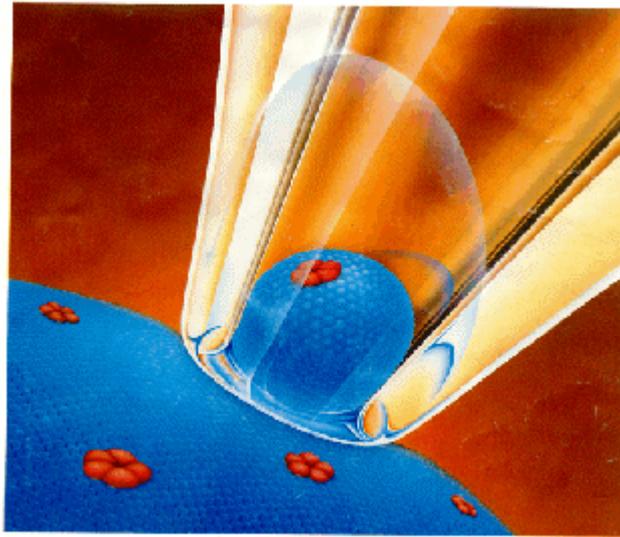


achille norsa



**Terapia biologica antimitotica
e meccanismi recettoriali**

“Ignoramus, ignorabimus”
dalle massime del Professor Luigi Di Bella



L'argomento trattato rappresenta un capitolo di un volume più vasto, che ho scritto dal titolo “Terapia Biologica dei tumori, principi fisiologici e riscontri clinici”, di prossima pubblicazione.

L'ispirazione per il mio lavoro è stata motivata dalla mia grande curiosità di capire gli enunciati per me inizialmente criptici del Professor Di Bella, riguardo alla Sua terapia innovativa delle malattie tumorali.

La ragione della difficoltà a comprendere in campo scientifico dipende dalla mancanza di strumenti, cioè di cognizioni atte a seguire un logico ragionamento scientifico.

Il meccanismo recettoriale della terapia biologica rappresenta il fulcro della trattazione, perché alla luce di tutti gli elementi e dei meccanismi che regolano i processi di trasduzione nella cellula, ci si può spiegare esattamente l'azione inibente la mitogenesi cellulare da parte dei singoli farmaci del protocollo terapeutico in questione.

l'autore

INDICE GENERALE

Introduzione

La proliferazione cellulare

- oncogeni
- Meccanismi di segnale che controllano la proliferazione
- La dimerizzazione dei ligandi dei recettori stimolano la chinase
- L'interazione fra proteine e recettore fa passare il segnale all'interno della cellula
- La sequenza biomolecolare della trasmissione del segnale lungo la sequenza specifica delle chinasi
- Myc e controllo dei geni della proliferazione
- Correlazione fra i segnali di proliferazione e quelli di sopravvivenza
- JUN e FOS
- L'omeostasi nel meccanismo mitogenetico
- ECM- il sistema di segnale extracellulare: la matrice delle integrine
- Sull'inibizione del contatto e la trasmissione del segnale per contatto tra cellula e cellula
- Limiti alla proliferazione, la senescenza della cellula ed i telomeri
- Telomeri e telomerasi
- Il p53: "Angelo guardiano"
- Ruolo della mutazione dell'APC nella carcinogenesi del colon
- Bibliografia

Considerazioni finali sui presidi della terapia biologica

- Somatostatina
- Retinoidi
- Bromocriptina
- Melatonina
- Conclusioni
- Bibliografia

Il meccanismo d'azione della melatonina a livello recettoriale dimostrato attraverso la tecnica del patch-clamp

La tecnica del patch-clamp per la dimostrazione dell'attività piastrinogenica a livello dei megacariociti

- Bibliografia

I farmaci della terapia biologica : interazione con i recettori specifici di membrana e con il processo di trasduzione

Introduzione

Le cellule sono delimitate da una membrana lipidica. Le estremità idrofile delle molecole dei fosfolipidi (blu) Fig 1 sono dirette verso l'interno e verso l'esterno della superficie della membrana.

Quando il primo messaggero (1)(un ormone, un fattore di accrescimento o una molecola farmacologica) si lega con il suo specifico recettore (2), viene attivato un traduttore (3) detto proteina G, composta da tre elementi detti (alfa), (beta) e (gamma). (Fig1)

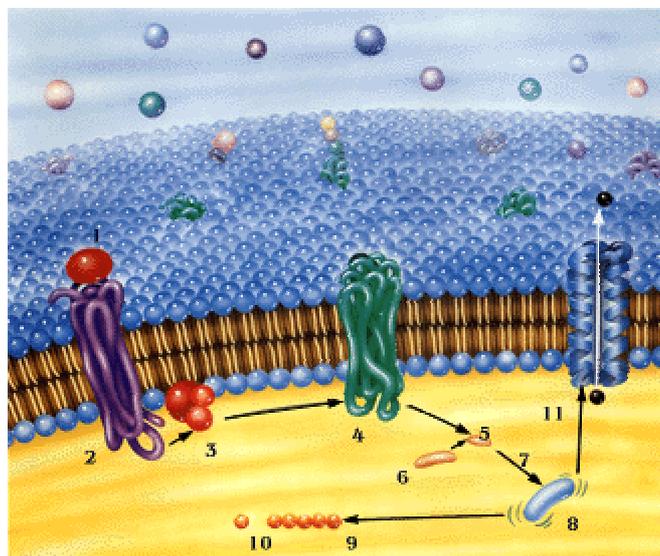


Fig 1

La proteina G a sua volta stimola un amplificatore (4), detto adenylate cyclase, che produce (5) il secondo messaggero detto cyclic AMP (cAMP), dal (6) ATP (adenosine -trifosfate).

Da questo momento in poi avvengono una cascata di reazioni enzimatiche (7) che alterano il comportamento della cellula (8); ad esempio per mezzo della fosforilazione (9) il glicogeno viene trasformato in glucosio (10), che la cellula usa per rigenerare l'ATP.

La fosforilazione può anche alterare le proteine di membrana, come i canali ionici, permettendone l'apertura o determinandone la chiusura (11).

La proteina G è l'elemento che in pratica mette in opera il meccanismo di trasduzione: nello stato di riposo il GDP (guanosine diphosphate) è saldamente unito alla componente alfa della proteina G. Quando il recettore di membrana è attivato dal primo messaggero, esso interagisce con la proteina G, causando la dissociazione del GDP dalla sua componente alfa. Il GDP è sostituito dal GTP (guanosine

triphosphate), che attiva la proteina G e porta alla sua dissociazione nella sua **componente (alfa)-** e nella **componente (beta)(gamma)** .(Fig 2)

