cilindrico perde, durante il suo sviluppo a partire da un uovo fecondato che prevede circa 10 cicli di divisioni cellulari, alcune delle cellule. Le analisi genetiche di Robert Horvitz e colleghi dimostrarono che la perdita di queste cellule non si verifica in determinati ceppi mutanti di *C. elegans*. La morte cellulare, quindi, è parte del normale programma di sviluppo di questo e anche di altri animali. Per esempio, durante la formazione delle estremità degli arti di molti vertebrati, le cellule localizzate tra le dita durante lo sviluppo devono mo-

rire, altrimenti le dita rimarrebbero fuse. La morte cellulare programmata è quindi un fenomeno fondamentale e ampiamente diffuso. Senza di essa, la formazione e la funzione degli organi sarebbero alterate a causa di cellule che semplicemente si accumulerebbero tra essi.

La morte cellulare programmata è anche importante nel prevenire l'insorgenza del cancro. Se una cellula con una capacità anomala di replicarsi viene uccisa, essa non può più moltiplicarsi per formare un tumore potenzialmente pericoloso. Quindi, la morte cellulare programmata è un importante controllo per le cellule anomale che altrimenti prolifererebbero in modo sregolato nell'organismo.

La morte cellulare programmata è chiamata **apoptosi**, dalla radice greca che significa "cadere lontano". Gli eventi che inducono la morte cellulare sono stati compresi solo parzialmente; tratteremo alcuni di essi più avanti in questo capitolo. I concreti eventi di "uccisione", tuttavia, sono conosciuti abbastanza in dettaglio. Una famiglia di enzimi proteolitici, chiamati *caspasi*, gioca un ruolo cruciale nel fenomeno di morte cellulare. Le caspasi eliminano piccole parti di altre proteine per idrolisi dei legami peptidici. A causa di questo taglio enzimatico le proteine bersaglio vengono inattivate. Le caspasi inattivano molti tipi di proteine, quali le lamine, che costituiscono il rivestimento interno dell'involucro nucleare, e varie strutture del citoscheletro. L'impatto globale di questo taglio proteolitico produce una perdita dell'integrità delle cellule; la cromatina viene frammentata, si formano bolle di citoplasma sulla superficie e la cellula inizia a raggrinzirsi. Le cellule che vanno incontro a questo tipo di disgregazione sono di solito inglobate dai fagociti, gli spazzini del sistema immunitario, e poi distrutte. Se il meccanismo apoptotico non funziona bene o è inattivo, la cellula, destinata a morire, potrebbe sopravvivere e proliferare. Questa cellula ha la potenzialità di formare un clone che potrebbe divenire canceroso se acquisisse la capacità di dividersi in modo non controllato.

LE BASI GENETICHE DEL CANCRO

L'attuale comprensione dei meccanismi alla base del cancro deriva dalle applicazioni delle tecniche di genetica molecolare. Anche prima che esse fossero a disposizione dei ricercatori, vi erano tuttavia convincenti evidenze che la causa scatenante del cancro fosse di origine genetica. Innanzitutto, era noto che la trasformazione cancerosa delle cellule venisse ereditata in maniera clonale: le cellule tumorali in coltura danno origine solamente a cellule tumorali. La condizione tumorale è quindi trasmessa da ciascuna cellula alle cellule figlie al momento della divisione, indicando che il cancro ha

una base genetica. In secondo luogo, era noto che alcuni tipi di virus potessero indurre la formazione di tumori negli animali da laboratorio. L'induzione del cancro da parte dei virus indica che le proteine codificate dai geni virali sono coinvolte nella determinazione del tumore. In terzo luogo, era noto che il cancro venisse indotto da agenti in grado di produrre mutazioni. È dimostrato che i mutageni chimici e le radiazioni ionizzanti possono indurre tumori in animali da laboratorio. I dati epidemiologici, inoltre, hanno indicato che questi agenti sono la causa dei tumori nell'uomo. Come quarto e ultimo punto di questa lista sintetica, era noto che alcuni tipi di cancro tendono a manifestarsi con maggiore frequenza in determinate famiglie. In particolare, la suscettibilità al retinoblastoma, un raro cancro dell'occhio, e la suscettibilità ad alcune forme di cancro del colon sembravano essere ereditate come semplici caratteri dominanti, anche se con penetranza incompleta ed espressività variabile. Poiché la suscettibilità a questi tipi di cancro è ereditabile, sembrava plausibile che tutti i tipi di cancro potessero essere determinati da difetti genetici: o da mutazioni ereditarie o da mutazioni somatiche acquisite durante la vita dell'individuo. Infine, era noto che alcuni tipi di cancro dei globuli bianchi (leucemie e linfomi) fossero associati a particolari aberrazioni cromosomiche. L'insieme di queste diverse osservazioni suggeriva fortemente che il cancro fosse dovuto a mutazioni genetiche.

Negli anni '80, quando le tecniche di genetica molecolare vennero utilizzate per la prima volta per studiare le cellule tumorali, i ricercatori scoprirono che la trasformazione cancerosa è effettivamente imputabile a difetti genetici specifici. Tuttavia, non uno, ma numerosi difetti sono necessari per trasformare una cellula normale in cancerosa. I ricercatori hanno identificato due classi di geni che, se mutati, possono contribuire allo sviluppo di un tumore. In una di queste classi, i geni mutati promuovono attivamente la divisione cellulare; nell'altra classe, i geni mutati non sono in grado di reprimerla. I geni mutati della prima classe sono detti **oncogeni**, dalla parola greca che significa "tumore", quelli della seconda classe sono detti **geni oncosoppressori**. Nei paragrafi seguenti discuteremo la scoperta, le caratteristiche e il significato di ciascuna classe di geni correlati al cancro.

