

- Capitolo 1 -
INTRODUZIONE

1.1 Virus e tumorigenesi umana.

I **virus** sono entità acellulari capaci di infettare e comportarsi come parassiti delle cellule degli eucarioti. Hanno un genoma costituito da RNA o da DNA a singola (ssRNA/DNA) o a doppia elica (dsRNA/DNA) avvolto da proteine capsidiche sintetizzate a spese della cellula ospite (**Fig.1**).

Negli ultimi 20 anni sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato un chiaro coinvolgimento dei virus nella **tumorigenesi umana**. Le prime osservazioni riguardo la presenza di virus in neoplasie animali risalgono agli inizi del Novecento, anche se questi risultati per molto tempo sono stati giudicati poco rilevanti, perchè riguardanti esclusivamente tumori non umani (Ellermann *et al.*,1908; Rous, 1911). Tuttavia, in seguito è stata dimostrata l' esistenza di virus anche in cellule tumorali umane, come nel caso del virus di Epstein-Barr (EBV), che negli anni '60 fu identificato mediante microscopia elettronica in una coltura di cellule umane derivata da Linfoma di Burkitt (Epstein *et al.*,1964).

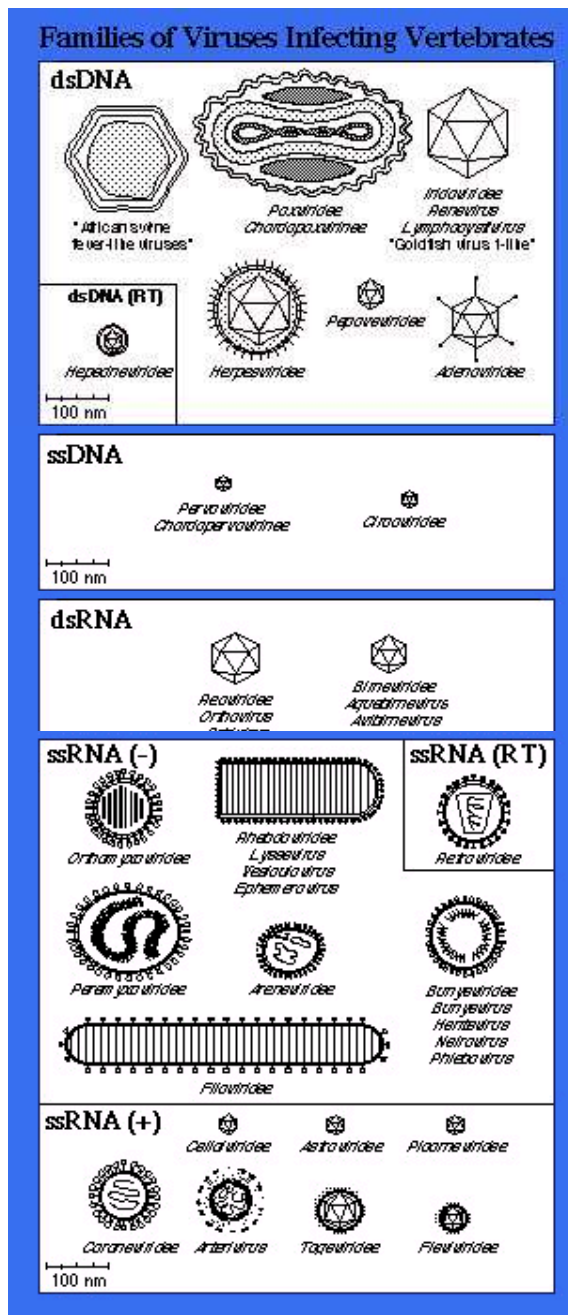


Fig.1. Famiglie di virus. Sono mostrate la variabilità morfologica e le diverse tipologie di genoma che si possono osservare all' interno delle famiglie di virus che infettano i vertebrati.

Si stima attualmente che circa il 15% dei tumori umani noti abbia un' eziologia virale (Parkin *et al.*,1999), con una prevalenza di cancro alla cervice e al fegato e con un' incidenza tre volte superiore nei Paesi in via di sviluppo, come riflesso della più elevata possibilità di trasmissione dei virus tumorigenici.

I virus umani considerati più pericolosi dal punto di vista della tumorigenesi sono gli Hepadnavirus (HBV), gli Herpesvirus (EBV e HHV-8) e i Papovavirus (HPV e i Polyomavirus SV40, JCV e BKV) (Butel, 2000). Tra i virus trasformanti vanno sicuramente ricordati:

- **HBV e HCV**, che predispongono al carcinoma epatocellulare (HCC) (Robinson,1999; Tanaka *et al.*, 1999);
- **EBV**, agente eziologico del Linfoma di Burkitt, del carcinoma nasofaringeo, di linfomi post-trapianto e del morbo di Hodgkin (Jeannel *et al.*,1999; Raab-Traub,1999; Brooks *et al.*,1999);
- gli **HPV ad alto rischio**, che causano cancro alla cervice, alla pelle, alla testa, al collo e a carico del tratto ano-genitale (Howley *et al.*,1999; Zur Hausen, 1996,1999; Herrero *et al.*,1999);
- **HTLV-1**, che induce la leucemia a cellule T dell'adulto (ATL) (Tajima *et al.*,1999);
- **HHV-8 o KSHV**, che è stato correlato al sarcoma di Kaposi, al PEL e alla malattia di Castleman (Chang,1999);
- **SV40**, che è stato associato a tumori cerebrali, all' osteosarcoma e al Mesotelioma Maligno (MM) (Butel *et al.*,1999).

Va inoltre ricordato che possono esistere significative differenze nelle proprietà oncogeniche di differenti **ceppi virali** correlati e che esistono virus che sono associati a neoplasie e contemporaneamente a patologie di tipo benigno (Butel, 2000).

La natura infettiva dei virus consente di distinguerli da tutti gli altri agenti cancerogeni, quali agenti chimici, radiazioni ed ormoni.

A causa della ***diversità soggettiva nella risposta immunitaria***, i livelli di replicazione virale e il tropismo tissutale possono variare da un individuo all' altro. Normalmente, la risposta immunitaria dell' ospite è sufficiente a tenere sotto controllo l' infezione cronica virale, anche se i virus possono adottare numerosi e vari meccanismi di difesa (Whitton *et al.*,1996).

Tuttavia, in caso di immunodepressione le cellule tumorali possono moltiplicarsi agevolmente, a causa dell' insufficienza del sistema di sorveglianza, che non riesce ad eliminare le rare cellule neoplastiche formatesi inizialmente. Non a caso, gli individui più a rischio per l' insorgenza dei tumori associati a virus sono i soggetti sottoposti a terapie immunosoppressive, come i trapiantati e i malati di AIDS (Raab-Traub *et al.*,1999).

1.2 I Recettori Tirosina Chinasi (RTKs).

E' opinione comune che i virus non siano cancerogeni completi, ma piuttosto agiscano come fattori promuoventi la tumorigenesi, che necessitano comunque della cooperazione con altri cofattori di tipo ambientale o con i prodotti di proto-oncogeni cellulari.

Tra questi ultimi vi sono alcuni recettori localizzati sulla membrana plasmatica, dotati di attività enzimatica di tipo tirosina chinasi (**RTKs**). Si sono individuate molteplici sottofamiglie di RTKs (**Fig. 2**), tutte aventi una simile organizzazione strutturale di base e un comune meccanismo di attivazione.

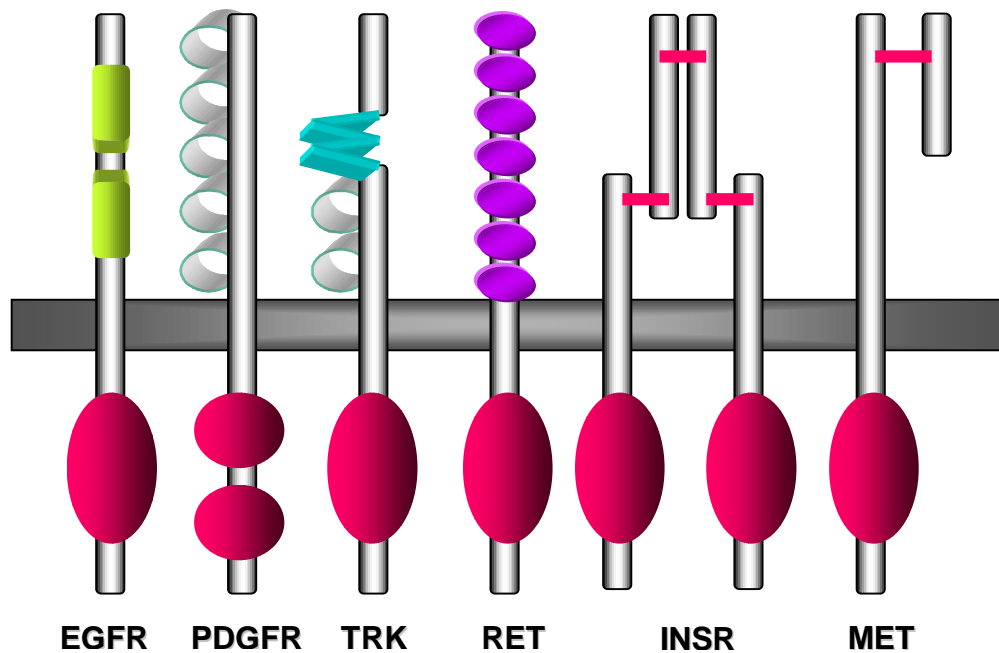


Fig. 2. Sottofamiglie di RTKs. Sono rappresentati i principali motivi strutturali caratteristici dei domini extracellulari dei recettori tirosina chinasi, la cui diversità è fondamentale per assicurare interazioni specifiche con i rispettivi ligandi. Sono raffigurati i domini catalitici (rossi), le regioni ricche in residui di cisteina (verdi), i domini Ig-like (anse), le regioni contenenti cerniere di leucina (azzurre), i domini con sequenze tipiche delle caderine (fucsia) e i ponti disolfuro (barre rosse), che stabilizzano i recettori composti da più subunità, come quelli della famiglia di Met, recettore dell' HGF (eterodimerici) e della famiglia del recettore dell'insulina (tetramerici). Sotto ad ogni tipologia, è riportato un esempio di recettore tirosina chinasi provvisto dei domini sopra indicati.

