

Il sottile equilibrio tra APOPTOSI e PROLIFERAZIONE CELLULARE (mitosi) e il ruolo dei segnali di sopravvivenza (FATTORI DI CRESCITA)

La teoria cellulare attribuisce, alla cellula, tutte le caratteristiche tipiche dei viventi.

È quindi naturale attendersi che, come tutti gli organismi, anche la cellula vada incontro a senescenza e a morte, ma fino agli anni '70 si riteneva che la morte cellulare fosse la conseguenza solo di eventi traumatici o della morte dell'intero organismo.

Fu da studi sullo sviluppo e la metamorfosi degli invertebrati che risultò sempre più evidente che esisteva anche una morte cellulare di tipo fisiologico, che come tale poteva non causare infiammazione e dolore, avere delle finalità proprie, essere conseguenza della senescenza, contribuire all'omeostasi cellulare.

Dal punto di vista morfologico, i testi di citopatologia degli anni sessanta già distinguevano tra cariolisi e carioressi: la prima morfologia corrisponde a quanto si osserva in caso di necrosi, l'unica modalità di morte cellulare conosciuta all'epoca; nella necrosi il nucleo, così come l'intera cellula, sembra dissolversi (lisi), in quanto la cellula si rigonfia e il suo contenuto si riversa all'esterno. Il materiale cellulare così disperso determina nell'area una reazione infiammatoria; ripetuti episodi di necrosi possono, col tempo, innescare reazioni autoimmuni (le cellule del sistema immunitario non sono "addestrate" a riconoscere come self il materiale presente all'interno delle cellule dell'organismo).

La carioressi (frammentazione del nucleo) si osserva invece in caso di apoptosi: il nucleo, ma anche tutta la cellula, si suddivide in frammenti; oggi sappiamo che in tale processo la membrana plasmatica resta integra e quindi il contenuto cellulare non fuoriesce; i frammenti vengono prontamente fagocitati dalle cellule circostanti o da fagociti professionisti e perciò non si hanno le conseguenze negative descritte per la necrosi. Tali modificazioni morfologiche si possono osservare per tempi relativamente brevi (1-2 ore), per cui i patologi del passato considerarono la carioressi una semplice variante morfologica e sporadica alla cariolisi e il fenomeno dell'apoptosi fu ignorato fino agli studi di Kerr (1965) sugli epatociti.

Nel 1972 lo stesso Kerr e Searle coniarono il termine apoptosi, da una parola greca che indica la caduta dei petali dei fiori o delle foglie dalle piante. Da allora gli studi sull'apoptosi si sono moltiplicati esponenzialmente. I meccanismi che portano all'esecuzione attiva di questo complesso meccanismo di autoeliminazione sono stati quasi completamente elucidati, mentre resta molto da capire a livello di segnalazione, regolazione e induzione dell'apoptosi.

L'apoptosi è un fenomeno tipico delle cellule degli organismi pluricellulari, anche se si avvale di prodotti genici in parte presenti negli organismi unicellulari cui, come spesso accade, l'evoluzione ha attribuito nuove funzioni. Le cellule degli organismi

pluricellulari non esprimono tutti i geni in loro possesso, ma attivano di volta in volta "pacchetti di geni specifici", cui corrispondono specifici "programmi cellulari": la morte per apoptosi è per l'appunto uno di questi programmi, alla pari del differenziamento e della divisione cellulare, e comporta, come gli altri programmi, una complessa rete di segnalazione inter-cellulare e un processo decisionale interno alla cellula stessa, nel quale vengono soppesate le varie opzioni presentate dai segnali che giungono alla cellula.

L'apoptosi è stata anche definita "morte cellulare programmata" o "suicidio cellulare". Questi termini sono più o meno equivalenti, nei limiti e nelle accezioni che chiariremo in seguito. Il termine "suicidio" è particolarmente appropriato in quanto si applica a un programma svolto "attivamente" dalla cellula (ossia con dispendio di energia e mediante l'utilizzo di prodotti di geni specifici) e, per lo più, con significato spesso altruistico, ossia tutte le volte che il sacrificio di cellule singole risulta vantaggioso per l'organismo nel suo complesso.

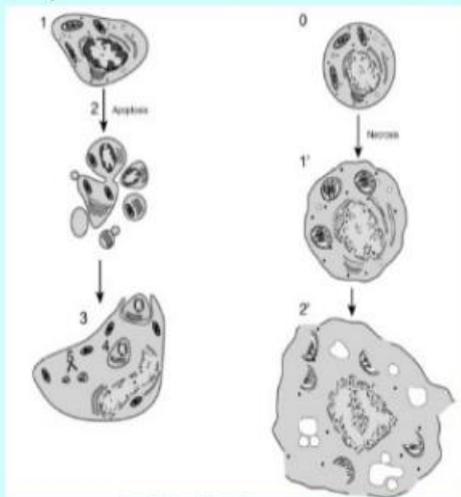
Morte cellulare

Le cellule possono morire attraverso due diversi meccanismi:

la **necrosi** e l'**apoptosi**, una serie di eventi programmati geneticamente, che portano la cellula all'auto-distruzione.

Apoptosi

Perdita di volume
condensazione.
Frammentazione del
nucleo e del citoplasma
in corpi apoptotici.
Non si ha versamento di
contenuto citosolico
nell'ambiente.
Nessun processo
infiammatorio.