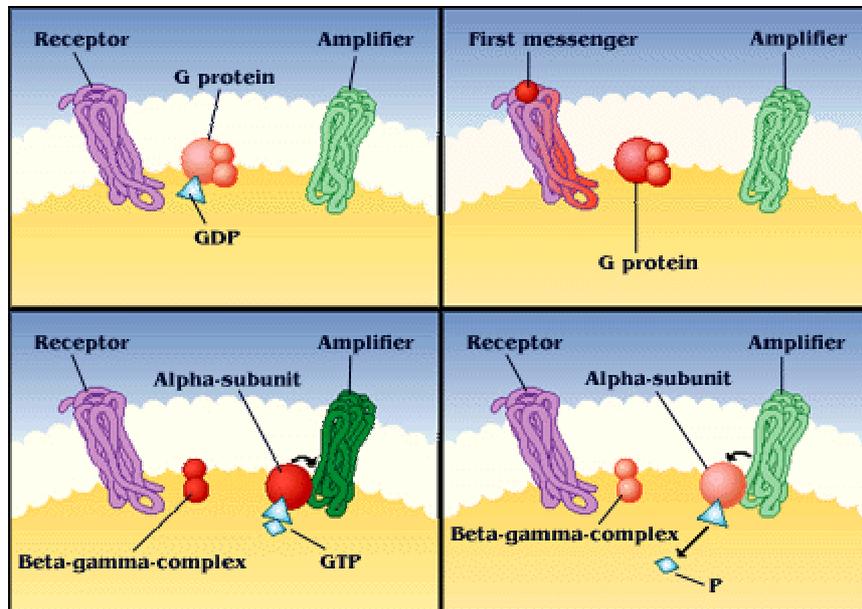


Fig 2

La proteina G così attivata, si lega subito alla protein kinase citoplasmatica, che attiva la fosforilazione della kinase. La kinase quindi può mandare un segnale attraverso un processo di fosforilazione.(Fig 3)

L'ultimo passo consiste nell'attivazione della trascrizione attraverso un fattore nucleare di trascrizione.

Activity of Membrane-bound Receptor Tyrosine Kinases

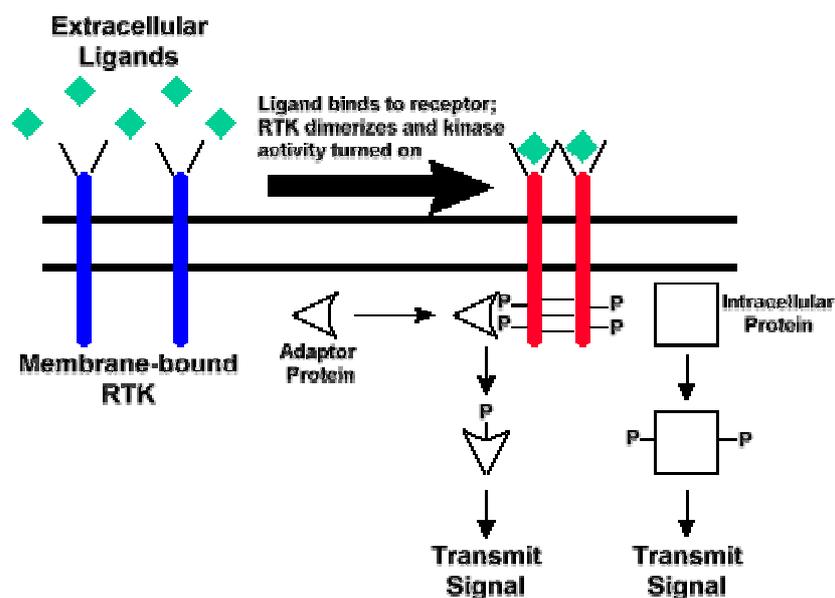


Fig 3

Una volta assolto il suo compito, la componente(alfa) rapidamente idrolizza il GTP in GDP, un'azione che lo rende inattivo e gli permette di riassociarsi alla componente (beta)(gamma) e lo porta alla posizione funzionale di inattività.

La struttura chimica della membrana citoplasmatica è fondamentale per la farmacologia. Per conoscere l'azione e gli effetti dei farmaci, è necessario avere delle conoscenze di chimica organica, di fisica-chimica, e di biochimica.

I fosfolipidi rappresentano una delle componenti chimiche della membrana. Una estremità di queste molecole è costituita da due catene di acidi grassi fortemente lipofile, e l'altra estremità contiene un gruppo ionico (colina phosphate) altamente idrofilico.(Fig 4)

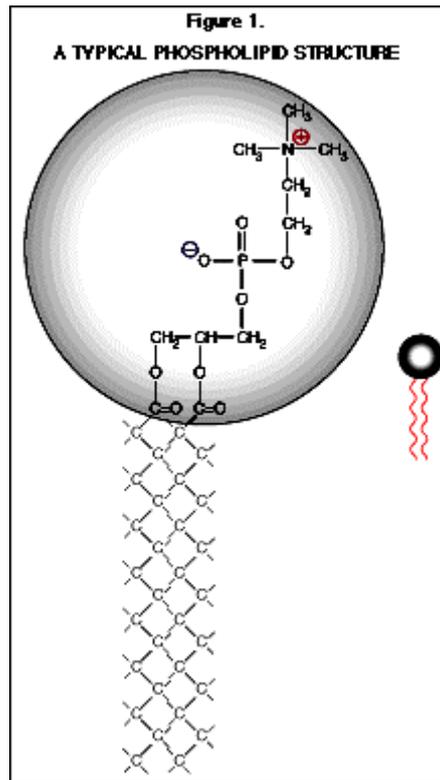


Fig 4

Le sfere rappresentano la porzione ionica della molecola fosfolipidica, e le code sono le catene degli acidi grassi. Queste ultime sono legate fra loro da legami di van der Waals e da fenomeni di attrazione dovuti all'idrofobicità.

La parte centrale della membrana contiene inoltre delle molecole rigide e lipofile di colesterolo, il cui ruolo è quello di consolidare ulteriormente la struttura della membrana, interagendo con le catene di acidi grassi.

In tale modo le superfici interna ed esterna della membrana sono strutturate come un sandwich, e sono ricoperte da ioni (positivi e negativi), che le rendono estremamente idrofiliche, mentre lo strato centrale della membrana è altamente lipofilo.

La struttura della membrana include anche molecole proteiche (rappresentate dalla figura 5 da masse irregolari), alcune delle quali sono enzimi. Altre molecole proteiche occupano l'intero spessore della membrana e possono, per mezzo di un cambiamento reversibile della loro morfologia, aprire i canali e fare così passare ioni o piccole molecole al di fuori o all'interno della cellula.

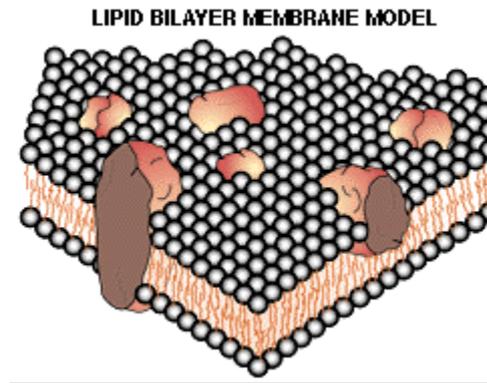


Fig 5

Un canale ionico tipico come struttura a due componenti è quello dell' Na^+ , rappresentato dalla figura 6: questa struttura è in grado di aprire e chiudere il passaggio per mezzo di un cambiamento della struttura proteica e della porzione con funzione di filtro, rappresentata da anioni carbossilati, che attraggono i cationi di sodio e respingono gli anioni.

Vi sono altri canali ionici specifici per il potassio, il calcio, i cloruri e altri.(Fig 6)

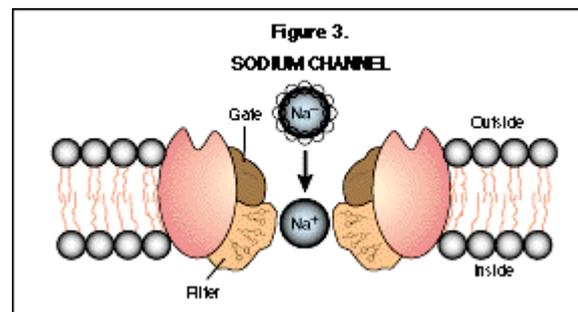


Fig 6

La superficie interna ed esterna della membrana sono rivestite da una struttura cristallizzata a traliccio di molecole di acqua. Questa struttura si modifica tutte le volte prima che una molecola farmacologica prenda contatto con qualche area recettoriale sulla membrana, oppure prima che una di tali molecole passi attraverso la membrana.