Ogni RTK transmembrana ha alcune **caratteristiche strutturali comuni** (Yarden *et al.*,1988):

- **DOMINIO EXTRACELLULARE** all' N-terminale, che comprende un' ampia regione idrofila impegnata nel riconoscimento di un ligando polipeptidico avente natura ormonale (es. insulina) o di fattore di crescita (es. EGF, PDGF, HGF). E' composto da centinaia di

amminoacidi (500-850), contiene siti di N-glicosilazione e regioni ricche in residui di cisteina, conservate all' interno della stessa sottofamiglia di recettori e implicate presumibilmente nel mantenimento dell' integrità strutturale.

Questa regione risulta la più variabile sia in struttura primaria sia in struttura secondaria, in modo che sia assicurata un' interazione specifica con il ligando. Tale variabilità è garantita dalla presenza di motivi strutturali specifici di ogni sottofamiglia (**Fig. 2**).

L' ampia estensione di questo dominio induce inoltre a pensare che la sua funzione non sia limitata all' interazione con il ligando, per la quale basterebbero pochi residui amminoacidici, ma sia anche quella di favorire la fase critica di dimerizzazione del recettore e i processi di adesione tra cellule o alla matrice extracellulare attraverso sequenze come quelle della fibronectina o delle caderine presenti in alcuni recettori;

- **DOMINIO TRANSMEMBRANA IDROFOBICO**, che collega il dominio extracellulare con quello citoplasmatico. E' composto da una ventina di amminoacidi idrofobici non conservati seguiti sempre da una serie di residui basici, che assicurano la traslocazione e l' ancoraggio in membrana. Ha fondamentalmente un ruolo strutturale, anche se nel caso dell' oncogene *neu*, ha anche un ruolo funzionale in quanto una mutazione puntiforme in questo dominio induce attivazione costitutiva del recettore in assenza di ligando;

- **DOMINIO CITOPLASMATICO** generalmente molto esteso (500-600 radicali amminoacidici), che è fondamentale per l' innesco di una serie di segnali intracellulari, che si propagano mediante trasduttori. Esso comprende la regione juxtamembrana (circa 50 amminoacidi), il dominio catalitico ad attività tirosina chinasi (circa 250 radicali amminoacidici), sequenze regolatrici attivatrici e inibitorie, contenenti residui di tirosina, serina e treonina e la "coda" nella regione carbossi-terminale.

La *regione juxtamembrana* contiene una sequenza di arresto del trasferimento del recettore attraverso la membrana e, data la sua conservazione all' interno delle distinte sottofamiglie, potrebbe avere un ruolo funzionale.

Il *dominio catalitico* è il più conservato anche tra sottofamiglie distinte; contiene una sequenza consenso (Gly X Gly X X Gly) all' N-terminale della regione catalitica, un sito contenente un residuo di lisina implicato nel legame all' ATP e residui di tirosina implicati nel mantenimento della chinasi in forma attiva e nella auto-transfosforilazione. L' importanza dei radicali di tirosina del recettore e del radicale di lisina, impegnato nel legame con l' ATP, è stata ampiamente dimostrata, attraverso la mutagenesi di questi siti. Si è infatti visto che, nonostante tali mutanti conservino la capacità di riconoscere il loro ligando, essi sono biologicamente inattivi.

La sequenza (*coda*) all' estremità *C-terminale* ha struttura primaria e lunghezza variabile (70-200 radicali), è molto idrofila e flessibile, grazie all' alto contenuto in amminoacidi di piccole dimensioni. La presenza di radicali di tirosina, che vengono fosforilati in seguito all' attivazione del recettore, consente l' interazione con i trasduttori del segnale o con proteine adattatrici.

L' attivazione degli RTKs è fondamentale per dare inizio ai meccanismi di trasduzione del segnale, richiesti per la mitogenesi, la trasformazione e il differenziamento cellulare. Il **modello generale del meccanismo di attivazione** di questi recettori è quello secondo il quale, in seguito al legame della molecola segnale con la regione extracellulare, viene favorita la dimerizzazione (oligomerizzazione) delle molecole di recettore, in modo da avvicinare i domini catalitici dei recettori coinvolti (Lemmon *et al.*,1994). Le modalità di legame al recettore sono molteplici; ad esempio, il PDGF dimerizza prima di legarsi al recettore (Hart *et al.*,1988), HGF e MSP stabilizzano i legami tra due molecole di recettore (Miller *et al.*,1998) e l'insulina si lega ad un recettore già in struttura tetrameric. Inoltre, ci sono casi in cui il ligando è una proteina di

membrana come le efrine che si legano all' EphR o una molecola dalla struttura complessa, come le fibre collagene, che attivano i recettori DDR-1 e DDR-2 (Schlessinger, 1997).

In seguito alla dimerizzazione, inizia la auto-transfosforilazione, un processo in cui ogni recettore fosforila i radicali di tirosina di quello adiacente e parte del dimero e in tal modo si attiva il dominio catalitico. Perciò, ogni recettore si comporta contemporaneamente come un enzima e come un substrato di una reazione enzimatica di fosforilazione, analoga a quella da esso catalizzata. La fosforilazione dei radicali di tirosina specifici del cosiddetto **loop di attivazione**, interno al dominio catalitico, è essenziale per il mantenimento della chinasi nella forma attiva, mentre quella dei radicali di tirosina esterni a questo dominio genera siti di attracco per i domini dei trasduttori del segnale (Schlessinger *et al.*, 1992) (**Fig. 3**).

Riguardo il meccanismo alla base dell' aumento dell' attività catalitica dei recettori, si ipotizza che la fosforilazione seguente alla dimerizzazione serva a stabilizzare il loop di attivazione in una conformazione "aperta", più adatta ad accogliere l' ATP e i substrati della reazione chinasi (Weiss *et al.*, 1998).

L' **attività biologica** predominante di alcuni RTKs è la stimolazione della crescita e della proliferazione, mentre, in altri casi, è il blocco della crescita e l' avvio di un programma di differenziamento. Inoltre, uno stesso recettore può inibire o stimolare la proliferazione, a seconda della linea cellulare in cui viene espresso, grazie all'utilizzo di sistemi di trasduzione del segnale differenti.

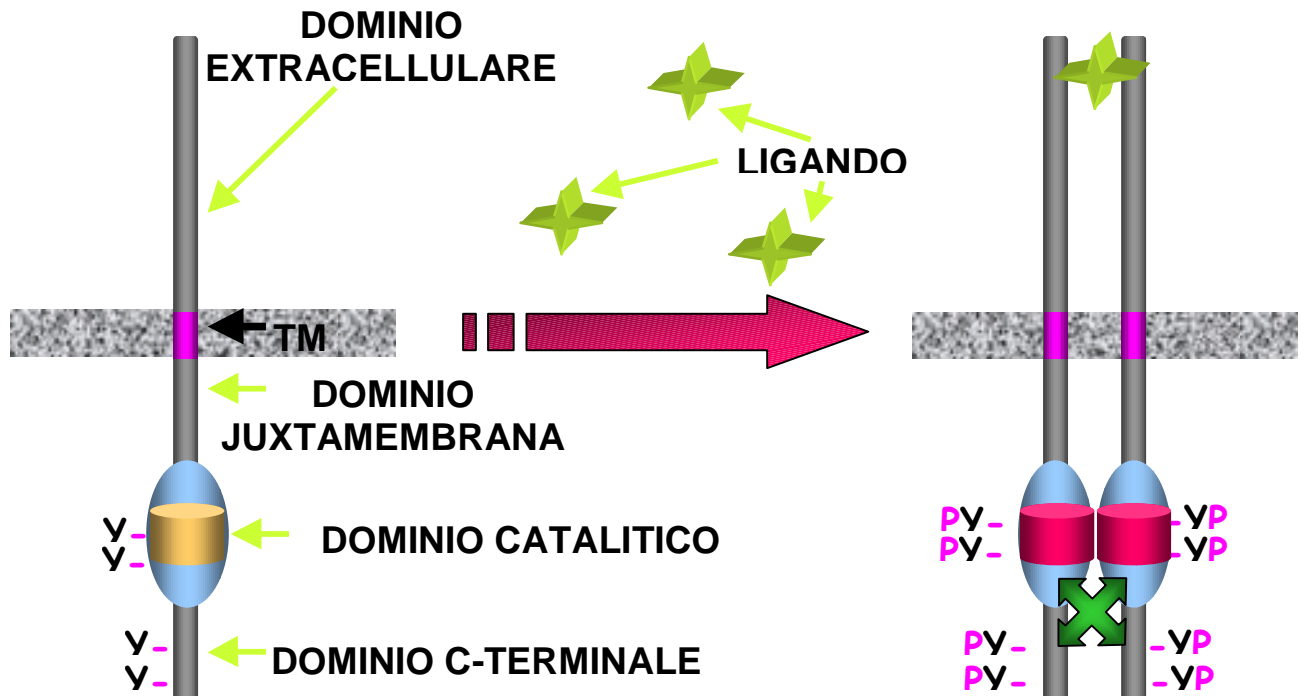


Fig.3. Meccanismo di attivazione degli RTKs. A sinistra è rappresentato il recettore in forma inattiva e a destra il recettore dimerizzato dopo l'interazione con il suo ligando specifico. L'attivazione e la produzione di siti di attracco per i trasduttori avviene attraverso la fosforilazione (P = gruppo fosfato) di radicali di tirosina (Y) specifici posti nel dominio catalitico e nel dominio C-terminale.