Necrosi

Le cellule si gonfiano e
si lisano rilasciando il
materiale
citoplasmatico
nell'ambiente
circostante.
Il processo necrotico è
spesso causa di
infiammazione

APOPTOSI E FATTORI DI CRESCITA – QUALE RELAZIONE?

Una delle funzioni dell'apoptosi all'interno di un organismo pluricellulare è quello di contribuire, insieme alla mitosi, al mantenimento dell'omeostasi numerica. È evidente che i due processi si devono equilibrare tra loro in ogni tessuto e in ogni momento

della vita dell'organismo (nell'accrescimento come nella vita adulta, nel normale turn over come in presenza di patologie) e che un loro squilibrio ha potenzialmente conseguenze molto gravi (aplasia o iperplasia).

Un ruolo molto importante in tale regolazione è giocato dai fattori di crescita (Growth Factors), che non hanno solo la funzione di indurre le cellule bersaglio alla proliferazione (come il termine farebbe supporre – in inglese growth non è propriamente la crescita ma la proliferazione cellulare), ma **svolgono il ruolo di veri e propri fattori di sopravvivenza:** molti tipi cellulari sembra abbiano insito un "programma di morte", che **solo la continua presenza di fattori di sopravvivenza impedisce di attuare.**

Questi aspetti risulteranno più comprensibili dopo aver esaminato le funzioni svolte dall'apoptosi e gli stimoli che possono attivare il programma apoptotico.

1- Nello sviluppo embrionale e fetale, e nella metamorfosi, l'apoptosi porta all'eliminazione di tutte le strutture vestigiali o che svolgono un proprio ruolo solo durante una data fase dello sviluppo. Ad esempio, sono eliminate per apoptosi nei mammiferi le membrane interdigitali che residuano dopo la formazione delle dita a partire da un arto "a paletta", oppure, negli anuri, la coda del girino quando subisce la metamorfosi in rana. L'apoptosi ha un vero e proprio ruolo morfogenetico nello sviluppo del sistema nervoso; infatti il numero, inizialmente elevatissimo, dei neuroni si riduce progressivamente a mano a mano che muoiono per apoptosi le cellule che non sono state in grado di stabilire tra loro e con le cellule bersaglio le corrette relazioni. I contatti cellula-cellula, analogamente ai fattori di crescita, che sono in quantità limitante, costituiscono un fattore di sopravvivenza per queste cellule.

2- Il normale turn-over tissutale si avvale dell'apoptosi per l'eliminazione delle cellule usurate: questo si osserva per esempio negli strati superficiali degli epitelii di rivestimento pluristratificati o all'apice dei villi intestinali, dove la proliferazione delle cellule dello strato basale o situate alla base del villo deve procedere con lo stesso ritmo della morte delle cellule senescenti.

3- Nel sistema immunitario, sia l'eliminazione selettiva delle cellule timiche autoreattive, sia lo spegnimento dei cloni alla fine di una risposta immunitaria si avvalgono dell'apoptosi. Inoltre, le cellule citotossiche del sistema immunitario inducono le cellule bersaglio al suicidio cellulare, inserendovi un enzima analogo alle caspasi, i tipici effettori dell'apoptosi (vedi in seguito). L'apoptosi è quindi molto importante nel sistema immunitario, sia nell'ontogenesi, sia nell'omeostasi, sia nel meccanismo dell'immunità cellulo-mediata.

4- Come abbiamo già accennato, i fattori di crescita sono in quantità limitante e per alcuni tipi cellulari la capacità di legarne a sufficienza ne determina il destino; nel corso della vita post-natale, questo meccanismo consente di adattare in modo molto rapido differenziamento e proliferazione di alcune cellule staminali al fabbisogno dell'organismo. Ad esempio, le cellule emopoietiche pluripotenti sono prodotte nel midollo osseo in numero superiore alle necessità basali; se non si verificano infezioni o emorragie, molte di esse sono destinate ad andare in apoptosi; tuttavia, in caso di

necessità, basterà che l'organismo produca una quantità superiore al normale di un dato fattore o di una combinazione di fattori per indurre sopravvivenza, proliferazione e differenziamento specifico di un numero di cellule superiore al fabbisogno basale.

5- **Anche gli ormoni possono costituire fattori di sopravvivenza** per alcune cellule: due esempi significativi sono costituiti dalle cellule ghiandolari mammarie, che, alla fine della lattazione, vanno incontro ad apoptosi quando viene a cessare lo stimolo della prolattina e dalle metastasi di alcuni tumori prostatici, che dipendono dalla presenza di androgeni.

6- Per alcuni tipi cellulari il contatto cellula-cellula e/o cellula-matrice extracellulare costituisce un fattore di sopravvivenza; il segnale, mediato da una chinasi della famiglia FAK (chinasi delle adesioni focali) si propaga da zone specializzate della superficie cellulare in cui alcune proteine di membrana mediano il rapporto con il citoscheletro. Qualora si verifichi la mancanza di contatto, queste cellule si auto-percepiscono come "inutili" o potenzialmente metastatiche e il suicidio cellulare (che prende il nome di anoikisi, dal greco "senza casa") sarebbe la risposta altruista a tale percezione. Questo meccanismo è anche quello che consente di eliminare, nel corso dello sviluppo embrionale, le cellule in eccesso che non abbiano stabilito le giuste connessioni.