Molte sostanze endogene penetrano attraverso la membrana con un meccanismo attivo, mediato da una reazione chimica tra la sostanza chimica trasportata e i componenti della membrana (comunemente proteine).

Il canale del sodio descritto sopra è un esempio di trasporto attivo.

Solo poche sostanze farmacologiche sono indotte in un trasporto attivo; molte sono assorbite, distribuite ed escrete per una diffusione passiva attraverso la membrana, da una regione ad alta concentrazione ad un'altra a relativa concentrazione minore. In

questo caso non c'è nessun coinvolgimento dei canali ionici: in questo caso le molecole farmacologiche possono dissolversi nello strato lipofilo della membrana, e per questo è necessario che dette molecole abbiano una grande affinità lipofila.

I recettori capaci di interagire con una sostanza farmacologica si modificano strutturalmente dopo l'interazione con la medesima, ed inducono un cambiamento dei meccanismi fisiologici della cellula.

Si è provato che alcune proteine sono dei potenziali recettori per le molecole farmacologiche, e altri biopolimeri (come gli acidi nucleici ed i carboidrati) che sono essenziali per la fisiologia della cellula, possono avere le medesime caratteristiche.

Le molecole farmacologiche possono insinuarsi tra due paia di basi adiacenti nella struttura del DNA. Il risultato che ne consegue consiste in una alterazione della struttura elicoidale del DNA, che si traduce in un effetto farmacologico.

Alcuni recettori (quelli degli steroidi) sono proteine solubili localizzate nel citoplasma della cellula. Le molecole lipofile di detti steroidi diffondono attraverso la membrana e reagiscono con questi recettori. L'ultima tappa è rappresentata dalla migrazione di questo complesso steroide-proteina nel nucleo della cellula, ove interagisce con un altro recettore macromolecolare, inducendo infine la sintesi di una proteina particolare.

La natura dell'interazione fra le molecole farmacologiche ed i recettori è abbastanza complessa. Dette molecole si attaccano in un modo reversibile ai loro recettori non in un singolo sito o per mezzo di un medesimo tipo di interazione.

Le interazioni possono essere di tipo covalente, ione-ioniche, con legame di idrogeno, dipolo-dipolari, con legame di van der Waals, e di tipo idrofobico.

Come corollario è necessario considerare che importante è la struttura tridimensionale del recettore per la molecola farmacologica: ogni recettore infatti riconosce in maniera discriminante la struttura stereochimica dell'isomero farmacologico.

Il razionale per un progetto per una nuova molecola farmacologica è capire l'azione e gli effetti della medesima in un sistema biologico, in quale parte dell'organismo possa essere di utilità e per quanto tempo agisca.

E' molto importante comprendere che l'effetto farmacologico di una molecola non si inserisce mai in un sistema lineare, ove la risposta fisiologica è direttamente proporzionale all'occupazione dei recettori.

In verità è di comune riscontro che basta una occupazione parziale dei recettori per determinare un grande aumento dei secondi messaggeri, e quindi una grande risposta fisiologica. Questo fenomeno si spiega con l'amplificazione di segnale ad ogni fase del processo di trasduzione.

La continua esposizione ad un agonista sfocia in un fenomeno di desensibilizzazione. La medesima concentrazione di un agonista diviene sempre meno efficace nel produrre una stessa risposta fisiologica. Quando questa desensibilizzazione avviene molto rapidamente, si parla di tachifilassi. In questo caso i recettori vengono fosforilati, e di conseguenza risultano meno efficienti nell'attivare la proteina G, e dimostrano anche una minore affinità per gli agonisti. Come è dimostrato per i farmaci che creano assuefazione e dipendenza,

così si può spiegare per tutti i farmaci in generale, come i chemioterapici ed anche i farmaci della terapia biologica.

I recettori possono anche essere rimossi e sequestrati dalla superficie della membrana. Questo evento indica che i secondi messaggeri non solo regolano i processi intracellulari, ma sono capaci anche di regolare il sistema recettoriale che li genera.

Da ricerche recenti si è dimostrato che i recettori possono essere attivi anche senza la presenza dell'agonista. Questo fenomeno si chiama attività recettoriale costituzionale. I recettori costituzionalmente attivi possono indurre la formazione di secondi messaggeri in assenza degli agonisti.

Possiamo quindi concludere che una sostanza farmacologica può comportarsi come un agonista inverso. Gli agonisti inversi si collegano ai recettori costituzionalmente attivi ed alterano l'equilibrio versus quelli inattivi, portando ad una rivoluzione del sistema recettoriale.

Questi presupposti rendono complessa la decisione sulla dose ottimale di somministrazione di un farmaco e sui ritmi di somministrazione.

E' razionale anche sostituire un farmaco con uno simile per sensibilizzare recettori diversi? E' giustificata la somministrazione discontinua del farmaco per disimpegnare ritmicamente i recettori, impedendone il blocco funzionale?

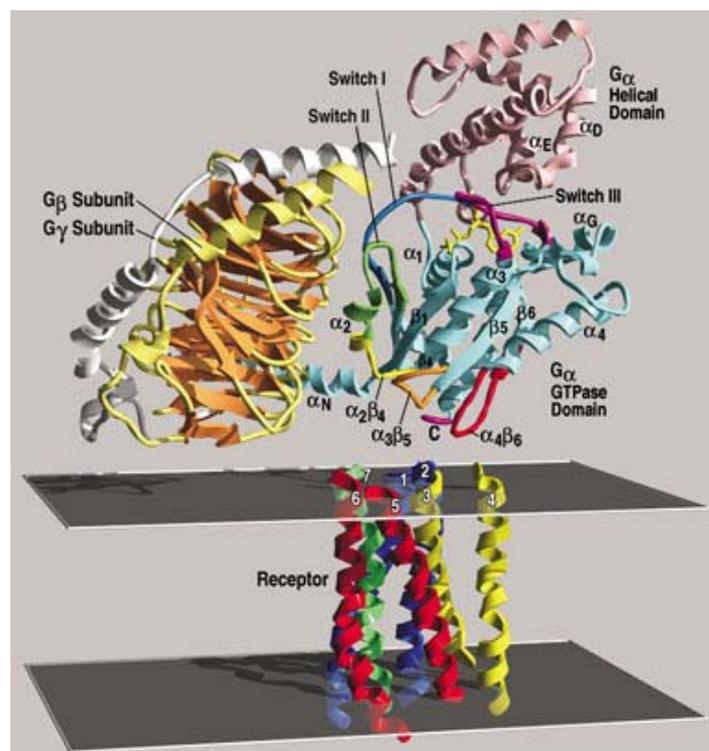


Fig 7 Modello del complesso recettore-proteina-G

Nella figura 7 il modello recettoriale tridimensionale è quello della Rodopsina. Il dominio della GPTase della componente alfa è blu. Il dominio elicoidale della componente alfa è rosa. La gdp è gialla. Lo switch 1 è blu scuro, lo switch 2 è verde e lo switch 3 è mafenta. La connessione alfa 2/beta-4 è gialla. L'alfa 3/beta 5 è

arancione, e l'alfa 4/beta 6 è rosso. L'estremità carbossilica della componente alfa (chiamata "C") è Magenta.