I **fattori di crescita** sono modulatori dell'attività biologica degli RTKs. La loro interazione con i recettori espressi in membrana innesca una cascata di segnali biochimici intracellulari, che portano all'attivazione o all'inibizione di geni importanti per la crescita e lo sviluppo. Perciò, è facilmente intuibile che tutte le alterazioni geniche, responsabili dell'espressione deregolata di un fattore di crescita o di una delle componenti delle vie di trasduzione del segnale, possano provocare anomalie dello sviluppo e della proliferazione e quindi tumorigenesi.

Un recettore tirosina chinasi perciò ha **potenzialità oncogeniche**, che, in caso di attivazione, portano a una sovversione dei normali meccanismi di controllo (Aaronson,1991). Queste potenzialità si manifestano in caso di **iperespressione** del recettore, responsabile di un aumento di sensibilità al ligando e di dimerizzazione spontanea, oppure in caso di espressione di un recettore qualitativamente alterato, a causa di **mutazioni** in punti chiave, quali i residui di tirosina o quelli implicati nel legame all' ATP e ai substrati intracellulari. Un altro evento che porta i recettori ad uno stato iperattivato è l' innesco di **circuiti autocrini** all' interno di un tessuto, in cui sono espressi contemporaneamente il recettore e il suo ligando (**Fig. 4**).

ESEMPI	
✓ MUTAZIONI PUNTIFORMI	Neu, c-Kit, Met, Ret
✓ MUTAZIONI ESTESE (es. DELEZIONI)	v-Kit, v-erbB
✓ IPERESPRESSIONE	EGFR, Met
✓ RIARRANGIAMENTI GENICI	Tpr-Met
✓ AUTOCRINIA	MET, EGFR, KDR

Fig. 4. Meccanismi di attivazione oncogenica delle chinasi recettoriali.

1.3 La sottofamiglia di $p190^{Met}$, recettore dell' HGF.

Questa sottofamiglia include:

- $p190^{Met}$, recettore dell' HGF
- $p185^{Ron}$, recettore di MSP
- il prodotto del gene aviario **SEA**.

Questi tre recettori si considerano parte di una stessa sottofamiglia, in quanto condividono

molte caratteristiche:

- **STRUTTURA ETERODIMERICA** stabilizzata da un ponte disolfuro e composta nel caso di p190^{Met}, da una catena α di 50 KDa e da una catena β di 145 KDa che si generano in seguito a taglio proteolitico di un comune precursore glicosilato (Giordano *et al.*, 1989) (**Fig. 5**);

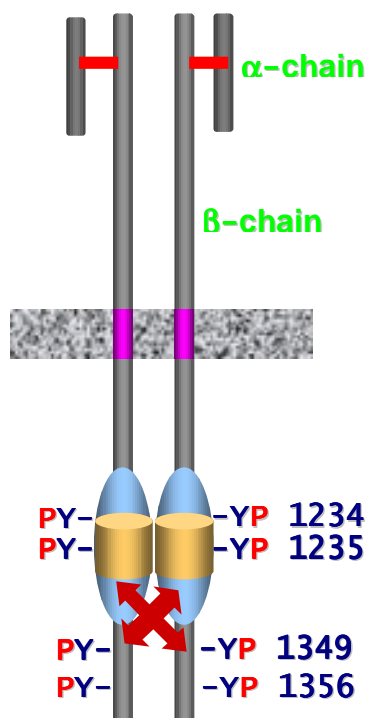


Fig. 5. Struttura di p190^{Met}. Sono rappresentate le catene α e β , tipiche della sua struttura eterodimerica, legate da ponte disolfuro nel dominio extracellulare (linea rossa). Sono anche raffigurati il dominio transmembrana (fucsia), il dominio catalitico (azzurro), i residui di tirosina (Y1234-1235) interni al loop di attivazione (giallo) e le tirosine (Y1349-1356) al C-terminale che richiamano i trasduttori con domini SH2.

- **DOMINIO EXTRACELLULARE**, che lega in modo specifico il proprio ligando
- **DOMINIO TRANSMEMBRANA** contenente amminoacidi idrofobici

- **REGIONE JUXTAMEMBRANA**
- **DOMINIO CATALITICO** ad attività tirosina chinasi, con due tirosine vicine (Y1234-Y1235) responsabili della regolazione dell'attività enzimatica (Ferracini *et al.*,1991; Longati *et al.*,1994) (**Fig. 6**).
- **SITO BIDENTATO AL C-TERMINALE** (Y1349-Y1356) con cui avvengono interazioni ad alta affinità con i domini SH2 dei trasduttori (Ponzetto *et al.*,1994)

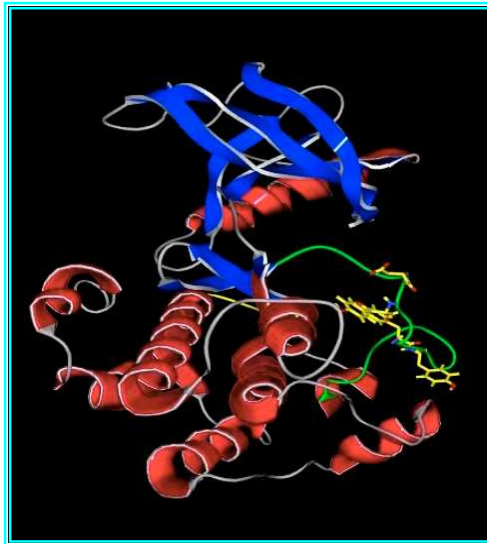


Fig. 6. Struttura tridimensionale del dominio catalitico di c-Met.
In rosso sono rappresentati i domini con struttura secondaria ad α -elica, in blu i piani β , in giallo gli anelli aromatici delle tirosine.

L'espressione di **c-Met** è stata osservata negli epatociti, nelle cellule epiteliali e in diversi tipi di tumore, in cui è risultato spesso iperespresso (Prat *et al.*, 1991).

HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor o Scatter Factor) è il suo ligando ed è un eterodimero stabilizzato da ponte disolfuro, composto da una catena α di 65 KDa e da una catena β di 34

KDa. Induce proliferazione, assunzione di fenotipo fibroblastoide, acquisizione di motilità e **effetto scatter** ossia dissociazione cellulare dovuta alla rottura delle giunzioni cellula-cellula di cellule epiteliali che crescono aggregate, come le MDCK (Madin Darby Canin Kidney) (Stocker, 1989).

1.4 Il Mesotelioma Maligno Pleurico.

1.4.1 - Epidemiologia. Il **Mesotelioma Maligno (MM) della pleura** viene considerato un tumore raro, anche se recenti osservazioni evidenziano che la sua incidenza è destinata ad aumentare nei prossimi anni.

In Italia, il **tasso medio di incidenza** è di 1 e di 0.5 ogni centomila abitanti all' anno rispettivamente nel sesso maschile e in quello femminile. L' incidenza maggiore è nella popolazione maschile e prevalentemente in alcune regioni (LIGURIA, LOMBARDIA, PIEMONTE e FRIULI VENEZIA GIULIA), a testimonianza dell' influenza sostanziale di alcuni settori produttivi a maggior rischio di esposizione all' amianto come l' industria meccanica e le attività portuali. Nel casalese, dove il pregresso insediamento di un' industria per la produzione di manufatti in cemento amianto sta causando una vera e propria epidemia di MM, l'incidenza di tale patologia si attesta sui 16 e sui 13 nuovi casi ogni 100000 abitanti all' anno rispettivamente nel sesso maschile e femminile.

Per quanto riguarda l' incidenza del MM nel mondo, secondo studi recenti inglesi e nord americani, essa sarebbe dell' ordine di 2.2 casi per milione di abitanti. I soggetti più colpiti sono quelli di sesso maschile (70% dei casi) ed età compresa fra i 40 e i 60 anni (Peto et al., 1995-1999).

1.4.2 - Eziopatogenesi. È un tumore maligno che può colpire le membrane sierose di rivestimento dei polmoni (*pleura*) o degli organi addominali (*peritoneo*).

I mesoteliomi sono quasi inesistenti nella popolazione non esposta ad asbesto e rappresentano il 15% dei tumori che colpiscono persone affette da asbestosi. La diagnosi di mesotelioma deve pertanto sempre far sospettare una pregressa esposizione ad asbesto.

Sono stati descritti casi di mesotelioma in persone esposte per motivi ambientali o occupazionali. L' esistenza di mesoteliomi nei residenti e nei familiari mostra che possono essere pericolose anche esposizioni a basse concentrazioni di asbesto. In genere il **tempo di latenza**, ovvero il tempo che intercorre tra l' esposizione ad amianto e la comparsa della malattia, è dell' ordine di decenni e può anche superare i 40 anni dall' inizio dell' esposizione.

I **sintomi** del mesotelioma sono legati ad una compressione degli organi viscerali che sono a contatto con la massa tumorale. Per lo più il primo segno nelle forme toraciche è costituito da un versamento pleurico, spesso emorragico, con rapide recidive, affanno, tosse stizzosa e comparsa insistente di alcune linee di febbre.

La **diagnosi** si basa essenzialmente sulla presenza dei sintomi ed esami radiografici.



Fig. 7. MM pleurico. La foto mostra la massa tumorale rappresentata dall'ispessimento biancastro che circonda l'area scura polmonare.

In tutti i casi sospetti l'indagine viene approfondita con altri esami strumentali, fra cui la T.A.C. e con esami istologici al microscopio di prelievi bioptici (pleuroscopia). In ogni caso la diagnosi differenziale fra tumore polmonare diffuso alla pleura e mesotelioma è spesso difficoltosa.