7- Molte sostanze tossiche, farmaci (tra cui numerosi antitumorali), radicali liberi dell'ossigeno e radiazioni ionizzanti causano danni al DNA o gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri: tutte queste condizioni, qualora superino una certa soglia, possono indurre la morte per apoptosi; come si è detto, si tratta di una morte "pulita" che non causa né infiammazione né danni all'organismo. Almeno nel caso del danno genotossico, si tratta probabilmente di un "suicidio altruistico" in quanto le cellule il cui DNA, gravemente danneggiato, non può essere riparato fedelmente potrebbero subire una trasformazione in senso neoplastico.

8- Le infezioni virali fanno anch'esse scattare nella cellula un meccanismo che tende a indurre apoptosi, anche in questo caso per difendere l'organismo intero dalla propagazione virale. Questo meccanismo può però determinare una grave carenza di alcuni tipi cellulari, come si verifica nel caso di infezione da HIV (le cellule colpite sono proprio un tipo di linfociti, destinati alla difesa immunitaria). I virus, come spesso accade, possono però mettere in atto delle contromisure, inducendo la sintesi di inibitori dell'apoptosi.

Il programma apoptotico si avvale di molecole specifiche, i cui geni sono altamente conservati. I prototipi di tali geni furono osservati per la prima volta nel nematode *Caenorhabditis elegans*, la cui importanza per la comprensione dell'embriologia può essere paragonata a quella della *Drosophila melanogaster* per la genetica (a Brenner, Horvitz e Sulston, che descrissero tali meccanismi per la prima volta, fu assegnato nel 2002 il Premio Nobel). Delle 1090 cellule somatiche di questo piccolo verme, 131 muoiono per apoptosi nel corso dello sviluppo embrionale. Questo processo è impedito dalla mutazione di alcuni geni, cui fu dato il nome di ced (da *C. elegans death*). Dei

primi geni identificati, si vide che alcuni (ced-3 e ced-4) inducevano apoptosi, mentre altri (ced-9 ed egl-1, riconosciuto in un secondo tempo) erano anti-apoptotici. Inoltre, dato che gli individui con la doppia mutazione ced-9/ced-3 non avevano apoptosi, si comprese che ced-9 doveva agire a monte di ced-3. Tutto questo fece pensare che il processo fosse soggetto a una complessa regolazione a più stadi. Il primo gene dell'apoptosi clonato nell'uomo fu isolato da una leucemia di tipo B e chiamato Bcl-2 (da B Cell Leukemia-2). Si trattava di un gene anti-apoptotico e si vide che era in grado sia di ibridare con ced-9 sia di sostituirsi ad esso nel nematode mutante: era quindi una proteina altamente conservata nella filogenesi. Come quasi sempre accade, l'evoluzione ha però complicato il meccanismo a mano a mano che si saliva verso gli organismi più complessi, sostituendo a un gene prototipo tutta una famiglia di geni con proprietà simili ma non del tutto sovrapponibili.

Studi condotti su *C. elegans* permisero di suddividere il processo di apoptosi in 3 fasi: 1) induzione; 2) esecuzione; 3) riconoscimento e fagocitosi.

Negli eucarioti superiori, la fase di induzione è regolabile e reversibile, in quanto vede un "colloquio incrociato" (cross-talk) tra stimoli contrastanti (segnali di sopravvivenza e segnali di morte). I diversi stimoli ed eventi apoptogeni seguono due (o forse più) distinte pathways (vie di segnalazione): una attivata da "segnali di morte" che giungono a specifici recettori di superficie, l'altra attivata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio (via recettoriale e via mitocondriale). La segnalazione specifica dell'apoptosi si avvale per lo più di interazioni tra domini omeotipici e non richiede in genere attivazione genica né sintesi proteica de novo. Entrambe le pathways convergono nell'attivazione di proteasi specifiche, dette caspasi. Questo evento segna l'inizio della fase di esecuzione. L'attivazione delle caspasi è determinata da un evento proteolitico e determina a sua volta un'ulteriore cascata di eventi proteolitici e nucleolitici preordinati, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi. La fase di esecuzione richiede energia e, nel caso che l'ATP disponibile non fosse sufficiente per completare il processo di apoptosi, questa potrebbe abortire e sfociare in necrosi (per questo motivo per "morte cellulare programmata" non si intende solo l'apoptosi in senso stretto, ma tutto gli eventi che portano all'apoptosi o alla necrosi a partire da segnali di morte). **La finalità dell'apoptosi è quella di predisporre la cellula ad essere facilmente fagocitata impedendo la fuoriuscita di materiale potenzialmente pro-infiammatorio o immunostimolante.** Si ha quindi la successiva fase di riconoscimento e fagocitosi. La superficie della cellula apoptotica (o dei corpi apoptotici in cui si è frammentata) espone segnali "eat-me" (mangiami!) che la rendono appetibile. Inoltre la cellula emette molecole chemiotattiche che richiamano i macrofagi professionisti. In loro assenza, il compito può essere svolto anche dalle cellule epiteliali vicine. La fagocitosi si attua grazie all'intervento di prodotti genici del fagocita, alcuni dei quali (come i recettori di membrana) possono essere specifici del processo apoptotico. Se (come può accadere in vitro) la cellula apoptotica non può essere fagocitata, esaurita l'energia disponibile, essa non riesce più a mantenere le proprietà di impermeabilità della membrana e va incontro a necrosi secondaria.