Le regioni selezionate delle strutture secondarie nella componente alfa, includendo l'amino alfa elica terminale e l'alfa N sono indicate.

Gli elementi della componente beta sono arancione, e l'amino elica terminale e le connessioni sono gialle.

La componente alfa è bianca. Le eliche del recettore sono numerate e quelle connesse tra loro con un legame intracellulare sono dello stesso colore.

Nella Fig 8 è rappresentata la relazione fra alcune famiglie di recettori legati alla proteina G: la più larga è quella della Rodopsina, che include il gruppo dei recettori amino-cationici(dopamina, acetilcolina, ecc), i prostanoidi, e molti altri ormoni. Oltre alla famiglia della Rodopsina vi sono rappresentate altre due famiglie di recettori legati alla proteina G, quella della secretina/calcitonina , quella del glutammato e quella della somatostatina.

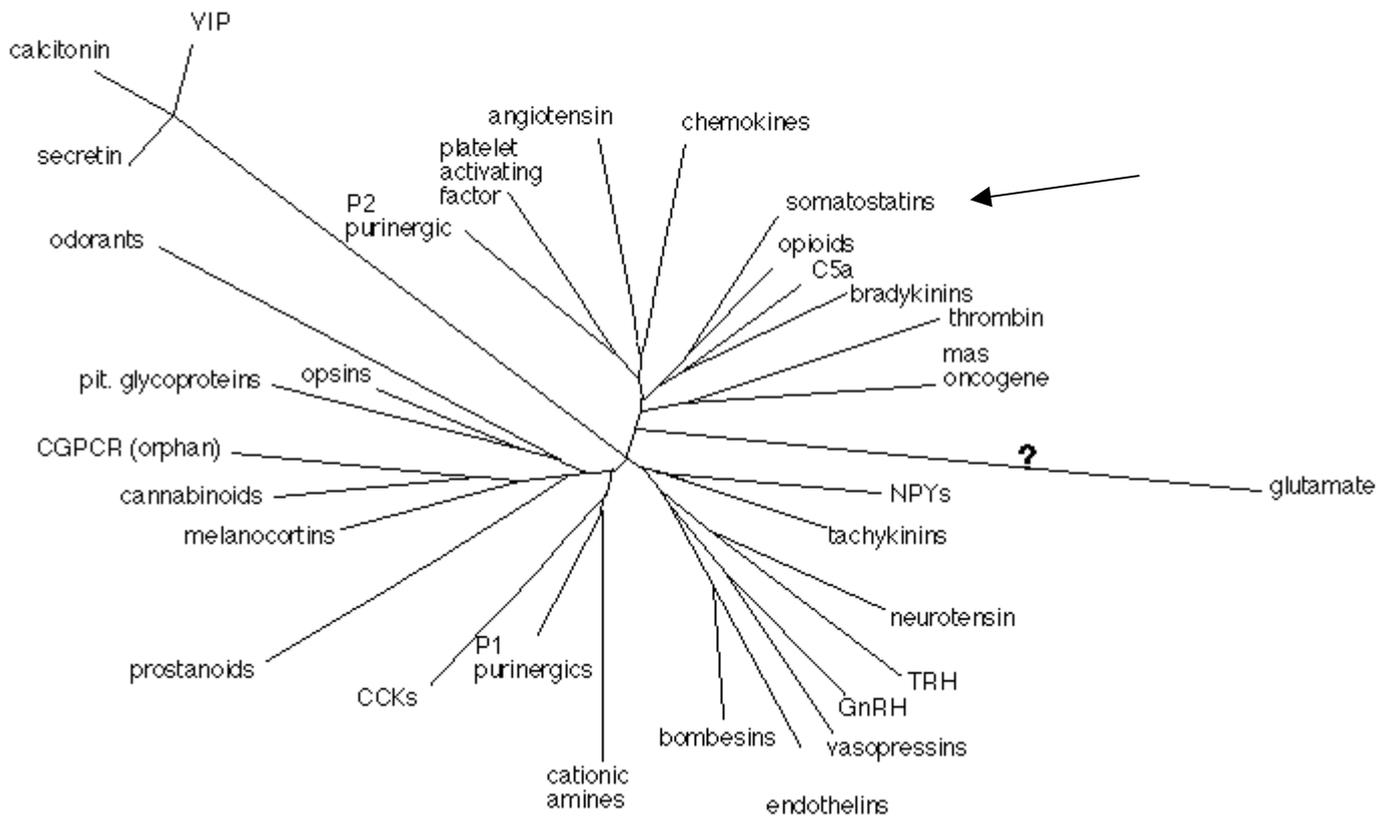


Fig 8

LA PROLIFERAZIONE CELLULARE

L'organizzazione multicellulare dipende da un programma di cooperazione delle cellule che compongono l'organismo. La differenziazione tissutale segue un piano ben preciso. In un organismo maturo le cellule sono limitate nella loro intrinseca spinta a moltiplicarsi a seconda dei loro territori, seguendo un preciso piano di sviluppo.

Questo meccanismo dipende dalla comunicazione tra le cellule, in modo che ogni cellula che occupa il suo posto specifico possa collaborare nel piano di sviluppo e di moltiplicazione secondo l'economia dell'organismo.

Come si può definire la normalità?

- **Dipendenza dal Growth factor** : la proliferazione dipende dalla disponibilità dei fattori di accrescimento specifici per ogni tessuto; la diminuzione di questi fattori porta all'apoptosi.

- **Dipendenza dall'ancoraggio:** la proliferazione viene regolata attraverso interazioni transmembrana di proteine dette integrine, che fanno parte degli elementi della matrice extracellulare (ECM). Specifiche integrine riconoscono specifiche molecole di ECM.
- **Il contatto fra le cellule:** il contatto con il medesimo tipo di cellule inibisce il movimento e la proliferazione cellulare. Il contatto con cellule di diverso tipo favorisce la motilità e la migrazione spontanea.
- **La limitazione della capacità di proliferazione:** le cellule somatiche dei vertebrati si dividono un numero limitato di volte (50-70) prima di entrare in uno stato di senescenza e mantenere una attività metabolica, senza alcun'altra possibilità di divisione. Questo fenomeno è chiamato "Limite di Hayflick"(Hayflick,1965).(1)

Un programma di segnali e di sistemi di regolazione controllano la proliferazione cellulare.(Evan and Vousden 2001)(2). Questo equilibrio può essere distrutto da una varietà di fattori, come alleli mutanti ereditati dagli ascendenti, mutazioni somatiche insorte nell'organismo e cambiamenti epigenetici che alterano il livello di espressione dei geni.(Hanahan and Weinberb 2000)(3)

I fattori che possono portare alla trasformazione cellulare sono:

- ° **L'immortalizzazione e l'aneuploidia:** le cellule diploidi arrivate allo stadio della senescenza, a volte danno origine a delle linee clonali che sopravvivono e si moltiplicano continuamente senza alcun limite. Generalmente la transizione passa attraverso cambiamenti telomerici risultanti in riarrangiamenti cromosomici e in aneuploidia.
- ° **Parziale o completa mancanza di dipendenza dal Growth Factor:** le cellule in trasformazione possono acquistare l'abilità di crescere nel siero più diluito o in presenza di una minore iniziale densità cellulare.
- ° **Peredita dell'ancoraggio**
- ° **Perdita dell'inibizione del movimento:** in conseguenza del deficit dei segnali per l'adesione fra le cellule.
- ° **Svincolo dal meccanismo dell'apoptosi**
- ° **Aumento dell'angiogenesi**

Oncogeni

Il DNA dei virus esprime delle proteine analoghe ai fattori di accrescimento. In contrasto gli oncogeni dell'RNA dei retrovirus sono derivati dai geni regolatori della cellula, con aumento delle funzioni di mutazione.