Il tumore si localizza, almeno inizialmente, alla pleura, che è costituita da una sottile strato di tessuto che riveste da un lato i polmoni e dall'altro la parete toracica ed il diaframma. Tale membrana normalmente consente ai polmoni di espandersi durante gli atti respiratori, anche grazie all'intervento di una modestissima quantità di liquido che agisce da lubrificante.

In caso di mesotelioma si verifica un ispessimento della pleura (**Fig. 7**) e spesso anche un notevole incremento del liquido stesso allo scopo di migliorare la capacità respiratoria.

Il mesotelioma pleurico presenta notevoli difficoltà sul piano diagnostico, terapeutico e della determinazione dell'estensione della malattia o stadiazione.

Il decorso dei mesoteliomi è quasi sempre molto rapido, accompagnato da un progressivo deterioramento delle condizioni generali. Sono possibili diffusioni del tumore ad altre sedi (**metastasi**) per il passaggio delle cellule tumorali nel circolo ematico o linfatico. La **sopravvivenza** è in genere inferiore a un anno dalla scoperta del tumore, e specialmente in soggetti giovani può limitarsi a soli sei mesi.

1.4.3 – Morfologia. Le **forme diffuse** sono prevalenti e caratterizzate da ispessimenti delle pareti di color bianco-grigiastro, con aree necrotiche ed emorragiche. Il processo interessa entrambi i foglietti pleurici e la cavità ne risulta obliterata completamente o parzialmente. In quest'ultimo caso si creano concamerazioni più o meno ampie, ripiene di essudato per lo più emorragico, grigiastro e spesso vischioso.

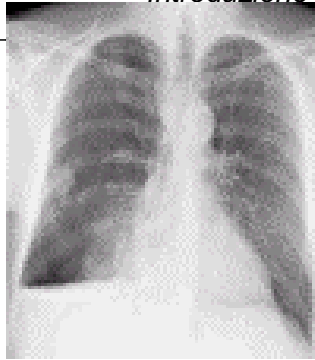


Fig. 8. Forma diffusa di Mesotelioma Pleurico. E' ben evidente nell' immagine la presenza della massa tumorale che ha prodotto il collasso polmonare nella parte destra.

Anche se il processo interessa più estesamente i distretti basali e diaframmatici, esso si estende progressivamente a tutta la superficie pleurica, a quella mediastinica e, al di là di questa, alla parete del lato opposto e alle strutture e ai linfonodi mediastinici, fino a incarcerare completamente il polmone, che appare collassato (**Fig. 8**).

I mesoteliomi circoscritti sono più rari e costituiti da una massa rotondeggiante o plurilobata di volume cospicuo. In alcuni casi può essere individuata in essi una specie di capsula fibrosa. Per lo più sono in rapporto con la pleura parietale, talvolta hanno una specie di peduncolo, ma più spesso hanno una larga base d' impianto. Sul versante parietale tendono a infiltrare le strutture sottopleuriche e anche, oltre la fascia endotoracica, i muscoli intercostali e le costole. Il polmone in genere non è infiltrato.

1.4.4 – Istologia. Il mesotelioma diffuso presenta contemporaneamente, e con diversa prevalenza, cellule di tipo epiteliale e mesenchimale (**Fig. 9**). Le cellule sono di tipo cubico, poliedrico o allungato, con citoplasma eosinofilo e nucleo vescicoloso con nucleoli e si organizzano in isole, cordoni, alveoli o formazioni tubulari, talora papillifere.

Possono coesistere aspetti di tipo indifferenziato con cellule di tipo epiteliale, globose, a citoplasma chiaro, grosso nucleo periferico rotondo e regolare, talvolta con atipie nucleari.

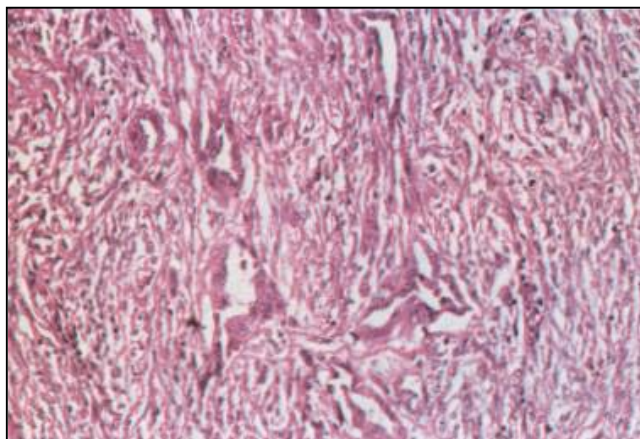


Fig. 9. Campione istologico di MM pleurico

1.4.5 - Terapie. A oggi non sono state individuate terapie efficaci. Il ruolo della chirurgia e della radioterapia rimane a tutt'oggi alquanto controverso ed attualmente si preferisce adottare una strategia terapeutica combinata a base di chirurgia, chemioterapia e radioterapia. Nella malattia avanzata bisogna considerare che questa patologia tumorale risulta al momento poco sensibile ai farmaci chemioterapici.

Nell'ambito dei cosiddetti modulatori della risposta biologica, l'**interleukina-2** ha dimostrato una modesta attività terapeutica per via endopleurica (Astoul *et al.*, 1998) e nella palliazione dei sintomi relativi al versamento pleurico (Castagneto *et al.*, 2001). Sul versante della **terapia genica** si devono segnalare la diffusione endopleurica di adenovirus ricombinante recante il gene suicida dell'Herpes Simplex timidina chinasi (AdRsVtk) seguita dal trattamento con ganciclovir (Albelda *et al.*, 1997).

Studi di biologia molecolare potrebbero aprire nuove e suggestive ipotesi terapeutiche, utilizzando farmaci che inibiscano l'espressione di fattori di crescita cellulare o di altre molecole importanti per la sopravvivenza delle cellule di mesotelioma.

1.5 Asbesto o Amianto.

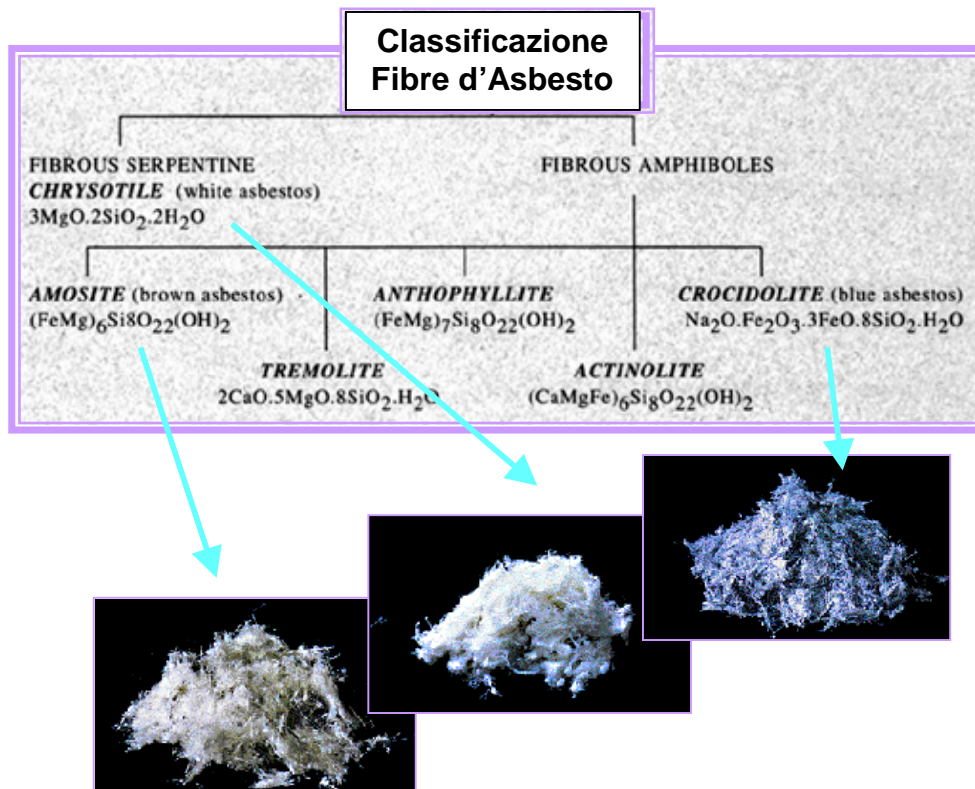
Amianto è una parola derivata dal greco che significa *incorruttibile, perpetuo, inestinguibile*.

E' detto anche asbesto ed è costituito da fibre sottili ma molto addensate, che ne fanno un materiale altamente resistente dal punto di vista meccanico, ma allo stesso tempo flessibile. Resiste a temperature anche di 500° C e, miscelato ad altre sostanze, anche a temperature maggiori. Sotto il nome di amianto sono raggruppati numerosi silicati idrati, di varia composizione chimica, a struttura microcristallina e di aspetto fibroso. I tipi principali di asbesto si dividono in due grandi gruppi:

SERPENTINI (silicati di magnesio) che includono il crisotilo

ANFIBOLI (silicati di calcio e magnesio) di cui fanno parte

- crocidolite (amianto blu);
- amosite (amianto bruno);
- antofillite;
- actinolite;
- tremolite;



L' amianto si trova in natura unito ad altri minerali costituenti la roccia madre dalla quale le fibre devono essere asportate; viene quindi estratto in miniera, dove per successive frantumazioni della roccia che lo contiene, si ottiene la fibra purificata. Le ottime caratteristiche chimiche e meccaniche dell' amianto hanno fatto sì che il suo utilizzo si sia rapidamente diffuso. Per anni è stato considerato un materiale a basso costo estremamente versatile, con estese e svariate applicazioni industriali, edilizie e in prodotti di consumo.