I geni dell'apoptosi sono in grado di dare risposte stereotipate a stimoli diversi. Si possono raggruppare nelle seguenti categorie (in colore i geni prototipo di *C. elegans*):

1. recettori di membrana (Fas/APO1/CD95, TNF, TRAIL)
2. adattatori (FADD, APAF-1, ced-4)
3. effettori (caspasi, ced-3, endonucleasi)
4. modulatori (antiapoptotici, come Bcl-2 e ced-9, pro-apoptotici come Bax e egl-1)
5. inibitori (CrmA, cFLIP, survivina)
6. induttori (p53, c-myc, reaper)
7. della fagocitosi (flippasi)

Sono stati identificati più di cinque recettori di membrana, che sembra si trovino già assemblati sotto forma di trimeri. La loro attivazione innesca la via di segnalazione recettoriale. I ligandi possono essere solubili (secreti) o essere presenti sulla superficie di altre cellule che entrano in diretto contatto con la cellula "condannata a morte". (Questo tipo di suicidio indotto da segnali esterni è stato paragonato a quello di Socrate, condannato a bere la cicuta.) Una volta legata la molecola-segnale, i recettori alterano la conformazione del dominio intracellulare, denominato DD (Death Domain), che favorisce così l'assemblaggio di un complesso formato da uno o più adattatori e da una pro-caspasi iniziatrice, come la pro-caspasi 8 (vedi sotto). L'assemblaggio è caratterizzato da interazioni omeotipiche: gli adattatori sono molecole che presentano sia un dominio DD che interagisce col dominio DD dei recettori sia un dominio DED (Death Effector Domain) che interagisce col dominio DED della pro-caspasi. Alcune pro-caspasi, caratterizzate da un dominio CARD (CASPase Recruitment Domain), richiedono un adattatore dotato sia di dominio CARD sia di dominio DD. La via di segnalazione mitocondriale, sopra menzionata, che si può considerare alternativa alla via di segnalazione recettoriale (anche se può essere da questa attivata in seconda battuta) porta alla formazione di un complesso analogo a quello che si costituisce a livello del dominio intracellulare dei recettori di membrana attivati. Anche il complesso di origine mitocondriale comprende un adattatore, APAF-1 (analogo a ced-4) e una pro-caspasi iniziatrice, la pro-caspasi 9; tali molecole interagiscono grazie ad un dominio CARD, che entrambe possiedono. Il complesso di origine mitocondriale (denominato apoptosoma) comprende anche una molecola di citocromo C e una di ATP o di dATP. Come vedremo in seguito, APAF-1 e il citocromo C fuoriescono dal mitocondrio quando i fattori che ne modulano l'integrità di membrana favoriscono il formarsi di pori a livello della membrana esterna.

I complessi che si formano a livello dei domini recettoriali e gli apoptosomi operano dei tagli nelle pro-caspasi iniziatrici, che in tal modo si attivano. Le caspasi (di cui le pro-caspasi sono i precursori) sono i veri e propri effettori dell'apoptosi. Si tratta di enzimi proteolitici il cui centro reattivo è caratterizzato da una Cisteina e che tagliano i loro bersagli a valle di una breve sequenza di quattro aminoacidi, l'ultimo dei quali è

di un residuo di acido ASpartico; sono delle proteASI. Non tutte le caspasi sono coinvolte nell'apoptosi; alcune svolgono altri compiti, come la caspasi 1 che regola l'attività dell'interleuchina (una citochina pro-infiammatoria). Il prototipo delle caspasi apoptotiche è il gene di *C. elegans* ced-3. Le caspasi vengono attivate a cascata da tagli proteolitici a livello di sequenze comprendenti un residuo Asp; i due spezzoni della molecola si uniscono a formare un dimero; le caspasi iniziatrici formano tetrameri (due molecole di caspasi, ciascuna costituita dai due spezzoni) dopo aver perso una porzione regolatrice. Tipicamente, le caspasi iniziatrici (2, 8, 9, 10) attivano le caspasi effettrici (3, 6, 7), ma possono essere anche attivate da queste ultime (amplificazione del segnale).

È interessante una delle modalità con le quali i linfociti citotossici inducono apoptosi nella cellula bersaglio: vi inseriscono infatti una caspasi attivata, il Granzyme B. Per analogia al termine "suicidio cellulare" qualcuno ha in questo caso parlato di "omicidio cellulare"!

Uno dei più importanti bersagli delle caspasi effettrici è ICAD, l'inibitore di CAD (Caspase Activated DNase), un'endonucleasi specifica dell'apoptosi. Una volta liberatasi dall'inibitore grazie all'azione delle caspasi, CAD effettua tagli a doppio filamento nella regione internucleosomica della cromatina, rendendosi così responsabile della frammentazione del DNA tipica dell'apoptosi (vedi sotto). Altre due nucleasi sono attive nell'apoptosi - ENDO G e AIF, che fuoriescono dal mitocondrio insieme agli altri fattori pro-apoptotici. Il taglio proteolitico effettuato dalle caspasi attiva alcune molecole e ne inattiva altre: il fine è quello di portare alla frammentazione della cellula mantenendone integra la membrana plasmatica. Verranno quindi inattivate le molecole coinvolte nella riparazione del DNA (tra cui la PARP, una molecola che porterebbe al consumo di una grande quantità di energia), le laminine dell'involucro nucleare, elementi del citoscheletro, mentre vengono attivate acinus, responsabile della condensazione della cromatina, e la trans-glutaminasi, una molecola che rende più resistente la membrana cellulare.