Gli omologhi cellulari dei proto-oncogeni (prefisso c-) esprimono dei componenti regolati nel sistema di segnali, mentre le forme virali (prefisso v-) sono costituzionalmente attive.

Il modello virale è stato assunto originariamente come possibile causa esterna del cancro, tuttavia anche se vi sono delle correlazioni fra gli oncogeni retrovirali e le mutazioni dei proto-oncogeni che si ritrovano nelle cellule tumorali, è evidente che il

cancro dipende da un aumento dei cambiamenti genetici indotti nel meccanismo di regolazione della moltiplicazione cellulare.

D'altra parte i proto-oncogeni hanno rappresentato una guida utile per decifrare questi meccanismi di regolazione.

Oncogene	Funzione del proto-oncogene	tumori virus indotti
abl	protein tyrosine chinasi	leucemia del topo
bcl-2	anti-apoptotic factor	linfoma
erb-B	EGF-receptor/ tyrosine kinase	fibrosarcoma del pollo
fos	nuclear trascriptio factor	osteosarcoma del topo
jun	AP-1 transcription factor	fibrosarcoma del pollo
mos	ser-thr kinase	sarcoma del topo
myc	nuclear protein	mielocitoma del pollo
H-ras	GTP protein	sarcoma del ratto
sis	platelet derived growth factor	sarcoma della scimmia
src	tyrosine kinase	sarcoma del pollo

Alcuni di questi geni appaiono oncogenici per un difetto di funzione e pertanto funzionano diminuendo l'azione dei fattori soppressori tumorali. Questi includono il **pRb105** o il **p53**, originariamente erroneamente classificati come oncogeni, o il **BRCA1** scoperto più recentemente.

MECCANISMI DI SEGNALE CHE CONTROLLANO LA PROLIFERAZIONE

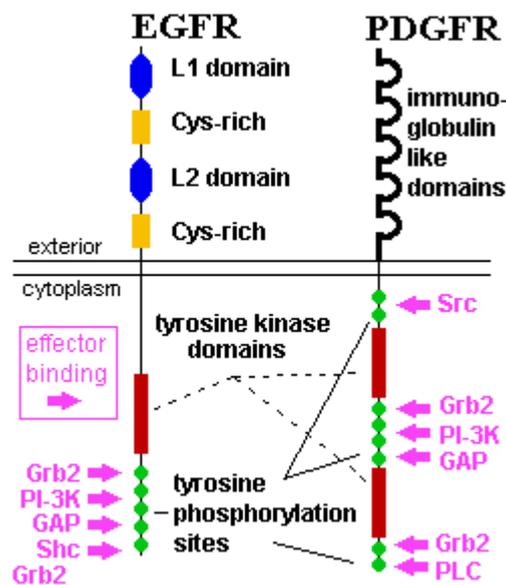


Fig 9- La patogenesi di segnale del fattore di accrescimento mitogenetico

I fattori di accrescimento sono delle proteine che hanno la funzione di promuovere l'accrescimento o la sopravvivenza delle cellule. Molti di questi fattori come l'**EGF (epidermal growth factor)**, l'**FGF (fibroblast growth factor)**, il **PDGF (platelet derived growth factor)** sono stati ritrovati nel siero del feto del vitello, mentre altri come l'**NGF (nerve growth factor)** hanno altre sorgenti. In generale si sa molto di più del loro meccanismo d'azione che non della loro origine.

I fattori di accrescimento prendono contatto con la parte esterna dei recettori di membrana, molti dei quali sono stati riscontrati essere delle **protein tyrosine kinases**.(Hubbard and Till 2000)(4).

Esempi di trasformazione oncogenica a questo livello includono il v-sis, che mette in condizione la cellula di esprimere il proprio PDGF, e l' erb-B che esprime un recettore EGF incompleto indipendente da qualsiasi influenza extracellulare, e quindi attivo autonomamente.

La trasformazione cellulare può derivare da fattori di accrescimento secreti dalla stessa cellula, indipendentemente da alcuna influenza esterna. In altri casi la cellula può perdere la sua dipendenza dai fattori di accrescimento per la formazione di recettori indipendenti, che attivano autonomamente le protein-chinasi.

LA DIMERIZZAZIONE DEI LIGANDI DEI RECETTORI STIMOLA LA KINASE

L'Insulin -like growth factor (IGF) receptor contiene L1, L2 e Cys -dominii simili all'EGFR. La struttura cristallografica(sotto a sx della figura 10) mostra i domini-L dalla beta-elica o della struttura a solenoide, L1 essendo evidenziato alla fine e d L2 a fianco nella stessa figura. Il dominio Cys contiene alcune paia di Cys -disulfide elementi, e la coppia s-s si trova all'inizio e alla fine dei due domini. Il collegamento con i ligandi avviene in una fessura compresa tra i due domini ed il microscopio elettronico dimostra che ogni "insulin legand"contatta L1 di una catena ed L2 del dimero partner.(Luo et al 1999)(5).

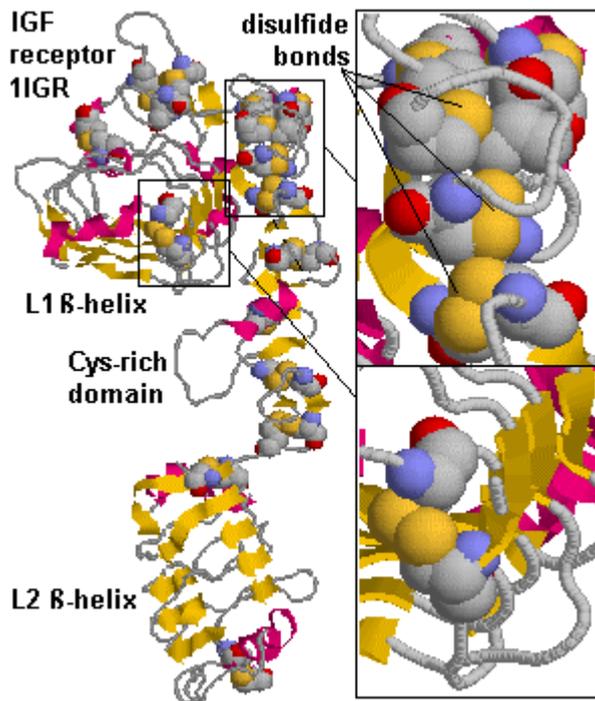


Fig 10

Il recettore FGF contiene dei siti di legame simili alle immunoglobuline connesse con un legame flessibile, simile al PDGFR (v.fig a DX). Il ruolo del sito di legame può essere quello di modificare il dominio 2 per favorire la dimerizzazione, o di ridurre l'entropia dell'interazione rendendo la struttura più flessibile.(Plotnikov et al 1999)(6).