PUNTI CHIAVE

- Il cancro è un gruppo di patologie nelle quali la crescita e la divisione cellulare non sono opportunamente regolate.
- I tumori possono svilupparsi se il meccanismo della morte cellulare programmata (apoptosi) è danneggiato.
- Il cancro è causato dalle mutazioni dei geni che codificano proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare.

► Oncogeni

In molti tipi di cancro si verifica una iperespressione di alcuni tipi di geni o un'attività anomala dei loro prodotti proteici mutati.

Gli oncogeni comprendono un gruppo eterogeneo di geni che codificano proteine che svolgono un ruolo importante nella regolazione delle attività biochimiche cellulari,

includendo quelle collegate alla divisione cellulare. Questi geni sono stati scoperti per la prima volta nel genoma di virus a RNA in grado di indurre tumori nei vertebrati. In seguito, in

numerosi organismi, dalla *Drosophila* all'uomo, è stata scoperta la controparte cellulare di questi oncogeni virali.

RETROVIRUS CHE INDUCONO TUMORI E ONCOGENI VIRALI

Gli studi fondamentali sulle basi genetiche del cancro derivano dalle conoscenze sui virus che inducono tumori. Molti di questi virus hanno un genoma costituito da RNA e non da DNA. Dopo che ha infettato la cellula, l'RNA virale viene usato come stampo per sintetizzare il DNA complementare, che viene poi inserito in una o più posizioni nel cromosoma della cellula. La sintesi di DNA a partire da RNA è catalizzata da un enzima virale, la trascrittasi inversa. Questa inversione del normale flusso di informazione genetica da DNA a RNA ha suggerito ai biologi di chiamare questi virus patogeni **retrovirus** (vedi Capitolo 18).

Il primo virus induttore di tumore fu scoperto nel 1910 da Peyton Rous; esso causa uno speciale tipo di tumore, detto sarcoma, nel tessuto connettivo dei polli, da cui il nome di virus del sarcoma di Rous. Ricerche più recenti hanno dimostrato che il genoma a RNA di questo retrovirus contiene 4 geni: *gag*, che codifica la proteina del capsido del virione; *pol*, che codifica la trascrittasi inversa; *env*, che codifica una proteina del rivestimento virale; *v-src*, che codifica una proteina chinasi che si inserisce nelle membrane plasmatiche delle cellule infettate. La caratteristica distintiva di una chinasi è che essa può fosforilare altre proteine. Di questi quattro geni, solo il gene *v-src* è responsabile della capacità del virus di indurre tumori. Infatti, un virus nel quale il gene *v-src* è deletato risulta infettivo, ma incapace di indurre la for-

mazione di tumori. I geni che, come *v-src*, causano il cancro sono chiamati oncogeni.

Studi su altri retrovirus che inducono tumori hanno portato all'identificazione di almeno 20 differenti oncogeni virali, di solito chiamati *v-onc* (TABELLA 22.1). Alcuni di questi sono correlati a geni che codificano fattori di crescita. Per esempio, *v-sis*, un oncogene del virus del sarcoma di scimmia, codifica il fattore di crescita di derivazione piastrinica (*platelet-derived growth factor*, PDGF). Il PDGF è normalmente prodotto dalle piastrine per promuovere la cicatrizzazione delle ferite; esso esercita questa funzione stimolando la crescita delle cellule in quel punto. I virus del sarcoma di scimmia che contengono il gene *v-sis* inducono tumori in tali animali. Essi sono anche in grado di trasformare le cellule in coltura da normali a cancerose, presumibilmente producendo grandi quantità della versione *v-sis* del PDGF, che quindi causa crescita cellulare non controllata.

Altri oncogeni virali codificano proteine simili a recettori dei fattori di crescita e degli ormoni. Per esempio, il gene *v-erbB* del virus dell'eritroblastosi aviaria codifica una proteina molto simile al recettore cellulare del fattore di crescita epidermico (EGF), e il gene *v-fms* del virus del sarcoma felino codifica una proteina molto simile al recettore del fattore di crescita cellulare CSF-1 (*colony-stimulating factor 1*). Entrambi questi recettori di fattori di crescita sono proteine transmembrana con un dominio di legame per il fattore di crescita all'esterno della cellula e un dominio protein chinasi verso l'interno che permette la fosforilazione di altre proteine, di solito a livello dell'aminoacido tirosina.