Prima però che le caspasi effettrici entrino in azione, rendendo irreversibile il cammino verso la morte cellulare, deve essere completata la **fase di induzione, durante la quale vengono soppesati i segnali che giungono alla cellula**. Infatti, una cellula riceve **segnali di morte** per la via recettoriale, oppure innesca un processo endogeno (causato ad esempio da stress genotossici) che attiva la via mitocondriale, ma nel frattempo può ricevere **segnali di sopravvivenza, veicolati da fattori di crescita**, da citochine o da integrine e molecole di adesione. **Quale sarà il risultato finale? Prevarranno i segnali di morte o quelli di sopravvivenza?** È come una partita a scacchi, in cui i due contendenti schierano i propri pezzi, tentano di eliminare quelli dell'avversario e di dominare la scacchiera. I "pezzi" sono costituiti da un'altra categoria di molecole proprie dell'apoptosi, i modulatori, che, così come i pezzi degli scacchi si presentano bianchi o neri, possono essere pro- o anti-apoptotici, ma appartengono tutti alla stessa famiglia di molecole. In *C. elegans* il prototipo di gene anti-apoptotico è ced-9, cui, come abbiamo visto, corrisponde nei mammiferi Bcl-2, mentre il modulatore pro-apoptotico di *C. elegans* è egl-1. La famiglia di Bcl-2 è nei mammiferi una famiglia numerosa, caratterizzata da alcuni domini (BH1, BH2, BH3,

BH4) che consentono l'interazione tra la maggior parte dei membri della famiglia, qualunque sia il loro "schieramento". Nel particolare gioco a scacchi che si svolge nella cellula, le due pathways opposte schierano i propri "pezzi" (che vengono spostati da altre localizzazioni o attivati o indotti ex-novo) sulla membrana esterna del mitocondrio. Semplificando un po', possiamo dire che i dimeri bianco-bianco e nero-nero si rafforzano tra loro, quelli nero-bianco si elidono. Alla fine, vinceranno i più numerosi: la preponderanza di modulatori anti-apoptotici manterrà integra la membrana mitocondriale, mentre la preponderanza di modulatori pro-apoptotici determinerà nel mitocondrio l'apertura di megapori, che causeranno la caduta del potenziale mitocondriale e la fuoriuscita di sostanze pro-apoptotiche. La superficie del mitocondrio è quindi al tempo stesso sede dell'integrazione dei segnali e di un meccanismo di innesco dell'apoptosi.

Attraversando i megacanaloni della membrana mitocondriale esterna, passano nel citoplasma i già nominati adattatore APAF-1 (una ATPasi) e il citocromo C, che contribuiranno alla formazione dell'apoptosoma, e due endonucleasi, ENDO G e AIF. Fuoriescono dal mitocondrio anche alcune molecole, come Smac/Diablo, che inattivano gli inibitori delle caspasi, e inoltre ioni calcio, radicali liberi e glutatione. Per motivi diversi, la fuoriuscita di ciascuna di queste molecole è in grado di amplificare il segnale.

Il mitocondrio è interessato dai fenomeni di apoptosi anche se il segnale parte dai recettori di membrana, in quanto la caspasi iniziatrice attiva un modulatore pro-apoptotico, bid, che si localizza sul mitocondrio. Sembra tuttavia che il coinvolgimento del mitocondrio non sia indispensabile nella via di attivazione recettoriale. Il citocromo C, indispensabile per la formazione dell'apoptosoma, si trova nello spazio intermembrana, debolmente associato alla superficie della membrana esterna, e fuoriesce, insieme alle altre molecole sopra elencate, da canali alla cui formazione partecipano i modulatori pro-apoptotici; tuttavia, quale sia il ruolo esatto dei modulatori e le modalità con cui molecole anti-apoptotiche come Bcl-2 o BCL-XL proteggono l'integrità della membrana mitocondriale e molecole pro-apoptotiche come Bax, Bak o Bid inducono l'apertura di megacanaloni, non è ancora del tutto chiaro. I fenomeni di rigonfiamento del mitocondrio, a volte osservabili, potrebbero essere dovuti alla formazione di pori che coinvolgono entrambe le membrane mitocondriali, in punti di vicinanza tra membrana esterna ed interna. È stato chiamato in causa il cosiddetto canale ionico regolato da voltaggio (VDAC), simile a una porina batterica, situato sulla membrana esterna, e il trasportatore di nucleotidi adenilici (ANT), situato sulla membrana interna. Attraverso tale canale possono passare molecole con massa molecolare relativa (M_r) minore di 1500 Da.