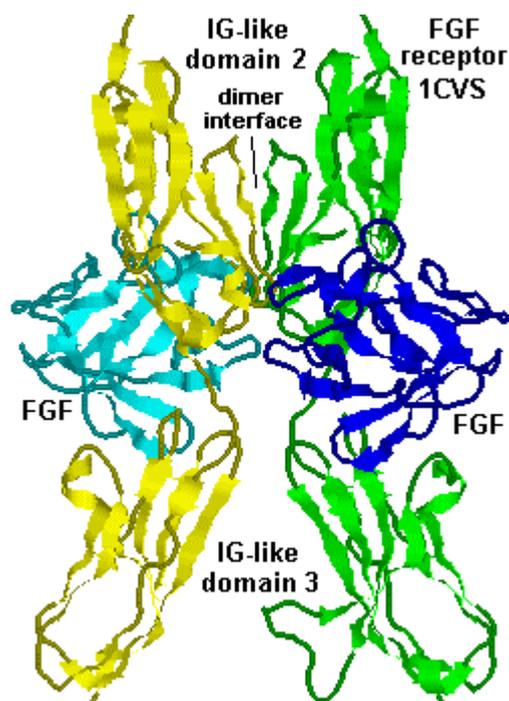


Fig 11

Inizialmente si pensava che queste tirosin-chinasi potessero agire attraverso un fosforilazione a cascata, mentre ultimamente si è dimostrato che lo stesso recettore provvede ad un'autofosforilazione, per mezzo di una dimerizzazione indotta dai siti di legame che vengono orientati opportunamente e modificati nella loro conformazione.(Blume-Jensen and Hunter 2001)(7). Nel monomero un legame regolatore C-terminale occupa il sito chinase in cis. Nel dimero, il legame regolatore è spostato, permettendo al sito tirosin-chinasi in trans di legarsi al sito catalizzatore.(Sadowski et al 1986)(8).

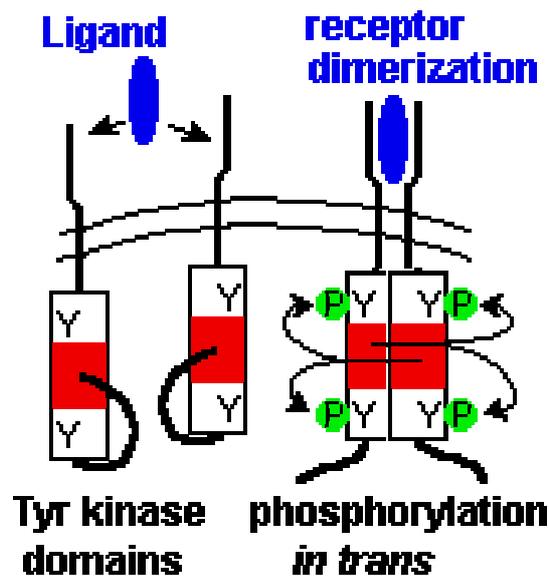


Fig 12

L'autofosforilazione genera dei siti di fosfotirosina che sono recettivi per legarsi all'adattatore di segnale delle proteine. Il sito SH2 è un complesso preordinato di alcune tirosin-chinasi, C-Src, Abl v-Fps, che non rappresentano il sito catalizzante della chinasi, ma che tuttavia sono richiesti per l'interazione con i siti. La fosfotirosina si lega con il fosfato caricato negativamente circondato dall'aminoacido SH2 caricato positivamente. Ulteriori interazioni con gli aminoacidi del terminale C della fosfotirosina permettono la selezione di specifici siti effettori presso differenti SH2 legati alle proteine.(Pauson and Nash 2000)(9). I tre maggiori sottotipi di SH2 includono il PLC- γ SH2 (fosfolipase C), che si collega con la fosfotirosina attraverso residui idrofobici, l'Src SH2 che preferisce i residui caricati a +1 e +3, e il Gbr SH2 dove unTrp richiede un sito con una struttura ruotata dopo la fosfotirosina.

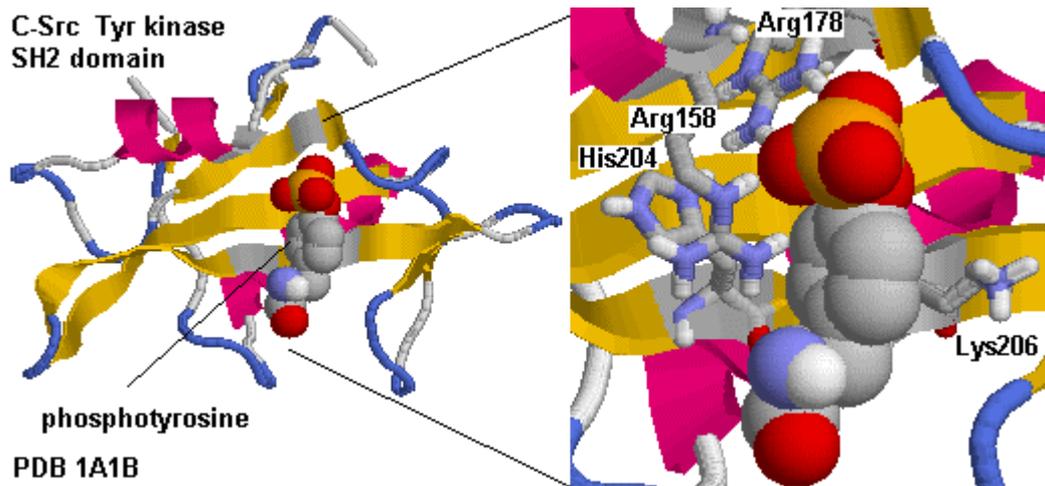


Fig 13

Mentre il sito Tyr per mezzo dell'SH2 è strettamente regolato attraverso la fosforilazione mediata dal segnale di legame, il sito SH3 (Fig 14) interagisce con le Pro-x-xPro componenti delle proteine del sito.

Le proteine che attivano il segnale possono usare delle combinazioni di SH2, SH3 ed altre proteine che possono interagire per aumentare l'affinità e la specificità del legame.



I domini SH3 agiscono Fig 14

L'estremità fosforilata dell'EGF è stata usata come target per il meccanismo di clonaggio ed espressione, ed un certo numero di SH2 proteine sono state isolate con questo metodo.

Queste proteine sono conosciute come grbs (growth-factor receptor bound). Il fattore grb2 consiste di un singolo SH2 dominunito a due SH3 domini. Questi ultimi agiscono come siti di collegamento con la prolina ed agiscono sulle molecole effettrici seguendo il progetto di utilizzazione del segnale.

Oltre ai siti della fosforilazione come l'EGFR, vi sono degli altri siti in grado di prendere rapporto con altre proteine SH2 con differente effetto; queste includono le tirosin-chinasi, le tirosin-fosfatasi ed una varietà di altre molecole di segnale.(Fig15)

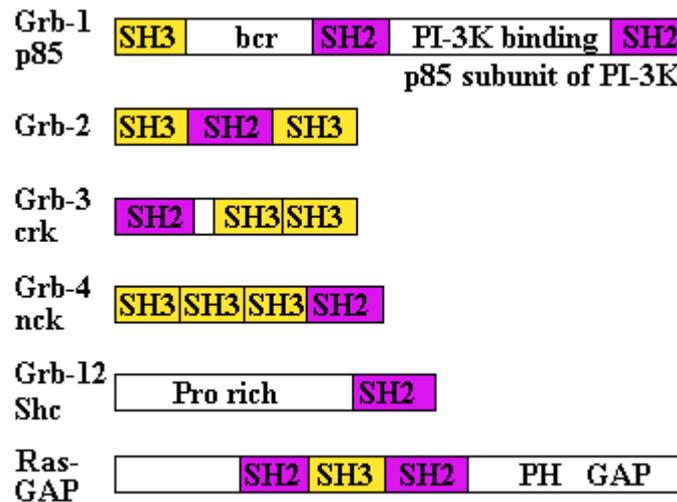


Fig 15

l'INTERAZIONE FRA PROTEINE E RECETTORE FA PASSARE IL SEGNALE ALL'INTERNO DELLA CELLULA

L'autofosforilazione del recettore tirosin chinasi permette ad esso di coinvolgere altri fattori per l'interazione con gli SH2 domini con la fosfotirosina. Il Grb2 può collegarsi direttamente o indirettamente via Shc; il Grb2 richiama il Sos, identificandolo sulla membrana, ove agisce come un guanine nucleotide exchange factor (GEF) per la RasGTPase. (Fig 16)(Pauson and Nash 2001)