La prima utilizzazione dell'amianto da parte dell' industria risale agli ultimi decenni dell' 800. Nel 1893 inizia in Austria la produzione del cemento-amianto. Nel 1912 in Italia viene costruita una macchina per la produzione di tubi in cemento-amianto.

Qualunque tipo di amianto risulta nocivo per l' uomo (**Fig. 10**). La prima malattia che venne riconosciuta come provocata dalla polvere di amianto fu l' **asbestosi**, che fu descritta in Inghilterra nel 1900. Nel 1934 venne descritto per la prima volta un particolare tumore della pleura, che fu denominato **mesotelioma**, e fu in seguito riscontrato anche nel peritoneo. Mentre l' asbestosi è una malattia tipicamente professionale, i casi di mesotelioma si riscontrano anche fra la popolazione non esposta professionalmente, ma residente in zone ove esistono insediamenti industriali che lavorano amianto. Il mesotelioma è infatti un segnale tipico di

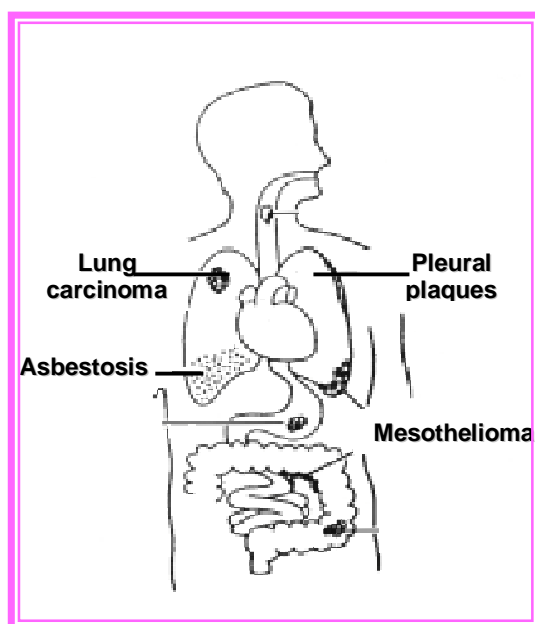


Fig. 10. Patologie da Asbesto.

presenza di amianto, in quanto la quasi totalità dei casi è riconducibile ad una esposizione ad asbesto. Inoltre l' amianto opera una azione sinergica di sostegno ad altri agenti patogeni, rafforzando il loro potere cancerogeno.

Infatti i soggetti professionalmente esposti ad asbesto, oltre a subire una elevata mortalità per le malattie specifiche provocate dall' amianto, subiscono un forte incremento della mortalità in genere, ed in particolare della mortalità per cancro in generale, soprattutto alle vie respiratorie e all' apparato gastro-intestinale.

In Italia la **legge 257 del 27 marzo 1992**, ha sancito la messa al bando dell' asbesto in Italia, quindi nel futuro i rischi da amianto saranno dovuti esclusivamente alle opere di bonifica delle

zone contaminate. Dato poi il lungo tempo di latenza dalla esposizione ad amianto fino alla possibile insorgenza del mesotelioma, l' amianto continuerà ad essere un problema ancora per parecchi decenni.

1.6 Fibre Asbestiformi.

L' alta incidenza di MM in alcuni villaggi della Cappadocia in Turchia sembra essere collegata alla esposizione ambientale all' Erionite, una forma fibrosa altamente nociva del minerale naturale Zeolite e simile per aspetto e proprietà alle fibre di asbesto (Comba *et al.*, 2003).

L' Erionite turca è un forte mutageno (Okayasu *et al.*, 1999) di gran lunga più cancerogeno dell'asbesto in modelli animali e sull' uomo (Carthew *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1990), forse per via della sua alta capacità di legare il ferro in superficie, nonostante il basso contenuto endogeno di questo metallo (Eborn *et al.*, 1995). Similmente all' asbesto induce sintesi di radicali ossidanti (ROS) nei macrofagi, responsabili di danno al mesotelio (Long *et al.*, 1997) e aumentata trascrizione dei proto-oncogeni *c-fos* e *c-jun* (Janssen *et al.*, 1994).

Analogamente, l' Erionite proveniente dall' Oregon, negli U.S.A., è genotossica (Poole *et al.*, 1983) e induce alta incidenza di MM dopo inalazione (Wagner *et al.*, 1985), suggerendo come a sua volta possa essere molto nociva per l' uomo.

Le fibre di Fluoro-edenite sono invece Anfiboli presenti nel piccolo comune di Biancavilla in provincia di Catania e recentemente sono state messe in relazione ai numerosi casi di MM verificatisi tra la popolazione locale che vi si è esposta (Paoletti *et al.*, 2000).

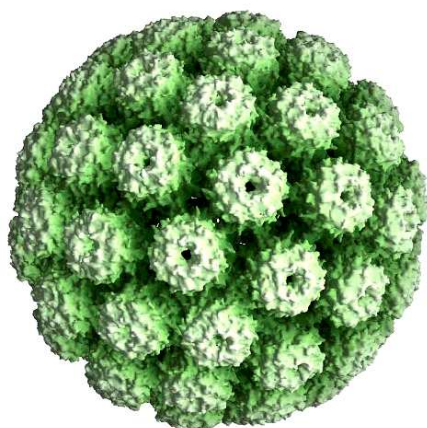


Fig. 11. Struttura tridimensionale del virus SV40.

1.7 SV40 e Mesotelioma.

Anche se l'incidenza del mesotelioma maligno continua ad aumentare nel mondo, come conseguenza di una passata esposizione all'asbesto, almeno il 20% dei casi di mesotelioma registrati negli Stati Uniti non è associato almeno apparentemente a tale esposizione; inoltre, tra coloro che si sono pesantemente esposti, esistono anche casi in cui la neoplasia non si è manifestata (Mossman *et al.*,1996). Perciò, altri agenti cancerogeni potrebbero indurre mesotelioma o potrebbero rendere particolari soggetti più suscettibili agli effetti cancerogeni dell'asbesto. Tra le ipotesi più accreditate, vi è quella di un sinergismo tra l'esposizione ad asbesto e al **virus delle scimmie SV40**, possibile contaminante del vaccino antipolio di tipo Salk, somministrato negli anni '50 (**Fig. 11**).

Esistono infatti studi condotti mediante PCR che dimostrano la presenza nei mesoteliomi di sequenze di DNA specifiche di tale virus e distinte da quelle dei virus correlati BKV e JCV (Galateau-Salle *et al.*,1998). Inoltre, si è spesso provata l' espressione nelle cellule mesoteliali maligne dell' **antigene virale large T (Tag)**, sia in immunoblotting sia in immunoistochimica (Carbone *et al.*,1997; De Luca *et al.*,1997).

Il virus SV40 (Simian virus) è un piccolo virus a DNA circolare che si replica in cellule di primati ed appartiene alla famiglia dei Polyomavirus. Durante un' infezione produttiva, la regione precoce del virus (**early region**) viene trascritta e quindi tradotta per sintetizzare i cosiddetti **antigeni T**, così chiamati in quanto la prima volta furono isolati in cellule *tumorali*. Essi sono proteine a collocazione nucleare con funzioni diverse, che agiscono durante il ciclo litico del virus, in quanto necessarie per l' espressione della regione tardiva e per la replicazione del DNA virale (**Fig. 12**).

Large T Antigen (Tag) è una proteina del peso di 90 KDa, che può legare la sequenza SV40ori (origine di replicazione del genoma virale) ed è l' unica proteina indispensabile alla replicazione del DNA di SV40 non fornita dalla cellula ospite. E' dotata di attività elicastica sostenuta dall' ATP, che consente lo svolgimento locale del DNA in corrispondenza dell' origine di replicazione. La sua attività topoisomerasica le consente invece di continuare a svolgere il

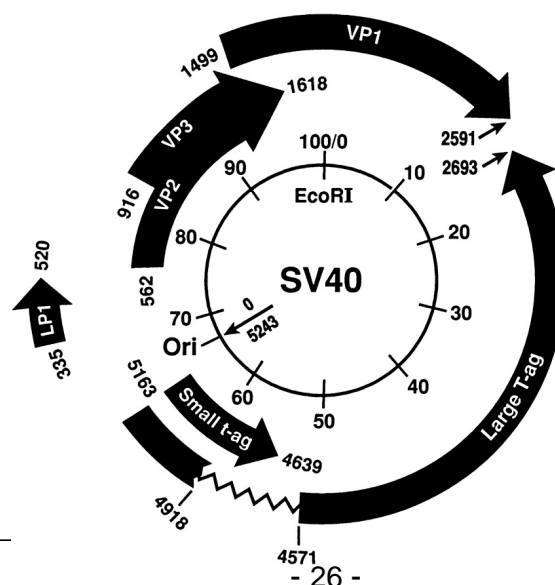


Fig. 12. Schema del genoma di SV40. Sono indicate le regioni codificanti gli antigeni Tag e tag e le proteine capsidiche tardive VP1, VP2 e VP3.

duplex, in modo da generare la forcella di duplicazione.

Studi sperimentali hanno dimostrato che l' iniezione intrapleurica di SV40 è in grado di indurre MM nel 100% degli animali da esperimento (Cicala *et al.*, 1993). Questo virus, come accade tipicamente per tutti i Polyomavirus, può svolgere la sua azione trasformante sia in seguito ad integrazione nel DNA delle cellule umane, sia agendo in forma libera nel citoplasma con un meccanismo di tipo episomale.