Come abbiamo visto, molecole di provenienza mitocondriale inattivano gli inibitori delle caspasi: infatti, le caspasi, sia quelle coinvolte nella risposta infiammatoria sia quelle caratteristiche dell'apoptosi, non devono assolutamente attivarsi per eventi casuali, per cui sono di norma complessate con inibitori naturali, endogeni, che devono essere rimossi. Inoltre, come abbiamo già notato, vi sono anche meccanismi di inibizione dell'apoptosi di origine virale, che si avvalgono di inibitori delle caspasi codificati dal genoma virale. Un ruolo particolare di protezione della cellula nei

confronti dell'apoptosi è svolto da una importantissima classe di proteine, le proteine dello stress termico (Heat Shock Proteins, HSP); alcuni tipi di HSP legano molecole come il citocromo C, l'APAF-1 o le caspasi, impedendone l'assemblarsi nell'apoptosoma. È il caso di menzionare anche altre modalità di inibizione dell'apoptosi, che sono state riscontrate nelle cellule tumorali, le quali acquisiscono un vantaggio selettivo dall'incapacità di essere indotte all'apoptosi, e riescono così ad eludere gli effetti di farmaci e di trattamenti genotossici. Queste cellule codificano per recettori, adattatori o modulatori pro-apoptotici mutanti, che hanno perso uno dei domini di interazione, per cui non sono più in grado di esercitare il loro ruolo, ma competono con i rispettivi prodotti genici normali. Ad esempio, un adattatore mutante, RIP, ha solo il dominio DD, per cui si lega al recettore attivato dal segnale di morte ma non ne trasduce il messaggio perché non possiede alcun dominio DED o CARD che possa interagire con il corrispondente dominio di una caspasi iniziatrice. Queste molecole sono dette molecole esca perché ingannano il meccanismo di induzione dell'apoptosi. Per inciso, si noti che le molecole con funzione pro-apoptotica (come gli adattatori) possono considerarsi oncosoppressori, e infatti una loro mutazione con perdita di funzione promuove la sopravvivenza; viceversa, le molecole anti-apoptotiche, come Bcl-2, sono proto-oncogeni: abbiamo infatti visto che l'espressione eccessiva (guadagno di funzione) di Bcl-2 è associata a una leucemia linfoide.

Appartengono alla categoria degli induttori un insieme eterogeneo di molecole, in grado di indurre apoptosi attraverso la via mitocondriale, determinando uno sbilanciamento tra modulatori anti e pro-apoptotici a favore dei secondi. Uno di questi prodotti genici è reaper di *Drosophila*, un induttore che si attiva in base a un "orologio interno", ancora per il momento misterioso. Altri induttori si attivano quando la cellula percepisce uno scompenso tra segnali di proliferazione e momento in cui tali segnali vengono inviati (es. myc), altri ancora quando la cellula non riesce a compiere correttamente le tappe del ciclo cellulare a causa di danni al DNA (es. p53). Quest'ultima molecola è giustamente "celebre", in quanto è uno dei più importanti oncosoppressori. Essa viene attivata da danni al DNA, conseguenti a radiazioni ionizzanti o ad altri agenti mutageni, nonché dalla presenza di oncogeni virali. Trattandosi di un fattore di trascrizione, induce la sintesi di diverse proteine, la cui funzione è quella di inibire la progressione del ciclo cellulare finché il DNA è danneggiato. Tuttavia, se il danno persiste – il che si verifica in genere quando il danno è esteso o non riparabile, p53 induce la sintesi di un modulatore pro-apoptotico, bax, che si localizza sulla membrana mitocondriale e favorisce l'apertura dei megacanaloni.

Nel corso del processo apoptotico, una delle prime modificazioni della cellula coinvolge i fosfolipidi della membrana plasmatica: la fosfatidil-serina (PS), localizzata di norma nello strato citosolico, viene trasferita sullo strato esterno con un meccanismo di ribaltamento, "a flip-flop". Questo è sufficiente per additare la cellula ai macrofagi, che percepiscono l'esposizione della PS come un segnale di appetibilità (segnale "eat-me", mangiami!). Alla PS si associano anche altre molecole normalmente citoplasmatiche, come l'annessina I e probabilmente si hanno ulteriori alterazioni delle molecole di superficie, con variazioni che coinvolgono anche gli oligosaccaridi del glicocalice. Tutte queste modificazioni sono percepite da monociti e macrofagi grazie ad una numerosa

schiera di recettori di superficie, tra cui molecole di tipo lectinico (che legano glucidi). I fagociti sono richiamati da segnali chemiotattici, tra cui la lisofosfatidil-colina, rilasciati dalla cellula apoptotica; sono state riconosciute anche le vie di trasduzione del segnale che i fagociti devono attivare per rispondere ai segnali chemiotattici e di fagocitosi.

Le modificazioni biochimiche e morfologiche tipiche dell'apoptosi vengono utilizzate per la valutazione e la quantificazione di questo fenomeno. In genere lo sperimentatore preferisce utilizzare una combinazione di più metodiche per confermare la presenza e valutare l'entità dell'apoptosi. Ad esempio, la microscopia elettronica consente di evidenziare le modificazioni nucleari (condensazione della cromatina, suo addossamento all'involucro nucleare e obliterazione dei pori nucleari), il rigonfiamento dei mitocondri, la disgregazione di strutture citoscheletriche, la frammentazione del nucleo e della cellula stessa in "corpi apoptotici", con sostanziale preservazione delle membrane. L'utilizzo di coloranti fluorescenti che si intercalano al DNA consente di osservare la morfologia nucleare anche al microscopio ottico. La microscopia ottica e la cinematografia pulsata permettono di osservare il caratteristico fenomeno del blebbing, ossia la rapida formazione e il rapido trasformarsi di estroflessioni di superficie, che preludono alla frammentazione cellulare.