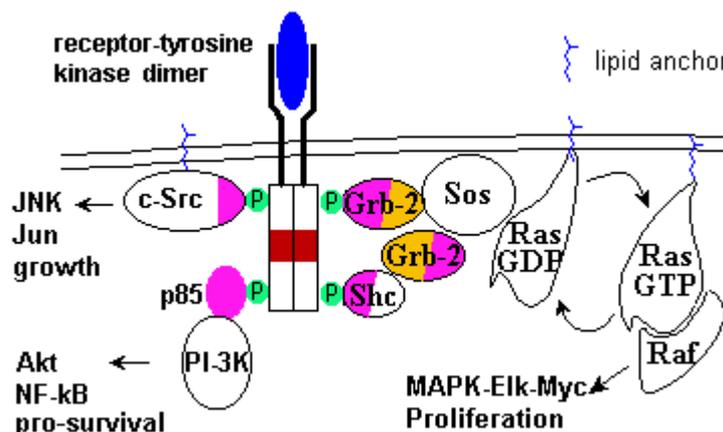


Fig 16

I componenti chiave di segnale come il Ras e il c-Src sono ancorati alla membrana con delle catene rispettivamente di poli-isoprenil e miristoil. Il coinvolgimento delle proteine adattatrici di segnale fissate alla membrana aumenta la loro concentrazione locale, permettendo al segnale di passare in modo effettivo. La Ras attiva la Raf, una ser/Thr protein chinasi, che rappresenta il punto di partenza per il controllo della proliferazione cellulare attraverso la Map chinasi.

LA SEQUENZA BIOMOLECOLARE DELLA TRASMISSIONE DEL SEGNALE LUNGO LA SEQUENZA SPECIFICA DELLE CHINASI.

La Raf è il primo componente delle tre sequenze modulari delle chinasi, con la generica denominazione di MAPKKK, MAPKK, e MPK (che significano Mitogen Activated Protein Kinases. Il meccanismo della proliferazione coinvolge specificatamente Raf, Mek1,2 ed Erk1,2(rispettivamente MAPK/ERK kinase ed Extracellular Receptor kinase. Come minimo altre sei chinasi sono coinvolte in questo meccanismo nelle cellule dei mammiferi, includendo la Jun kinase/stress activated kinase(SAPK).

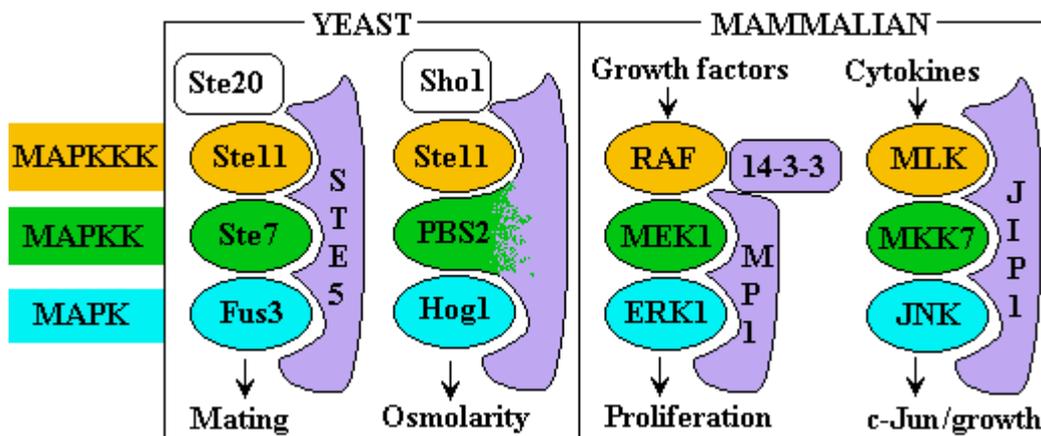


Fig 17

Nel lievito la risposta al fattore stimolante coinvolge la MAPK lungo la sequenza Ste11,Ste7, Fus3, ma qualcuna delle medesime chinasi come la Ste11 sono anche coinvolte nell'osmolarità. Ciò che recepisce il segnale è il complesso dei componenti della cascata verso un fattore strutturato come lo Ste5, che sembra trattenere il segnale. Le proteine MP1 (MEK Partner) e JIP1 (Jun N-terminal kinase interacting protein) hanno dimostrato di interagire con i componenti dell'ERK growth receptor/proliferation e con il JNK/SAPK. Tuttavia il fattore MP1 da solo sembra legarsi con l'MAPKK ed il MAPK, ed un componente del 14-3-3 (famiglia di proteine adattatrici) lega la Raf al MEK. I componenti della famiglia del 14-3-3 si

legano alla fosfoserina o alla fosfotreonina, ma non sono stati dimostrati essere modulatori di altre proteine come gli SH2.

Per convenzione la cascata sequenziale delle chinasi ha la funzione di amplificazione del segnale. e del suo isolamento da interferenze estranee.(Ferrel and Machleder 1998)(10). Recentemente si è dimostrato che vi può essere una interazione con le beta-arrestine regolate dagli altri recettori, che hanno la funzione di integrare o modulare la combinazione dei segnali.(Perry and Lefkowitz 2002)(11).

Il risultato finale della sequenza MAPK consiste nella ricostituzione di un attivo ERK a livello del nucleo, e nella fosforilazione di una regolata trascrizione dei fattori della famiglia dell'Ets. Il risultato finale è l'aumento dell'espressione del c-Myc, che rappresenta la chiave per il controllo della proliferazione.

Myc e controllo dei geni della proliferazione

La Myc protein è un fattore di trascrizione HLH-leucina che rappresenta una chiave per i segnali di proliferazione. Essa agisce con un eterodimero con il Max transcription factor, per controllare i geni responsabili della proliferazione, attivando l' inibitore Cyclin D e reprimendo i CDK inibitori come il p15INK4.(Grandori et al 2000)(12).

Myc-Max si collega con la sequenza E-box CAGCTG . Gli eterodimeri Mad-Max prendono contatto con elementi simili, ma esercitano un effetto antiproliferativo, a differenza del Myc-Max che esercita l'effetto opposto. Tuttavia il complesso recettoriale degli eterodimeri dipende dal contesto delle altre DNA binding protein, così il Myc-Max ed il Mad-Max non necessariamente si collegano con lo stesso E-box con uguale affinità.(Fig 18)

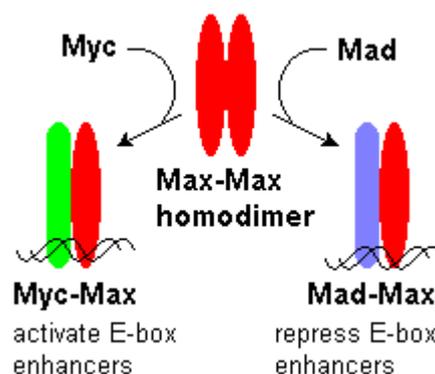


Fig 18

CORRELAZIONE FRA I SEGNALI DI PROLIFERAZIONE E QUELLI DI SOPRAVVIVENZA

Myc stimola anche il meccanismo di apoptosi attraverso l'espressione dei fattori Bax e BH3. I fattori antiapoptosici sono stimolati dal growth factor receptor kinase, che agisce sul PI-3K (fosfotidilinositol trifosfato kinasi). (Shields et al 2000)(12). Il componente p85 del PI-3K contiene recettori SH2 per connettersi direttamente con i siti della fosfotirosin kinase, mentre Ras attiva il p110, componente del PI-3K. Il PI-3K attiva l'Akt protein kinase B, un regolatore negativo dei fattori pro-apoptosici, come il Bad, attraverso la protein kinase C, che stimola l' NF- κ B. (Fig 19).

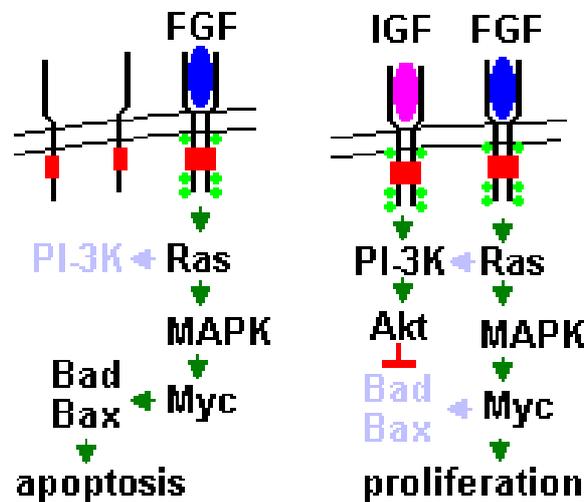


Fig 19

Comunque se soltanto il Myc è stimolato, la risposta pro-apoptotica può dominare. Questa protegge nei confronti dei segnali spuri per la proliferazione derivati da un Myc superattivo. Differenti fattori di accrescimento stimolano il meccanismo della proliferazione e della sopravvivenza verso diverse tendenze; per esempio gli insulin-like growth factors (IGFs) sono identificati primariamente come segnali di sopravvivenza.

Questa complessità spiega quanto sia difficile definire l'equilibrio nelle cellule non trasformate. Nel siero vi sono una quantità di fattori di accrescimento che conferiscono un necessario bilancio fra i segnali di proliferazione e quelli di sopravvivenza.

JUN e FOS

La Jun protein, il target del meccanismo di segnale JNK, è un fattore costitutivo per la trascrizione per la sopravvivenza e non fortemente proliferativi come un semplice omodimero. Jun si combina col Fos, che è un prodotto della trascrizione Myc-indotta, che procura un eterodimero che attiva geni con TRE (tumor response element) favorenti la crescita. Le mutazioni che eliminano le sequenze destabilizzanti nell'UTR del mRNA, mutazioni che aumentano l'espressione basale del Jun, e la delezione dei segnali di degradazione nel polipeptide (normalmente di breve durata) sono tutti fattori che spingono verso la trasformazione. I Jun omodimeri di lunga durata o sovraespressi attivano la trascrizione del fos. Sotto l'influenza dei dimeri Jun/Fos, aumenta il processo di trascrizione, ma il range delle proteine espresse è molto ridotto, risultando in una riduzione di fenotipi differenziati. Le cellule ritornano alla loro funzione di base, al loro accrescimento e divisione normali.

L'OMEOSTASI NEL MECCANISMO MITOGENICO

Il meccanismo normale contiene dei feedback negativi o dei signal relaxation elements, im modo che il risultato finale dipenda dal mantenimento costante dei segnali per i fattori di accrescimento.

Gli elementi negativi o di relaxation sono:

- ° i recettori SH2 collegati con la protein tyrosine phosphatase PTP1.
- ° la MAPK fosforilazione del Sos causa la sua collocazione arretrata nel citoplasma.
- ° l'idrolisi intrinseca del GTP nel Ras muta questo in un GDP-Ras inattivo.
- ° l'attivazione del RasGAP per mezzo dell'RTK accelera il turnover del Ras.

Il massimo potenziale oncogenico è associato al Ras; mutazioni che portano all'idrolisi del GTP o che esistono nella conformazione attiva in assenza di nucleotide provocano la trasformazione. Un grande numero di cancro umani sono stati riscontrati possedere dei Ras mutati.

ECM – IL SISTEMA DI SEGNALE EXTRACELLULARE : LA MATRICE DELLE INTEGRINE

La Famiglia delle integrine consiste di alfa,beta eterodimeri con 18 alfa-elementi ed 8 beta-elementi. Tutti gli elementi attraversano la membrana, hanno dei siti di legame ECM nel campo extracellulare, e di solito corti siti effettori di legame nel citoplasma. Il nome di **Integrine** si riferisce alla loro azione di coordinare le interazioni fra il citoplasma e l'ECM. I componenti proteici delle ECM portano come target la sequenza RDG, ed includono i collagene, le laminine, e le fibronectine. Ogni

componente delle integrine è un mosaico di specifici moduli di ricognizione per queste proteine.(Hynes 1999)(14).

Le integrine possono mediare il segnale dall'esterno all'interno e viceversa. L'azione intracellulare prevede:

- ° l'espressione dell'attivazione del Cdks e delle cicline A,B,D,E
- ° l'attività degli inibitori p21cip e p27 kip
- ° la progressione attraverso il G1-S checkpoint e la fosforilazione del pRb
- ° il citoscheletro dell'actina e la catena della miosina.(Fig 20)

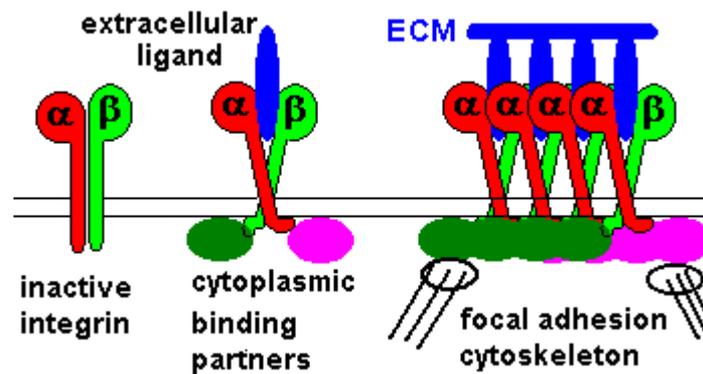


Fig 20

Le integrine possono adottare una configurazione attiva o inattiva, che è determinata dalla differenza dell'orientamento dei componenti alfa e beta. La forma attiva ha grandi affinità sia per i ligandi esterni, che per quelli citoplasmatici. Il legame con entrambi i ligandi condiziona la trasformazione nella forma attiva, cosicché i ligandi citoplasmatici possono promuovere il legame con l'ECM, e l'ECM può aumentare l'interazione con i ligandi citoplasmatici o i ligandi partners.(Fig 21)

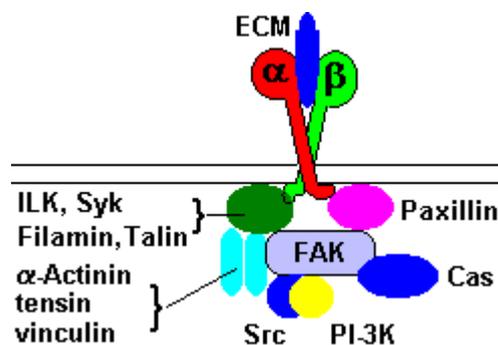


Fig 21