Molti oncogeni virali, incluso *v-src*, codificano tirosin chi-

► TABELLA 22.1

Oncogeni retrovirali

Oncogene	Virus	Specie ospite	Funzione del prodotto genico
<i>abl</i>	Virus della leucemia murina di Abelson	Topo	Protein chinasi tirosina-specifica
<i>erbA</i>	Virus della eritroblastosi aviaria	Pollo	Analogo del recettore dell'ormone tiroideo
<i>erbB</i>	Virus della eritroblastosi aviaria	Pollo	Versione tronca del recettore dell'EGF
<i>fes</i>	Virus del sarcoma felino ST	Gatto	Protein chinasi tirosina-specifica
<i>fgr</i>	Virus del sarcoma felino di Gardner-Rasheed	Gatto	Protein chinasi tirosina-specifica
<i>fms</i>	Virus del sarcoma felino di McDonough	Gatto	Analogo del recettore del CSF-1
<i>fos</i>	Virus dell'osteosarcoma FJB	Topo	Attivatore trascrizionale
<i>fps</i>	Virus del sarcoma di Fuginami	Pollo	Protein chinasi tirosina-specifica
<i>jun</i>	Virus 17 del sarcoma aviario	Pollo	Attivatore trascrizionale
<i>mil (mbt)</i>	Virus MH2	Pollo	Protein chinasi serina/treonina
<i>mos</i>	Virus del sarcoma di Moloney	Topo	Protein chinasi serina/treonina
<i>myb</i>	Virus della mieloblastosi aviaria	Pollo	Fattore di trascrizione
<i>myc</i>	Virus della mielocitomatosi MC29	Pollo	Fattore di trascrizione
<i>raf</i>	Virus del sarcoma murino 3611	Topo	Protein chinasi serina/treonina
<i>H-ras</i>	Virus del sarcoma murino di Harvey	Ratto	Proteina che lega il GTP
<i>K-ras</i>	Virus del sarcoma murino di Kirsten	Ratto	Proteina che lega il GTP
<i>rel</i>	Virus della reticoloendoteliosi	Tacchino	Fattore di trascrizione
<i>ros</i>	Virus del sarcoma aviario UR11	Pollo	Protein chinasi tirosina-specifica
<i>sis</i>	Virus del sarcoma di scimmia	Scimmia	Analogo del PDGF
<i>src</i>	Virus del sarcoma di Rous	Pollo	Protein chinasi tirosina-specifica
<i>yes</i>	Virus del sarcoma Y73	Pollo	Protein chinasi tirosina-specifica

nasi che non attraversano la membrana plasmatica ma sono localizzate sul lato interno della membrana, dove eseguono le loro funzioni di fosforilazione. I vari oncogeni *v-ras* codificano proteine che legano il GTP, in modo molto simile alle proteine cellulari G, che rivestono un importante ruolo nella regolazione dei livelli di AMP ciclico.

Un altro gruppo di oncogeni virali codifica proteine che hanno la funzione di fattori di trascrizione. Essi comprendono i geni *v-jun*, *v-fos* e *v-myc*, ognuno presente in un retrovirus diverso. Le proteine codificate sono omologhe a proteine cellulari che si legano al DNA e ne regolano la trascrizione.

Ogni tipo di oncogene virale codifica una proteina che potrebbe teoricamente svolgere un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione dei geni cellulari, inclusi quelli coinvolti nei processi di crescita e divisione. Alcune di queste proteine agiscono da segnali nella stimolazione di specifiche attività cellulari, altre agiscono da recettori del segnale sulla membrana o sono coinvolte nel trasporto intracellulare del segnale dalla membrana plasmatica al nucleo; altre proteine virali agiscono come fattori di trascrizione per stimolare l'espressione genica.

OMOLOGHI CELLULARI DEGLI ONCOGENI VIRALI: I PROTO-ONCOGENI

Le proteine codificate dagli oncogeni virali sono simili a proteine cellulari che hanno importanti funzioni regolative.

Molte di queste proteine cellulari sono state, in realtà, identificate isolando i geni cellulari omologhi a quelli virali. Per esempio, l'omologo cellulare del gene *v-src* è stato isolato analizzando una libreria di DNA genomico ottenuta da cellule di pollo non infettate. Per identificare i cloni di DNA ricombinante è stato utilizzato il gene *v-src* come sonda molecolare. Dall'analisi è stato possibile stabilire che le cellule di pollo contenevano un gene molto simile a *v-src*, che è quindi un gene conservato nel corso dell'evoluzione. Questo gene differiva dal gene *v-src* per una importante caratteristica: conteneva introni (FIGURA 22.3). Infatti, il gene virale *v-src* è totalmente privo di introni, mentre nel suo omologo, nelle cellule di pollo, sono presenti 11 introni. Questa sorprendente scoperta suggerì che forse *v-src* si era evoluto da un normale gene cellulare e che contemporaneamente avesse perso i suoi introni.

Gli omologhi cellulari degli oncogeni virali sono chiamati **proto-oncogeni** o, talvolta, *oncogeni cellulari normali*, detti *c-onc*. L'omologo cellulare di *v-src* è quindi *c-src*. Le sequenze codificanti di questi due geni sono molto simili e differiscono solamente per 18 nucleotidi; *v-src* e *c-src* codificano proteine di 526 e 533 aminoacidi, rispettivamente. Usando i geni *v-onc* come sonde, sono stati isolati altri geni *c-onc* da molti organismi diversi, compreso l'uomo. Di regola, questi oncogeni cellulari mostrano una struttura notevolmente conservata. Per esempio, alcuni geni di *Drosophila* hanno

Diagramma del DNA eteroduplex di *v-src* e *c-src*

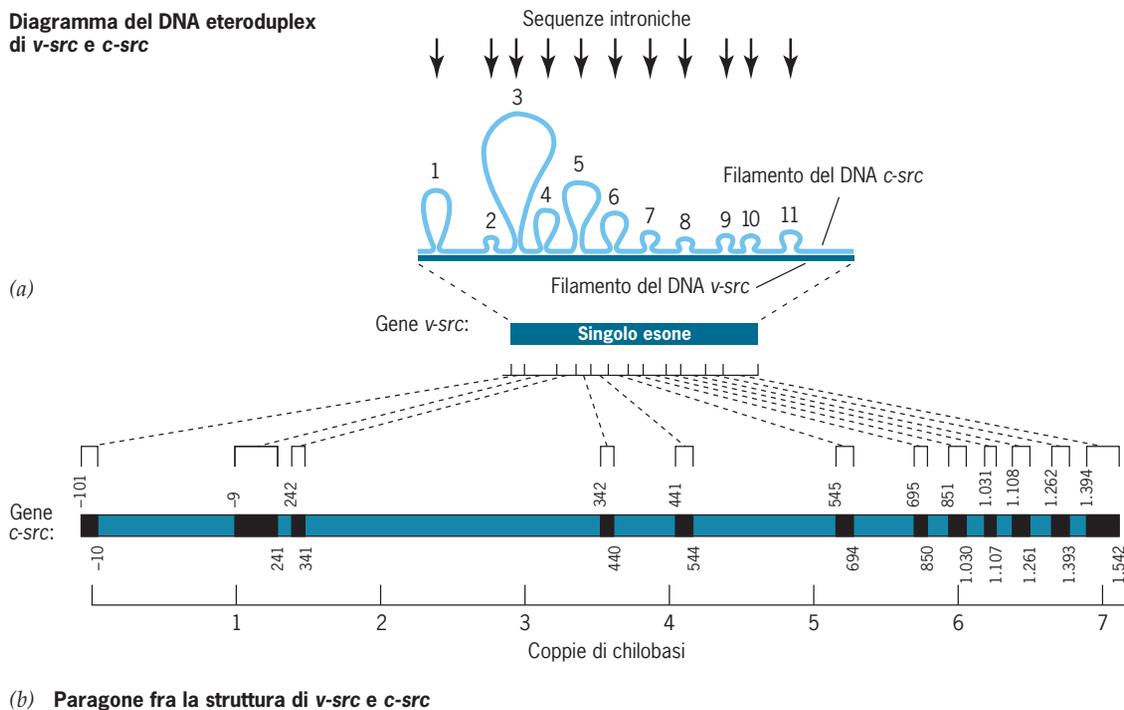


Figura 22.3 ► Struttura dei geni *v-src* e *c-src*. (a) Schema dell'ipotetico eteroduplex formato dall'ibridazione di un filamento del gene *c-src* (in alto) e un filamento parzialmente complementare del gene *v-src* (in basso). Gli introni (numerati da 1 a 11) formano anse a singolo filamento. (b) Paragone schematico di questi due geni, con gli esoni indicati in nero. Il sistema di coordinate per gli esoni del gene *c-src* è basato sul primo nucleotide della sequenza codificante (posizione 1). Il primo esone (posizione da -101 a -10) si trova nella sequenza leader al 5' del gene.

omologia con gli oncogeni cellulari dei vertebrati *c-abl*, *c-erbB*, *c-fps*, *c-raf*, *c-ras* e *c-myb*. L'omologia degli oncogeni presenti in specie diverse suggerisce fortemente che le proteine che essi codificano siano coinvolte in importanti funzioni cellulari.

Ma perché nei geni *c-onc* sono presenti gli introni, mentre i *v-onc* non li hanno? La risposta più plausibile è che i *v-onc* potrebbero derivare dall'inserzione di un RNA di *c-onc* maturo nel genoma di un retrovirus. Un virione che contiene questa molecola ricombinante sarebbe quindi in grado di trasdurre il gene *c-onc* ogni volta che infetta un'altra cellula. Durante l'infezione, l'RNA ricombinante verrebbe retroscritto in DNA e successivamente integrato nei cromosomi della cellula. Che cosa vi è di meglio, per un virus, che acquisire un nuovo gene che stimola la crescita del suo ospite mentre il suo genoma è integrato e pronto per la replicazione?

In molti casi, l'acquisizione di un oncogene da parte di un retrovirus è accompagnata dalla perdita di parte del DNA virale. Dato che questo DNA perso è necessario per la replicazione, i virus oncogeni sono in grado di riprodursi solo se è presente un virus helper (aiutante). Per tale ragione, essi ricordano i batteriofagi trasducenti difettivi che abbiamo descritto nel Capitolo 8.

Perché i *v-onc*, a differenza dei *c-onc*, inducono tumori? In alcuni casi, sembra che gli oncogeni virali producano molta più proteina dei loro corrispondenti cellulari, forse perché sono trascrizionalmente attivati da enhancer presenti nel genoma virale. Nelle cellule tumorali di pollo, per esempio, il gene *v-src* produce 100 volte più tirosin chinasi del gene *c-src*. Questa sovrapproduzione della chinasi evidentemente sconvolge i delicati meccanismi segnalatori che controllano la divisione cellulare, determinando una crescita incontrollata. Altri geni *v-onc* possono indurre tumori esprimendo le loro proteine in momenti inappropriati o esprimendo forme alterate, cioè mutanti, di queste proteine.

ONCOGENI CELLULARI MUTANTI E CANCRO

I prodotti dei geni *c-onc* svolgono ruoli chiave nel regolare le attività cellulari. Una mutazione in uno di questi geni potrebbe pertanto alterare drammaticamente la regolazione e causare la proliferazione neoplastica. Studi riguardanti molti tipi di cancro umano hanno dimostrato che mutazioni degli oncogeni cellulari sono associate, infatti, con lo sviluppo dello stato canceroso.

La prima evidenza che collegava lo sviluppo del cancro a un *c-onc* mutato è derivata dallo studio del tumore alla vescica dell'uomo. La mutazione responsabile di questo tumore della vescica fu identificata da Robert Weinberg e colleghi con un esperimento di trasfezione (FIGURA 22.4). Il DNA estratto dal tessuto canceroso fu frammentato; ognuno di questi piccoli frammenti fu unito a un segmento di DNA batterico con funzione di marcatore molecolare. I frammenti di DNA marcati furono poi introdotti, o trasfettati, in cellule in coltura, per verificare se qualcuno di essi potesse trasformare le cellule normali in cancerose. Le cellule tumorali trasformate sono riconoscibili dalla loro capacità di formare

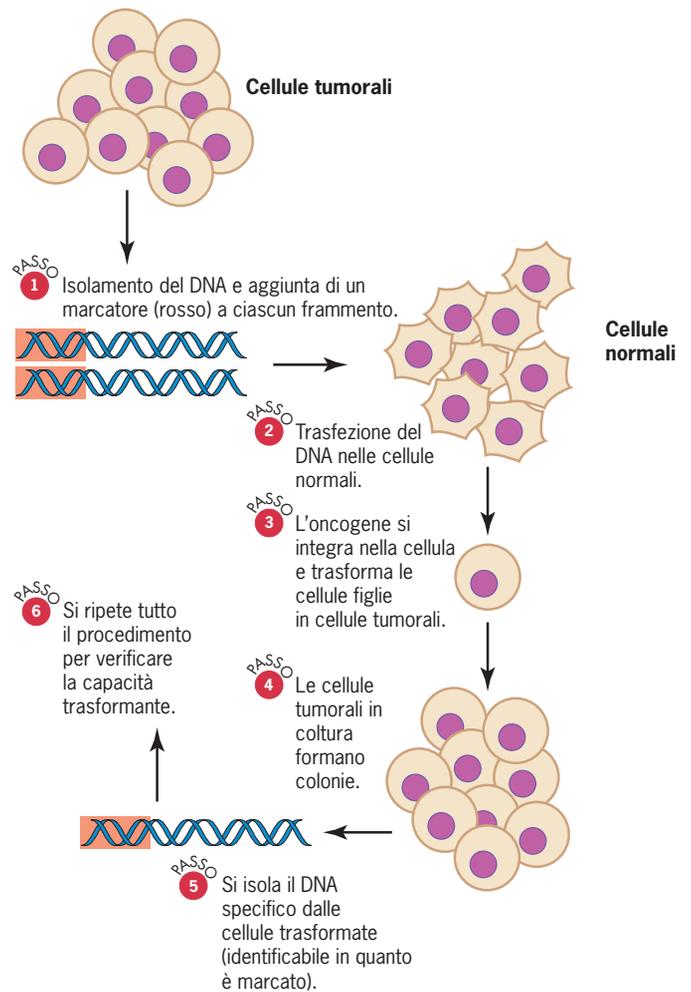


Figura 22.4 ▶ Il test di trasfezione per identificare sequenze di DNA in grado di trasformare cellule normali in cancerose.

piccoli gruppi, o foci, quando sono poste in coltura in piastre di agar semisolido. Il DNA di queste cellule fu estratto e analizzato per identificare l'eventuale presenza del marcatore molecolare. Il DNA positivo a questa analisi fu nuovamente analizzato per la sua capacità di indurre lo stato canceroso. Dopo parecchi esperimenti di verifica delle proprietà trasformanti dei vari frammenti di DNA, il gruppo di ricerca di Weinberg identificò un frammento di DNA proveniente dall'originario tessuto canceroso che trasformava in modo riproducibile le cellule in coltura da normali a tumorali. Questo frammento conteneva un allele dell'oncogene *c-H-ras*, un omologo dell'oncogene presente nel ceppo Harvey del virus del sarcoma murino. L'analisi della sequenza di DNA mostrò successivamente che una mutazione nel codone 12 di questo allele determinava la sostituzione della glicina con la valina nella proteina c-H-Ras.

I genetisti, oggi, hanno compreso in che modo la mutazione induca le cellule a divenire cancerose. L'allele mutato *c-H-ras* non determina una quantità anomala di proteina, come nel caso di altri oncogeni virali. La sostituzione della

glicina in posizione 12 con la valina altera invece la capacità della proteina c-H-ras di idrolizzare uno dei suoi substrati, la guanosina trifosfato (GTP). Per questo motivo, la proteina segnale mutata rimane in uno stato sempre attivo, e in definitiva trasmette un'informazione che stimola le cellule a dividersi in modo incontrollato (FIGURA 22.5).

Fino a oggi sono state trovate mutazioni degli oncogeni *c-ras* in un gran numero di differenti tumori umani, come quelli del polmone, del colon, della mammella, della prostata, della vescica, e anche nei neuroblastomi (tumori delle

cellule nervose), nei fibrosarcomi (tumori dei tessuti connettivi) e nei teratocarcinomi (tumori che contengono differenti tipi di cellule embrionali). In tutti questi casi, le mutazioni coinvolgono cambiamenti aminoacidici della proteina in una delle tre seguenti posizioni: 12, 59 o 61. Ognuno di questi cambiamenti altera la capacità della proteina Ras di “spegnere” il suo stato attivo di segnalazione. Tutte queste mutazioni stimolano, quindi, le cellule a crescere e a dividersi.

In questo tipo di tumori, solo una delle due copie del gene *c-ras* è mutata. L'allele mutato è dominante nella sua

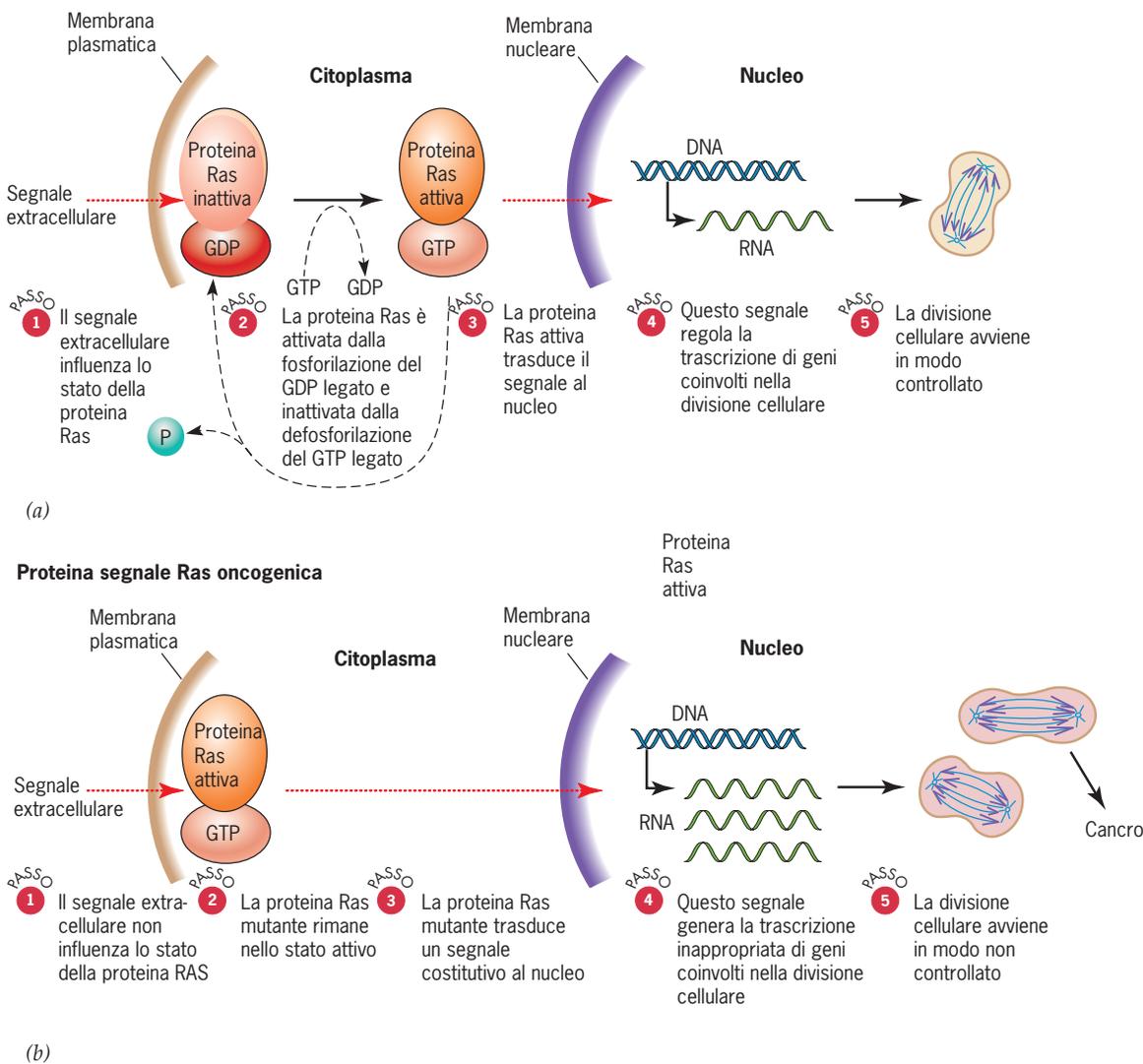


Figura 22.5 ► La proteina segnale Ras e il cancro. (a) Il normale prodotto del gene si alterna tra uno stato inattivo e uno attivo, in dipendenza del suo legame al GDP o al GTP, rispettivamente. I segnali extracellulari, come i fattori di crescita, stimolano la conversione della proteina Ras da inattiva ad attiva. Mediante Ras attiva, questi segnali sono trasmessi ad altre proteine e quindi al nucleo, dove inducono l'espressione di geni coinvolti nella divisione cellulare. Poiché questi segnali sono intermittenti e regolati, la divisione cellulare avviene in maniera controllata. (b) Le proteine Ras mutate sono principalmente nella forma attiva. Queste proteine trasmettono i loro segnali in modo più o meno costante, determinando una divisione cellulare non controllata, segno distintivo del cancro.

capacità di indurre uno stato canceroso. Mutazioni di *c-ras* e di altri oncogeni cellulari che determinano il cancro in questo modo sono pertanto *attivatori dominanti* di crescita cellulare incontrollata.

Questo tipo di mutazioni sono ereditate raramente attraverso la linea germinale; la maggior parte di esse avviene invece spontaneamente nelle cellule somatiche, nel corso delle divisioni cellulari. Poiché il numero delle divisioni cellulari durante la vita umana è molto elevato (più di 10^{16}), potrebbero avvenire migliaia di mutazioni potenzialmente oncogeniche; se ciascuna funzionasse come attivatore dominante della crescita cellulare incontrollata, lo sviluppo di un tumore sarebbe inevitabile. Tuttavia, molte persone vivono a lungo senza sviluppare tumori. La spiegazione di questo paradosso è che la mutazione di un singolo oncogene è, di per sé, raramente capace di indurre uno stato canceroso. Tuttavia, quando numerosi geni differenti che regolano la crescita sono alterati, la cellula non può compensare i loro effetti separati, la sua crescita diventa deregolata e si sviluppa il cancro. In molti tumori, almeno una di queste mutazioni dannose avviene in un oncogene cellulare. Quindi, questo gruppo di geni svolge un ruolo importante nell'eziologia del cancro nell'uomo.

RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI E CANCRO

Alcuni tipi di cancro nell'uomo sono associati con riarrangiamenti cromosomici. Per esempio, la leucemia mieloide cronica (*chronic myelogenous leukemia*, CML) negli esseri umani è associata con un'aberrazione del cromosoma 22. Questo cromosoma anomalo fu originariamente scoperto nella città di Philadelphia e fu, quindi, chiamato *cromosoma Philadelphia*. Inizialmente, si ritenne che l'anomalia fosse una semplice delezione del braccio lungo; invece, successive analisi molecolari rivelarono che il cromosoma Philadelphia era, in realtà, il risultato di una traslocazione reciproca tra i cromosomi 22 e 9. (Per una descrizione delle traslocazioni, vedi il Capitolo 6.) In questa traslocazione, l'estremità del braccio lungo del cromosoma 9 è unita al cromosoma 22 e la porzione distale del braccio lungo del cromosoma 22 al cromosoma 9 (FIGURA 22.6). Il punto di rottura della traslocazione sul cromosoma 9 corrisponde all'oncogene *c-abl*, che codifica una tirosin chinasi, mentre quello sul cromosoma 22 a un gene chiamato *bcr*. A causa della traslocazione, i geni *bcr* e *c-abl* vengono fisicamente uniti, creando un gene di fusione il cui prodotto polipeptidico presenta l'estremità ammino-terminale della proteina Bcr e l'estremità carbossi-terminale della proteina Abl. Sebbene non si sappia precisamente il motivo, questo polipeptide di fusione induce i leucociti a divenire cancerosi. Il meccanismo potrebbe coinvolgere l'attività tirosin chinasi della proteina c-Abl, che è strettamente controllata nelle cellule normali, ma risulta deregolata nelle cellule che producono il polipeptide di fusione. In effetti, la funzione tirosin chinasi della proteina c-Abl è attivata in modo costitutivo dalla fusione *bcr/c-abl*. Questa fusione è quindi un attivatore dominante della tirosin chinasi c-Abl.

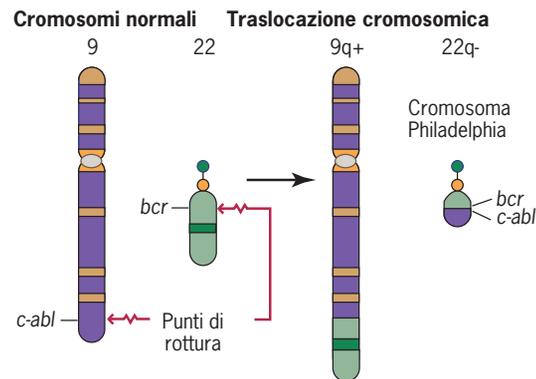


Figura 22.6 ▶ La traslocazione reciproca del cromosoma Philadelphia associata con la leucemia mieloide cronica.

La deregolazione della tirosin chinasi c-Abl porta a un'anomala fosforilazione di altre proteine, incluse alcune coinvolte nel controllo del ciclo cellulare. Nel loro stato fosforilato, queste proteine inducono le cellule a crescere e dividersi in modo incontrollato.

Il linfoma di Burkitt è un altro esempio di cancro dei leucociti associato a traslocazioni reciproche. Queste traslocazioni coinvolgono sempre il cromosoma 8 e uno dei tre cromosomi (2, 14 e 22) sui quali mappano i geni per le immunoglobuline (anche conosciute come anticorpi; vedi Capitolo 21). Le traslocazioni che coinvolgono i cromosomi 8 e 14 sono le più comuni (FIGURA 22.7). In queste traslocazioni, l'oncogene *c-myc* sul cromosoma 8 viene posto in prossimità dei geni per le catene pesanti delle immunoglobuline (*IGH*) sul cromosoma 14. Come risultato di questo riarrangiamento, il gene *c-myc* viene iperespresso nelle cellule che producono le catene pesanti delle immunoglobuline, cioè nei linfociti B del sistema immunitario. Il gene *c-myc* codifica un fattore di trascrizione che attiva i geni coinvolti nella promozione della divisione cellulare. Di conseguenza, l'iperespressione di *c-myc* nelle cellule che contengono la fusione *IGH/c-myc* creata dalla traslocazione t(8;14) determina la trasformazione tumorale.

PUNTI CHIAVE

- ▶ Alcuni virus contengono geni (oncogeni) che possono indurre la formazione di tumori negli animali.
- ▶ Questi oncogeni virali hanno omologhi cellulari (proto-oncogeni) che possono indurre tumori quando vengono iperespressi o quando sono mutati e codificano una proteina modificata.
- ▶ Le mutazioni dei proto-oncogeni promuovono attivamente la proliferazione cellulare.
- ▶ Alcuni tipi di cancro sono associati con riarrangiamenti cromosomici che aumentano l'espressione di proto-oncogeni o che alterano la natura dei loro prodotti proteici.

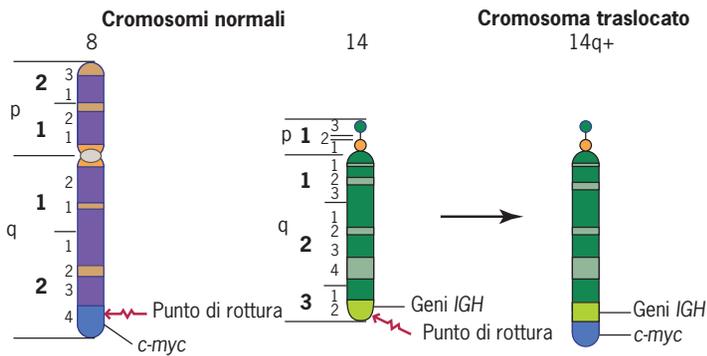


Figura 22.7 ► Una traslocazione reciproca coinvolta nel linfoma di Burkitt. È mostrato solo il cromosoma traslocato (14q+) che porta sia l'oncogene *c-myc* sia i geni per le catene pesanti delle immunoglobuline (*IGH*).

► Geni oncosoppressori

Molti tipi di cancro coinvolgono l'inattivazione di geni i cui prodotti giocano un ruolo importante nel regolare il ciclo cellulare.

Gli alleli normali di geni quali *c-ras* e *c-myc* producono proteine che regolano il ciclo cellulare. Quando questi geni vengono iperespressi o quando codificano proteine che funzionano come attivatori dominanti, la cellula è predisposta a diventare cancerosa. Tuttavia, lo sviluppo completo dello stato canceroso richiede, di solito, mutazioni addizionali a carico di geni che sono normalmente coinvolti nell'inibizione della crescita cellulare. Queste mutazioni definiscono, quindi, una seconda classe di geni correlati al cancro – gli anti-oncogeni o, come più spesso sono definiti, i geni oncosoppressori o soppressori di tumore.

CANCRO EREDITARIO E IPOTESI DEI DUE COLPI DI KNUDSON

La maggior parte dei geni soppressori di tumore è stata scoperta inizialmente con l'analisi di casi rari nei quali la predisposizione allo sviluppo del cancro sembrava seguire una modalità di eredità dominante. La predisposizione è dovuta all'eterozigosi per una mutazione ereditaria con perdita di funzione di un gene soppressore di tumore. Un cancro si sviluppa solo se avviene una seconda mutazione nelle cellule somatiche e se questa mutazione annulla la funzione dell'allele selvatico di quell'oncosoppressore. Quindi, lo sviluppo del cancro richiede due mutazioni con perdita di funzione – cioè due “colpi” di inattivazione, uno in ciascuno dei due alleli del gene soppressore di tumore.

Nel 1971, Alfred Knudson propose questa spiegazione per la formazione del *retinoblastoma*, un raro tumore infantile dell'occhio. Nella maggior parte delle popolazioni umane, l'incidenza del retinoblastoma è di circa 5 bambini su 100.000. L'analisi degli alberi genealogici indica che circa il 40% dei casi coinvolge una mutazione ereditaria che predispone l'individuo a sviluppare il cancro. Il rimanente 60% non può essere imputato a una mutazione specifica ereditaria. Questi casi non ereditari vengono definiti *sporadici*. Sulla base di analisi statistiche, Knudson propose che sia i casi sporadici

che quelli familiari di retinoblastoma si verificassero perché i due alleli di un particolare gene venivano inattivati (**FIGURA 22.8**). Nei casi ereditari, una delle mutazioni inattivanti veniva trasmessa attraverso la linea germinale e l'altra avveniva durante lo sviluppo dei tessuti somatici dell'occhio. Nei casi sporadici, entrambe le mutazioni inattivanti avvenivano durante lo sviluppo dell'occhio. Quindi, in entrambi i tipi di retinoblastoma sono richieste due mutazioni (due “colpi”) per inattivare un gene che normalmente funziona sopprimendo la formazione del tumore dell'occhio.

Successive scoperte hanno verificato la correttezza dell'ipotesi dei due colpi di Knudson. Innanzitutto, si è scoperto che numerosi casi di retinoblastoma erano associati a una piccola delezione del braccio lungo del cromosoma 13. Il gene che normalmente impedisce la formazione del retinoblastoma – detto *RB* – deve quindi essere localizzato nella regione definita da questa delezione. Una mappatura citogenetica più dettagliata ha, in seguito, localizzato il gene *RB* nel locus 13q14.2. È stato inoltre utilizzato il clonaggio posizionale per isolare l'ipotetico gene *RB* (gene candidato). Dopo averlo isolato, ne sono state determinate la struttura, la sequenza e la modalità di espressione. La struttura del gene candidato è stata esaminata nelle cellule prelevate dai tessuti tumorali dell'occhio e, come previsto dall'ipotesi di Knudson dei due colpi, nelle cellule di retinoblastoma erano mutate entrambe le copie di questo gene. È apparso quindi evidente che il gene candidato era realmente il gene *RB*. Infine, esperimenti su cellule in coltura hanno dimostrato che il cDNA dell'allele selvatico del gene candidato poteva revertire le proprietà cancerose delle cellule tumorali in coltura. Questi esperimenti di reversione del cancro provarono, senza alcun dubbio, che il gene candidato era realmente il gene *RB*, un soppressore di tumore. Successivamente, venne scoperto che la proteina codificata dal gene – detta pRB – è espressa in modo ubiquitario e interagisce con una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.