Come abbiamo visto, l'endonucleasi CAD, attivata dalle caspasi, effettua dei tagli al DNA a livello della regione internucleosomica, generando quindi frammenti di 200 basi o di lunghezza multipla di 200 basi. Se sottoposti ad elettroforesi, i filamenti di DNA (che sono molecole dotate di carica negativa) migrano verso il polo positivo, con una velocità inversamente proporzionale alla loro lunghezza; una volta visualizzati tramite colorazione, numerosi frammenti di lunghezza definita formeranno bande nette in corrispondenza della zona in cui sono migrati. Questo fa sì che frammenti di 200, 400, 600, 800 ecc. nucleotidi diano luogo ad una tipica immagine "a scaletta a pioli" (ladder), che è una delle caratteristiche distintive dell'apoptosi. In caso di necrosi, invece, le endonucleasi aspecifiche attivate daranno luogo a frammenti di tutte le lunghezze possibili e quindi non si avranno bande nette, ma una specie di "strisciata"; nel caso di cellule integre, infine, il DNA rimane ad alto peso molecolare e non migra, in quanto non riesce a penetrare nelle maglie del gel che costituisce il supporto dell'elettroforesi. Il taglio operato dalle endonucleasi apoptotiche costituisce la base anche della tecnica di visualizzazione TUNEL, che consente di individuare, grazie ad una specifica colorazione, i nuclei di cellule in apoptosi nell'ambito di un preparato istologico osservato con la microscopia ottica. Questa metodica si è rivelata particolarmente utile in quanto ha permesso di scoprire che numerose patologie di cui non si conosce la patogenesi, tra cui molte malattie neurogenerative, avevano la loro base in fenomeni di apoptosi.

Le tecniche di citofluorimetria a flusso sono ampiamente applicate allo studio dell'apoptosi. Esse permettono di studiare contemporaneamente alcuni parametri fisici (come la dimensione cellulare, che risulta ridotta nelle cellule apoptotiche) e il legame con più traccianti fluorescenti, che vengono eccitati dal raggio laser ed emettono luce a lunghezze d'onda diverse. Si utilizza tale tecnica per enumerare le cellule apoptotiche in un campione e valutarne contemporaneamente alcune proprietà. Le

cellule apoptotiche vengono riconosciute, ad esempio, in quanto un colorante che si intercala al DNA, lo ioduro di propidio, emette una fluorescenza minore del normale se il DNA è frammentato; un altro parametro spesso utilizzato per riconoscere in citofluorimetria le cellule apoptotiche è l'esposizione della fosfatidil-serina (che in genere si evidenzia facendola reagire con annessina fluorescente). Con la citometria a flusso è stato possibile evidenziare il processo di perdita del potenziale mitocondriale,, studiando una molecola a localizzazione mitocondriale la cui fluorescenza dipende dall'entità di tale potenziale.

Praticamente ogni molecola coinvolta nel processo apoptotico si può oggi studiare valutandone l'entità, l'eventuale attività enzimatica, lo stato di fosforilazione, l'integrità, la localizzazione con tecniche biochimiche, di immunoprecipitazione e di immunoelettroforesi (Western Blot).

L'ingegneria genetica e la tecnologia del DNA ricombinante hanno consentito di creare modelli animali in cui uno o più geni dell'apoptosi erano del tutto carenti (geni KO). Questi modelli hanno consentito di comprendere l'enorme importanza del fenomeno apoptotico nei processi morfogenetici, in particolar modo nello sviluppo dell'encefalo dei vertebrati che, in mancanza di apoptosi, viene ad essere costituito da un numero abnorme di cellule non funzionali.

Morte cellulare nel sistema immunitario

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è una malattia caratterizzata dal lento deterioramento del sistema immunitario, la cui causa sembra essere una massiccia diminuzione di un gruppo di linfociti T detti 'cellule CD4'. La funzione principale di queste cellule è di controllare e stimolare la risposta immunitaria alle infezioni. Sembra che la morte di tali cellule nei pazienti affetti da HIV, ossia dal virus dell'immunodeficienza umana, avvenga per apoptosi, sebbene gli eventi cellulari che provocano la morte cellulare siano ancora sconosciuti. Ciò che sappiamo con certezza è che, in gran parte, l'apoptosi delle cellule CD4 non è mediata direttamente dal virus dell'AIDS, ma attraverso un meccanismo indiretto. Una volta entrato nella cellula tramite gp120, una delle proteine strutturali del virus che riveste un ruolo fondamentale nel processo che gli consente di prendere contatto con i linfociti CD4, il virus si integra nel genoma cellulare dove rimane finché non è stimolato a replicarsi. La proteina gp120 viene prodotta anche durante il processo replicativo e può essere rilasciata nel siero dove può legarsi ad altre cellule. Se stimolate per dare origine a una risposta immunitaria, queste stesse cellule vanno incontro ad apoptosi invece di proliferare come farebbero in un processo di risposta normale. Perciò, quando una cellula CD4 riceve un segnale di proliferazione, se nello stesso tempo si è legata a una proteina gp120, si comporta esattamente al contrario in risposta ai segnali provenienti dalla proteina virale. Mentre la proteina gp120 e la stimolazione della cellula CD4 attraverso il suo recettore possono essere gli eventi chiave nella stimolazione dell'apoptosi, poco si sa riguardo al modo in cui avviene esattamente l'apoptosi delle cellule CD4. L'effettiva morte cellulare potrebbe essere causata da una molecola della superficie cellulare detta 'Fas' e dal suo ligando (FasL). Negli ultimi anni Fas è

diventata una molecola particolarmente importante per la comprensione dei primi passaggi del meccanismo di apoptosi.