Tag agisce quale **agente trasformante in base ad almeno tre meccanismi** (Barbanti-Brodano *et al.*, 2004):

- inattivando i prodotti di oncogeni soppressori
- inducendo l' espressione di fattori di crescita
- favorendo aberrazioni strutturali cromosomiche quali aneuploidia o mutazioni puntiformi

La potenzialità trasformante del virus è dovuta prevalentemente alla capacità di Tag di legarsi e inattivare i prodotti di geni oncosoppressori, tra i quali **p53** e i prodotti della famiglia del retinoblastoma (**Rb**) (**Fig. 13**). Si è infatti visto in linee di mesotelioma maligno che Tag e p53 sono frequentemente coespressi e che tra loro avviene un' interazione avente un effetto stabilizzante e inattivante su p53. A conferma di ciò, si è anche visto che nei casi in cui Tag e p53 sono coespressi, non c'è traccia di espressione dell' inibitore del ciclo cellulare **p21**, che viene normalmente indotta da p53 solo se essa è attiva e funzionale (Carbone *et al.*, 1997).

Analogamente, si è trovata un' interazione tra le proteine della famiglia del retinoblastoma (pRb/p105, p107, pRb2/p130) e Tag in molte linee di mesotelioma maligno. Come conseguenza, vengono disattivati i prodotti di antioncogeni, la cui funzione è quella di impedire

che i fattori trascrizionali della famiglia E2F si vadano a legare a sequenze di geni richiesti per la progressione nel ciclo cellulare. Perciò, inattivando le proteine della famiglia di pRb, i fattori E2F risultano derepressi e la proliferazione cellulare diviene incontrollata (De Luca *et al.*, 1997).

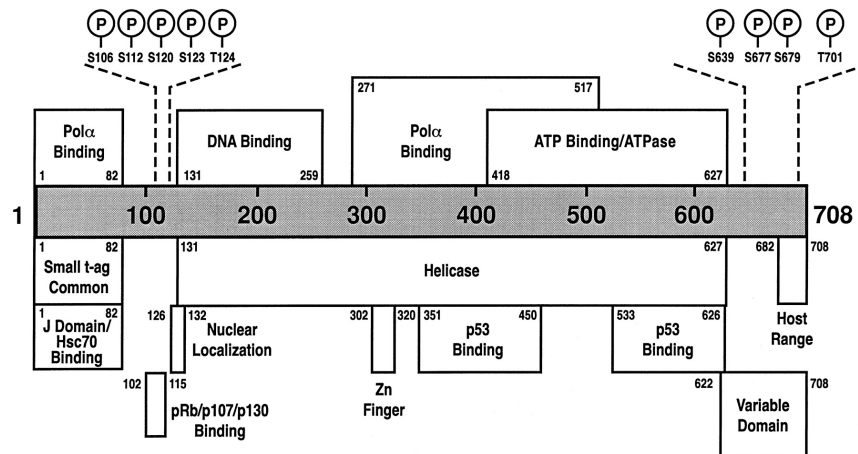


Fig. 13. Domini del genoma di SV40 coinvolti nel legame a p53 e pRb.

Il fatto che non sempre nelle linee di mesotelioma maligno venga trovato Tag può essere spiegato ammettendo che tale proteina giochi un ruolo negli stadi iniziali della cancerogenesi, legandosi a p53 e ai prodotti di altri geni oncosoppressori, e che possa non essere più indispensabile una volta che nelle cellule tumorali si sono accumulate sufficienti mutazioni da consentire al tumore di progredire (**meccanismo Hit and Run** – Bouchard *et al.*, 1988). Un'altra possibilità è che SV40 abbia soltanto un ruolo secondario nell'insorgenza del mesotelioma maligno rispetto ad altri agenti cancerogeni come l'asbesto (Carbone *et al.*, 1997).

Per quanto concerne **small t antigen (tag)**, esso sarebbe in grado di contribuire alla trasformazione attraverso l'inattivazione della fosfatasi PP2A (Rundell e Parakati, 2001), l'aumento di attivazione dell'enzima **telomerasi** (Foddis *et al.*, 2002), importante per la sopravvivenza cellulare e l'aumento di espressione di **Notch-1**, regolatore del ciclo cellulare

(Bocchetta *et al.*, 2002).

In considerazione dell' associazione frequente fra virus SV40 e mesotelioma pleurico (circa 60% dei casi)(Carbone *et al.*, 1999), di indubbio interesse è un possibile impiego a scopo terapeutico di anticorpi diretti contro gli antigeni Tag e tag dell' SV40 stesso.

In tale ambito comunque sono ancora molti i problemi aperti, soprattutto relativamente alla fattibilità del trattamento nell' uomo.

1.8 Morte cellulare: Apoptosi e Necrosi

Fino all' inizio degli anni Sessanta si riteneva che le cellule fossero entità immortali e che la loro morte fosse un evento patologico legato a grossolane perturbazioni dell' omeostasi, quali ipossia, ischemia, ipertermia o avvelenamento da tossine, che portavano alla **necrosi** di vaste porzioni del tessuto colpito. La morte cellulare appariva quindi come un fenomeno non fisiologico e dannoso per l' organismo. Le successive esperienze di Leonard Hayflick dimostrarono invece che le colture *in vitro* non si mantenevano indefinitamente, ma si esaurivano spontaneamente dopo un certo numero di duplicazioni. Apparve chiaro, dunque, che le cellule invecchiavano e morivano fisiologicamente. Nel 1965 John Kerr, studiando i diversi quadri di morte cellulare che si verificavano negli epatociti, descrisse un nuovo tipo di morte con caratteristiche diverse da quelle della necrosi (Kerr, 1965). Nel 1972 lo stesso Kerr e Searle proposero per esso il nome di **apoptosi** (Kerr *et al.*, 1972), dal termine greco col quale si indica la caduta delle foglie.

L' apoptosi sembra essere presente in tutti gli eucarioti multicellulari. L'eliminazione di cellule invecchiate, potenzialmente danneggiate, infettate da virus, trasformate, o che semplicemente non servono più, si traduce in ultima analisi in un vantaggio per l' organismo. Alla luce di questi dati, era stato ipotizzato che l' apoptosi si fosse sviluppata solo negli organismi multicellulari,

probabilmente come meccanismo di difesa dalle infezioni virali (Vaux *et al.*, 1994). Recentemente tuttavia, l' esistenza di fenomeni in certa misura comparabili all' apoptosi sono stati descritti anche in organismi procarioti, suggerendo un' origine evolutiva comune con l'apoptosi dei metazoi.

1.8.1 - Aspetti morfologici. A differenza della cellula necrotica, quella apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine perdendo altresì le specializzazioni di membrana ed esponendo componenti, normalmente nascoste o poco espresse, della membrana plasmatica. Queste vengono riconosciute dalle cellule vicine, che operano la fagocitosi della cellula morente.

L' organizzazione interna è mantenuta, almeno nelle fasi precoci del processo, mentre a livello nucleare si osserva la disgregazione del/i nucleolo/i, il taglio della lamina, la condensazione e il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 paia di basi o multipli interi di questi numeri, lunghezza che corrisponde a quella dei tratti di DNA internucleosomale. Granuli compatti di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo, formando spesso una caratteristica figura a mezzaluna. Frammenti discreti di materiale nucleare raggiungono in seguito la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (***blebbing***). Queste *blebs* si staccano dal corpo cellulare trascinando con sé parte del citoplasma e del materiale nucleare, dando origine ai cosiddetti ***corpi apoptotici*** che vengono fagocitati dalle cellule vicine (***Fig.14***).

Dato che non si ha versamento di contenuto citosolico nell' ambiente circostante, non ha origine alcun processo flogistico secondario. Tutto il processo non dura che una-due ore e colpisce solamente alcune cellule all' interno di un tessuto, rendendone così difficoltosa l'identificazione (Majno e Joris, 1995).

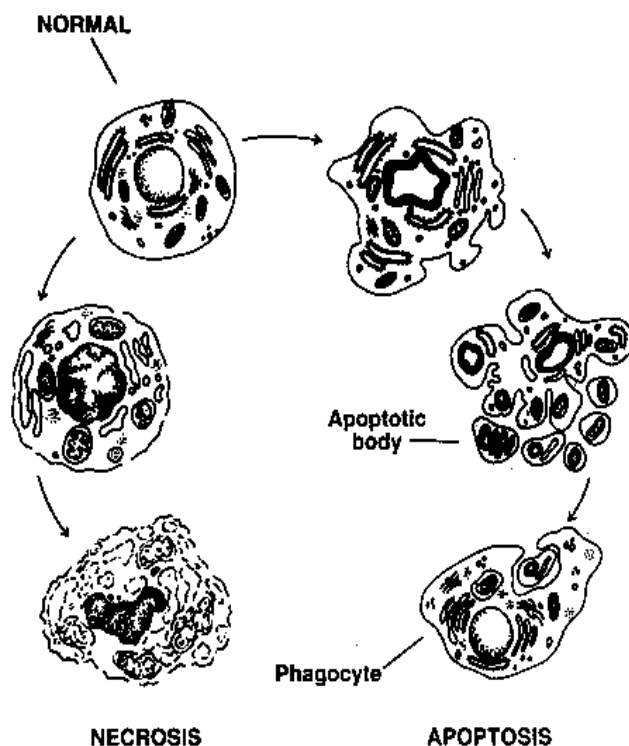


Fig. 14. Aspetti morfologici dell' apoptosi e della necrosi. Si noti la formazione dei caratteristici corpi apoptotici e la generale conservazione dell' organizzazione strutturale interna osservabili solo durante la morte per apoptosi e non per necrosi.

1.8.2 - Significato biologico. La sequenza di eventi molecolari, biochimici e morfologici dell'apoptosi richiede una regolazione molto fine, talvolta accompagnata da espressione genica e sintesi proteica (Golstein *et al.*, 1991), nonchè un alto consumo di energia che ha portato fin dall'inizio a pensare che si trattasse di una forma di **morte cellulare programmata (Programmed Cell Death, PCD)**, diretta in tutto o in parte dalla cellula apoptotica stessa. La scoperta di numerosi geni, tra cui alcuni proto-oncogeni come *c-jun*, *c-fos*, *c-myc* (Buttayan *et al.*,

1988; Grassilli *et al.*, 1992), coinvolti a diverso titolo in questo processo, ha confermato tale ipotesi. In effetti, la morte cellulare per apoptosi è parte integrante dello sviluppo embrionale e fetale dell' organismo e dell' omeostasi tissutale dell' adulto.

Nell' uomo, processi apoptotici sono coinvolti in:

- sviluppo embrionale (Kerr e Harmon, 1991)
- sviluppo del sistema nervoso centrale (Naruse e Keino, 1995)
- atrofia tissutale endocrino-dipendente (Kyprianou e Isaacs, 1988)
- *turn-over* cellulare (Wyllie *et al.*, 1980)
- selezione timica (Kappler *et al.*, 1987)
- reazioni di citotossicità (Cohen e Duke, 1992)
- spegnimento delle risposte immunitarie (Cohen e Duke, 1992)

Anche in numerosi processi patologici, quali, ad esempio, infezioni virali (AIDS), tumori e malattie autoimmuni, una deregolazione dell' apoptosi può essere la base o una delle cause della patogenesi della malattia (Banda *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1994).

1.8.3 - Meccanismi molecolari. I meccanismi genetici e molecolari dell' apoptosi furono identificati per la prima volta nel Nematode *Caenorabditis elegans*. Basandosi sugli studi eseguiti su questo animale, si è stabilito di suddividere **il processo apoptotico in 4 fasi:**

- 1. induzione;**
- 2. esecuzione;**
- 3. riconoscimento e fagocitosi del corpo cellulare;**

4. *degradazione dello stesso da parte della cellula fagocitica.*

Questi passaggi, e i geni che li governano, sono ampiamente conservati lungo la scala evolutiva, dal verme fino all'uomo.

Sono state scoperte nell' uomo proteasi chiamate **casпси** analoghe a quelle del nematode *C. elegans*. L' attività delle casпси è indispensabile nella fase esecutiva dell' apoptosi, in quanto esse inattivano alcune proteine necessarie per la sopravvivenza cellulare, come, ad esempio, gli enzimi coinvolti nella riparazione del DNA, e ne attivano invece altre necessarie per la morte della cellula, quali le endonucleasi che degradano il DNA.

1) **Fase di induzione.** Un ruolo fondamentale nell' innescare il processo di apoptosi è giocato dalla presenza o dall' assenza di ben precisi stimoli fisici o chimici portati da molecole segnale. Queste molecole, di origine esogena od endogena, innescano percorsi biochimici diversi (**private pathways**) per giungere ad attivare la fase centrale di esecuzione del programma di morte. Questa fase centrale, su cui paiono convergere tutte le *private pathways*, è stereotipata ed irreversibile (**common pathway**) e porta ai cambiamenti morfologici e biochimici tipici dell' apoptosi. Fra le *private pathways* alcune sono ubiquitarie (ad esempio, quella innescata dalla proteina **p53**), altre invece come quella innescata dalla proteina **Fas** sono presenti solo in alcuni specifici tipi cellulari e si attivano esclusivamente in determinati momenti.

p53. Le cellule normali non hanno la capacità di proliferare indiscriminatamente, a causa dell' azione repressoria dei prodotti di alcuni geni ubiquitari, tra cui *p53* e *pRb*. Il prodotto di *p53* è una proteina dal peso molecolare di 53 kDa (da cui il nome) associata alla cromatina e alla

matrice nucleare, sia di cellule normali che neoplastiche. La sua entrata nel nucleo è mediata dal legame con alcune proteine *chaperone*, in particolare con la *heat shock protein* Hsp70. *p53* è considerato un gene oncosoppressore, in quanto la sua attività è in grado di arrestare la crescita delle cellule trasformate (Packham e Cleveland, 1995). Un danno al DNA, dovuto ad esempio a radiazioni ionizzanti, può attivare *p53*, la quale blocca la progressione del ciclo cellulare nella fase G₁, favorendo la riparazione del DNA. Se la riparazione è produttiva, il ciclo cellulare può riprendere e la cellula sopravvive; nel caso invece che il danno sia troppo esteso ed irreparabile, *p53* promuove l'apoptosi della cellula (Cotter e McCarthy, 1994) (**Fig. 15**).

p53 è una proteina che lega il DNA, in grado di riconoscere un motivo simmetrico di 10 bp e di attivare la trascrizione dei geni i cui promotori contengono copie multiple di questo motivo. In alcuni *loci*, al contrario, reprime la trascrizione. Attraverso questa regolazione genica, *p53* controlla il ciclo cellulare. La perdita della funzione di *p53* o di *pRb*, anch' essa legata al controllo del ciclo cellulare, porta alla crescita incontrollata delle cellule affette e contribuisce alla formazione di tumori, come dimostrato da alcune patologie neoplastiche, quali la sindrome di Li-Fraumeni (mutazione autosomica dominante di *p53*), o il retinoblastoma infantile (mutazione somatica di *Rb* o delezioni della banda q14 del cromosoma 13 dove *Rb* è localizzato).

Fas. L' innesco di apoptosi può anche essere avviato dal legame di specifiche molecole-segnale con i propri recettori posti sulla membrana plasmatica. Ne è un esempio il legame del recettore Fas col suo ligando Fas-L (Nagata e Golstein, 1995) (**Fig. 15**).

Fas, precedentemente indicato anche come **APO-1**, ed ora classificato come **CD95**, è una proteina di superficie appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF-NGF. In questo caso l' apoptosi è mediata dal reclutamento di diverse proteine citosoliche sul cosiddetto **death domain** di Fas, essenziale per la generazione del segnale di morte. In pochi secondi il legame

di Fas-L induce infatti la oligomerizzazione del recettore Fas, che provoca a sua volta il reclutamento delle proteine citosoliche **FADD/MORT1** ad attività adattatrice.

Su queste si aggancia poi la **caspari 8** (precedentemente nota come FLICE/MACH) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). Altre caspasi sono poi di seguito attivate a cascata dalla prima, portando alla fine all'idrolisi dei loro substrati citosolici e nucleari (Enari *et al.*, 1995). Un altro meccanismo più lento innescato dall'interazione Fas/Fas-L è legato all'attivazione di una fosfolipasi C specifica per la fosfatidilcolina e di una sfingomielinasi acida (Cifone *et al.*, 1994). I ceramidi generati dall'idrolisi della sfingomielina inducono apoptosi nelle cellule emopoietiche, attraverso la sintesi del ganglioside GD3 (De Maria *et al.*, 1997). L'apoptosi da GD3 sembra agire a valle delle caspasi, in quanto non può essere bloccata da specifici inibitori di queste ultime.

Altre vie di innesco. L'apoptosi può essere provocata in molti altri modi, ad esempio rimuovendo dal mezzo di coltura fattori importanti per la sopravvivenza cellulare, come i fattori di crescita (Kerr *et al.*, 1972). Un'altra importante causa di apoptosi è la riduzione di disponibilità di molecole di ATP. Pare infatti che esista un rapporto tra la forma tri- e di-fosfato dei nucleotidi adeninici (1:5) al di sotto della quale la cellula va incontro a morte. Se il calo di ATP è massiccio ed improvviso, la cellula muore per necrosi; se invece è più moderato, per apoptosi (Leist *et al.*, 1997).

Anche la deregolazione di importanti messaggeri intracellulari, quali il Ca^{2+} (Richter e Kass, 1991) e di enzimi regolatori quali la proteina chinasi C (PKC) (Bertrand *et al.*, 1994) può indurre apoptosi in un'ampia varietà di tipi cellulari, presumibilmente agendo sull'attivazione di enzimi coinvolti nel processo apoptotico.

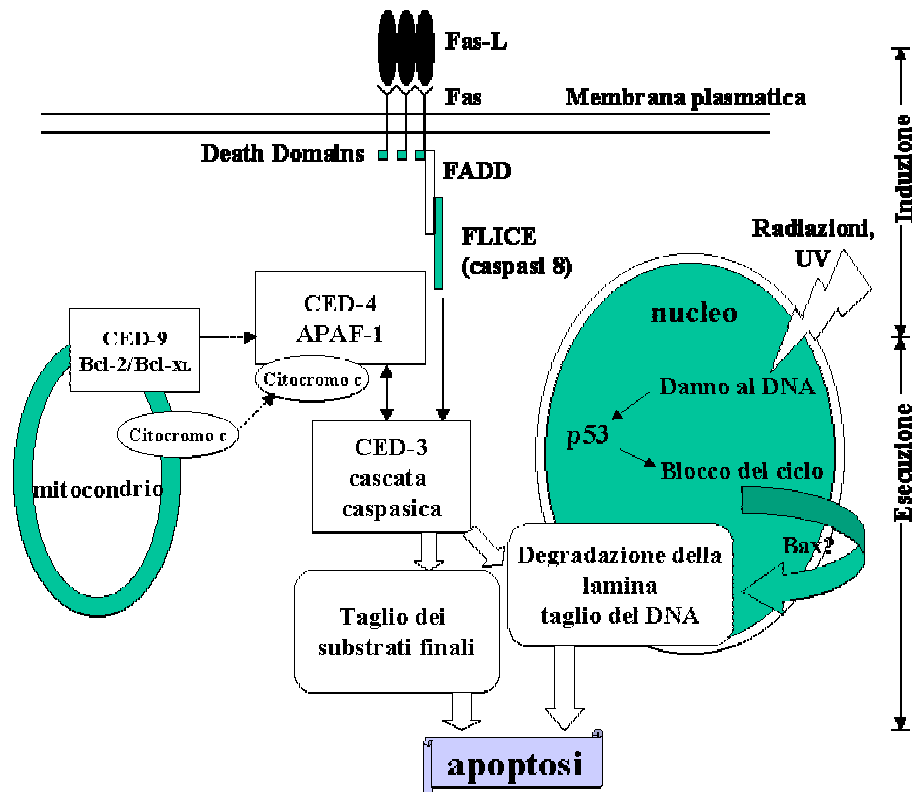


Fig. 15. Schema riassuntivo delle fasi del processo apoptotico innescato dai geni CED del nematode *C. elegans*, da Fas e da p53.

2) Fase di esecuzione. La fase di esecuzione sembra essere comune a tutte o quasi le vie d' innesco ed è costituita da una serie di reazioni enzimatiche a cascata. Una volta innescata, la reazione non è più arrestabile, se non da alcune proteine virali o da specifici inibitori peptidici del sito catalitico (Kumar e Lavin, 1996). Come per il *C. elegans*, gli enzimi coinvolti sono delle **caspari** (*cysteiny*l *aspartate-specific proteinases*) (Alnemri *et al.*, 1996), proteasi caratterizzate da un' assoluta specificità per i residui di aspartato. A differenza del *C. elegans*, in cui è presente la singola caspari CED-3, nell' uomo sono state identificate almeno 10 di tali proteine (Porter *et al.*, 1997), suddivisibili in tre principali sottofamiglie: quella di **ICE**, che comprende, oltre ad ICE, le caspari 4 e 5; quella di **CPP32**, o caspari 3, comprendente le

caspasi 6, 7, 8, 9, e 10 e quella di ***Ich1/Nedd-2***. La prima gioca un ruolo prevalentemente nei processi infiammatori, mentre la seconda è coinvolta nell' apoptosi.

Le caspasi sono presenti in forma inattiva nel citoplasma; ognuna di esse è attivata dalla precedente e, a sua volta, attiva la seguente, fino ad arrivare al taglio dei substrati finali. Questi includono proteine coinvolte nella riparazione e duplicazione del DNA, nello *splicing* dello RNA, nel mantenimento della struttura citoscheletrica, nella divisione cellulare, nella frammentazione del DNA, ecc.

L' omologo umano di *CED-4* di *C. elegans* è una proteina dal peso molecolare di 130 kDa ad attività regolatrice in grado di attivare le caspasi e, per questo, indicata come ***APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1)*** (Zou *et al.*, 1997). APAF-1 può essere associato all'omologo umano del prodotto del gene *CED-9* di *C. elegans*. Nell' uomo, questo gene è stato identificato per la prima volta in un linfoma a cellule B, e per questo chiamato ***bcl-2***.

Bcl-2 rappresenta il capostipite di una famiglia di geni che include sia membri ad attività antiapoptotica (*bcl-2*, *bcl-x_L*) che proapoptotica (*bax*, *bad*, *bak*) (Vaux *et al.*, 1988; Reed, 1994). Le proteine di questa famiglia si trovano localizzate sulla membrana nucleare, su quella mitocondriale esterna e su quelle del reticolo endoplasmatico. Bcl-2 può interagire con diverse proteine, tra cui R-Ras, una variante non trasformante di Ras, e la serina-treonina chinasi Raf-1, suggerendo un suo possibile ruolo modulatorio su una delle vie di trasduzione del segnale che controllano la morte cellulare. Principalmente però, Bcl-2 si lega ad altri membri della sua famiglia per formare omodimeri od eterodimeri, il cui significato funzionale varia da proapoptotico (Bax/Bax; Bcl-x_S/Bcl-x_S) ad antiapoptotico (Bcl-2/Bcl-2, Bcl-x_L/Bcl-2), a seconda che all' interno della cellula prevalgano i membri pro-apoptotici o quelli antiapoptotici. In particolare, i membri pro-apoptotici della famiglia, essendo in grado di sequestrare quelli antiapoptotici, fungono come una sorta di "ago della bilancia" nel determinare la sensibilità di una cellula in risposta ad uno stimolo nocivo (Korsmeyer, 1995).

Si pensa poi che la funzione principale di queste proteine sia quella di regolare la corretta omeostasi elettrochimica degli organelli su cui sono localizzati tramite la partecipazione, con ruolo di controllo, a strutture che formano canali ionici nelle membrane. Tuttavia, non è da escludere che l'attività antiapoptotica di Bcl-2, similmente a quella di CED-9, possa essere basata sul legame e sequestro di APAF-1 dal citoplasma.

Da quando è stata scoperta la localizzazione di Bcl-2 nei mitocondri e la necessità del citocromo c per l'innescamento delle caspasi, è stato ipotizzato per questi organelli un ruolo cardine nella fase di esecuzione (Susin *et al.*, 1997). In effetti, nei mitocondri, Bcl-2 pare essere legato a complessi, formati da un dimero di porine mitocondriali VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*) e da due molecole del trasportatore di nucleotidi adeninici (AdNT) (Zoratti e Szabò, 1995). Questi complessi, localizzati nei punti di contatto tra la membrana mitocondriale interna e quella esterna, danno origine a strutture chiamate pori mitocondriali, la cui apertura è regolata da Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , ADP, voltaggio, ma anche dalle proteine della famiglia di Bcl-2 (Zamzami *et al.*, 1996). L'apertura di questi pori provoca fenomeni di transizione di permeabilità della membrana mitocondriale, con conseguente abbassamento della differenza di potenziale elettrico.

Questo contribuirebbe a stabilizzare l'apertura del poro, con entrata di soluti, rigonfiamento della matrice, distensione delle creste e aumento del volume mitocondriale. In conseguenza di ciò, si avrebbe la rottura della membrana esterna, con fuoriuscita di proteine localizzate nello spazio intermembrana, fra cui il citocromo c. Recentemente, è stato isolato anche un altro fattore contenuto nello stesso compartimento e in grado di indurre attivazione caspatica. È stato chiamato **AIF (Apoptosis Inducing Factor)**, e sembra vicariare il ruolo di APAF-1 ed avere esso stesso attività proteasica (Susin *et al.*, 1996).

3-4) Fasi finali del processo apoptotico. Il riconoscimento e la fagocitosi dei corpi apoptotici, risultanti dalla degradazione della cellula, completano il processo di morte cellulare programmata. Queste fasi, tuttavia, sono ancora poco conosciute rispetto a quelle di innesco ed esecuzione. Nei tessuti i corpi apoptotici sono rapidamente fagocitati dalle cellule circostanti e/o dai macrofagi e degradati all' interno dei lisosomi. Sono stati finora identificati tre diversi sistemi mediante i quali i fagociti (professionali o occasionali) riconoscono i corpi apoptotici. A seconda del tipo cellulare e del fagocita interessato possono essere utilizzati il recettore delle asialoglicoproteine, quello della vitronectina VnR/CD36, o quello della fosfatidilserina (PS) (Savill *et al.*, 1993) (**Fig. 16**).

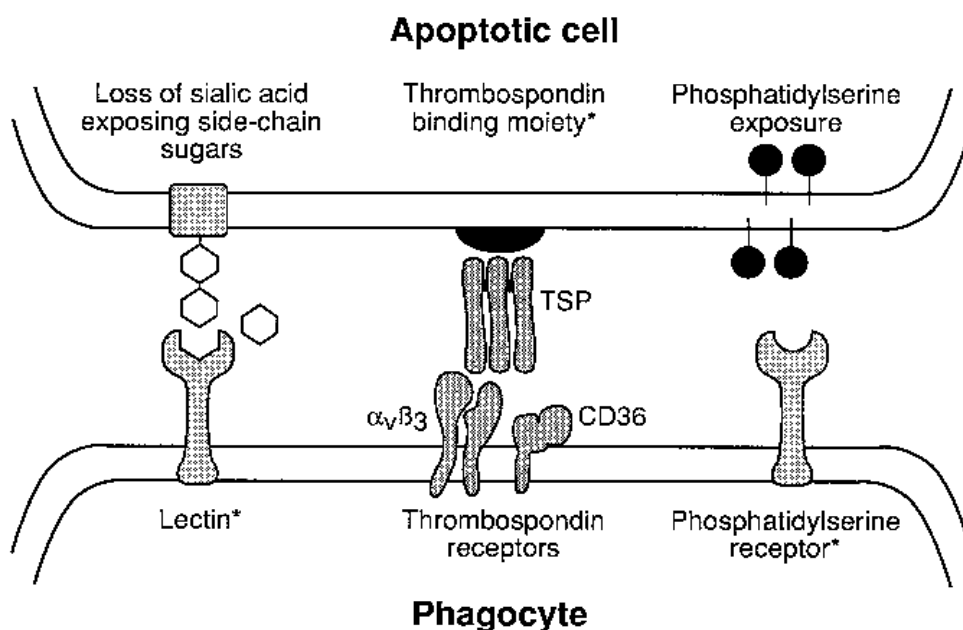


Fig.16. Meccanismi di riconoscimento delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi. Normalmente i residui di fosfatidilserina sono situati sulla faccia citoplasmatica della membrana; nelle cellule apoptotiche l' asimmetria del foglietto lipidico viene persa in seguito all' attivazione dell' enzima scramblasi che trasloca i residui di PS sulla faccia esterna della membrana.

Si pensa che la scelta del meccanismo di riconoscimento usato dai fagociti sia influenzato, oltre che dal tipo cellulare coinvolto, anche da stimoli provenienti dal microambiente. Quale che sia la modalità con cui le cellule ed i corpi apoptotici vengono riconosciuti e fagocitati, il risultato finale è sempre quello di un' eliminazione "pulita", senza sconvolgimento dell' architettura strutturale del tessuto e senza innesco di un processo flogistico.