Fas appartiene alla famiglia dei TNF (Tumour necrosis factor) così chiamati per il loro ruolo nella morte cellulare. Essa è espressa sulla superficie di molte cellule del corpo e, quando si lega al suo ligando naturale, induce l'apoptosi. La maggior parte delle nostre conoscenze su Fas deriva dagli studi effettuati sulle cellule del sistema immunitario, dove questa proteina sembra svolgere un ruolo cruciale nell'apoptosi. Nel timo, organo responsabile dello sviluppo dei linfociti T, circa il 99% di tutti i timociti prodotti muore e sembra che la morte avvenga per apoptosi naturale. I timociti esprimono un elevato livello di Fas e vi sono numerose prove del fatto che la morte cellulare osservata in queste cellule sia mediata da Fas. Le mutazioni nella molecola Fas causano la proliferazione dei linfociti; ciò indica che questa molecola è fondamentale nella regolazione dell'equilibrio tra proliferazione e morte dei linfociti. Fas ha inoltre un ruolo nella distruzione delle cellule tumorali a opera dei linfociti T citotossici. In altri termini, i linfociti T citotossici uccidono le loro cellule bersaglio inducendo l'apoptosi; in questo processo sembra essere coinvolta anche la proteina Fas.

Fas è una proteina recettore transmembrana con una coda citoplasmatica contenente un cosiddetto 'dominio di morte'. Tale denominazione è dovuta al fatto che le mutazioni in questa regione della molecola ne bloccano la capacità di indurre la morte cellulare. Uno dei quesiti fondamentali che i ricercatori si pongono riguarda il modo in cui il recettore Fas determini le principali caratteristiche morfologiche e biochimiche dell'apoptosi. La risposta sembra essere la seguente. Quando il ligando di Fas si lega al suo recettore inizia una cascata di eventi che porta all'attivazione della caspasi. Il primo evento in questa cascata è l'aggregazione del complesso Fas/FasL. Il passaggio successivo prevede la formazione di una struttura composta da più proteine chiamata DISC e situata immediatamente al di sotto della superficie della membrana plasmatica. Componenti chiave di questo passaggio comprendono una proteina chiamata FADD che si lega alla coda citoplasmatica di Fas. FADD a sua volta interagisce con la procaspasi-8, evento che determina l'attivazione dell'enzima, la quale poi conduce all'attivazione della cascata mediata dalle caspasi e infine all'apoptosi. L'attivazione di queste vie implica l'esistenza di un interruttore molecolare che interrompe il processo quando ciò si rivela necessario. Nel caso in questione, l'interruttore che interrompe il processo è una proteina detta FLIP, la quale compete con la caspasi-8 per un sito di legame su FADD; ciò regola la velocità con cui la cellula va incontro ad apoptosi.

Morte cellulare nel sistema nervoso

La morte cellulare nel sistema nervoso è stata identificata da quasi un secolo. Nel 1949 Rita Levi-Montalcini dimostrò che nell'embrione di pollo un notevole numero di neuroni andava incontro a morte durante lo sviluppo del sistema nervoso. Questi primi studi aprirono la strada alla comprensione del ruolo svolto dalla morte cellulare nei processi ontogenetici. L'interesse per la morte cellulare nel sistema nervoso ebbe

nuovo stimolo soltanto negli anni Settanta, quando furono presentati i risultati degli importanti lavori sperimentali di Andrew H. Wyllie e dei suoi colleghi.

Studi successivi dimostrarono che la morte cellulare, documentata precedentemente da Levi-Montalcini, era in realtà l'apoptosi. I neuroni morenti mostravano le classiche caratteristiche morfologiche dell'apoptosi e, inoltre, frammentavano il loro DNA in pezzi delle dimensioni di un nucleosoma. Il fatto che l'apoptosi delle cellule nervose fosse un processo attivo dipendente dalla sintesi di RNA e proteine venne dimostrato coltivando cellule neuronali in assenza di fattori di crescita, come per esempio quello delle fibre nervose (NGF, Nerve growth factor). In questo modo le cellule andavano incontro ad apoptosi che poteva essere prevenuta trattandole con un inibitore della sintesi proteica come la cicloesimmide. Attualmente è noto che durante l'ontogenesi viene prodotta un'enorme quantità di neuroni, i quali sopravvivono se possono formare connessioni con le cellule circostanti, altrimenti muoiono. Tali connessioni non soltanto rendono le cellule vitali, ma sono anche utili nella costruzione del sistema nervoso. Quindi, se non si connettono con i neuroni vicini, i neuroni neoformati muoiono; la formazione di connessioni è pertanto, per i neuroni, un incentivo alla sopravvivenza. Una delle caratteristiche delle malattie neurodegenerative degli esseri umani è la morte cellulare nel sistema nervoso centrale. Sebbene ancora si discuta sul fatto che la morte cellulare osservata avvenga oppure no per apoptosi, le prove a disposizione sono a favore dell'apoptosi. Con la perdita di cellule si verifica un deterioramento delle funzioni cerebrali che si manifesta in molti modi. Prevenendo la perdita di cellule cerebrali, è probabile che si possa intervenire efficacemente in malattie quali il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson.