

La cellula come unità di salute e malattia

Richard N. Mitchell

CONTENUTI DEL CAPITOLO

Il genoma 1

Il DNA non codificante 1
Organizzazione degli istoni 3
MicroRNA e RNA lunghi non codificanti 4
MicroRNA 4
RNA lunghi non codificanti 5
Editing genetico 6

Funzioni della cellula 6

Membrana plasmatica: protezione e acquisizione di sostanze nutritive 8
Trasporto di membrana 9

Citoscheletro 11
Interazioni cellula-cellula 12
Apparato biosintetico: reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi 13
Eliminazione dei rifiuti: lisosomi e proteasomi 13

Metabolismo cellulare e funzione mitocondriale 15

Attivazione cellulare 16

Segnalazione cellulare 16
Vie di trasduzione del segnale 17

Proteine modulari di segnalazione, hub e nodi 19
Fattori di trascrizione 19

Fattori di crescita e recettori 19

Matrice extracellulare 21

Componenti della matrice extracellulare 22

Mantenimento delle popolazioni cellulari 26

Proliferazione e ciclo cellulare 26
Cellule staminali 27
Medicina rigenerativa 29

Il termine *patologia* significa letteralmente lo studio della *sofferenza* (dal greco *pathos* = sofferenza, *logos* = studio); più comunemente, nel senso applicato alla medicina moderna, è lo *studio della malattia*. Virchow è stato profetico nell'affermare che le malattie hanno origine a livello cellulare, e oggi sappiamo che le patologie cellulari derivano da perturbazioni nelle molecole (geni, proteine e metaboliti) che regolano la sopravvivenza e i comportamenti delle cellule. Da questo punto di vista, la base della patologia moderna è comprendere le aberrazioni *cellulari e molecolari* che danno origine alle malattie. È utile considerare queste anomalie nel contesto della normale struttura e funzione cellulare, che è l'oggetto di questo capitolo introduttivo.

Sarebbe improponibile (e persino inesatto) condensare il vasto e affascinante campo della biologia cellulare in un solo capitolo. Più che tentare una revisione completa, quindi, l'obiettivo di questo capitolo è quello di esaminare principi di base e sottolineare i progressi scientifici recenti rilevanti per lo studio dei meccanismi di sviluppo delle malattie, che sono centrali nel resto del libro.

IL GENOMA

Il sequenziamento del genoma umano all'inizio del 21° secolo è stato un risultato epocale della scienza biomedica. Da allora, la rapida diminuzione del costo del sequenziamento, la crescente capacità computazionale di estrarre i dati che ne derivano e sempre migliori strumenti di analisi per gli output funzionali (genomica, proteomica e metabolomica) promettono di rivoluzionare la nostra comprensione della salute e della malattia. Le nuove conoscenze hanno anche fatto emergere un incomparabile

livello di complessità ben oltre la sequenza lineare del genoma. Il potenziale di queste potenti innovazioni per spiegare la patogenesi della malattia e guidare la scoperta terapeutica appassiona e ispira allo stesso modo gli scienziati e un più ampio pubblico.

Il DNA non codificante

Il genoma umano contiene circa 3,2 miliardi di coppie di basi di DNA. Tuttavia, nel genoma vi sono soltanto circa 20.000 geni che codificano per proteine, che costituiscono solo circa l'1,5% del genoma stesso. Questi sono i modelli su cui si basa la costruzione di enzimi, elementi strutturali e molecole coinvolte nella trasduzione del segnale all'interno dei 50 trilioni di cellule che compongono il corpo umano. Sebbene 20.000 sia un valore approssimativo, probabilmente inferiore al numero reale di proteine codificate (la maggior parte dei geni produce molteplici trascritti di RNA che a loro volta codificano per differenti isoforme proteiche), è tuttavia sorprendente osservare che i vermi composti da meno di 1.000 cellule e un numero di genomi 30 volte minore contengano ugualmente circa 20.000 geni codificanti per proteine, e la maggior parte di tali proteine siano chiaramente omologhe a molecole che si trovano negli esseri umani. Quindi, che cosa distingue gli esseri umani dai vermi?

Una risposta definitiva ancora non c'è, ma le conoscenze suggeriscono che gran parte della differenza risieda nel 98,5% del genoma umano che non codifica per proteine. La funzione di tali lunghi tratti di DNA (la cosiddetta "materia oscura" del genoma) è rimasta per molti anni avvolta nel mistero. Ora si è compreso che oltre l'85% del genoma umano viene trascritto; quasi l'80% è preposto alla regolazione dell'espressione genica. Ne consegue che se da un lato le proteine forniscono gli elementi

costitutivi fondamentali e i meccanismi necessari per assemblare le cellule, i tessuti e gli organismi, le regioni non codificanti del genoma provvedono al complesso “progetto architettonico”. In pratica, la differenza tra i vermi e gli esseri umani risiede apparentemente più nei “progetti” che nei materiali da costruzione.

Si distinguono cinque principali categorie di sequenze funzionali non codificanti per proteine nel genoma umano (Fig. 1.1):

- Regioni *promoter* ed *enhancer* che forniscono siti di legame per fattori di trascrizione.
- Siti di legame per elementi che organizzano e conservano le strutture di cromatina di ordine superiore.
- *RNA regolatori non codificanti*. Più del 60% del genoma è trascritto in catene di RNA che non vengono mai tradotte ma regolano l'espressione genica mediante diversi meccanismi. Le due varietà più studiate, microRNA (miRNA) e RNA lunghi non codificanti (lncRNA,) sono descritte più avanti in questo capitolo.
- Più di un terzo del genoma umano è costituito da *elementi genetici mobili* (per esempio, *trasposoni*). Questi geni che possono cambiare la loro posizione nel genoma possono muoversi all'interno dello stesso nel corso dell'evoluzione, con conseguente numero di copie e posizionamento variabili anche tra specie strettamente correlate (per esempio, esseri umani e altri primati). Sebbene siano coinvolti nella regolazione genica e nell'organizzazione della cromatina, la funzione degli elementi genetici mobili non è ben compresa.
- Particolari regioni strutturali di DNA, in particolare *telomeri* (regioni terminali dei cromosomi) e *centromeri* (regioni di co-

strizione che separano il cromosoma). Un componente importante dei centromeri è il cosiddetto DNA satellite, costituito da grandi parti — fino a megabasi di lunghezza — di sequenze ripetute (da 5 bp fino a 5 kb). Sebbene classicamente associato all'attacco dell'apparato del fuso, il DNA satellite è anche importante nel mantenere l'organizzazione densa e strettamente avvolta dell'eterocromatina (discussa più avanti).

Molte variazioni genetiche (polimorfismi) associate a malattie sono localizzate in regioni non codificanti del genoma. Di conseguenza, una variazione nella regolazione dei geni potrebbe dimostrarsi più rilevante, nel provocare malattie, di quanto non lo siano i cambiamenti strutturali di proteine specifiche. Un'altra sorpresa emersa dal sequenziamento del genoma è che ogni essere umano ha in generale un DNA identico a quello di un altro per oltre il 99,5% (e per il 99% identico a quello di uno scimpanzé). Pertanto la variazione individuale, compresa la suscettibilità differente alle malattie e agli stimoli ambientali, è codificata in meno dello 0,5% del nostro DNA (che rappresenta circa 15 milioni di bp).

Le due forme più comuni di variazioni del DNA nel genoma umano sono i polimorfismi a singolo nucleotide e le variazioni del numero di copie.

- I polimorfismi a singolo nucleotide (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNP) sono variazioni nelle posizioni di un singolo nucleotide e sono quasi sempre biallelici (vale a dire che a livello di un determinato sito esistono solo due scelte nella popolazione, come A o T). Sono stati identificati oltre 6 milioni di SNP umani, molti dei quali presentano ampie variazioni di frequenza nelle diverse popolazioni.

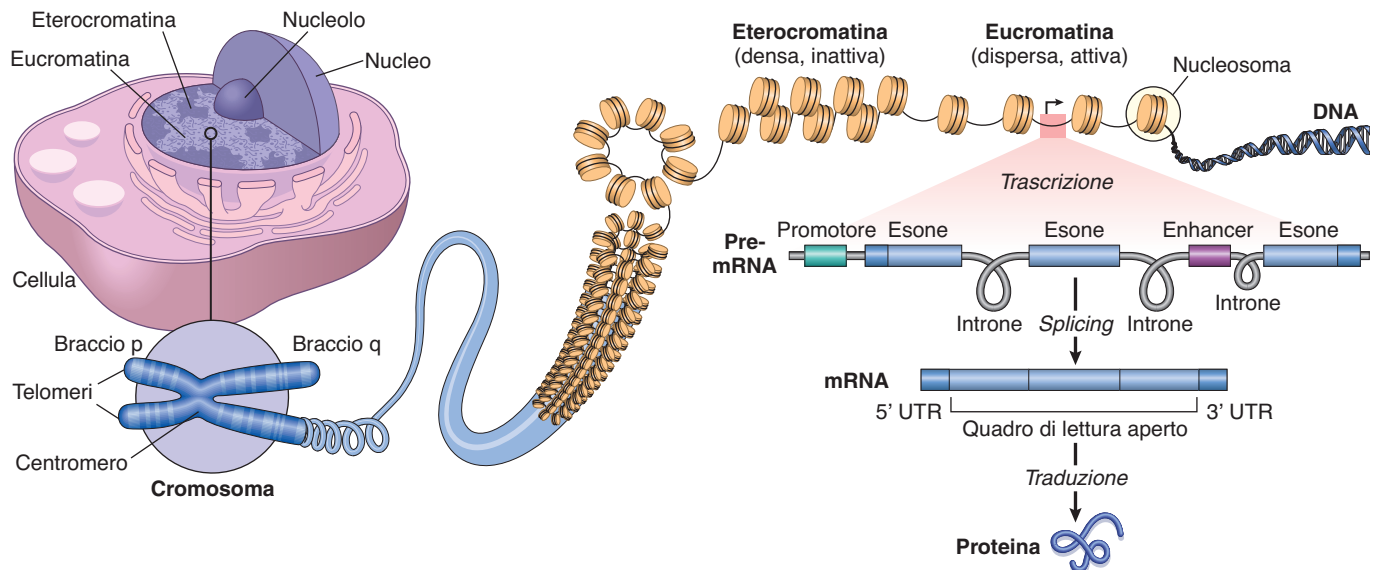


Figura 1.1 Organizzazione del DNA nucleare. A livello di microscopico ottico, il materiale genetico nucleare è organizzato in eucromatina dispersa e trascrizionalmente attiva, o in eterocromatina densamente compatta e trascrizionalmente inattiva; la cromatina può essere anche meccanicamente connessa alla membrana nucleare e una sua perturbazione della membrana può quindi influire sulla trascrizione. I cromosomi (come mostrato in figura) possono essere visualizzati solo durante mitosi. Nel corso della mitosi, sono organizzati in coppie di cromatidi connessi ai centromeri; i centromeri sono la sede della formazione del cinetocore, un complesso proteico che regola la segregazione cromosomica durante la metafase. I telomeri sono sequenze di nucleotidi ripetitive presenti nelle terminazioni dei cromatidi e consentono una replicazione ripetuta dei cromosomi senza deterioramento dei geni in prossimità della fine. I cromatidi sono organizzati in bracci brevi “P” (“corti”) e lunghi “Q”. Il pattern di bandeggiatura caratteristico dei cromatidi è stato attribuito al contenuto relativo di GC (le bande contengono meno GC rispetto alle interbande), e i geni tendono a situarsi nelle regioni tra le bande. Singole fibre di cromatina sono formate da una serie di nucleosomi (DNA avvolto intorno a nuclei di istoni ottamerici) connessi tra loro mediante linker di DNA. I promotori sono regioni non codificanti di DNA che danno inizio alla trascrizione genica; si trovano sul medesimo filamento e a monte del gene corrispondente. Gli enhancer possono modulare l'espressione genica a distanza anche di 100 kB e più, avvolgendosi sui promotori e favorendo il reclutamento di ulteriori fattori che attivano l'espressione di RNA pre-messaggero (pre-mRNA). Le sequenze introniche sono tagliate (“spliced out”) dal pre-mRNA per generare l'RNA messaggero finale che verrà tradotto in proteina, senza la regione 3'-5' non tradotta (UTR). Oltre agli enhancer, ai promotori e alle sequenze UTR, in tutto il genoma sono stati riscontrati altri elementi non codificanti incluse brevi sequenze ripetute, regioni che legano fattori di regolazione, RNA regolatori non codificanti e trasposoni distribuiti in tutto il genoma.

- Nel genoma gli SNP possono essere presenti negli esoni, negli introni, nelle regioni intergeniche e nelle regioni codificanti.
- Circa l'1% degli SNP si osserva nelle regioni codificanti, che è ciò che ci si aspetta da una distribuzione casuale, dal momento che le regioni codificanti costituiscono circa l'1,5% del genoma.
- Gli SNP situati in regioni non codificanti possono trovarsi tra elementi genomici di regolazione, alterando così l'espressione dei geni; in tali circostanze l'SNP influenza direttamente la propensione a contrarre malattie.
- Si pensa che alcuni SNP, definiti varianti "neutre", non abbiano alcun effetto sulla funzione genica o sul fenotipo individuale.
- Anche gli SNP "neutri" possono essere marcatori utili quando ereditati insieme, perché spazialmente vicini a un polimorfismo associato a una malattia. In altri termini, l'SNP e il gene suddetto si trovano in *associazione genetica preferenziale*.
- L'effetto della maggior parte degli SNP sulla predisposizione verso una malattia è poco rilevante e resta da verificare se l'identificazione di tali varianti, da sole o in combinazione, possa essere utilizzata per elaborare efficaci strategie per identificare i fattori di rischio, ed in ultima analisi prevenire la malattia.
- Le variazioni del numero di copie (Copy Number Variations, CNV) sono modalità di variazione genetica consistenti in differenti quantità di ampi frammenti contigui di DNA: i range di variazione vanno da 1.000 fino a milioni di coppie di basi. I CNV possono essere biallelici e semplicemente duplicati o, in alternativa eliminati in alcuni individui. In altri casi si verificano riarrangiamenti complessi del materiale genomico, con varianti multiple nella popolazione umana.
 - I CNV sono responsabili di sequenze differenti tra due individui che coprono dai 5 ai 24 milioni di coppie di basi.
 - Circa il 50% delle CNV contiene sequenze codificanti; pertanto, le CNV possono essere responsabili di un'ampia percentuale delle diversità dei fenotipi umani.

È importante notare che variazioni nella sequenza del DNA non possono spiegare da sole la varietà dei fenotipi negli esseri umani; inoltre, la classica eredità genetica non riesce a spiegare fenotipi differenti nei gemelli monoziogoti. Le risposte a questi dubbi probabilmente possono trovarsi nell'*epigenetica*, la serie di modificazioni ereditabili nell'espressione genica non causate da variazioni della sequenza del DNA (si veda sezione seguente).

Organizzazione degli istoni

Sebbene di fatto tutte le cellule dell'organismo hanno la medesima composizione genetica, per effetto del differenziamento cellulare esse presentano strutture e funzioni distinte che derivano da programmi di espressione genica specifici per un dato clone (*lineage*) cellulare. Tali differenze nella trascrizione e traduzione, specifiche per ogni tipo di cellula, dipendono da *fattori epigenetici* (letteralmente, fattori che stanno "sopra la genetica") che possono essere definiti nel modo seguente (Fig. 1.2):

- *Istoni e fattori che modificano gli istoni.* I *nucleosomi* sono costituiti da segmenti di DNA lunghi 147 bp avvolti intorno a una struttura centrale di nucleoproteine ben conservate, caratterizzate da un basso peso molecolare, chiamate *istoni*. Il complesso DNA-istone che ne risulta ricorda una serie di biglie unite da brevi sequenze di DNA. Il DNA libero di una singola cellula umana è lungo circa 1,8 m. Avvolto intorno agli istoni come una bobina di spago, l'intero genoma può essere raccolto in un piccolo nucleo, con un diametro fino a 7-8 μm . Nella maggior parte dei casi, questo DNA struttura-

to, noto come *cromatina*, non è avvolto in maniera *uniforme*. Così, mediante microscopia ottica, la cromatina nucleare è riconoscibile come *eterocromatina*, chimicamente densa e trascrizionalmente inattiva e rara *eucromatina* trascrizionalmente attiva (si veda Fig. 1.1). In generale, solo le regioni che sono "non avvolte" sono disponibili per la trascrizione. La struttura della cromatina può quindi regolare la trascrizione indipendentemente dai promotori tradizionali e dagli elementi leganti il DNA e, a causa delle variazioni tra i tipi di cellule, aiuta a definire l'identità e l'attività cellulare.

Gli istoni non sono strutture statiche, ma notevolmente dinamiche e regolate da una lunga serie di proteine nucleari. Di conseguenza, i complessi di rimodellamento della cromatina possono riposizionare i nucleosomi sul DNA, mediante esposizione (o mascheramento) di elementi di regolazione genetica come i promotori. I complessi *writer* della cromatina, d'altro canto, sono in grado di effettuare più di 70 modificazioni differenti dell'istone definite in genere marcatori istonici (*marks*). Tali alterazioni covalenti comprendono la metilazione, l'acetilazione o la fosforilazione di specifici aminoacidi sugli istoni.

I geni attivamente trascritti nell'eucromatina sono associati a marcatori istonici che rendono il DNA accessibile alle RNA polimerasi. Al contrario, i geni inattivi possiedono marcatori istonici che determinano la condensazione del DNA in eterocromatina. I marcatori istonici sono reversibili mediante l'attività degli "erasers della cromatina". Altre proteine, tuttavia, fungono da "readers della cromatina", legandosi agli istoni caratterizzati da particolari marcatori e regolando così l'espressione genica.

- *Metilazione degli istoni.* Le lisine e le arginine possono essere metilate da specifici enzimi *writers*; la metilazione degli istoni su residui di lisina può portare all'attivazione o alla repressione trascrizionale in base al residuo aminoacidico che è "marcato" sull'istone.
- *Acetilazione dell'istone.* I residui di lisina sono acetilati a opera dell'istone acetiltransferasi (Histone Acetyl Transferases, HAT), tali modificazioni attivano la cromatina e ne aumentano la trascrizione. A loro volta, tali alterazioni possono essere annullate grazie all'azione dell'istone deacetilasi (Histone Deacetylases, HDACs) che determina la condensazione della cromatina.
- *Fosforilazione degli istoni.* I residui di serina possono essere modificati mediante fosforilazione; in base al residuo specifico, il DNA può essere attivato per la trascrizione o essere condensato e inattivato.
- *Metilazione del DNA.* La presenza di alti livelli di metilazione del DNA negli elementi regolatori dei geni generalmente determina un silenziamento trascrizionale. Come accade per le modificazioni degli istoni, la metilazione del DNA è altamente regolata da metiltransferasi, da enzimi demetilanti e da proteine che legano il DNA metilato.
- *Fattori che organizzano la cromatina.* Queste proteine sono molto meno conosciute: si ritiene che leghino regioni non codificanti e controllino l'avvolgimento del DNA a lungo raggio, regolando così la relazione spaziale tra gli enhancer e i promotori che controllano l'espressione del gene.

Decifrare i meccanismi che consentono a fattori epigenetici di controllare l'organizzazione genomica e l'espressione genica specifica per ogni tipo di cellula è un progetto straordinariamente complesso. Nonostante le complessità insite in tale progetto, esistono già molteplici evidenze a sostegno del fatto che un'alterazione dell'"epigenoma" eserciti un ruolo centrale sulla trasformazione maligna cellulare (Cap. 7), e dati recenti sembrano indicare che molte altre patologie siano associate ad alterazioni epigenetiche ereditarie o acquisite. A differenza dei

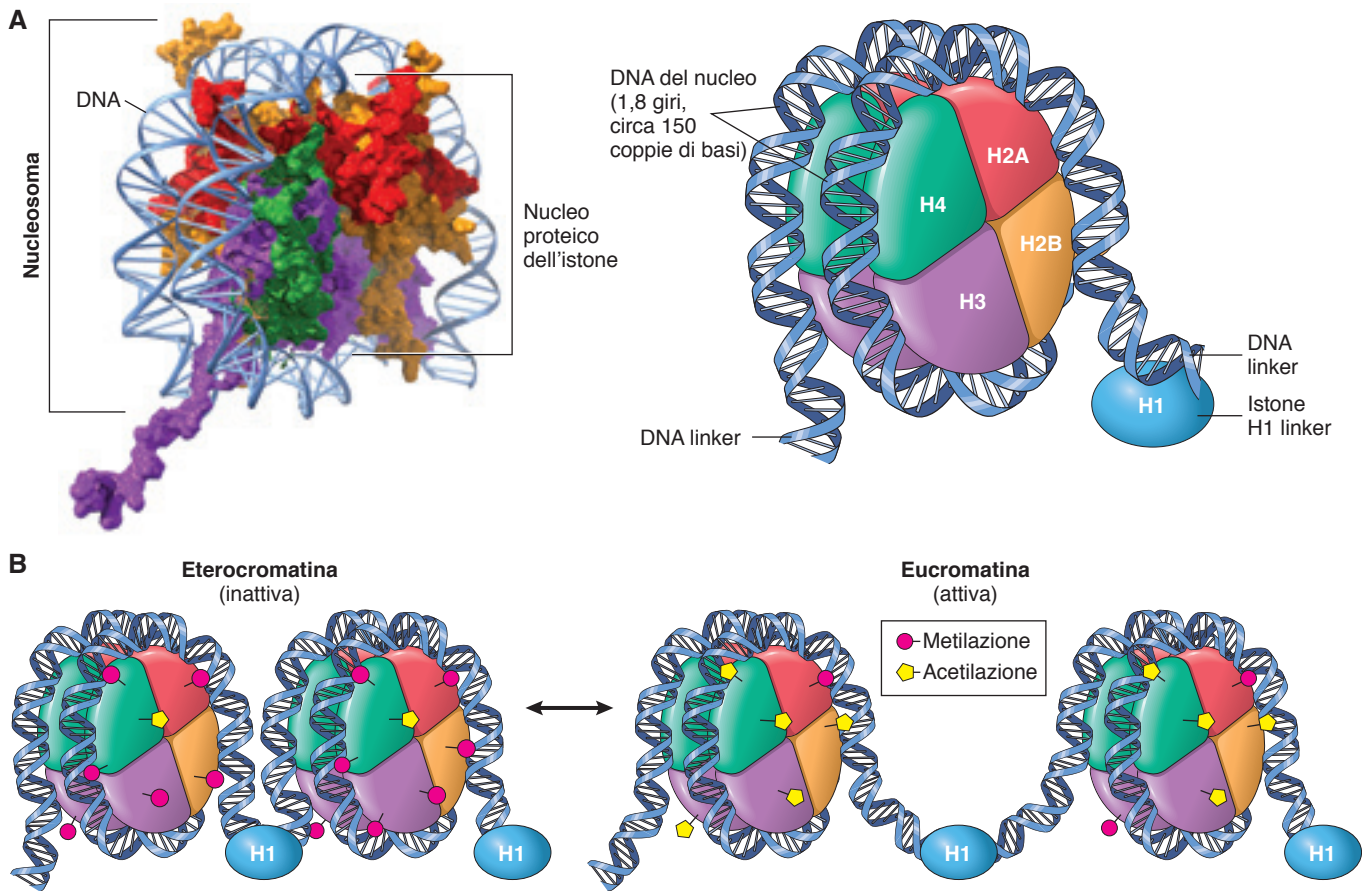


Figura 1.2 Organizzazione degli istoni. **A.** I nucleosomi sono formati da ottameri di proteine istoniche (due per ogni subunità istonica H2A, H2B, H3 e H4) circondati da 1,8 giri, 147 coppie di basi; l'istone H1 si lega con una sequenza linker di DNA di 20-80 serie di nucleotidi presenti tra i nucleosomi. Le subunità istoniche hanno carica positiva, quindi consentono l'impacchettamento di DNA a carica negativa. **B.** Il corrispondente stato di srotolamento del DNA (e il conseguente accesso dei fattori di trascrizione) è regolato dalle modificazioni dell'istone, incluse acetilazione, metilazione e/o fosforilazione questi "marks" sono scritti e cancellati in maniera dinamica. Alcuni marks, come l'acetilazione istonica, aprono la struttura della cromatina, mentre altri, come la metilazione di particolari residui istonici, condensano il DNA per silenziare i geni. Il DNA può anche essere sottoposto a metilazione, portando a inibizione trascrizionale.

cambiamenti genetici, molte alterazioni epigenetiche (come l'acetilazione degli istoni e la metilazione del DNA) sono reversibili e quindi potenzialmente suscettibili di interventi terapeutici. In effetti, gli inibitori delle istone deacetilasi e gli inibitori della metilazione del DNA sono già stati sperimentati nel trattamento di diverse forme di cancro.

MicroRNA e RNA lunghi non codificanti

I geni possono anche essere regolati da RNA non codificanti.

Queste sequenze genomiche sono trascritte ma non tradotte. Sebbene esistono molte famiglie diverse di RNA non codificanti, qui considereremo solo due esempi: le piccole molecole di RNA chiamate *microRNA* (*miRNA*), e gli *RNA lunghi non codificanti* (*lncRNA*) di lunghezza superiore a 200 nucleotidi.

MicroRNA

I **microRNA (miRNA) non codificano per proteine: regolano la traduzione di RNA messaggeri "target"**. Il silenziamento post-trascrizionale dell'espressione genica da parte dei miRNA è un meccanismo fondamentale di regolazione genica, ben conservato e presente in tutti gli eucarioti (piante animali, e funghi). Persino i batteri possiedono una versione primitiva dello stesso meccanismo, che utilizzano per proteggersi da DNA estranei (come batteriofagi e virus a DNA). La profonda influenza dei

miRNAs sull'espressione proteica consente a questi RNA relativamente corti (in media 22 nucleotidi) di essere regolatori critici di vie di trasduzione del segnale che regolano lo sviluppo e le condizioni patologiche (per esempio i tumori maligni).

Il genoma umano codifica quasi 6.000 geni miRNA, circa il 30% del numero totale di geni che codificano per le proteine. Alcuni singoli miRNA possono regolare molteplici geni che codificano per proteine, consentendo a ogni miRNA di co-regolare interi programmi di espressione genica. La trascrizione dei geni che codificano i miRNA dà luogo a una trascrizione primaria (*pri-miRNA*), che è progressivamente processata in segmenti più piccoli, tra cui "il taglio" da parte dell'enzima *Dicer*. Ciò genera miRNA maturi a singolo filamento di 21-30 nucleotidi che si associano a un complesso multiproteico denominato complesso di silenziamento indotto da RNA (*RNA-Induced Silencing Complex, RISC*); (Fig. 1.3). Il successivo accoppiamento di basi tra il filamento di miRNA e il suo mRNA target stimola il complesso RISC a indurre la degradazione dell'mRNA o a inibirne la traduzione. In tal modo, l'mRNA target viene *silenziato a livello post-trascrizionale*.

Gli RNA interferenti brevi (*small interfering RNA, siRNA*) sono brevi sequenze di RNA che si possono inserire sperimentalmente nelle cellule, dove fungono da substrati per il *Dicer* interagendo con il RISC, replicando così la funzione endogena dei miRNA. I siRNA sintetici che agiscono su specifiche sequenze di mRNA sono potenti strumenti di laboratorio per studiare

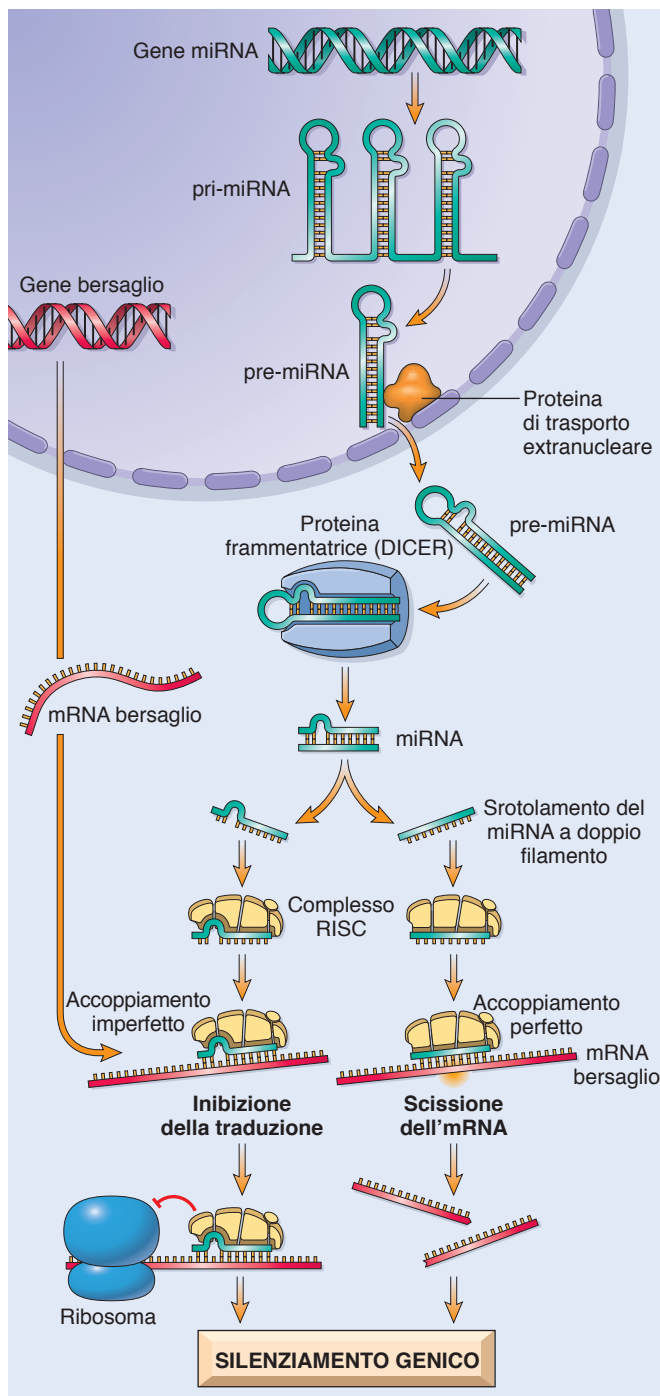


Figura 1.3 Generazione di microRNA (miRNA) e loro modalità di azione nella regolazione della funzione del gene. La trascrizione di geni che codificano i miRNA produce un miRNA primario (pri-miRNA), che è processato all'interno del nucleo e dà luogo a un pre-miRNA costituito da filamento di RNA a singola catena e da strutture secondarie a forcina e frammenti di RNA a doppio filamento. Una volta esportato al di fuori del nucleo mediante proteine trasportatrici specifiche, il pre-miRNA è tagliato dall'enzima citoplasmatico Dicer generando doppi filamenti di miRNA maturi di 21-30 nucleotidi. Il miRNA quindi si srotola e i singoli filamenti sono incorporati nel complesso multiproteico di silenziamento indotto da RNA (RISC). L'accoppiamento di base tra miRNA a singolo filamento e l'RNA messaggero bersaglio (mRNA) indirizza il RISC a tagliare l'RNA o a reprimere la traduzione, con conseguente silenziamento post-trascrizionale.

la funzione dei geni (la cosiddetta tecnologia del *knock-down*) e vengono anche studiati come potenziali agenti terapeutici per silenziare geni patologici (per esempio, gli oncogeni che guidano la trasformazione neoplastica).

RNA lunghi non codificanti

Alcuni studi recenti hanno ulteriormente scoperto un universo inesplorato di RNA lunghi non codificanti (Long Noncoding RNA, lncRNA): si stima che il numero di lncRNA possa superare quello degli mRNA codificanti di 10-20 volte. Gli lncRNA modulano l'espressione genica mediante molteplici meccanismi (Fig. 1.4). Per esempio, gli lncRNA possono legarsi alla cromatina e limitare l'accesso di RNA polimerasi ai geni codificanti all'interno di quella regione. L'esempio più noto è il gene *XIST*, che è trascritto dal cromosoma X e svolge un ruolo essenziale nella inattivazione fisiologica del cromosoma X presente nelle donne. Lo stesso *XIST* si sottrae alla inattivazione del cromosoma X, formando una sorta di compartimento in cui la trascrizione è inibita e, conseguentemente il gene è silenziato.

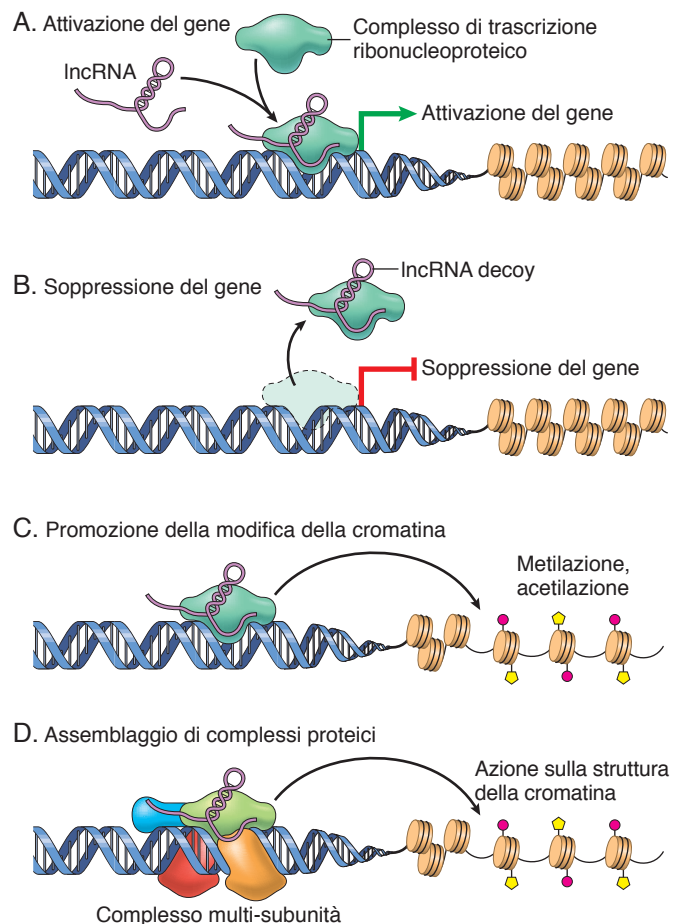


Figura 1.4 Funzioni di RNA lunghi non codificanti (lncRNAs). **(A)** Gli lncRNA possono favorire il legame dei fattori di trascrizione e, di conseguenza, promuovere l'attivazione genica. **(B)** In maniera opposta, gli lncRNA possono legare i fattori di trascrizione e inibire la trascrizione. **(C)** Le modificazioni degli istoni e del DNA da parte delle acetilasi o delle metilasi (o deacetilasi e demetilasi) possono essere indotte dal legame dei lncRNA. **(D)** In altri casi, gli lncRNA possono agire da impalcatura per stabilizzare strutture secondarie o terziarie e complessi multi-subunità che influiscono sull'architettura della cromatina o sull'attività genica. (Adattata da Wang KC, Chang HY: Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Mol Cell 43:904, 2011)

Al contrario, molti enhancer sono in realtà sede di sintesi di lncRNA. In questo caso gli lncRNA espandono la trascrizione dai promotori genici attraverso una varietà di meccanismi (si veda Fig. 1.4).

Editing genetico

Nuovi entusiasmanti sviluppi che consentono l'editing ad alta fedeltà del genoma potrebbero inaugurare la prossima era della rivoluzione molecolare. Questo progresso proviene da una fonte del tutto inaspettata: la scoperta di *brevi ripetizioni palindromiche raggruppate e separate a intervalli regolari* (CRISPR) e di geni associati a CRISPR (Cas), come la nucleasi Cas9. Questi sono elementi genetici collegati che conferiscono ai procari una forma di immunità acquisita ai fagi e ai plasmidi. I batteri utilizzano il sistema per campionare il DNA degli agenti infettanti e per integrare porzioni nei loro genomi come CRISPR. Questi segmenti CRISPR vengono successivamente trascritti e trasformati in sequenze di RNA guida che legano e dirigono la nucleasi Cas9 in siti specifici (per esempio, una sequenza di fagi) in modo che possa scindere tali sequenze per inattivare l'agente infettivo.

L'editing genetico ripropone questo processo utilizzando RNA guida artificiali di 20-basi (gRNAs) che legano Cas9 e sono complementari a una sequenza bersaglio del DNA (Fig. 1.5). Cas9 poi induce il taglio nel doppio filamento di DNA nel sito complementare al gRNA legante. La riparazione delle scissioni altamente specifiche può condurre a mutazioni destabilizzanti casuali (mediante unioni di estremità non omologhe) o può introdurre con precisione nuovo materiale genetico (mediante ricombinazione omologa). Sia le sequenze guida che l'enzima Cas, sia come DNA codificante (cDNA) che come proteina, possono essere facilmente introdotti nelle cellule. La potenziale applicazione all'ingegneria genetica, a causa dell'impressionante specificità del sistema Cas9 (fino a 10.000 volte migliore rispetto ad altri sistemi di editing precedenti), ha portato a una grande fermento. Possibili applicazioni includono l'inserimento di mutazioni specifiche in cellule e tessuti per generare modelli di tumori, altre malattie e modelli sperimentali di animali transgenici, con più rapidità, agendo sulle cellule staminali embrionali. CRISPR rende anche possibile modificare selettivamente le mutazioni che causano malattie ereditarie, o — il che è forse più preoccupante — per eliminare solo tratti meno "desiderabili". Prevedibilmente la tecnologia ha ispirato un dibattito vigoroso per quanto riguarda l'etica del suo utilizzo.

FUNZIONI DELLA CELLULA

Il normale funzionamento e l'omeostasi intracellulare dipendono da una serie di funzioni fondamentali che tutte le cellule differenziate devono svolgere per mantenere la vitalità e la normale attività. Queste includono protezione dall'ambiente, acquisizione di sostanze nutritive, metabolismo, comunicazione, movimento, rinnovamento di molecole senescenti, catabolismo molecolare e produzione di energia.

Diverse funzioni fisiologiche della cellula si svolgono in compartimenti della cellula e in particolare negli organuli intracellulari legati alle membrane (Fig. 1.5). Segregando alcune funzioni cellulari in compartimenti distinti, enzimi di degradazione potenzialmente dannosi o metaboliti tossici possono essere mantenuti a concentrazioni utilmente alte senza alcun rischio di danno per componenti intracellulari più delicati. La compartimentazione, inoltre, consente anche di creare ambienti intracellulari unici (per esempio, a pH basso o a elevati livelli di calcio) che facilitano il funzionamento più efficiente di alcuni enzimi o delle vie metaboliche.

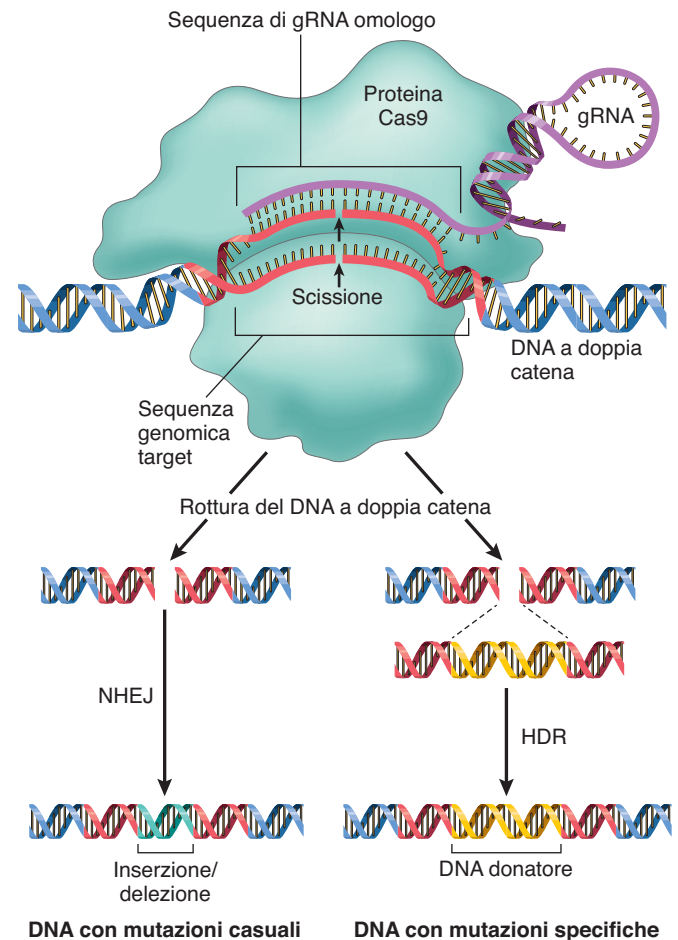


Figura 1.5 Gene editing con brevi ripetizioni palindromiche raggruppate e separate a intervalli regolari (CRISPRs) e la nucleasi Cas9. Nei batteri, le sequenze di DNA costituite da CRISPR sono trascritte nell'RNA guida (gRNA) di circa 20 basi con una regione costante e una sequenza variabile. Le regioni costanti gRNA si legano a Cas9, mentre le regioni variabili formano eteroduplex con sequenze di DNA omologhe di interesse; la nucleasi Cas9 scinde quindi il DNA legato per produrre una rottura del DNA a doppio filamento. In natura, i batteri utilizzano il sistema CRISPR/Cas9 per proteggersi dai fagi e plasmidi; le sequenze CRISPR provenienti da aggressioni precedenti sono trascritte in gRNA dal genoma batterico. Questi si legano alle sequenze nucleotidiche del patogeno e formano un complesso con la nucleasi Cas9 che porta alla rottura e, in definitiva, alla distruzione del DNA dell'invasore. Per eseguire l'editing genetico, i gRNA sono progettati con regioni variabili omologhe a una specifica sequenza di DNA di interesse; la coespressione del gRNA e del Cas9 porta quindi a una scissione efficiente e altamente specifica della sequenza target. In assenza di DNA omologo, la rottura a doppio filamento viene riparata da una giunzione delle estremità non omologhe (NHEJ), un meccanismo soggetto a errori che in genere introduce inserimenti o eliminazioni dannose. Al contrario, in presenza di DNA "donatore" omologo che attraversa la regione bersaglio dal complesso CRISPR/Cas9, le cellule possono invece utilizzare la ricombinazione omologa del DNA (HDR) per riparare la rottura. La HDR è meno efficiente della NHEJ ma ha la capacità di introdurre cambiamenti precisi nella sequenza del DNA. Le potenziali applicazioni di CRISPR/Cas9 accoppiato con la HDR includono del danno al DNA nelle riparazione di malattie genetiche ereditarie e la creazione di mutazioni patogene in cellule staminali pluripotenti inducibili.

Le nuove proteine destinate alla membrana plasmatica o alla secrezione sono fisicamente assemblate nel *reticolo endoplasmatico rugoso* (RER) e nell'*apparato del Golgi*; le proteine del citosol sono sintetizzate a livello dei ribosomi liberi. Il *reticolo endoplasmatico liscio* (REL) è utilizzato per la sintesi degli ormoni steroidei e delle lipoproteine, e la modificazione di composti idrofobi in molecole idrosolubili che si possono esportare.

Volumi relativi degli organuli intracellulari (epatocita)

Compartimento	% sul volume complessivo	Numero/cellula	Funzione nella cellula
Citosol	54%	1	metabolismo, trasporto, traduzione delle proteine
Mitocondri	22%	1700	produzione di energia, apoptosi
RE rugoso	9%	1	sintesi della membrana e delle proteine secrete
RE liscio, Golgi	6%	1	modificazione, suddivisione e catabolismo delle proteine
Nucleo	6%	1	regolazione cellulare, proliferazione, trascrizione del DNA
Endosomi	1%	200	trasporto intracellulare ed esportazione, ingestione di sostanze extracellulari
Lisosomi	1%	300	catabolismo cellulare
Perossisomi	1%	400	metabolismo di catene di acidi grassi molto lunghe

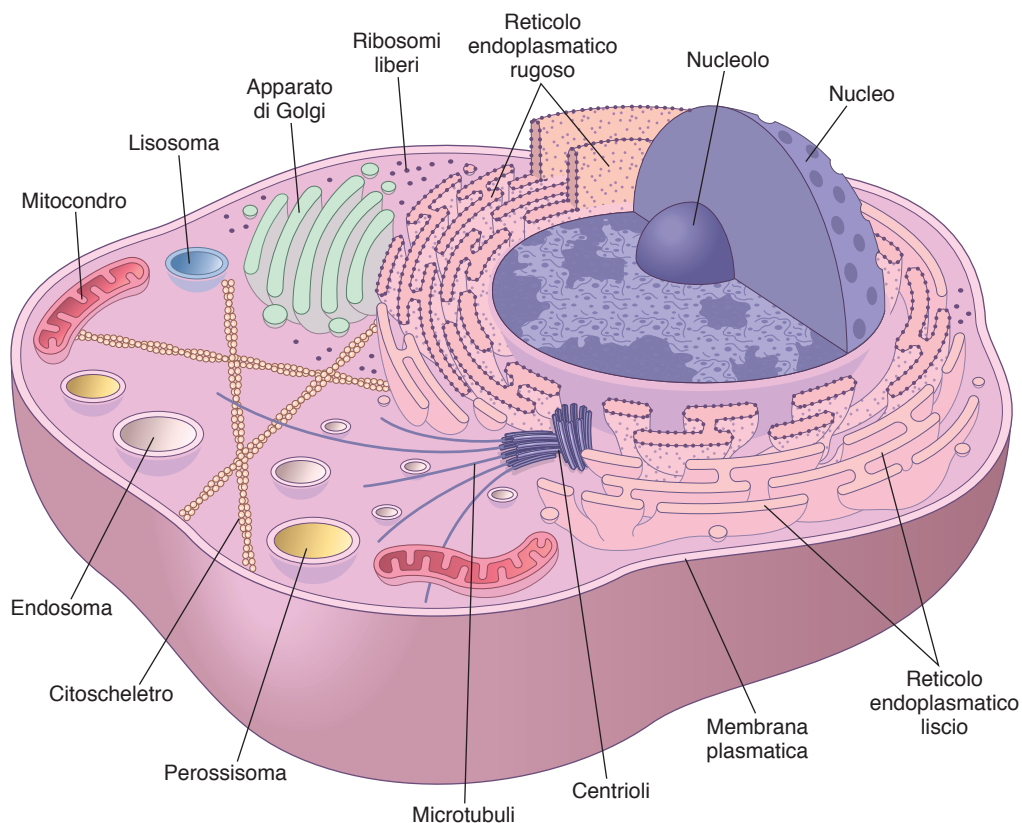


Figura 1.6 Principali componenti subcellulari della cellula. La tabella mostra il numero dei vari organuli presenti all'interno di un tipico epatocita, oltre alle loro dimensioni nella cellula. La figura mostra le relazioni topografiche, anche se non si riportano accuratamente le loro proporzioni. RE, reticolo endoplasmatico. (Adattato da Weibel ER, Stäubli W, Gnägi HR, et al: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. J Cell Biol 42:68, 1969)

Le cellule catabolizzano l'ampia varietà di molecole che endocitano, così come l'intero repertorio delle proprie proteine e organelli—che vengono costantemente degradati e rinnovati. La ripartizione di questi costituenti avviene in tre siti diversi, servendo, in ultima analisi, diverse funzioni.

- Il *proteasoma* è un complesso di “smaltimento” che degrada le proteine citosoliche denaturate o altrimenti legate all'ubiquitina. Nelle cellule che presentano l'antigene, i peptidi corti risultanti sono presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità di classe I o di classe II per aiutare a guidare la risposta immunitaria adattativa (Cap. 6). In altri casi, la degradazione proteasomale delle proteine regolatrici o dei fattori di trascrizione può innescare l'attivazione o la soppressione delle vie di segnalazione.
- I *lisosomi* sono organelli intracellulari contenenti enzimi digestivi che consentono la digestione di una vasta gamma di macromolecole, tra cui proteine, polisaccaridi, lipidi e acidi nucleici. Rappresentano il sito di degradazione di organelli intracellulari senescenti (un processo chiamato autofagia) e di microbi fagocitati che vengono così uccisi e catabolizzati.
- I *perossisomi* contengono la catalasi e la perossidasi e altri enzimi ossidativi; svolgono una funzione specializzata nella degradazione di catene molto lunghe degli acidi grassi, generando in questo processo perossido di idrogeno.

Anche i contenuti e la localizzazione degli organuli cellulari sono strettamente regolati. Le vescicole endosomiali trasportano il materiale endocitato verso i siti intracellulari appropriati, mentre altre vescicole legate alla membrana dirigono i materiali di nuova sintesi verso la superficie cellulare o gli organelli specifici. Il movimento—sia degli organelli che delle proteine all'interno della cellula, così come dell'intera cellula nel suo ambiente—è compiuto dal *citoscheletro*, che è composto da actina filamentosa (microfilamenti), cheratine (filamenti intermedi) e microtubuli. Queste proteine strutturali mantengono anche la forma cellulare e l'organizzazione intracellulare, che sono essenziali per la generazione e il mantenimento della *polarità cellulare*. Ciò è particolarmente importante nell'epitelio, in cui la parte su-

periore (*apicale*) della cellula, quella inferiore e quella laterale (*basolaterale*) sono esposte a differenti condizioni ambientali e svolgono funzioni distinte. La perdita di polarità potrebbe, per esempio, interrompere il trasporto transcellulare vettoriale nelle cellule dell'intestino o del tubulo renale.

La crescita e il mantenimento di una cellula richiedono un costante rifornimento di energia e di "componenti" necessari alla sintesi di macromolecole. La maggior parte dell'adenosina trifosfato (ATP) che fornisce energia alle cellule viene prodotta tramite la *fosforilazione ossidativa mitocondriale*. I mitocondri servono anche come un'importante fonte di intermedi metabolici necessari per il metabolismo anabolico, sono siti di sintesi di alcune macromolecole (per esempio, l'eme) e contengono importanti sensori di danno cellulare che possono avviare e regolare la morte cellulare programmata (per esempio, apoptosi).

Durante la crescita e la divisione cellulare, tutti questi organuli devono essere replicati (*biogenesi degli organuli*) e, dopo la mitosi, suddivisi in maniera appropriata nelle cellule figlie. Inoltre, dal momento che le macromolecole e gli organuli hanno una vita piuttosto breve (i mitocondri, per esempio, durano solo una decina di giorni), devono anche esistere meccanismi che consentano di effettuare il riconoscimento e la degradazione degli elementi cellulari "invecchiati".

Dopo aver descritto le principali funzioni cellulari, possiamo approfondire la trattazione dei singoli componenti della cellula e delle loro funzioni.

Membrana plasmatica: protezione e acquisizione di sostanze nutritive

Le membrane plasmatiche (nonché tutte le altre membrane degli altri organuli cellulari, del resto) non sono semplicemente guaine lipidiche protettive e statiche. Piuttosto, sono foglietti

doppi di fosfolipidi fluidi anfipatici con gruppi idrofilici, che comunicano con l'ambiente acquoso, e code lipidiche idrofobe che interagiscono tra loro per formare una barriera alla diffusione passiva di molecole grandi o cariche (Fig. 1.7). Il doppio strato ha una composizione notevolmente eterogenea di fosfolipidi che variano in base alla posizione e sono anche asimmetrici, ossia i lipidi di membrana si associano preferenzialmente con i lati extracellulari o citosolici. La corretta localizzazione di queste molecole è importante per la vitalità della cellula. Per esempio, fosfolipidi specifici interagiscono con particolari proteine della membrana e modificano le loro distribuzioni e funzioni.

- Il *fosfatidilinositolo*, presente sul foglietto interno della membrana, può essere fosforilato e funge da supporto elettrostatico per proteine intracellulari; in alternativa, i polifosfoinositidi possono essere idrolizzati dalla fosfolipasi C per generare secondi messaggeri intracellulari quali il diacilglicerolo e l'inositolo trifosfato.
- La *fosfatidilserina* è generalmente localizzata nella superficie interna della membrana, a cui conferisce una carica negativa coinvolta in interazioni elettrostatiche con le proteine; quando, tuttavia, è esposta sul foglietto extracellulare, diventa un potente segnale "mangiami", attivato durante la morte programmata della cellula (per esempio, apoptosi). Nelle piastrine, la fosfatidilserina è anche un cofattore nella coagulazione del sangue.
- I *glicolipidi* e la *sfingomielinina* sono localizzati preferenzialmente sulla superficie extracellulare; i glicolipidi, inclusi i gangliosidi, caratterizzati da legami glucidici complessi e acidi sialici terminali che conferiscono loro cariche negative, supportano interazioni basate sulla carica che contribuiscono al reclutamento di cellule infiammatorie e alla fusione spermatozoo-ovulo.

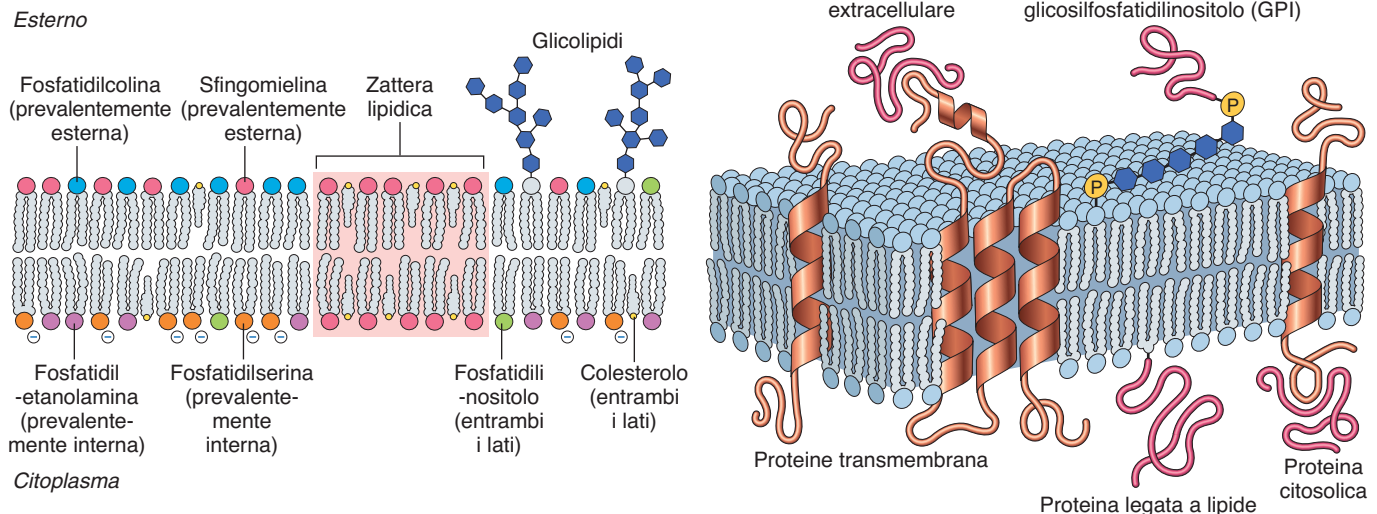


Figura 1.7 Organizzazione e asimmetria della membrana plasmatica. **(A)** La membrana plasmatica è costituita da un doppio foglietto di fosfolipidi, colesterolo e proteine associate. La distribuzione dei fosfolipidi all'interno della membrana è asimmetrica a causa dell'azione della flippasi; la fosfatidilcolina e la sfingomielinina sono presenti in misura maggiore nel foglietto esterno, mentre la fosfatidilserina (carica negativa) e la fosfatidiletanolamina si trovano soprattutto nel foglietto interno; i glicolipidi sono presenti solo nella porzione esterna dove partecipano alla formazione del glicocalice extracellulare. Sebbene la membrana sia fluida e i suoi diversi componenti possano diffondersi in maniera casuale, possono anche formarsi alcuni domini particolari, per esempio le zattere lipidiche (*rafts*) ricche in colesterolo e glicosfingolipidi. **(B)** Le proteine associate alla membrana possono attraversarla (una o più volte) mediante sequenze amminoacide idrofobiche a struttura ad α -elica; in base al contenuto lipidico della membrana e al grado di relative idrofobicità dei domini proteici, tali proteine possono avere una distribuzione non casuale nella membrana. Le proteine presenti sul lato citosolico possono essere associate al plasma membrana mediante modificazioni post-traduzionali (per esempio, la farnesilazione) o l'aggiunta di acido palmatico. Le proteine presenti sul lato extracitoplasmatico possono essere associate alla membrana mediante legami glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Oltre alle interazioni proteina-proteina all'interno della membrana, le proteine della membrana possono associarsi anche a proteine extracellulari e/o intracitoplasmatiche dando luogo a domini distinti e relativamente stabili (come il complesso di adesione focale). Le proteine transmembrana possono trasdurre forze meccaniche (per esempio, dal citoscheletro o dalla matrice extracellulare), così come segnali chimici attraverso la membrana.

Nonostante la sostanziale fluidità laterale, alcuni costituenti della membrana si concentrano in domini specializzati (per esempio, *zattere lipidiche*) che sono arricchiti in glicosfingolipidi e colesterolo. Poiché le proteine di membrana inserite hanno solubilità intrinseche differenti nei domini con composizione lipidica differente, questa organizzazione della membrana inoltre influisce sulla distribuzione delle proteine. Questa organizzazione geografica dei componenti della membrana plasmatica influisce sulle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, sulla segnalazione intracellulare e sui siti specializzati di gemmazione o fusione delle vescicole.

La membrana plasmatica è abbondantemente costellata da un'ampia gamma di proteine e glicoproteine coinvolte in diversi processi: (1) trasporto di ioni e metaboliti; (2) captazione di macromolecole, sia in fase fluida che mediata da recettori; (3) interazioni cellula-ligando, cellula-matrice e cellula-cellula. Le modalità con cui queste proteine si associano alle membrane riflettono spesso la loro funzione. Per esempio, le proteine transmembrana che attraversano completamente il doppio strato lipidico della membrana cellulare, sono spesso pori o trasportatori molecolari, mentre le proteine che sono adese superficialmente alla membrana attraverso legami labili sono più probabilmente coinvolte nella trasduzione del segnale. In generale, le proteine si associano al doppio foglietto lipidico secondo quattro diversi meccanismi:

- La maggior parte delle proteine è integrale o transmembrana e possiede uno o più segmenti α -elicoidali relativamente idrofobi che attraversano il doppio foglietto lipidico.
- Le proteine possono essere sintetizzate su ribosomi liberi nel citosol e possono essere modificate post-traduzionalmente per l'aggiunta di gruppi prenili (per esempio, il gruppo farnesile legato al colesterolo) o di acidi grassi (per esempio, l'acido palmitico o l'acido miristico), che le portano a essere inserite nel lato citosolico della membrana plasmatica.
- Le proteine sul lato extracellulare della membrana plasmatica possono esservi ancorate attraverso code di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) aggiunte post-traduzionalmente.
- Le proteine periferiche di membrana possono legarsi in maniera non covalente a vere proteine transmembrana.

Molte proteine della membrana plasmatica operano come grandi complessi: possono aggregarsi sotto il controllo di chaperoni molecolari nel reticolo endoplasmatico rugoso oppure mediante diffusione laterale nella membrana plasmatica, a cui segue la formazione del complesso in situ. Per esempio, molte proteine recettoriali (per esempio, i recettori delle citochine) dimerizzano o trimerizzano in presenza del ligando, per formare unità funzionali di segnalazione. Sebbene i doppi foglietti lipidici siano fluidi nel piano della membrana, i componenti possono essere confinati in domini separati. Tale evento può verificarsi per la loro localizzazione in *zattere lipidiche* (già trattata), o mediante interazioni intercellulari proteina-proteina (per esempio, *giunzioni occludenti*) che definiscono strutture di delimitazione cellulare distinte e hanno anche una composizione lipidica unica. Questi ultimi meccanismi sono utilizzati per mantenere la *polarità cellulare* (per esempio, parte apicale/parte libera vs parte basale/basolaterale/legame con la matrice extracellulare [Extracellular Matrix, ECM]) nelle cellule epiteliali. Contribuiscono anche alla polarità cellulare le interazioni di altre proteine di membrana e citosoliche tra loro e il citoscheletro.

La superficie extracellulare della membrana plasmatica presenta abbondanti residui carboidratici, non solo sotto forma di oligosaccaridi complessi espressi dalle glicoproteine e glicolipidi, ma anche come catene di polisaccaridi connesse ai proteoglicani integrali di membrana. Tale *glicocalice* può formare una barriera chimica e meccanica

Trasporto di membrana

Sebbene la barriera fornita dalle membrane plasmatiche sia fondamentale, il trasporto di molecole selezionate attraverso il doppio strato lipidico o verso i siti intracellulari tramite trasporto vescicolare è essenziale. Diversi meccanismi contribuiscono a questo trasporto.

Diffusione passiva. Molecole non polari di piccole dimensioni, come O_2 e CO_2 , si dissolvono facilmente nei doppi foglietti lipidici e attraverso essi si diffondono. Molecole idrofobiche più grandi (per esempio, molecole a base di steroidi come estradiolo o vitamina D) possono anche attraversare i doppi strati lipidici con relativa facilità. Invece piccole molecole polari come l'acqua (18 Da) possono anche diffondere attraverso le membrane in piccole quantità, nei tessuti responsabili del movimento significativo dell'acqua (per esempio, epitelio tubulare renale), speciali proteine integrali di membrana chiamate aquaporine formano canali transmembrana per acqua, H_2O_2 e altre piccole molecole. Al contrario, il doppio foglietto lipidico costituisce una barriera efficace al passaggio di molecole polari più grandi (>75 Da); a 180 Da, per esempio, il glucosio viene efficacemente escluso. I doppi foglietti lipidici sono anche impermeabili agli ioni, a causa della loro carica ed idratazione.

Molecole trasportatrici e canali (Fig. 1.8). Le proteine di trasporto della membrana plasmatica sono necessarie per l'assorbimento e la secrezione di ioni e molecole più grandi necessarie per la funzione cellulare (per esempio, assorbimento dei nutrienti e smaltimento dei rifiuti). Gli ioni e le piccole molecole possono essere trasportati dalle proteine canale e dalle proteine trasportatrici. Pori e canali simili mediano anche il trasporto attraverso le membrane degli organelli. Questi trasportatori che muovono ioni, zuccheri, nucleotidi, ecc., spesso hanno ottima specificità e possono essere attivi o passivi (vedi sotto). Per esempio, alcuni trasportatori legano il glucosio ma non il galattosio.

- Le *proteine canale* creano pori idrofili che, una volta aperti, consentono il movimento rapido dei soluti (di solito limitato dalle dimensioni e dalla carica).
- Le *proteine trasportatrici* legano il loro soluto specifico e subiscono una serie di cambiamenti conformazionali per trasferire il ligando attraverso la membrana; il loro trasporto è relativamente lento.

Il trasporto dei soluti attraverso la membrana plasmatica è spesso determinato dalla loro concentrazione e/o da un gradiente elettrico tra l'interno e l'esterno della cellula mediante un *meccanismo di trasporto passivo* (quasi tutte le membrane plasmatiche possiedono una differenza di potenziale elettrico, con carica negativa all'interno). In altri casi il *trasporto attivo* di alcuni soluti (contro un gradiente di concentrazione) avviene tramite molecole trasportatrici (e mai proteine canale) con consumo di ATP o attraverso un gradiente accoppiato a ioni. Per esempio, la maggior parte dei trasportatori apicali di nutrienti nell'intestino e nei tubuli renali sfruttano il gradiente di concentrazione del Na^+ che si crea tra l'ambiente extracellulare e intracellulare per consentire l'assorbimento anche quando le concentrazioni di nutrienti intracellulari superano le concentrazioni extracellulari. Questa forma di trasporto attivo non utilizza direttamente ATP, ma dipende dal gradiente di concentrazione del Na^+ generato dalla pompa sodio-potassio ($Na^+ - K^+$ ATPasi). Altri trasportatori sono ATPasi. Un esempio è la Multidrug Resistance Protein (MDR), che funziona come una pompa in grado di trasportare composti polari (come i farmaci chemioterapici) fuori dalle cellule, rendendo così le cellule tumorali resistenti al trattamento chemioterapico.

Il movimento dell'acqua dentro o fuori le cellule è passivo e diretto dalle concentrazioni dei soluti. Di conseguenza, una con-

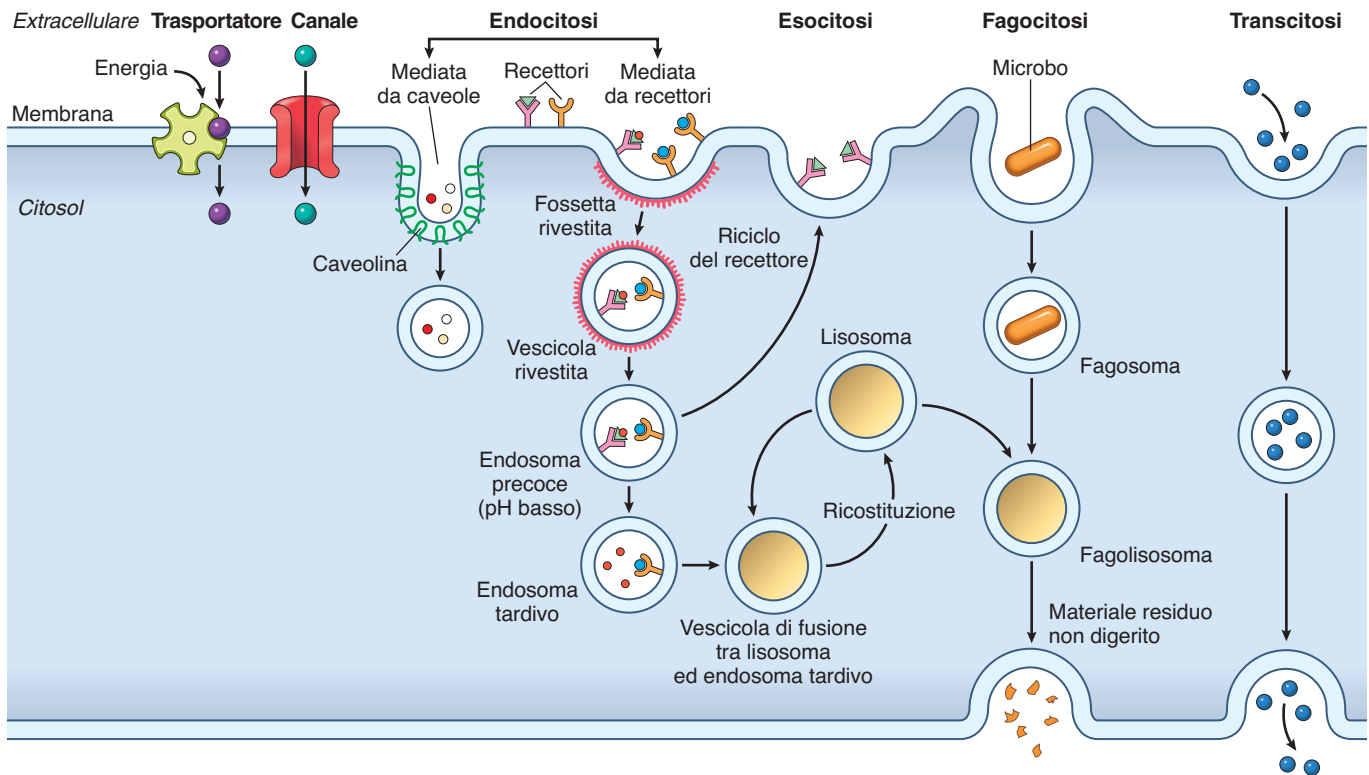


Figura 1.8 Movimento di molecole piccole e di strutture più grandi attraverso le membrane. Il doppio foglietto lipidico è relativamente impermeabile eccetto che per le molecole più piccole e/o più idrofobiche. Di conseguenza, il trasporto all'interno o all'esterno della cellula di composti carichi richiede il coinvolgimento di proteine trasportatrici specifiche presenti nella regione transmembrana, del traffico vescicolare, o deformazioni della membrana. Da sinistra a destra nella figura: piccoli soluti carichi si possono muovere attraverso la membrana sia mediante canali sia mediante trasportatori; in generale, ogni molecola richiede un trasportatore specifico. I canali sono impiegati quando i gradienti di concentrazione possono guidare il movimento dei soluti; l'attivazione del canale apre un poro idrofilo che consente un flusso limitato dalle dimensioni e dalla carica. I trasportatori sono necessari quando il soluto si muove in senso opposto al gradiente di concentrazione; questo richiede in genere dispendio energetico per guidare un cambiamento conformazionale nel vettore che facilita il trasporto transmembrana di molecole specifiche. La captazione di sostanze da parte di recettori o in fase fluida coinvolge vescicole legate alla membrana. Il fluido extracellulare, le proteine di membrana e alcune molecole legate ai recettori (come il folato) vengono internalizzati nelle caveole attraverso l'endocitosi, un processo controllato dalla caveolina che è concentrata nelle zattere lipidiche. Possono successivamente fondersi con gli endosomi o riciclarsi nella membrana. L'endocitosi del complesso recettore-ligando spesso coinvolge fossette rivestite di clatrina e vescicole. Dopo l'internalizzazione la clatrina si stacca e i singoli componenti possono essere riutilizzati. La vescicola risultante diventa parte della via endocitica, in cui i compartimenti diventano progressivamente più acidi. Dopo il rilascio del ligando, il recettore può essere riciclato nella membrana plasmatica per ripetere il processo (per esempio, il ferro si dissocia dalla transferrina a pH ~5,5; l'apotransferrina e il recettore della transferrina ritornano quindi in superficie). In alternativa, i complessi dei recettori e dei ligandi possono essere degradati all'interno dei lisosomi (per esempio, il fattore di crescita epidermico e il suo recettore sono entrambi degradati, il che impedisce un'eccessiva trasduzione del segnale). L'endocitosi è il processo mediante il quale le vescicole legate alla membrana si fondono con la membrana plasmatica e riversano il loro contenuto nello spazio extracellulare. Ciò include il riciclo degli endosomi (mostrato), il rilascio di materiale residuo non digerito dai lisosomi, il trasporto transcitotico delle vescicole e la secrezione del contenuto del vacuolo secretorio (non mostrato). La fagocitosi comporta l'invaginazione della membrana per inghiottire particelle di grandi dimensioni ed è più comune nei fagociti specializzati (per esempio, macrofagi e neutrofilii). I fagosomi risultanti alla fine si fondono con i lisosomi per facilitare la degradazione del materiale inglobato all'interno della cellula. La transcitosi può mediare il trasporto transcellulare in entrambe le direzioni apicale-basale o basale-apicale, a seconda del recettore e del ligando.

centrazione di soluti extracellulari in eccesso rispetto a quella intracellulare (ipertonicità) causa un'improvvisa fuoriuscita di acqua dalle cellule, mentre l'*ipotonicità* provoca un'improvvisa entrata di acqua nelle cellule. Al contrario, i metaboliti e le proteine cariche all'interno del citoplasma attraggono cariche controioniche che aumentano l'osmolarità intracellulare. Pertanto, per prevenire la sovraidratazione, le cellule necessitano un continuo trasporto verso l'esterno di piccoli ioni inorganici (per esempio, Na^+), generalmente mediante l'attività di scambio ionico dell'ATPasi della membrana. La perdita della capacità di produrre energia (come in una cellula danneggiata da sostanze tossiche o da ischemia), pertanto, causa un rigonfiamento osmotico e, alla fine, la rottura delle cellule. Meccanismi di trasporto simili regolano anche le concentrazioni di altri ioni (per esempio, Ca^{2+} e H^+). Questo è fondamentale per molti processi. Per esempio, la maggior parte degli enzimi citosolici sono so-

prattutto attivi a pH 7,4, e sono spesso regolati da Ca^{2+} , mentre gli enzimi lisosomiali funzionano meglio a pH 5 o più basso.

La captazione di fluidi o di macromolecole da parte della cellula, è denominata *endocitosi*. A seconda delle dimensioni della vescicola, l'endocitosi può essere classificata in pinocitosi (assunzione di sostanze in fase liquida da parte delle cellule) o fagocitosi (ingestione di materiale solido da parte delle cellule). Generalmente, la fagocitosi è limitata a determinati tipi di cellule (per esempio, macrofagi e neutrofilii) il cui ruolo è quello di ingerire specificamente microorganismi patogeni o frammenti di cellule morte.

Assorbimento mediato dai recettori e in fase fluida (si veda Fig. 1.8) Alcune molecole di piccole dimensioni (come alcune vitamine) si legano ai recettori della superficie cellulare e sono internalizzate mediante invaginazioni della membrana pla-

smatica chiamate caveole. L'assorbimento può avvenire anche attraverso invaginazioni di membrana rivestite da proteine di clatrina, che si assemblano spontaneamente in un reticolo che aiuta a guidare l'endocitosi (discusso più avanti). In entrambi i casi, l'attività della dinamina, che scinde la vescicola neofornata dalla membrana plasmatica, è necessaria per il rilascio delle vescicole.

Le macromolecole possono anche essere trasportate fuori dalle cellule per *esocitosi*. In tale processo, le proteine sintetizzate e impacchettate nel reticolo endoplasmatico rugoso e nell'apparato del Golgi sono concentrate in vescicole secretorie, che si fondono successivamente con la membrana plasmatica per poter poi espellere il loro contenuto. Tra gli esempi comuni sono inclusi gli ormoni peptidici (per esempio, insulina) e le citochine.

La transitosi è il movimento delle vescicole endocitate tra il compartimento apicale e quello basolaterale delle cellule. Si tratta di un meccanismo che serve a trasferire grandi quantità di proteine intatte attraverso le barriere epiteliali (per esempio, anticorpi ingeriti con il latte materno) o per muovere rapidamente grandi volumi di soluti.

Torniamo ora a occuparci di forme specifiche di endocitosi (si veda Fig. 1.8).

- **Endocitosi mediata da caveole.** Le *caveole* ("piccole caverne") sono invaginazioni della membrana plasmatica prive di rivestimento associate a molecole legate a GPI, a proteine che legano l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), a chinasi della famiglia SRC e al recettore dei folati; la caveolina è la principale proteina strutturale delle caveole, che, come le zattere lipidiche (si veda sopra), sono ricche di glicosfingolipidi e colesterolo. L'internalizzazione delle caveole insieme alle molecole legate e il liquido extracellulare associato è denominata *potocitosi* (letteralmente "cellula che sorseggia"). Oltre a supportare il rilascio di alcune molecole transmembrana (per esempio, il folato), le caveole regolano la segnalazione transmembrana e l'adesione cellulare tramite internalizzazione di recettori e integrine.
- **L'endocitosi mediata da recettori.** Le macromolecole legate ai recettori di membrana (come la transferrina o i recettori delle lipoproteine a bassa densità [LDL]) vengono assorbite in regioni specializzate della membrana plasmatica chiamate *fossette rivestite di clatrina*. I recettori sono efficientemente internalizzati mediante invaginazioni della membrana plasmatica regolate dalla matrice di clatrina che alla fine vengono scisse per formare le vescicole *rivestite di clatrina*. Intrappolato all'interno di queste vescicole è anche una piccola frazione dell'ambiente extracellulare (*pinocitosi in fase fluida*). Le vescicole perdono quindi rapidamente il loro rivestimento di clatrina e si fondono con una struttura intracellulare acida chiamata *endosoma precoce*; le vescicole endosomiali subiscono una maturazione progressiva a endosomi tardivi, fondendosi infine con i lisosomi. Nell'ambiente acido degli endosomi, i recettori LDL e transferrina rilasciano il loro carico (colesterolo e ferro, rispettivamente), che viene poi trasportato nel citosol.

Dopo il rilascio del ligando, alcuni recettori tornano alla membrana plasmatica e sono riutilizzati (per esempio, recettori di LDL e della transferrina), mentre altri sono degradati all'interno dei lisosomi (per esempio, il recettore per il fattore di crescita epidermoidale). In quest'ultimo caso, la degradazione del recettore dopo la sua internalizzazione provoca la down-regolazione del recettore che inibisce la segnalazione mediata dallo stesso. Difetti nel trasporto delle LDL mediato dal recettore sono alla base dell'ipercolesterolemia familiare, come descritto nel Capitolo 5.

L'endocitosi richiede il riciclo delle vescicole internalizzate sulla membrana plasmatica (esocitosi) per un altro ciclo di in-

ternalizzazione. Ciò è critico, poiché una cellula internalizzerà dallo spazio extracellulare l'equivalente del 10-20% del suo volume cellulare ogni ora — il che ammonta a 1-2% della sua membrana plasmatica ogni minuto. Senza questo processo di riciclo, la membrana plasmatica sarebbe rapidamente esaurita. L'endocitosi e l'esocitosi devono quindi essere strettamente accoppiate per evitare grandi cambiamenti nell'estensione della membrana plasmatica.

Citoscheletro

La capacità delle cellule di adottare una particolare morfologia, di mantenere la polarità, di organizzare gli organuli intracellulari e migrare deriva dalla complessa "impalcatura" di proteine strutturali intracellulari che formano il citoscheletro (Fig. 1.9). Sebbene il citoscheletro possa avere un aspetto simile alle travi e ai supporti di un edificio, le strutture citoscheletriche si allungano e si accorciano costantemente; i microfilamenti e i microtubuli sono più attivi e il loro assemblaggio e disassemblaggio regola la migrazione cellulare.

Nelle cellule eucariotiche vi sono tre classi principali di proteine del citoscheletro:

- **I microfilamenti di actina** sono fibrille di 5-9 nm di diametro costituite dall'actina globulare (G-actina), la proteina citosolica più abbondante nelle cellule. I monomeri di G-actina polimerizzano in modo non covalente in lunghi filamenti (F-actina) che si intrecciano a formare eliche a doppio filamento con una polarità ben definita; per quanto i dettagli siano (come sempre) più sfumati, nuove unità sono tipicamente aggiunte alla terminazione "positiva" del filamento e rimosse dalla terminazione "negativa", un processo denominato *tapis roulant*

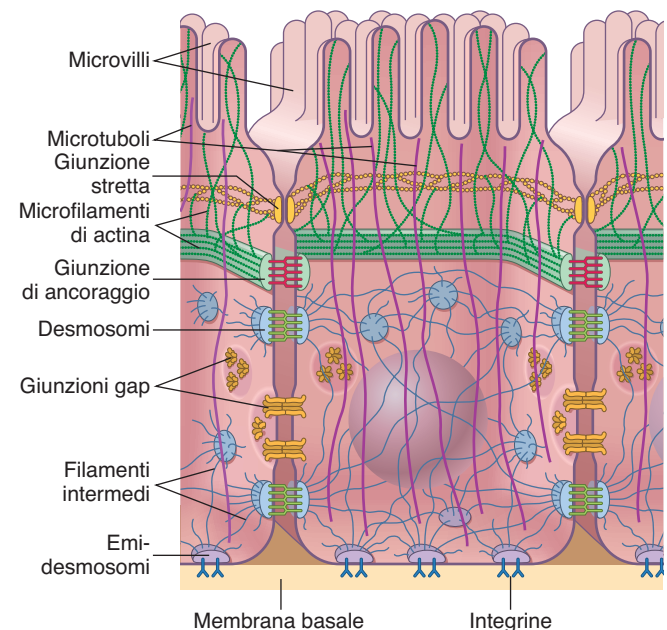


Figura 1.9 Componenti del citoscheletro e interazioni cellula-cellula. L'adesione interepiteliale coinvolge diverse interazioni tra proteine della superficie cellulare nelle giunzioni occludenti, giunzioni aderenti e desmosomi; l'adesione alla matrice extracellulare coinvolge le integrine (e le proteine associate) all'interno degli emidesmosomi. Le varie proteine di adesione all'interno della membrana plasmatica si associano a microfilamenti di actina e filamenti intermedi per fornire una matrice meccanica per la struttura cellulare e la trasduzione del segnale. Le giunzioni gap non conferiscono integrità strutturale ma consentono la comunicazione cellula-cellula mediante il movimento di molecole a peso molecolare e/o cariche. Si veda il testo per i dettagli.

dell'actina. Il legame dell'actina con proteine regolatrici ne organizza la polimerizzazione e la ramificazione per formare un network che controlla la forma e il movimento cellulare. Questo complesso e la sua associazione con le proteine contrattili (per esempio, miosina) è così finemente organizzato nel muscolo scheletrico e cardiaco ed è responsabile della caratteristica striatura visibile al microscopio ottico. L'idrolisi dell'ATP da parte della miosina permette lo scorrimento dei filamenti di actina su quelli di miosina provocando la contrazione muscolare. Sebbene meno coordinate, le miosine, di cui ne esistono numerose isoforme, sono responsabili di altre funzioni che dipendono dalla contrazione dell'actina, tra cui il trasporto vescicolare, la regolazione della barriera epiteliale e la migrazione cellulare.

- I *filamenti intermedi* sono fibrille di 10 nm di diametro che formano una famiglia vasta ed eterogenea che include cheratine e lamine nucleari. I filamenti intermedi formano prevalentemente polimeri simili a corde e di solito non si riorganizzano attivamente come l'actina e i microtubuli. Ciò consente ai filamenti intermedi di fornire resistenza alla trazione in modo che le cellule possano sopportare sollecitazioni meccaniche, per esempio negli epitelii dove i filamenti intermedi collegano *desmosomi* ed *emidesmosomi* (si veda Fig. 1.9). Alcuni filamenti intermedi sono tessuto-specifici e possono essere utili per attribuire l'origine cellulare di tumori scarsamente differenziati. Queste includono:
 - *Vimentina*: espressa in cellule mesenchimali (fibroblasti, endotelio).
 - *Desmina*: espressa in cellule muscolari (forma il supporto sul quale si contraggono l'actina e la miosina).
 - *Neurofilamenti*: sono importanti per la struttura dell'assone neuronale e conferiscono sia forza sia rigidità).
 - *Proteina gliale fibrillare acida*: è espressa nelle cellule gliali.
 - *Citocheratine*: sono espresse in cellule epiteliali. Esistono almeno 30 diverse e distinte citocheratine espresse in diverse linee cellulari (per esempio, epitelio del polmone vs. quello gastrointestinale).
 - *Laminine*: sono proteine a filamento intermedio che formano la lamina nucleare, mantenendo la forma nucleare e che possono regolare la trascrizione.
- I *microtubuli* sono fibrille di 25 nm di spessore composte da dimeri, polimerizzati in modo non covalente, di tubulina α e β organizzati a formare tubi cavi. Queste fibrille sono estremamente dinamiche e polarizzate, con estremità "+" e "-". L'estremità "-" è tipicamente incorporata in un *centro organizzatore di microtubuli* (MTOC o centrosoma) vicino al nucleo, dove è associata alla coppia di centrioli; l'estremità "+" si allunga o si accorcia in risposta a vari stimoli mediante l'aggiunta o la sottrazione di dimeri di tubulina. Microtubuli:
 - Servono da ancoraggio per i motori molecolari proteici che utilizzano ATP per traslocare vescicole, organelli o altre molecole all'interno della cellula. Le principali proteine motorie, chinesine e dineine, tipicamente (ma non esclusivamente) trasportano rispettivamente il carico in direzioni anterograde (- a +) o retrograde (+ a-).
 - Mediano la segregazione di cromatidi fratelli durante la mitosi.
 - Formano il core o assonema delle ciglia primarie, singole proiezioni non mobili che si riscontrano in molte cellule nucleate e che regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare (mutazioni nelle proteine del complesso delle ciglia primarie portano a forme di malattia renale policistica; Capitolo 20).
 - Formano il core o assonema delle ciglia mobili (per esempio, nell'epitelio bronchiale) o flagelli (nello sperma).

Interazioni cellula-cellula

Le cellule si connettono e comunicano tra loro tramite complessi giunzionali che formano collegamenti meccanici e facilitano le interazioni recettore-ligando. Complessi simili mediano anche l'interazione con la matrice extracellulare (ECM). Le giunzioni cellulari sono organizzate in tre tipologie principali (si veda Fig. 1.8):

- Le *giunzioni occludenti* (*serrate*) uniscono insieme cellule epiteliali adiacenti per creare una barriera continua che limita il movimento paracellulare (tra cellule) di ioni e altre molecole. Le giunzioni occludenti formano (viste frontalmente tramite microscopia elettronica freeze-fracture) una fitta rete di contatti macromolecolari tra cellule confinanti; i complessi che mediano le interazioni cellula-cellula sono composti da proteine transmembrana, delle famiglie delle tetraspaine, come la *claudina*, e della *proteina MARVEL* associate alle giunzioni strette (TAMP). Queste si connettono con numerose proteine adattatrici e strutturali di sostegno intracellulari, tra cui tre membri della *famiglia delle proteine della zonula occludens* (ZO-1, ZO-2, ZO-3) e alla cingulina. Oltre a costituire una barriera selettivamente permeabile che sigilla lo spazio tra le cellule (cioè, lo spazio paracellulare), le giunzioni occludenti rappresentano anche il confine che separa il dominio apicale dal dominio basolaterale, e aiuta così a mantenere la polarità cellulare. Tuttavia, tali giunzioni sono strutture dinamiche che possono modificarsi per favorire la cicatrizzazione delle cellule epiteliali e la migrazione delle cellule infiammatorie attraverso le superfici epiteliali rivestite di mucosa.
- Le *giunzioni ancoranti* (giunzioni aderenti e desmosomi) legano meccanicamente le cellule — e il loro citoscheletro — ad altre cellule o alla matrice extracellulare. Le giunzioni aderenti sono spesso associate alle giunzioni strette e si localizzano al di sotto di esse. I desmosomi sono localizzati più in basso nella cellula e formano diversi tipi di giunzioni. Quando i desmosomi ancorano la cellula alla membrana basale, struttura specializzata della matrice extracellulare, vengono chiamati emidesmosomi (mezzo desmosoma), poiché l'altra metà del desmosoma non è presente all'interno della membrana basale. Sia le giunzioni aderenti che i desmosomi sono formati da interazioni extracellulari omotipiche tra glicoproteine transmembrana chiamate *caderine*, espresse su cellule adiacenti.
 - Nelle giunzioni aderenti le molecole di adesione transmembrana sono associate a microfilamenti intracellulari di actina attraverso i quali influenzano la forma e/o la motilità cellulare. La perdita della molecola di adesione E-caderina spiega il modello di invasione unicellulare "a fila indiana" di alcuni tumori gastrici e carcinomi lobulari del seno (Capp. 17 e 23).
 - Nei desmosomi le caderine sono collegate a filamenti intermedi intracellulari permettendo la trasmissione (e la dispersione) di forze meccaniche extracellulari.
 - Negli emidesmosomi le proteine transmembrana di connessione sono chiamate *integrine* e, come le caderine desmosomali, si uniscono ai filamenti intermedi, collegando il citoscheletro all'ECM. I *complessi di adesione focale* sono composti da >100 proteine che possono trovarsi negli emidesmosomi. Le proteine che compongono tali complessi generano segnali intracellulari quando le cellule sono sottoposte a forti sollecitazioni meccaniche, (per esempio, l'endotelio nel flusso sanguigno o i cardiomiociti in un cuore infartuato).
- Le *giunzioni comunicanti* (*giunzioni gap* o *nexus*) sono strutture che permettono la diffusione di segnali chimici o elettrici da una cellula a un'altra. La giunzione consiste in una sequenza di pori di 1,5-2 nm (chiamati *connessioni*) formati da una coppia di esamero (una su ogni cellula) di proteine transmembrana

chiamate connessine. Queste formano pori che consentono il passaggio di ioni, nucleotidi, zuccheri, amminoacidi, vitamine e altre molecole di piccole dimensioni; la permeabilità delle giunzioni è rapidamente ridotta da un abbassamento del pH intracellulare o da un aumento del calcio intracellulare. Le giunzioni gap svolgono una funzione fondamentale nella comunicazione cellula-cellula. Per esempio, le giunzioni gap presenti sui cardiomiociti permettono il passaggio di ioni calcio tra le cellule consentendo al miocardio di comportarsi come un sincizio funzionale, con onde coordinate di contrazione.

Apparato biosintetico: reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi

Tutti i costituenti cellulari – incluse le proteine strutturali, gli enzimi, i fattori di trascrizione, e anche le membrane fosfolipidiche – sono rinnovati costantemente in un continuo processo che bilancia sintesi e degradazione. Il reticolo endoplasmatico (RE) è il compartimento preposto alla sintesi di tutte le proteine transmembrana e dei lipidi destinati alla membrana plasmatica e agli organuli cellulari, compreso il RE stesso. È anche il sito iniziale della sintesi delle proteine secrete. Il RE è organizzato in un dedalo interconnesso di condotti ramificati simile a una rete e in lamelle appiattite che formano una lamina ininterrotta intorno a un singolo lume, che topograficamente equivale all'ambiente extracellulare. Il RE è formato da domini contigui, ma separati, contraddistinti dalla presenza (RER) o dall'assenza (REL) di ribosomi (si veda Fig. 1.6).

- **Reticolo endoplasmatico rugoso (RER):** i ribosomi legati alla membrana sulla superficie citosolica del RER traducono l'mRNA in proteine che sono rilasciate nel lume del RE o si integrano nelle membrane del RE. Tale processo è guidato da sequenze segnale specifiche presenti sul dominio N-terminale delle proteine nascenti; la sintesi delle proteine guidata dai peptidi segnale è iniziata sui ribosomi liberi nel citosol, ma il complesso nascente si attacca progressivamente alla membrana del RE e la proteina viene inserita nella membrana del RE mentre è tradotta. Per quanto riguarda le proteine prive di sequenze segnale, la traduzione rimane sui ribosomi liberi nel citosol, formando poliribosomi cioè più ribosomi attaccati allo stesso mRNA; tali proteine trascritte rimangono nel citoplasma.

Le proteine inserite nel reticolo endoplasmatico si ripiegano nella loro conformazione attiva e possono formare polipeptidici complessi (oligomerizzazione); si formano, inoltre, legami disolfurici e sono aggiunti oligosaccaridi N-linked (frazioni di zucchero collegate a residui di asparagina). Le molecole chaperone aiutano a ripiegare e trattenere le proteine nel RE finché le modificazioni non siano complete e non venga raggiunta la corretta conformazione della proteina. Se una proteina non si ripiega o non oligomerizza correttamente, è trattenuta nel RE e va incontro a degradazione. Un esempio di questo processo è la mutazione più comune della proteina CFTR, nella fibrosi cistica. Nella proteina CFTR mutante, la delezione di un codone con conseguente assenza di un singolo amminoacido (la fenilalanina 508), risulta nella sua alterata conformazione "misfolding", la sua ritenzione nel RE e la conseguente degradazione e a cui consegue una ridotta espressione di superficie. Inoltre, un eccessivo accumulo di proteine mal ripiegate (che avviene quando si supera la capacità del RE di assemblarle e degradarle), porta alla *risposta di stress del RE* (denominata anche *Unfolded Protein Response, UPR – risposta a proteine non ripiegate*) (Fig. 1.10 B). La rilevazione delle proteine anormalmente piegate in eccesso conduce a una progressiva riduzione nella sintesi delle proteine con un aumento simultaneo delle proteine chaperone; la mancata correzione del sovraccarico può innescare la morte cellulare mediante *apoptosi* (Cap. 2).

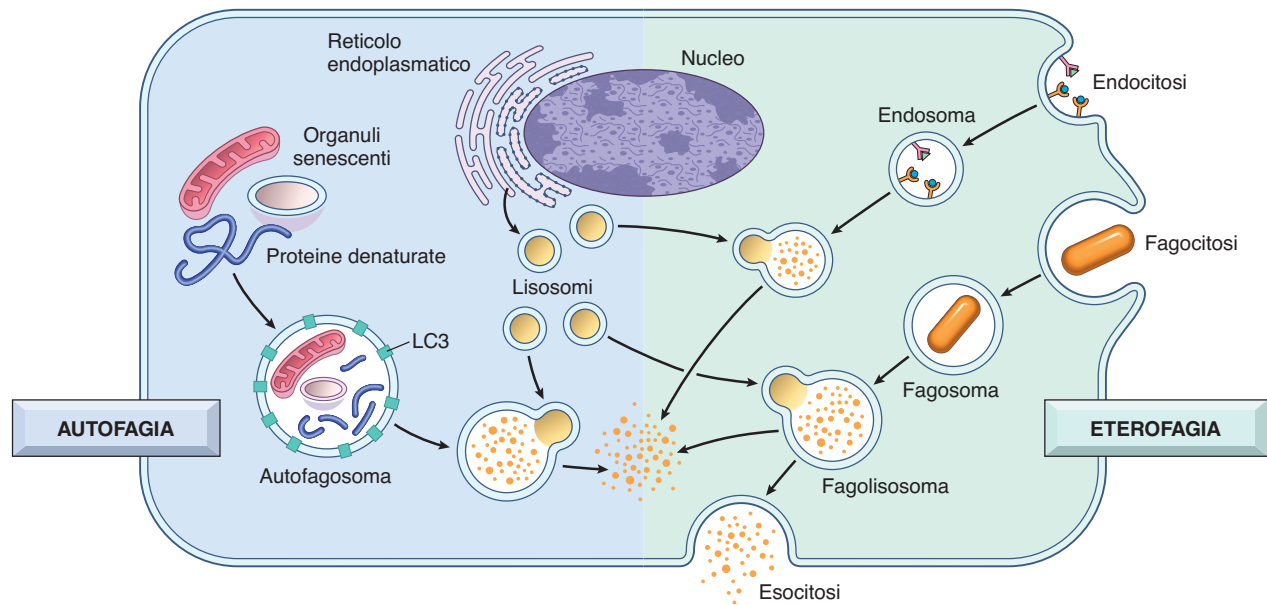
- **Apparato del Golgi:** dal RER, le proteine e i lipidi destinati ad altri organuli o a essere secreti fuori dalla cellula, sono trasportati nell'apparato del Golgi. Questo è formato da cisterne impilate che modificano progressivamente e costantemente le proteine dal versante *cis* (vicino al RE) al versante *trans* (presso la membrana plasmatica). La progressione cisternale, cioè il movimento dalle cisterne dal versante *cis* verso il versante *trans* del Golgi, simile ai passaggi su una scala mobile, consente l'elaborazione sequenziale di proteine appena sintetizzate e può essere facilitata da piccole vescicole legate alla membrana. Vescicole simili trasportano gli enzimi residenti nel Golgi da *trans* a *cis* per mantenere i diversi contenuti cisternali lungo questa catena di montaggio. Man mano che le cisterne maturano, gli oligosaccaridi N-linked originariamente aggiunti alle proteine nel RE vengono accorciati ed estesi in modo graduale; si aggiungono anche gli oligosaccaridi O-linked (frazioni di zucchero legate a serina o a treonina). Parte di questi processi di glicosilazione sono importanti nell'indirizzare le molecole verso i lisosomi (attraverso il legame con il recettore del mannosio-6-fosfato). Altri prodotti della glicosilazione sono importanti per le interazioni cellula-cellula o cellula-matrice, oppure per eliminare le cellule senescenti (per esempio, piastrine e eritrociti). Il versante *trans* del Golgi smista le proteine e i lipidi e li indirizza verso altri organuli, la membrana plasmatica o verso vescicole di secrezione. Il complesso del Golgi è particolarmente rilevante per la funzione secretoria di cellule specializzate, comprese le cellule calciformi dell'intestino e dell'epitelio bronchiale che secernono grandi quantità di mucopolisaccaridi. Nelle plasmacellule che secernono anticorpi, il Golgi può essere riconosciuto come una zona più chiara perinucleare (hoff) visibile dopo colorazione con ematossilina-eosina (Cap. 6).
- **Reticolo endoplasmatico liscio (REL):** nella maggior parte delle cellule, il REL è relativamente scarso ed esiste principalmente come zona di transizione che si estende dal RER per generare vescicole di trasporto che veicolano proteine di nuova sintesi all'apparato di Golgi. Il REL può, tuttavia, essere particolarmente sviluppato nelle cellule che sintetizzano ormoni steroidei (per esempio, nelle gonadi o nelle ghiandole surrenali), o in quelle che catabolizzano molecole liposolubili (per esempio, gli epatociti). Infatti, un'esposizione ripetuta a composti metabolizzati dal REL (per esempio, fenobarbital, catabolizzato mediante il sistema del citocromo P-450) può indurre un'iperplasia del REL stesso. Il REL è anche responsabile dell'immagazzinamento del calcio intracellulare, che, quando viene rilasciato nel citosol regola numerose risposte a segnali extracellulari (compresa la morte cellulare apoptotica). Nelle cellule muscolari, un REL specializzato, denominato reticolo sarcoplasmatico, è responsabile del rilascio ciclico e del sequestro di ioni calcio che regolano rispettivamente la contrazione e il rilassamento del muscolo.

Eliminazione dei rifiuti: lisosomi e proteasomi

Sebbene le cellule si affidino principalmente ai lisosomi per digerire il materiale internalizzato e i rifiuti endogeni accumulati, ci sono molte altre vie per degradare le macromolecole intracellulari (si veda Fig. 1.10). Tra queste proteosomi e perossisomi. Questi ultimi sono responsabili del catabolismo degli acidi grassi a catena lunga.

- I **lisosomi** sono organelli rivestiti da membrana, contenenti approssimativamente 40 diverse idrolasi acide (che funzionano a pH ≤ 5); queste comprendono proteasi, nucleasi, lipasi, glicosidasi, fosfatasi e solfatasi. Gli enzimi lisosomiali sono originalmente sintetizzati nel lume del RE. Il legame di un residuo di mannosio-6-fosfato (M6P) indirizza questi enzimi nell'apparato di Golgi, da cui vengono veicolati nei lisosomi

A. DEGRADAZIONE LISOSOMIALE



B. DEGRADAZIONE PROTEASOMICA

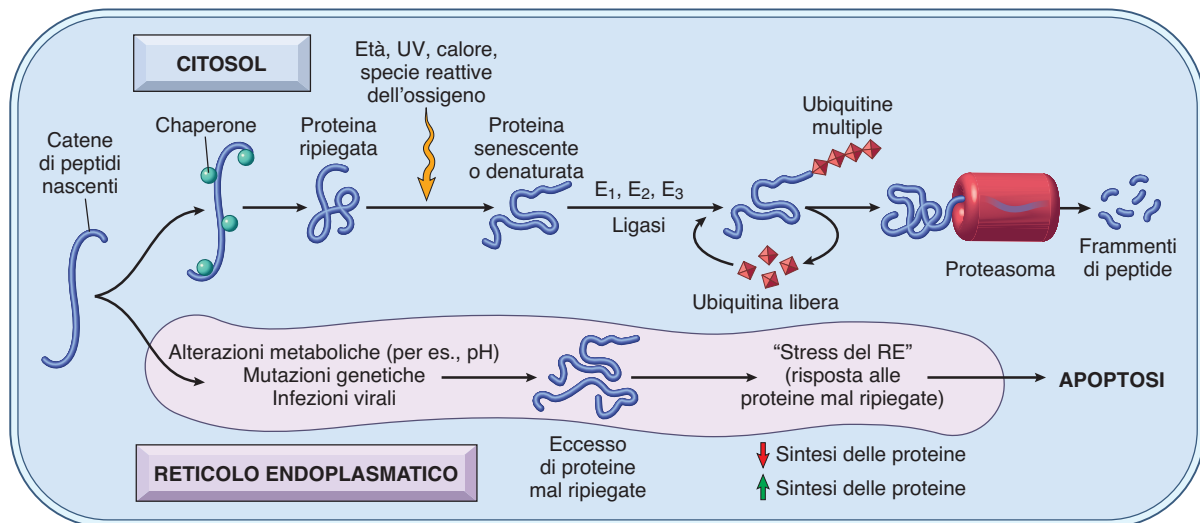


Figura 1.10 Catabolismo intracellulare. **A.** Degradazione lisosomiale. Nell'eterofagia (a destra), i lisosomi si fondono con gli endosomi o con i fagosomi per favorire la degradazione del loro contenuto internalizzato (si veda la Fig. 1.8). I prodotti finali, possono essere liberati nel citosol per nutrire la cellula o essere riversati nello spazio extracellulare (esocitosi). Nell'autofagia (a sinistra del quadro A), gli organuli senescenti o le proteine denaturate sono indirizzati alla degradazione lisosomiale, essendo circondati da un vacuolo a doppia membrana derivato dal reticolo endoplasmatico che esprime proteine LC3 (1A/1B catena leggera 3 della proteina associata ai microtubuli). Anche alcuni stimoli che inducono stress cellulare, come il deficit di sostanze nutritive o alcune infezioni intracellulari, possono attivare la via autofagocitica. **B.** Degradazione proteasomica. Le proteine citosoliche destinate al ricambio (come i fattori di trascrizione o le proteine regolatrici), le proteine senescenti o le proteine denaturate da stimoli meccanici o chimici esterni possono essere legate da più di una molecola di ubiquitina (mediante l'attività dell'ubiquitina ligasi E₁, E₂ ed E₃). Questo evento marca le proteine per la degradazione a opera dei proteasomi, complessi costituiti da multi-subunità citosoliche che degradano le proteine in piccoli frammenti peptidici. Elevate concentrazioni di proteine mal ripiegate all'interno del reticolo endoplasmatico (RE) attivano una risposta protettiva (unfolded protein response) che determina una notevole riduzione della sintesi proteica, ma anche un aumento specifico di proteine chaperone che favoriscono il ripiegamento delle proteine. Se tale strategia si rivela inefficace per far fronte ai livelli di proteine mal ripiegate può innescare l'apoptosi.

attraverso la formazione di vescicole ad alto contenuto di recettori per il M6P da parte del trans Golgi. Le macromolecole destinate al catabolismo nei lisosomi giungono in queste vescicole utilizzando una delle tre vie elencate di seguito (si veda Fig. 1.10).

- Il materiale internalizzato mediante pinocitosi in *fase fluida* o *endocitosi mediata da recettori* passa dalla membrana plasmatica all'endosoma precoce e quindi all'endosoma tardivo, e infine arriva nel lisosoma. Questi compartimen-

ti sono progressivamente acidificati in modo da permettere l'attivazione degli enzimi proteolitici nell'endosoma tardivo e nei lisosomi.

- Gli organuli senescenti e i grandi complessi di proteine denaturate possono essere trasportati nei lisosomi attivando un processo chiamato *autofagia* (Cap. 2). Mediante un meccanismo che coinvolge i prodotti di differenti geni (*Atg*) correlati all'autofagia, gli organuli obsoleti sono avvolti da una doppia membrana proveniente dal RE. La membrana

si espande progressivamente per avvolgere una serie di organelli e strutture cellulari formando l'*autofagosoma* definitivo; queste strutture sono destinate alla distruzione finale dopo fusione con lisosomi. Oltre a facilitare la sostituzione delle strutture invecchiate e/o non funzionali, l'autofagia può essere utilizzata per preservare la vitalità durante la deplezione di sostanze nutritive; è coinvolta nelle risposte protettive alle infezioni intracellulari; partecipa alla riparazione intracellulare; e, in alcune circostanze, innesca la morte cellulare programmata (*apoptosi*). L'autofagia verrà trattata in maniera più esaustiva nel Capitolo 2.

- La *fagocitosi* di microrganismi o di grossi frammenti di matrice extracellulare o di detriti avviene principalmente nei fagociti "professionisti" (macrofagi o neutrofili). Il materiale viene fagocitato a formare un *fagosoma* che si fonde successivamente con i lisosomi.
- I *proteasomi* svolgono una funzione importante nella degradazione di proteine citosoliche (si veda Fig. 1.10); queste includono proteine denaturate o mal ripiegate, così come qualsiasi altra macromolecola la cui attività funzionale deve essere regolata (per esempio, molecole di segnalazione). Molte proteine destinate a essere degradate sono identificate grazie al legame covalente con una piccola proteina chiamata *ubiquitina*. Le molecole poli-ubiquitinate si distendono e vengono introdotte nel complesso polimerico del proteasoma, una struttura cilindrica contenente attività proteasiche differenti. I proteasomi digeriscono le proteine in piccoli frammenti (da 6 a 12 amminoacidi) che possono essere successivamente degradati nei rispettivi componenti amminoacidici e riciclati.

METABOLISMO CELLULARE E FUNZIONE MITOCONDRIALE

I mitocondri si sono evoluti dai procarioti ancestrali che furono fagocitati da eucarioti primitivi circa 1,5 miliardi di anni fa. La loro origine spiega perché i mitocondri contengano un loro proprio DNA che codifica circa l'1% delle proteine cellulari totali, e approssimativamente il 20% delle proteine che intervengono nella fosforilazione ossidativa. Sebbene i loro genomi siano piccoli, i mitocondri possono effettuare tutte le fasi della replicazione, della trascrizione e della traduzione del DNA, utilizzando strumenti simili a quelli dei batteri attuali: i mitocondri, per esempio, avviano la sintesi delle proteine con la N-formilmietionina e sono sensibili ad alcuni antibiotici antibatterici. Poiché la biogenesi dei mitocondri richiede un contributo genetico dai mitocondri preesistenti, e l'ovulo contribuisce alla maggior parte degli organuli citoplasmatici dello zigote fertilizzato, il DNA mitocondriale si eredita quasi completamente per via materna. Tuttavia, poiché i componenti proteici dei mitocondri sono codificati dal DNA, sia nel nucleo sia nel mitocondrio, le disfunzioni mitocondriali possono essere legate al cromosoma X, autosomiche o ereditate per via materna.

I mitocondri sono straordinariamente dinamici, costantemente sottoposti a fissione e fusione con altri mitocondri di nuova sintesi; questo supporta il rinnovamento e li difende dai processi degenerativi che si verificano a seguito dei danni indotti dai radicali liberi dell'ossigeno. Tuttavia, i mitocondri hanno una vita di breve durata, venendo degradati attraverso l'autofagia (un processo chiamato mitofagia), con un'emivita stimata da 1 a 10 giorni, a seconda del tessuto, dello stato nutrizionale, delle richieste metaboliche e dei danni intracellulari di differente natura.

Oltre a fornire i meccanismi enzimatici per effettuare la fosforilazione ossidativa (e quindi un'efficiente produzione di energia a partire dal glucosio e dagli acidi grassi), i mitocon-

dri rivestono un ruolo fondamentale nel regolare l'apoptosi (Fig. 1.11). Le funzioni mitocondriali sono le seguenti:

- *Produzione di energia.* Ogni mitocondrio possiede due membrane distinte e con funzioni distinte; la membrana interna contiene gli enzimi della catena respiratoria racchiusi nelle creste. Questa racchiude una matrice centrale che contiene gli enzimi dei cicli dell'acido glicolitico e tricarbossilico che costituiscono le principali componenti funzionali degli organelli. All'esterno della membrana interna si trova lo spazio intermembrana, dove avviene la fosforilazione dei nucleotidi e che, a sua volta, è circoscritto dalla membrana esterna che contiene le porine, proteine che costituiscono canali anionici-voltaggio dipendenti e che sono permeabili a molecole di piccole dimensioni (<5000 Da). Come per altre membrane cellulari, le molecole più grandi (e alcune specie polari di piccole dimensioni) richiedono mezzi di trasporto specifici.

La principale fonte di energia che permette tutte le funzioni cellulari deriva dal metabolismo ossidativo. I mitocondri ossidano substrati a CO₂, trasferendo gli elettroni a elevata energia dalla molecola originaria (per esempio, zucchero) all'ossigeno molecolare. L'ossidazione di diversi metaboliti attiva *pompe protoniche* che trasferiscono H⁺ dalla matrice centrale allo spazio intermembrana. Quando gli ioni H⁺ fluiscono lungo il loro gradiente elettrochimico e fuori dallo spazio intermembrana, l'energia liberata è utilizzata per generare ATP.

In particolare, la catena di trasporto di elettroni non è necessariamente associata alla produzione di ATP. Una proteina della membrana interna arricchita di grasso bruno chiamata termogenina (chiamata anche proteina disaccoppiante-1 [UCP-1]) è un trasportatore di ioni idrogeno in grado di dissipare il gradiente protonico, disaccoppiandolo dalla fosforilazione ossidativa. In questo modo, vi è una rapida ossidazione del substrato senza sintesi di ATP che consente ai tessuti con alti livelli di UCP-1 di generare calore (termogenesi "non da brivido"). Come prodotto naturale (sebbene di solito di basso livello) dell'ossidazione dei substrati e del trasporto di elettroni, i mitocondri sono anche una fonte rilevante di specie reattive dell'ossigeno (come i radicali liberi dell'ossigeno o il perossido d'idrogeno, etc.); è importante osservare che l'ipossia, danni tossici o perfino l'invecchiamento dei mitocondri possono causare stress ossidativo intracellulare, caratterizzato da aumento delle specie reattive dell'ossigeno intracellulare.

- *Metabolismo intermedio.* La fosforilazione ossidativa genera efficientemente da 36 a 38 molecole di ATP per molecola di glucosio, ma "brucia" anche i substrati a CO₂ e H₂O senza lasciare molecole di carbonio da utilizzare per la costruzione di lipidi e proteine. Di conseguenza, per garantire gli elementi costitutivi necessari per la crescita, le cellule in rapida divisione (sia benigne sia maligne) aumentano il loro assorbimento di glucosio e glutammina e passano alla glicolisi aerobica, un fenomeno chiamato *effetto Warburg*. In tale contesto, ogni molecola di glucosio viene catabolizzata in acido lattico (anche in presenza di ossigeno adeguato), generando solo due molecole nette di ATP ma producendo prodotti intermedi che possono essere convertiti in nuovi lipidi, amminoacidi e proteine e acidi nucleici. Il metabolismo mitocondriale può essere modulato per supportare il mantenimento dell'energia cellulare o la proliferazione cellulare.
- *Morte della cellula.* Oltre a fornire l'ATP che rende possibile gran parte delle attività della cellula, i mitocondri sono essenziali per la sopravvivenza cellulare. Il ruolo dei mitocondri nella morte cellulare è spiegato più in dettaglio nel Capitolo 2 e brevemente menzionato qui.
 - *Necrosi:* uno stimolo lesivo cellulare esterno (tossina, ischemia, trauma) può danneggiare i mitocondri, inducendo la formazione di pori di transizione della perme-

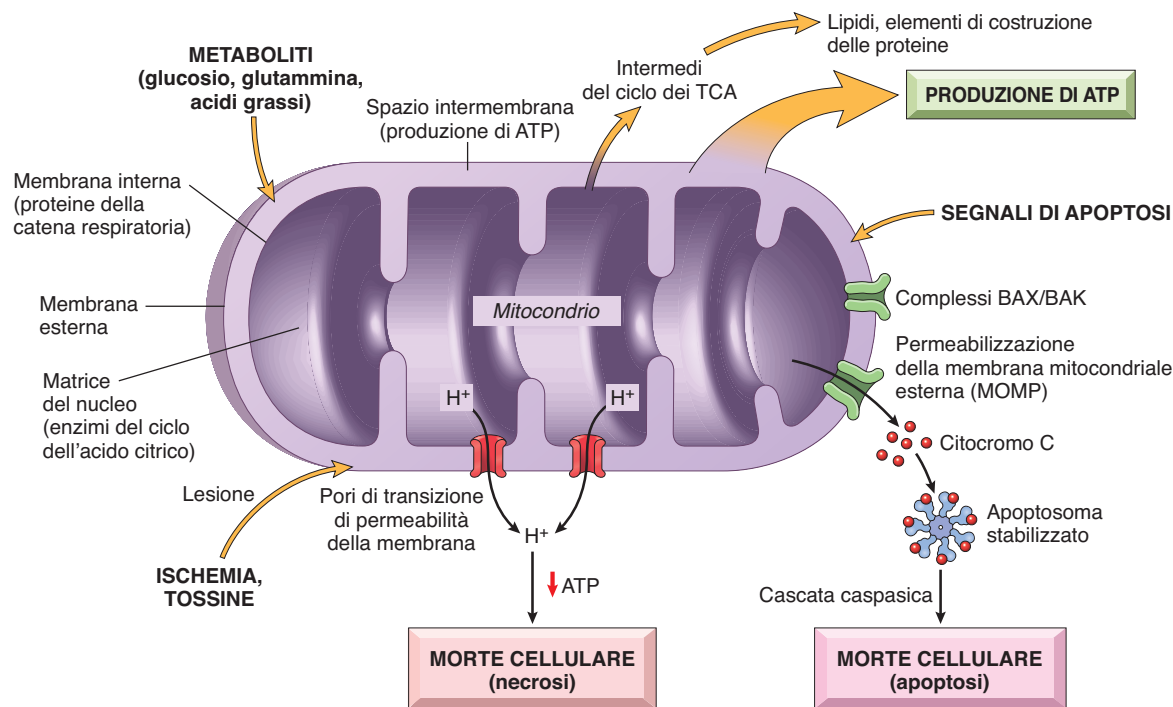


Figura 1.11 Funzioni dei mitocondri. Oltre a un'efficace produzione di adenosina trifosfato (ATP) a partire da substrati quali i carboidrati e acidi grassi, i mitocondri rivestono anche un ruolo importante nel metabolismo intermedio, producendo substrati utilizzati per sintetizzare lipidi, proteine e nucleotidi. Sostanzialmente, sono coinvolti centralmente nelle decisioni di vita e morte delle cellule: (1) lesioni tossiche o ischemiche indurranno una transizione di permeabilità della membrana che dissipa il gradiente protonico intermembrana, portando alla morte cellulare per la mancata produzione di ATP; (2) la segnalazione intracellulare da fonti intrinseche ed estrinseche può anche provocare la formazione di pori mediati dall'oligomerizzazione delle proteine Bax e Bak che inducono permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP) che facilita il rilascio del citocromo C. Il citocromo C citosolico stabilizza il complesso dell'apoptosoma per promuovere l'attivazione della caspasi e, infine, la morte cellulare apoptotica. TCA, acido tricarbossilico.

abilità mitocondriale nella membrana esterna. Questi canali consentono la dissipazione del gradiente protonico, inibendo così la successiva produzione di ATP nei mitocondri e portando la cellula a morte.

- **Apoptosi:** la morte programmata della cellula è una caratteristica fondamentale del normale sviluppo e ricambio tissutale, e può essere innescata da segnali estrinseci (come i segnali rilasciati da cellule T citotossiche o dalle citochine infiammatorie) oppure mediante vie intrinseche (come danni al DNA o stress intracellulare). I mitocondri elaborano i segnali effettori proapoptotici e antiapoptotici intracellulari per generare un segnale finale "sì" o "no" per l'attivazione dell'apoptosi. Un segnale proapoptotico chiaro provoca la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP) – distinta dalla transizione di permeabilità mitocondriale – che permette la fuoriuscita del citocromo C (e altre proteine) nel citoplasma. A loro volta, queste proteine attivano le vie di morte cellulare programmate intracellulari. In particolare, un fallimento della fisiologica segnalazione proapoptotica (o troppi effettori antiapoptotici) può essere alla base della trasformazione neoplastica maligna, anche a fronte di mutazioni che altrimenti scatenerebbero il suicidio cellulare. Al contrario, un segnale apoptotico troppo forte (o la mancanza di effettori antiapoptotici) può portare alla morte prematura delle cellule, come nei disturbi neurodegenerativi (Cap. 28).

ATTIVAZIONE CELLULARE

La comunicazione intracellulare è essenziale per gli organismi multicellulari. A livello più elementare, i segnali extracellulari

possono determinare se una cellula viva o muoia, resti in uno stato di riposo o si attivi per eseguire le sue funzioni specifiche. La segnalazione intercellulare è critica nello sviluppo dell'embrione e nel preservare l'organizzazione dei tessuti, ma è anche importante in organismi adulti, dove la segnalazione intercellulare garantisce che tutti i tessuti agiscano in modo sincrono (per esempio, in risposta a un trauma a livello locale o a un'infezione sistemica). La perdita di comunicazione intercellulare e dei meccanismi di "controllo" può anche condurre a una crescita cellulare incontrollata (per esempio, neoplasia maligna) o a una risposta inefficace a uno stimolo lesivo esogeno (per esempio, nello shock).

Segnalazione cellulare

Le singole cellule sono costantemente esposte a una notevole varietà di segnali non armonici, che devono essere integrati per ottenere una risposta razionale. Alcuni segnali possono indurre un determinato tipo di cellula a differenziarsi, mentre altri possono stimolarne la proliferazione, o attivare la cellula a eseguire funzioni specifiche. La presenza di più segnali contemporaneamente in certi casi può anche innescare un tipo di risposta del tutto differente. Molte cellule hanno bisogno di ricevere determinati stimoli solo per continuare a vivere; in assenza di adeguati segnali esogeni, muoiono per apoptosi.

I segnali a cui risponde la maggior parte delle cellule possono essere classificati in diversi gruppi:

- **Segnali di pericolo e patogeni.** Molte cellule possiedono un'innata capacità di percepire e rispondere al danno cellulare (segnali di pericolo), nonché a patogeni invasori estranei come i microbi. I recettori coinvolti sono trattati nei Capitoli 3 e 6.

- *Contatti tra cellula e cellula*, ottenuti mediante molecole di adesione e/o giunzioni gap. Come già detto precedentemente, la segnalazione delle giunzioni gap avviene tra cellule adiacenti mediante canali di collegamento idrofili che consentono il movimento di piccoli ioni (per esempio, il calcio), di metaboliti e di secondi messaggeri (per esempio, cAMP).
- *Contatti tra cellula ed ECM* mediante integrine. Torneremo a occuparci di integrine nel contesto dell'adesione dei leucociti ad altre cellule durante l'infiammazione nel Capitolo 3.
- *Molecole secrete*. Le molecole secrete più importanti comprendono i fattori di crescita (trattati più avanti); le citochine, un termine usato per indicare potenti mediatori delle risposte infiammatorie e immunitarie (Capp. 3 e 6); e gli ormoni, che sono secreti dagli organi endocrini (Cap. 24).

Le vie di segnalazione possono anche essere classificate in base alle relazioni spaziali tra le cellule che inviano e ricevono i segnali.

- Nella *segnalazione paracrina* sono interessate solo le cellule che si trovano nelle immediate vicinanze. In tale segnalazione, il segnale ha una diffusione minima, dopo di che si esaurisce rapidamente, catturato da altre cellule o intrappolato nella ECM.
- La *segnalazione autocrina* avviene quando le molecole secrete da una cellula agiscono sulla cellula stessa. Può essere uno strumento per permettere a gruppi di cellule di svilupparsi in maniera sincrona, oppure può essere utilizzato per amplificare (feedback positivo) o diminuire (feedback negativo) una particolare risposta.
- Nella *segnalazione sinaptica* i neuroni attivati secernono neurotransmettitori nelle giunzioni cellulari specializzate (i.e. sinapsi) verso cellule bersaglio.
- Nella *segnalazione endocrina* un mediatore viene rilasciato nel sangue e agisce a distanza sulle cellule bersaglio.

Indipendentemente dalla natura di uno stimolo extracellulare (paracrina, autocrino, sinaptico o endocrino), il segnale inviato viene trasmesso alla cellula attraverso recettori di natura proteica. Le molecole di segnalazione (ligandi) si legano ai loro rispettivi recettori e generano una cascata di eventi intracellulari che culmina nella risposta cellulare desiderata. I ligandi, generalmente, possiedono un'affinità elevata per i loro recettori ($\leq 10^{-8}$ M) e, a concentrazioni fisiologiche, li legano in modo estremamente specifico. I recettori possono essere presenti sulla superficie cellulare o all'interno della cellula (Fig. 1.12):

- I *recettori intracellulari* includono fattori di trascrizione attivati da ligandi liposolubili che possono attraversare facilmente la membrana plasmatica; la vitamina D e gli ormoni steroidei che attivano i recettori ormonali nucleari ne sono ottimi esempi. In altri casi un ligando di segnalazione piccolo e/o non polare prodotto da un tipo di cellula può modulare l'attività delle cellule adiacenti. Così l'ossido nitrico prodotto dalle cellule endoteliali si diffonde nelle cellule muscolari lisce sottostanti, attivando l'enzima guanilato ciclasi per produrre guanosina monofosfato ciclico (cGMP), che causa il rilassamento della muscolatura liscia; l'endotelio può quindi regolare il tono vasomotorio.
- I *recettori della membrana cellulare* sono generalmente proteine transmembrana con domini extracellulari in grado di legare ligandi attivatori. In base al tipo di recettore, il ligando può quindi:
 1. Aprire canali ionici, come avviene tipicamente nelle sinapsi tra cellule elettricamente eccitabili.
 2. Attivare una proteina regolatrice associata a GTP (guanidina trifosfato - proteina G).

3. Attivare un enzima endogeno o associato (spesso una tirosin-chinasi).
4. Stimolare un evento proteolitico o modificazione della capacità di legame o della sua stabilità, che attiva un fattore di trascrizione latente.

I recettori accoppiati alla proteina G e i recettori associati all'attività tirosin-chinasica sono tipicamente coinvolti nella segnalazione che guida la proliferazione cellulare; i cambiamenti proteolitici o di conformazione sono caratteristiche comuni di più vie di segnalazione (per esempio, Notch, Wnt e Hedgehog) che regolano il normale sviluppo. Gli eventi intracellulari secondari prodotti a valle coinvolgono frequentemente la fosforilazione o la defosforilazione delle molecole bersaglio, con successivi cambiamenti conformazionali che influenzano l'accesso nucleare o l'attività enzimatica (si veda più avanti). È intuibile come i segnali trasdotti da recettori presenti sulla superficie cellulare siano spesso alterati nei disturbi dello sviluppo e nelle neoplasie.

Vie di trasduzione del segnale

Il legame di un ligando con il suo recettore espresso sulla membrana plasmatica può attivare la trasduzione del segnale attraverso l'aggregazione del recettore indotta dal legame con il ligando (cross-linking del recettore) o inducendo un cambiamento fisico nella struttura del recettore (si veda Fig. 1.12). Entrambi i meccanismi determinano un cambiamento conformazionale nel dominio intracellulare del recettore che induce ulteriori eventi biochimici intracellulari.

I recettori cellulari sono raggruppati in vari tipi secondo i meccanismi di trasduzione del segnale che utilizzano e le vie biochimiche intracellulari che attivano (si veda Fig. 1.12). Le vie di trasduzione del segnale attivate dai recettori generalmente determinano la generazione o la modificazione di intermedi biochimici e/o l'attivazione di enzimi che infine portano all'attivazione di fattori di trascrizione, che entrano nel nucleo e modificano l'espressione genica:

- *Recettori ad attività chinasi*. La fosforilazione è un evento di segnalazione comune coinvolto nella trasduzione del segnale. I cambiamenti strutturali del recettore possono stimolare l'attività proteinchinasi intrinseca del recettore o promuovere l'attività enzimatica di chinasi intracellulari reclutate a livello del recettore; tali chinasi aggiungono residui di fosfato carichi alle molecole bersaglio. La tirosin-chinasi fosforila specifici residui di tirosina, mentre le serina/treonina chinasi aggiungono gruppi fosfato a residui di serina o di treonina e le chinasi lipidiche fosforilano i substrati lipidici. Per ogni evento di fosforilazione vi è anche una fosfatasi, che è in grado di rimuovere il fosfato residuo per modulare la trasmissione del segnale; le fosfatasi normalmente inibiscono la trasduzione del segnale.
- I *recettori tirosin-chinasici* (RTK) sono proteine integrali di membrana (per esempio, i recettori dell'insulina, del fattore di crescita dell'epidermide e del fattore di crescita di derivazione piastrinica); il loro cross-linking indotto dall'interazione con il ligando attiva i domini tirosin-chinasici presenti nelle loro code citoplasmatiche.
- Diversi tipi di recettori non possiedono alcuna attività catalitica intrinseca (per esempio, gli immunorecettori, alcuni recettori per le citochine e le integrine). Per questi, una particolare proteina intracellulare, nota come *tirosin-chinasi non recettoriale*, interagisce con il recettore dopo il legame con il ligando e fosforila motivi specifici presenti nel recettore o in altre proteine. L'omologo cellulare della proteina trasformante del virus del sarcoma di Rous, chiamata SRC, è il prototipo di un'importante famiglia delle cosiddette tirosin-chinasi non recettoriali

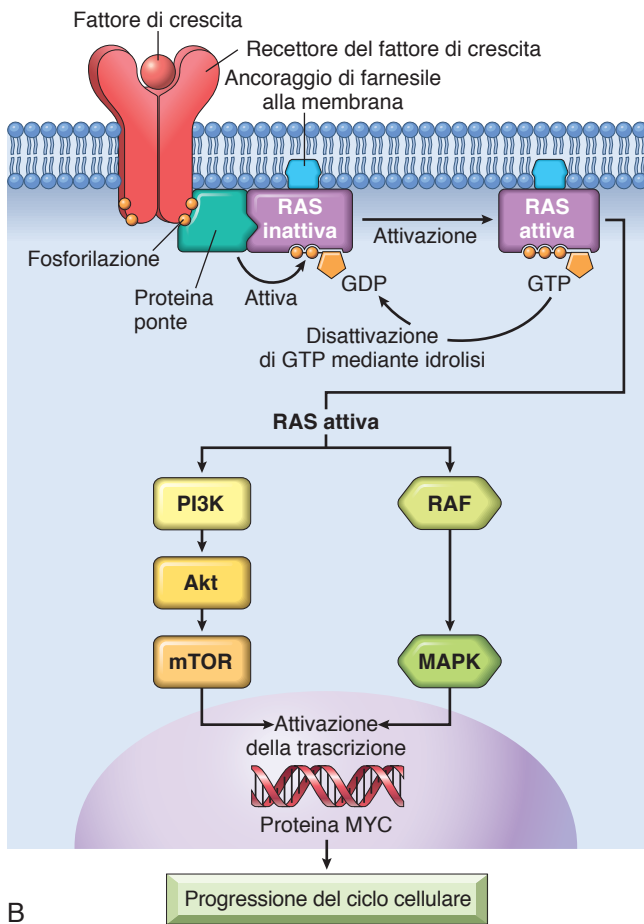
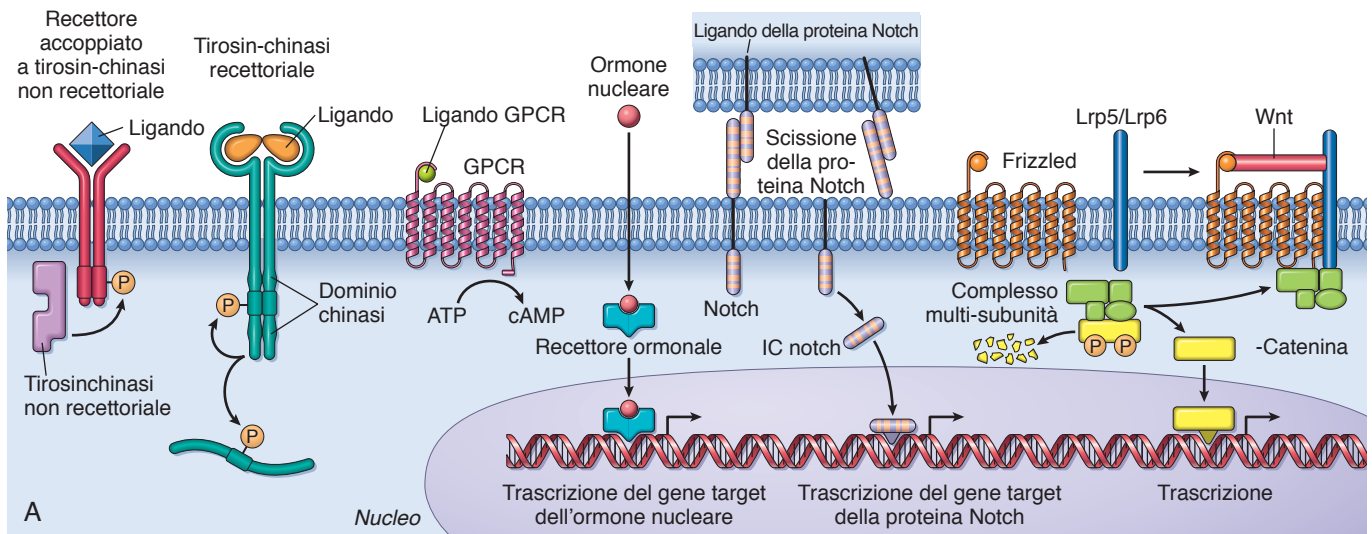


Figura 1.12 Trasduzione del segnale mediata dal recettore. **A.** Categorie di recettori che mediano la trasduzione del segnale tra cui (da sinistra a destra) recettori che utilizzano una tirosin-chinasi non recettoriale; un recettore che ha attività tirosin-chinasica intrinseca; un recettore accoppiato a proteine G (GPCR), il recettore ha sette domini transmembrana ed è legato alle proteine G eterotrimeriche; un recettore nucleare che lega il suo ligando e può quindi influenzare la trascrizione; la proteina Notch, che dopo il legame con il suo ligando espresso su un'altra cellula, viene scissa generando un frammento intracellulare Notch (IC Notch) che entra nel nucleo e modula la trascrizione di specifici geni bersaglio; e la via Wnt/Frizzled, la cui attivazione libera β -catenina intracellulare a partire da un complesso proteico che in genere ne controlla la costitutiva degradazione. La β -catenina liberata può così traslocare nel nucleo e fungere da fattore di trascrizione. **B.** Via di trasduzione del segnale mediata dal recettore con attività tirosin-chinasica dopo il legame con un fattore di crescita. Il legame del fattore di crescita (ligando) induce la dimerizzazione del recettore e l'autofosforilazione dei residui di tirosina. Il reclutamento di proteine adattatrici accoppia il recettore a proteine RAS inattive legate a guanosina difosfato (GDP), consentendo alla guanosina trifosfato (GTP) di sostituire il GDP e attivare le proteine RAS. Le proteine RAS attive interagiscono e attivano RAF (conosciuta anche come chinasi MAPKKK) e la attivano. Questa chinasi poi fosforila la protein-chinasi attivata dai mitogeni (MAPK) e, a sua volta, la MAP chinasi attivata fosforila altre proteine citoplasmatiche nonché fattori di trascrizione nucleari, che inducono risposte cellulari. Il recettore ad attività tirosin-chinasica fosforilato può legare anche altre proteine, come la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), che attiva ulteriori vie di trasduzione del segnale. La cascata è disattivata quando RAS attivata idrolizza il GTP in GDP convertendo così RAS nella forma inattiva. Le mutazioni in RAS che causano l'idrolisi ritardata di GTP possono quindi portare a un aumento della trasduzione del segnale che media la proliferazione cellulare. ATP, Adenosina trifosfato; cAMP, adenosina monofosfato ciclico; Lrp5/Lrp6, proteine 5 e 6 correlate ai recettori delle lipoproteine a bassa densità; mTOR, bersaglio della rapamicina nei mammiferi.

(chinasi della famiglia Src). La proteina SRC contiene regioni funzionali uniche, chiamate domini di omologia con src (SH); i domini SH2 tipicamente legano recettori fosforilati da un'altra chinasi, consentendo l'aggregazione di molteplici complessi enzimatici, mentre i domini SH3 mediano altre interazioni proteina-proteina, che spesso coinvolgono sequenze ricche di prolina.

- I recettori accoppiati a proteine G (GPCR) attraversano la membrana plasmatica sette volte (e per questo sono indicati anche come recettori a sette domini transmembrana o a serpentina);

sono stati identificati oltre 1.500 recettori di questo tipo. Dopo aver legato il ligando, i GPCR si associano a una proteina che lega la guanosina trifosfato intracellulare (GTP) (proteina G), che contiene guanosin-difosfato (GDP). L'interazione della proteina G con il complesso ligando-GPCR induce l'attivazione del recettore attraverso lo scambio GDP-GTP. Le successive vie di trasduzione del segnale mediate da GPCR includono la generazione di cAMP e inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3), con quest'ultimo che innesca il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico.

- **Recettori nucleari.** I ligandi liposolubili si possono diffondere all'interno della cellula, dove interagiscono con proteine intracellulari per formare un complesso ligando-recettore che lega direttamente il DNA nucleare; il risultato può essere o l'attivazione o la repressione della trascrizione genica.
- **Altre tipologie di recettori.** Oggi sappiamo che altri recettori, originariamente identificati per la loro importanza nello sviluppo dell'embrione e nella determinazione del destino della cellula, partecipano al funzionamento delle cellule mature, in particolare di quelle del sistema immunitario. Invece che sull'attività enzimatica, l'attivazione della via di trasduzione del segnale si basa sulle interazioni proteina-proteina.
 - Le proteine recettore della famiglia *Notch* fanno parte di questa categoria. Il legame tra i ligandi e i recettori Notch porta a una digestione proteolitica del recettore e a una conseguente traslocazione del suo frammento citoplasmatico (Notch intracellulare) nel nucleo per formare un complesso di trascrizione.
 - Le proteine *Wnt* possono anch'esse influenzare lo sviluppo cellulare attraverso l'attivazione di una via canonica che coinvolge i recettori transmembrana della famiglia *Frizzled*, un gruppo distinto di GPCR che regolano i livelli intracellulari di β -catenina. Di norma, la β -catenina è costantemente degradata dal proteasoma in maniera ubiquitina-dipendente. Tuttavia, il ligando Wnt che si lega al recettore Frizzled (e ad altri co-recettori) recluta anche un'altra proteina intracellulare (la proteina *Dsh*) che distrugge il complesso che porta a degradazione. Ciò stabilizza la β -catenina, permettendole di traslocare quindi nel nucleo e formare un complesso trascrizionale.

Proteine modulari di segnalazione, hub e nodi

La tradizionale visione lineare della segnalazione (secondo cui l'attivazione di un recettore innesca una sequenza precisa di eventi biochimici intermedi che alla fine modificano l'espressione genica e portano alla risposta biologica desiderata) è troppo semplicistica. Al contrario, appare sempre più chiaro che tutti i segnali iniziali producono processi multipli, anche divergenti, ognuno dei quali contribuisce al risultato finale. Ciò è particolarmente vero per le vie di trasduzione del segnale che si basano sull'attività enzimatica. Per esempio, la fosforilazione specifica di una determinata proteina può permetterle di associarsi a tutta una serie di altre molecole, generando (tra gli altri effetti):

- Attivazione (o disattivazione) di enzimi.
- Localizzazione nucleare (o citoplasmatica) di fattori di trascrizione (si veda oltre).
- Attivazione (o disattivazione) di fattori di trascrizione.
- Polimerizzazione (o depolimerizzazione) dell'actina.
- Degradazione (o stabilizzazione) di proteine.
- Attivazione di circuiti di feedback inibitori (o stimolatori).

Le proteine adattatrici hanno una funzione centrale nell'organizzare le vie di trasduzione del segnale intracellulari. Queste proteine agiscono come connettori molecolari che collegano fisicamente enzimi differenti e favoriscono l'assemblaggio di complessi molecolari. Le proteine adattatrici possono essere proteine integrali di membrana o proteine citosoliche. Una proteina adattatrice tipica contiene domini specifici (per esempio, SH2 o SH3) che mediano le interazioni proteina-proteina. Influenzando i diversi tipi di proteine che vengono reclutate nei diversi complessi di segnalazione, le proteine adattatrici determinano gli eventi di segnalazione a valle.

Per analogia con le reti dei computer, i complessi proteina-proteina possono essere considerati nodi e gli eventi biochimici che giungono a tali nodi o che da essi si originano possono

essere considerati come hub. La trasduzione del segnale può, quindi, essere considerata come una sorta di network. Comprendere queste complessità di ordine più elevato è compito della *biologia dei sistemi*, che implica una fusione tra biologia e computer science, detta biologia computazionale.

Fattori di trascrizione

La maggior parte delle vie di trasduzione del segnale induce effetti durevoli sulle funzioni cellulari modulando la trascrizione genica; ciò accade mediante l'attivazione e la localizzazione nucleare dei fattori di trascrizione. Alcuni fattori di trascrizione dirigono l'espressione di un numero limitato di geni o programmi genetici specifici, mentre altri hanno effetti più ampi. Tra i fattori di trascrizione che regolano la divisione cellulare ci sono prodotti di diversi geni che promuovono la crescita, come *MYC* e *JUN*, e prodotti di geni che inibiscono il ciclo cellulare, come *TP53*. I fattori di trascrizione contengono spesso domini modulari che si legano al DNA, a piccole molecole come gli ormoni steroidei e alle proteine regolatrici intracellulari. Le interazioni mediate da questi domini possono essere controllate da modifiche post-traduzionali come la fosforilazione. Questi cambiamenti possono provocare la traslocazione del fattore di trascrizione dal citoplasma nel nucleo, modificare l'emivita proteica del fattore di trascrizione, esporre specifici motivi di legame al DNA o promuovere il legame con i componenti del complesso di RNA polimerasi per aumentare l'attività del fattore di trascrizione.

- Il dominio che lega il DNA consente il legame specifico a sequenze corte di DNA. Sebbene storicamente l'interesse si sia concentrato soprattutto sul legame dei fattori di trascrizione ai promotori dei geni, oggi ci si è resi conto che i fattori di trascrizione possono legarsi lungo tutto il genoma e che il legame avviene per lo più con elementi regolatori quali gli enhancer. Gli enhancer sono situati di norma nelle immediate vicinanze dei geni, anche se a volte possono essere anche distanti; si pensa persino che alcuni di essi possano essere localizzati su altri cromosomi. Tali scoperte sottolineano l'importanza dell'organizzazione della cromatina nella regolazione dell'espressione genica, in condizioni sia normali sia patologiche.
- Affinché un fattore di trascrizione promuova la trascrizione, deve anche possedere *domini di interazione proteina-proteina* in grado di reclutare, in maniera diretta o indiretta, enzimi che modificano gli istoni, complessi che rimodellano la cromatina e (in maniera più importante) l'RNA polimerasi – un grande complesso enzimatico multiproteico che è responsabile della sintesi di RNA.

FATTORI DI CRESCITA E RECETTORI

I fattori di crescita stimolano l'attività delle vie di trasduzione del segnale e di geni che incrementano la sopravvivenza, la crescita e la divisione cellulare. I fattori di crescita si legano a recettori specifici e, in sostanza, influenzano l'espressione di geni che:

- Promuovono l'ingresso nel ciclo cellulare.
- Rimuovono eventuali fattori che inibiscono la progressione cellulare (promuovendo quindi la replicazione).
- Prevengono l'apoptosi.
- Potenziano la sintesi di alcuni componenti (acidi nucleici, proteine, lipidi, carboidrati) richiesta per la divisione cellulare.

Sebbene i fattori di crescita siano considerati come proteine in grado soltanto di stimolare la proliferazione di cellule e/o

la loro sopravvivenza, è importante sottolineare che possono anche controllare tutta una serie di funzioni cellulari non legate alla crescita, come la migrazione, la differenziazione e la capacità di sintesi. Alcuni fattori di crescita rilevanti per la riparazione e la rigenerazione dei tessuti sono elencati nella Tabella 1.1 e descritti ulteriormente nel Capitolo 3.

I fattori di crescita sono coinvolti nella proliferazione in condizioni fisiologiche e in seguito a stimoli lesivi, quando le cellule irreversibilmente danneggiate devono essere sostituite. Situazioni di proliferazione incontrollata si possono verificare quando l'attività del fattore di crescita non è regolata o quando le vie di trasduzione del segnale attivate dal fattore di crescita sono alterate e restano sempre attive. Di conseguenza, molti geni attivati dai fattori di crescita sono *proto-oncogeni*. In virtù dei loro effetti proliferativi, le mutazioni che portano a un guadagno di funzione li convertono in *oncogeni* che portano alla divisione cellulare incontrollata e all'insorgenza di neoplasie. Sebbene i fattori di crescita descritti in questa sede agiscano tutti mediante recettori dotati di attività chinasi intrinseca, i fattori di crescita possono trasdurre i segnali mediante una delle vie illustrate nella Figura 1.12.

Fattore di crescita dell'epidermide (EGF) e fattore di crescita trasformante (TGF- α). Entrambi i fattori appartengono alla famiglia del fattore di crescita dell'epidermide (Epidermal Growth Factor, EGF), si legano a gruppi di recettori simili e condividono molte attività biologiche. L'EGF e il fattore di crescita trasformante α (Transforming Growth Factor, TGF α), prodotti da macrofagi e da alcune cellule epiteliali, sono mitogeni per epatociti e fibroblasti, nonché per tutta una serie di cellule epiteliali. La "famiglia dei recettori dell'EGF" comprende quattro recettori di membrana con attività tirosin-chinasi intrinseca; il recettore più caratterizzato è l'EGFR1, noto anche come ERB-B1 o semplicemente EGFR. Mutazioni e/o amplificazione di EGFR1 si verificano frequentemente in numerosi tipi di tumori, del polmone, della testa e del collo, della mammella e del cervello. Il recettore ERB-B2 (noto anche come *HER-2*) è sovraespresso in un sottogruppo di tumori mammari. Anticorpi e piccole mo-

lecole antagoniste, che legano molti di questi recettori, si sono dimostrati efficaci in alcuni tipi di tumore maligno.

Fattore di crescita degli epatociti. Il fattore di crescita degli epatociti (Hepatocyte Growth Factor, HGF), (noto anche come *scatter factor*, ossia fattore di dispersione), esercita effetti mitogeni sugli epatociti e sulla maggior parte delle cellule epiteliali, tra cui quelle biliari, del polmone, dei reni, della mammella e della cute. L'HGF agisce come un *morfogeno* nello sviluppo embrionale (ossia, influisce sul pattern di differenziazione dei tessuti), stimola la migrazione cellulare (da cui la denominazione di *fattore di dispersione*) e promuove la sopravvivenza degli epatociti. L'HGF è prodotto dai fibroblasti e dalla maggior parte delle cellule mesenchimali, endoteliali e da cellule epatiche non-epatocitiche. Viene sintetizzato come precursore inattivo (pro-HGF) ed è attivato proteoliticamente mediante una serin-proteasi rilasciata dai tessuti danneggiati. Il recettore dell'HGF è chiamato MET e possiede attività tirosin-chinasi intrinseca. MET è frequentemente mutato o amplificato nei tumori, in particolare nei carcinomi renali e nei carcinomi papilliferi della tiroide. Di conseguenza, gli inibitori del recettore MET sono attualmente oggetto di studio per la terapia antitumorale.

Fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF). Il fattore di crescita di derivazione piastrinica (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) costituisce una famiglia di diverse proteine strettamente omologhe, ognuna delle quali è formata da due catene (indicate da coppie di lettere). Tre isoforme di PDGF (AA, AB e BB) sono costitutivamente biologicamente attive; il PDGF-CC e il PDGF-DD devono essere attivati mediante digestione proteolitica. Il PDGF è immagazzinato nei granuli citoplasmici delle piastrine e viene rilasciato in seguito alla loro attivazione. Sebbene le diverse isoforme del PDGF siano state in origine isolate dalle piastrine (da cui il nome), esse vengono prodotte da diverse cellule, tra cui macrofagi attivati, cellule dell'endotelio, cellule muscolari lisce e cellule tumorali. Tutte le isoforme del PDGF esercitano i loro effetti legandosi a due recettori di membrana (PDGFR α e β), entrambi caratterizzati

Tabella 1.1 Fattori di crescita coinvolti nella rigenerazione e nella riparazione

Fattore di crescita	Fonti	Funzioni
Fattore di crescita dell'epidermide (EGF)	Macrofagi attivati, ghiandole salivari, cheratinociti e diverse altre cellule	Tipi di cellule mitogene; stimola la migrazione delle cellule epiteliali; stimola la formazione di tessuto di granulazione
Fattore di crescita trasformante α (TGF α)	Macrofagi attivati, cheratinociti, altre cellule	Stimola la proliferazione di epatociti e altre differenti cellule epiteliali
Fattore di crescita degli epatociti (HGF) (<i>scatter factor</i>)	Fibroblasti, cellule stromali nel fegato, cellule endoteliali	Promuove la proliferazione degli epatociti e di altre cellule epiteliali; aumenta la motilità cellulare
Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)	Cellule mesenchimali	Stimola la proliferazione di cellule endoteliali; aumenta la permeabilità vascolare
Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)	Piastrine, macrofagi, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, cheratinociti	Chemiotattico per neutrofili, macrofagi, fibroblasti e cellule muscolari lisce; attiva e stimola la proliferazione di fibroblasti, di cellule endoteliali e di altri tipi cellulari; stimola la sintesi di proteine della ECM
Fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs), di tipo acido (FGF-1) e basico (FGF-2)	Macrofagi, mastociti, cellule endoteliali, diversi altri tipi di cellule	Chemiotattico e mitogeno per i fibroblasti; stimola l'angiogenesi e la sintesi di proteine della ECM
Fattore di crescita trasformante- β (TGF- β)	Piastrine, linfociti T, macrofagi, cellule endoteliali, cellule epiteliali, cellule muscolari lisce, fibroblasti	Chemiotattico per leucociti e fibroblasti; stimola la sintesi di proteine della ECM; blocca l'infiammazione acuta
Fattore di crescita dei cheratinociti (KGF) (es. FGF-7)	Fibroblasti	Stimola la migrazione, la proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti

ECM, matrice extracellulare.

da attività tirosin-chinasica intrinseca. Il PDGF induce la proliferazione cellulare dei fibroblasti e delle cellule endoteliali e muscolari lisce ed è chemiotattico per tali cellule (oltre che per le cellule infiammatorie), inducendone quindi l'accumulo nei siti di infiammazione e di danno tissutale.

Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF). I VEGF (Vascular Endothelial Growth Factors,) sono una famiglia di proteine omodimeriche: VEGF-A, -B, -C e -D e il PlGF (fattore di crescita placentare). Il VEGF-A, in genere denominato semplicemente VEGF, è il principale fattore *angiogenico* (che determina lo sviluppo dei vasi sanguigni) in caso di danni tessutali e nei tumori. Il VEGF-B e il PlGF sono coinvolti nello sviluppo dei vasi durante l'embriogenesi, mentre il VEGF-C e il VEGF-D stimolano sia l'angiogenesi sia lo sviluppo dei vasi linfatici (*linfangiogenesi*). A parte il loro ruolo nell'angiogenesi, i diversi tipi di VEGF partecipano anche al mantenimento dell'endotelio normale, mostrando un'espressione più elevata nelle cellule endoteliali adiacenti all'epitelio fenestrato (per esempio, podociti nel rene, epitelio pigmentato nella retina e plesso corioideo). Il VEGF induce tutte le attività necessarie per l'angiogenesi, incluse la migrazione e la proliferazione (gemmazione dei capillari) delle cellule endoteliali, e favorisce la formazione del lume vascolare. Il VEGF induce inoltre la vasodilatazione e aumenta la permeabilità vascolare (il VEGF originariamente era chiamato Vascular Permeability Factor per riflettere tale attività). Come si può facilmente prevedere, l'ipossia del tessuto è l'induttore più importante della produzione di VEGF, attraverso vie di trasduzione del segnale che coinvolgono l'attivazione del fattore di trascrizione fattore 1 inducibile dall'ipossia (Hypoxia Inducible Factor-1, HIF-1). Altri induttori di VEGF (prodotti nei siti di infiammazione o di cicatrizzazione) sono il PDGF e il TGF α .

I VEGF si legano a una famiglia di recettori ad attività tirosin-chinasica intrinseca (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3); il VEGFR-2 è espresso a livelli elevati nell'endotelio ed è il più importante fattore angiogenico. Gli anticorpi contro il VEGF sono stati approvati per il trattamento di tumori (come quello del rene e del colon) che richiedono l'angiogenesi per crescere e metastatizzare. Le terapie anti-VEGF hanno avuto successo nelle malattie oftalmiche, come la degenerazione maculare "umida" legata all'età (una disfunzione caratterizzata da alterazioni dell'angiogenesi e della permeabilità vascolare, che provoca cecità negli adulti), l'angiogenesi associata a retinopatia prematura e la perdita vascolare che conduce all'edema maculare diabetico. Infine, l'aumento di isoforme solubili di VEGFR-1 (noto anche come s-FLT-1) nelle donne in gravidanza può provocare pre-eclampsia (ipertensione e proteinuria), per la loro capacità di sequestrare il VEGF libero necessario per il mantenimento della funzione dell'endotelio.

Fattore di crescita dei fibroblasti. Il fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor, FGF) comprende una famiglia di fattori di crescita caratterizzata da oltre 20 componenti. Quelli a oggi meglio caratterizzati sono gli FGF acidi (aFGF, noti anche come FGF-1) e gli FGF basici (bFGF, noti anche come FGF-2); il fattore FGF-7 è noto come fattore di crescita dei cheratinociti (KGF). Gli FGF rilasciati dalla cellula si associano all'eparan-solfato nella ECM, che funge da serbatoio di accumulo per fattori inattivi che possono successivamente essere rilasciati mediante proteolisi (per esempio, nei punti di cicatrizzazione). Gli FGF trasducono il segnale attraverso quattro recettori ad attività tirosin-chinasica (FGFR1-FGFR4) che promuovono la guarigione delle ferite, l'emopoiesi e lo sviluppo dei tessuti; il bFGF promuove l'angiogenesi.

Fattore di crescita trasformante-beta. Il TGF β presenta tre isoforme (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) che appartengono a una

famiglia più estesa di circa 30 membri, che comprende le proteine morfogenetiche dell'osso (Bone Morphogenetic Proteins, BMP), le attivine, le inibine e la sostanza inibitrice Mülleriana. Il TGF β 1 è l'isoforma più ampiamente distribuita ed è comunemente indicato semplicemente come TGF β . Si tratta di una proteina omodimerica prodotta da vari tipi di cellule, tra cui le piastrine, l'endotelio, le cellule epiteliali e le cellule infiammatorie; il TGF β è secreto come un precursore che richiede la proteolisi per essere biologicamente attivo. Esistono due recettori del TGF β (il tipo I e il tipo II), entrambi caratterizzati da attività serina/treonina chinasica, che stimolano la fosforilazione di molteplici fattori di trascrizione, chiamati *Smad*. Gli Smad fosforilati formano eterodimeri il che consente la loro traslocazione nucleare e l'associazione con altre proteine in grado di legare il DNA per attivare o inibire la trascrizione genica. La trasduzione del segnale mediata dal TGF β induce molteplici effetti, spesso opposti, che dipendono dal tipo di tessuto e da eventuali segnali concomitanti. Gli agenti dotati di una tale varietà di effetti sono chiamati *pleiotropici*, e il TGF- β è considerata una molecola pleiotropica con effetti opposti. In primo luogo, tuttavia, il TGF β può essere definito come uno stimolatore del processo di riparazione delle ferite e come un inibitore del processo infiammatorio che accompagna la fase di cicatrizzazione.

- Il TGF β stimola la produzione di collagene, di fibronectina e di proteoglicani e inibisce la degradazione del collagene sia riducendo l'attività delle metalloproteasi (MMP) sia aumentando l'attività degli inibitori tissutali delle proteasi stesse (TIMP) (si veda oltre). Il TGF β non solo partecipa alla formazione di cicatrici, ma induce il processo fibrotico nei polmoni, nel fegato, nell'intestino e nei reni nel contesto di un'infiammazione cronica.
- Il TGF β è anche una citochina antinfiammatoria che serve a limitare e a inibire le risposte infiammatorie. Ottiene tale risultato inibendo la proliferazione dei linfociti e l'attività di altri leucociti. In animali con deficit di TGF β si osserva un'infiammazione diffusa e persistente.

MATRICE EXTRACELLULARE

La matrice extracellulare (ECM) è un sistema di proteine che costituisce una parte significativa di ogni tessuto. Le interazioni cellulari con la ECM sono fondamentali per lo sviluppo, per i processi di riparazione e per mantenere la normale struttura dei tessuti (Fig. 1.13). Ben più di un semplice sistema di riempimento dello spazio intercellulare, la ECM svolge diverse funzioni:

- **Supporto meccanico** per l'ancoraggio, la migrazione delle cellule e per il mantenimento della loro polarità.
- **Meccanismo di regolazione della proliferazione cellulare**, immagazzinando ed esponendo fattori di crescita e trasmettendo segnali attraverso i recettori cellulari della famiglia delle integrine. La ECM rappresenta un serbatoio di accumulo per fattori di crescita latenti che possono essere rilasciati durante il processo infiammatorio o stimoli lesivi.
- **Impalcatura per il rinnovamento dei tessuti.** Poiché il mantenimento della normale struttura di un tessuto richiede una membrana basale o uno stroma, l'integrità della membrana basale o dello stroma di cellule del parenchima è fondamentale per permettere una rigenerazione coordinata dei tessuti. Di conseguenza, alterazioni nella ECM ostacolano la rigenerazione e la riparazione dei tessuti.
- **Fondamenta per la costituzione di microambienti tissutali.** La membrana basale agisce da confine tra l'epitelio e il sottostante tessuto connettivo, ma spesso non si limita a fornire

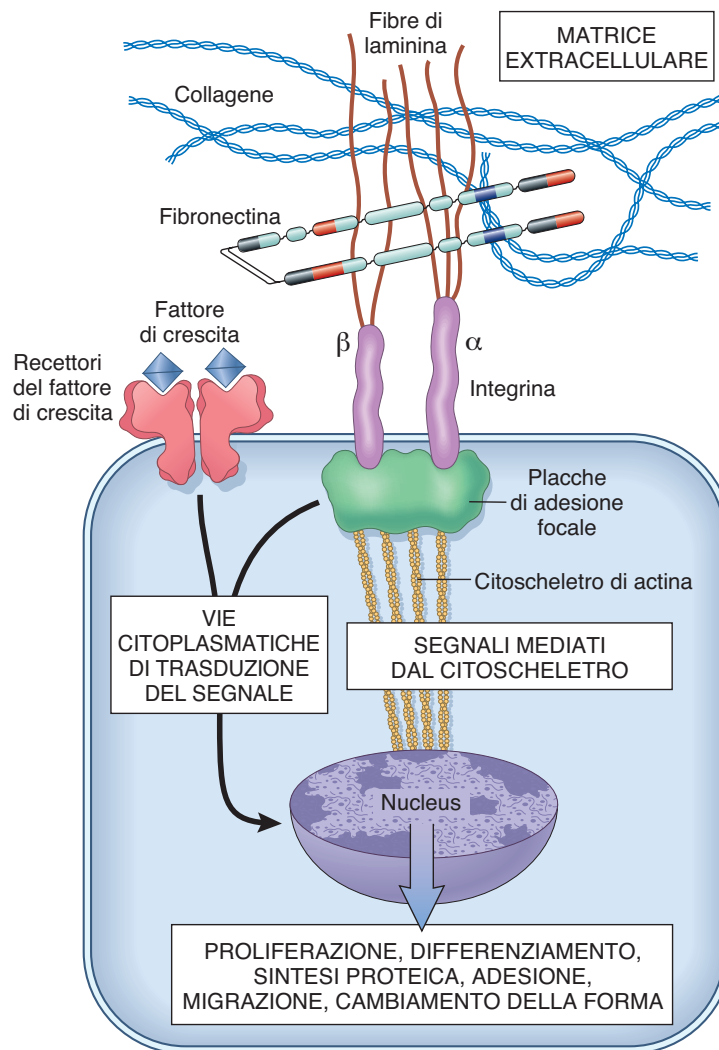


Figura 1.13 Interazioni della matrice extracellulare (ECM) e vie di segnalazione cellulare generate dai fattori di crescita. Le integrine sulla membrana cellulare interagiscono con il citoscheletro a livello di complessi di adesione focale (aggregati proteici che contengono vinculina, α -actinina e talina; si veda la Fig. 1.17 C). Ciò determina la generazione di messaggeri intracellulari oppure la trasduzione di segnali direttamente al nucleo. I recettori di fattori di crescita possono attivare vie di trasduzione del segnale simili a quelle attivate dalle integrine. I segnali generati sia dalle interazioni della ECM e sia dai fattori di crescita possono essere integrati dalla cellula per indurre risposte specifiche, come la proliferazione, la migrazione o la differenziazione.

un mero supporto strutturale, ma è anche funzionale; per esempio, nel rene fa parte dell'apparato di filtrazione.

L'ECM è rimodellata continuamente: il suo processo di degradazione e sintesi accompagna processi importanti quali la morfogenesi, la rigenerazione e la riparazione dei tessuti, la fibrosi cronica, l'invasione tumorale e la metastatizzazione.

L'ECM si presenta in due forme fondamentali: la matrice interstiziale e la membrana basale (Fig. 1.14).

- **Matrice interstiziale.** La matrice interstiziale occupa gli spazi tra le cellule stromali nel tessuto connettivo, oltre che tra l'epitelio dei parenchimi e le strutture sottostanti di sostegno vascolari e muscolari lisce in alcuni organi. La matrice interstiziale viene sintetizzata da cellule mesenchimali (come i fibroblasti) e forma un gel tridimensionale semi-fluido relativamente amorfo. In alcuni tessuti, quali il tratto gastrointestinale, la vescica e i tessuti molli periarteriali, il liquido all'interno della matrice attenua le forze di compressione dei tessuti associate con la peristalsi, la minzione e il flusso sanguigno arterioso pulsatile. I principali costituenti non flu-

idi della matrice interstiziale sono i collagene fibrillari e non fibrillari, così come la fibronectina, l'elastina, i proteoglicani, lo ialuronato e altri componenti (si veda oltre).

- **Membrana basale.** La matrice interstiziale nei tessuti connettivi assume un aspetto estremamente organizzato intorno alle cellule epiteliali, alle cellule endoteliali e alle cellule della muscolatura liscia, dove forma membrane basali, superfici specializzate per la crescita cellulare. I componenti della membrana basale, sintetizzati dall'epitelio sovrastante e dalle cellule mesenchimali sottostanti, costituiscono una sorta di rete laminare piatta (sebbene sia classificata come membrana, essa è piuttosto porosa). I principali componenti sono il collagene non fibrillare di tipo IV e la laminina.

Componenti della matrice extracellulare

I componenti della ECM (Fig. 1.15) si suddividono in tre famiglie:

- **Proteine strutturali fibrose** come i collagene e le elastine, che conferiscono resistenza alla trazione e capacità retrattile.

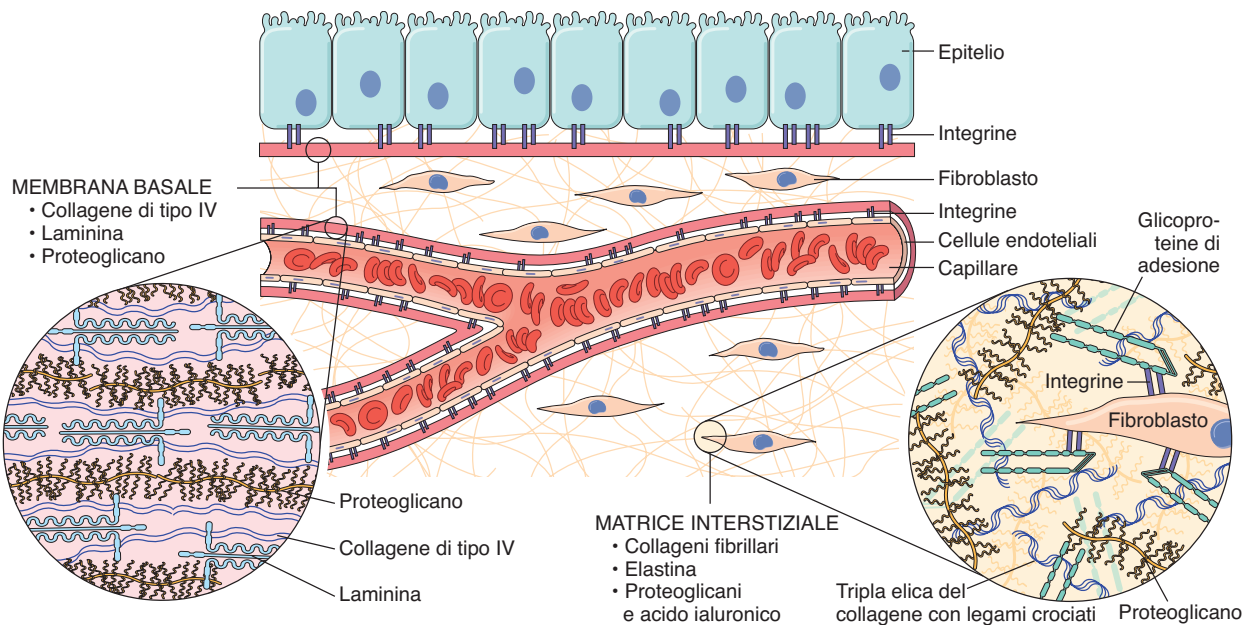


Figura 1.14 Componenti principali della matrice extracellulare (ECM), quali i collagene, i proteoglicani e le glicoproteine adesive. Sia le cellule epiteliali sia quelle mesenchimali (come i fibroblasti) interagiscono con la ECM grazie alle integrine. Le membrane basali e la ECM interstiziale presentano un'architettura e una composizione generale differenti, sebbene abbiano alcuni componenti in comune. Per una maggiore chiarezza, non sono mostrati molti componenti della ECM (come l'elastina, la fibrillina, l'acido ialuronico e il sindecano).

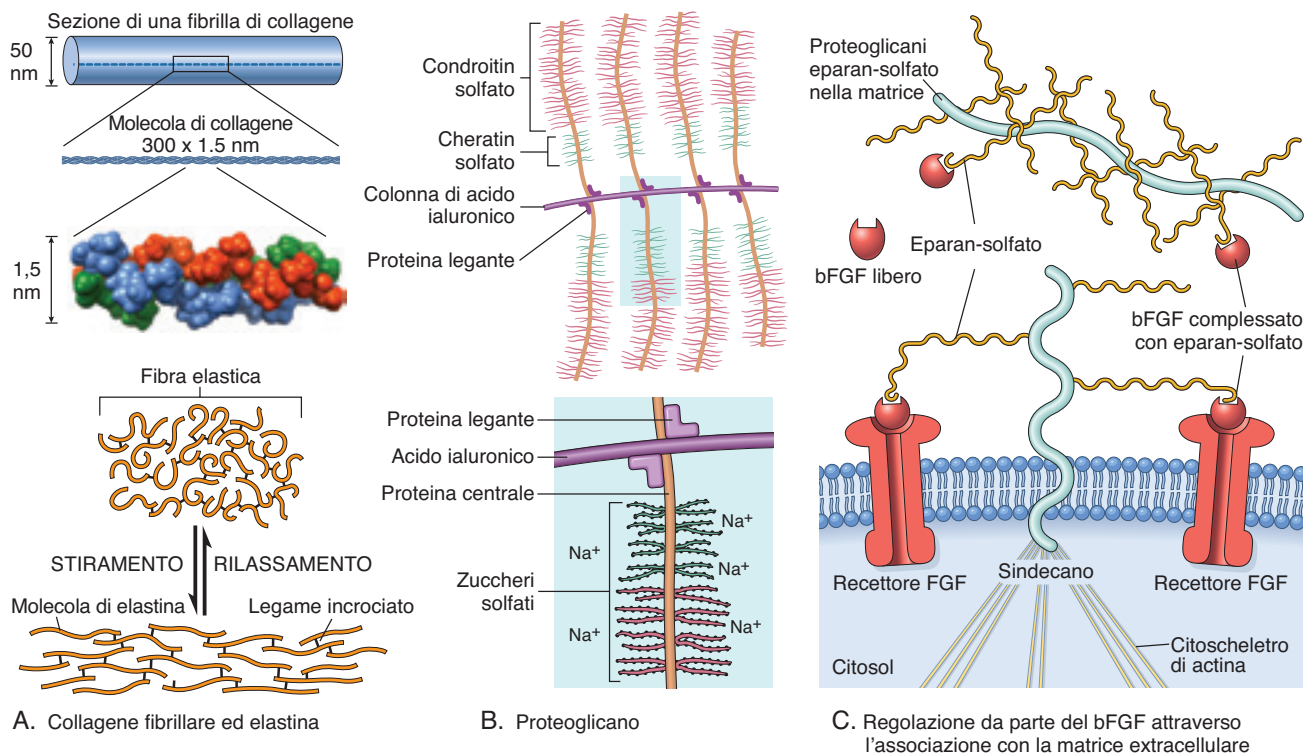


Figura 1.15 Componenti della matrice extracellulare (ECM). **A.** Collagene fibrillare e strutture dei tessuti elastici. A causa della struttura bastoncina delle fibrille e in virtù dell'ampio cross-linking laterale, le fibre di collagene possiedono una notevole resistenza alla trazione, ma non hanno molta elasticità. Anche l'elastina forma un aggregato, ma differisce per la presenza di ampi segmenti idrofobici che a riposo le conferiscono una densa configurazione globulare. Quando si applica uno stimolo che induce stiramento, i domini idrofobici si aprono, ma l'aggregato fa sì che il tessuto si conservi intatto; quando la tensione di stiramento si allenta, i domini idrofobici delle proteine possono ripiegarsi. **B.** Struttura dei proteoglicani. Gli zuccheri solfati a carica altamente negativa presenti sulle catene laterali dei proteoglicani attraggono sodio e acqua per produrre una matrice viscosa, ma comprimibile. **C.** Regolazione dell'attività del fattore di crescita fibroblastico basilico (bFGF, detto anche FGF-2) da parte della ECM e dei proteoglicani cellulari. L'eparan-solfato si lega al bFGF secreto nella ECM. Il sindecano è un proteoglicano presente sulla membrana cellulare formato da una struttura proteica centrale transmembrana e da catene laterali di glicosaminoglicani extracellulari che sono in grado di legare il bFGF, e una coda citoplasmatica che interagisce con il citoscheletro intracellulare di actina. Le catene laterali del sindecano legano il bFGF rilasciato dalla ECM danneggiata, favorendo così un'interazione bFGF con i recettori della superficie cellulare. *FGF*, Fibroblast Growth Factor.

- *Gel idratati* come i proteoglicani e l'acido ialuronico, che permettono la lubrificazione e la resistenza alla compressione.
- *Glicoproteine adesive* che collegano gli elementi della ECM tra loro e con le cellule.

Collageni. I collageni sono formati da tre distinte catene di polipeptidi, intrecciate in una tripla elica simile a una corda (Fig. 1.16). Sono stati identificati circa 30 tipi diversi di collagene, alcuni dei quali sono specifici di alcune cellule e tessuti.

- Alcuni tipi di collagene (per esempio, tipo I, II, III e V) formano fibrille lineari stabilizzate da legami idrogeno intercatena; tali *collageni fibrillari* costituiscono gran parte del tessuto connettivo delle ossa, dei tendini, della cartilagine, dei vasi sanguigni e della cute, e sono presenti nelle ferite in via di guarigione e nelle cicatrici. La resistenza alla trazione dei collageni fibrillari deriva dal cross-linking laterale delle triple eliche formato da legami covalenti dovuti all'idrossilazione della lisina. L'attivazione dell'enzima responsabile di ciò, la *lisil idrossilasi*, dipende dalla presenza di vitamina C, il che spiega perché i bambini con carenza di acido ascorbico presentano deformazioni ossee e perché individui di qualsiasi età con carenza di vitamina C hanno difficoltà a cicatrizzare e sanguinano facilmente. Difetti genetici, tra cui le mutazioni dei collagene e della lisil idrossilasi, provocano malattie come l'*osteogenesi imperfetta* e alcune forme della *sindrome di Ehlers-Danlos* (Cap. 5).
- I *collageni non fibrillari* (per esempio, collagene di tipo IV) possono contribuire alla struttura di membrane basali pla-

nari; aiutano a regolare i diametri del collagene fibrillare e le interazioni collagene-collagene per mezzo del cosiddetto collagene associato a fibrille con tripla elica interrotta (il collagene di tipo IX nella cartilagine), oppure forniscono fibrille che mantengono la struttura dell'epitelio squamoso stratificato (per esempio, collagene di tipo VII; le mutazioni causano lesioni cutanee bollose).

Elastina. La capacità dei tessuti di retrarsi in maniera elastica e recuperare la struttura normale in seguito a uno stress fisico è dovuta all'elastina (si veda Fig. 1.15 A). L'elasticità è particolarmente importante nelle valvole cardiache e nei grandi vasi sanguigni che devono periodicamente ricevere un flusso pulsatile, così come nell'utero, nella cute e nei legamenti. Dal punto di vista morfologico, le fibre elastiche sono composte da un nucleo centrale di elastina associato a un complesso a rete formato dalla glicoproteina fibrillina. Questa particolare struttura spiega in parte perché i difetti di sintesi della fibrillina determinino anomalie dello scheletro e indebolimento delle pareti aortiche, come accade in pazienti affetti dalla sindrome di Marfan; la fibrillina controlla anche la disponibilità del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) libera, e tale funzione svolge un ruolo nella patogenesi della sindrome di Marfan (Cap. 5).

Proteoglicani e acido ialuronico (si veda Fig. 1.15 B). I proteoglicani formano gel comprimibili altamente idratati che conferiscono resistenza a forze meccaniche di compressione; nella cartilagine delle articolazioni, i proteoglicani forniscono

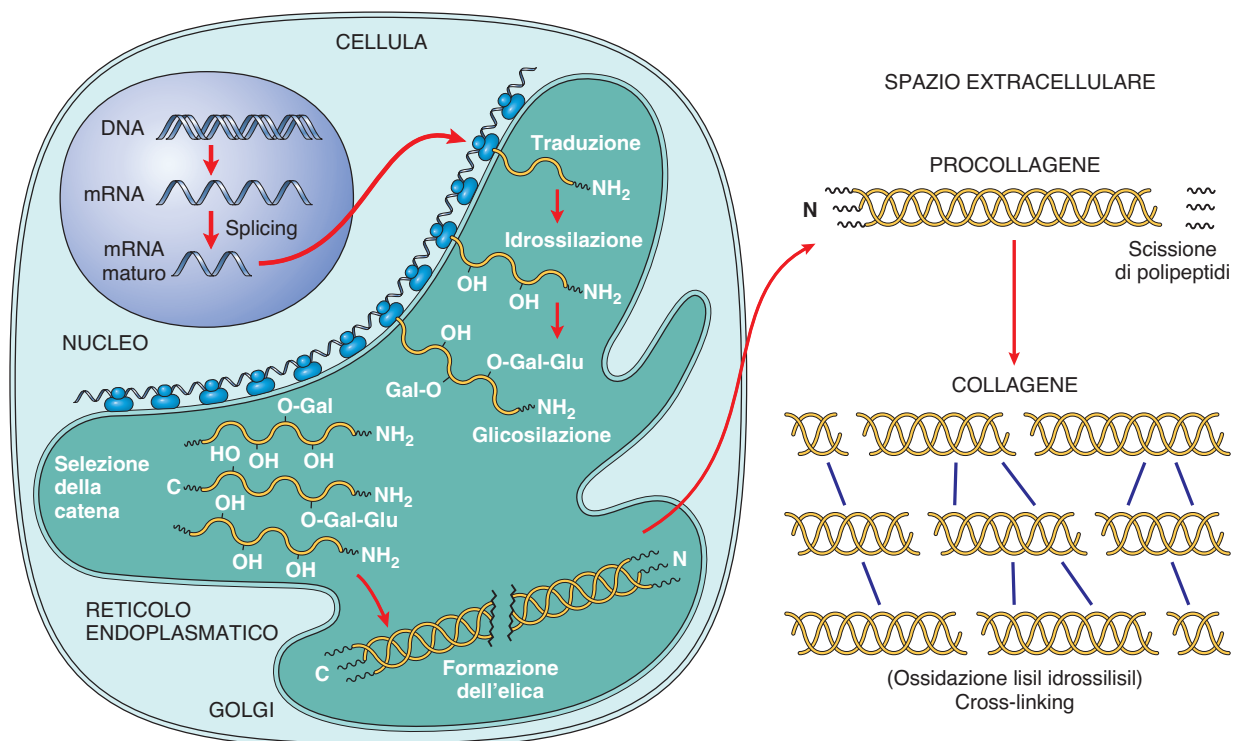


Figura 1.16 Via di biosintesi del collagene. Alcuni tipi di collagene sono eterotrimeri (tipi I, V e XI), mentre altri sono omotrimeri (tipi II e III). Le catene- α che costituiscono una molecola di collagene fibrillare sono sintetizzate come pro-catene- α , con molteplici polipeptidi globulari che affiancano il dominio centrale a tripla elica. Dopo l'idrossilazione della prolina e della lisina e dopo la glicosilazione della lisina all'interno del reticolo endoplasmatico, tre catene di procollagene si allineano per formare una tripla elica. Per tutti i collageni fibrillari, l'estremità carbossilica del propeptide viene completamente rimossa dall'attività dell'endopeptidasi dopo la secrezione e i risultanti domini a forma di bastoncino a tripla elica polimerizzano in modo sfalsato per formare fibrille. Il propeptide N-terminale è processato diversamente in base alla catena del collagene. Per i tipi di collagene I e II, l'elaborazione del N-propeptide è completa, mentre per i collageni V e XI, una grande parte dei N-propeptidi rimane attaccata; tale elaborazione "incompleta" può regolare la dimensione della fibrilla. Dopo la secrezione, il collagene raggiunge la stabilità laterale mediante il cross-linking che coinvolge la lisil ossidasi e i residui precedentemente idrossilati. mRNA, Messenger RNA. Eventuali difetti nella sequenza primaria, nella processazione del procollagene da parte delle endopeptidasi, nell'idrossilazione o nel cross-linking possono portare a lassità del tessuto connettivo. Le strutture specifiche (per esempio, vasi sanguigni, pelle, ossa, legamenti) colpite da tali disturbi sono identificabili in base al collagene che predomina in quel tessuto.

anche uno strato lubrificante tra le superfici ossee adiacenti. I proteoglicani sono formati da lunghe catene di polisaccaridi, denominati *glicosamminoglicani* (alcuni esempi sono il cheratan-solfato e il condroitin-solfato), legati a una proteina "core"; essi si legano poi a un lungo polimero di acido ialuronico chiamato *ialuronato*, in un modo che ricorda la disposizione delle setole di uno spazzolino. La carica fortemente negativa degli zuccheri solfati sottoposti a compattazione attrae cationi (per la maggior parte di sodio), e contemporaneamente, grandi quantità di acqua attratta osmoticamente, generando una matrice viscosa di consistenza simile al gel. Oltre a fornire comprimibilità ai tessuti, i proteoglicani fungono anche da serbatoi di accumulo per i fattori di crescita secreti nella ECM (per esempio, FGF e HGF). Alcuni proteoglicani sono proteine integrali di membrana che svolgono funzioni nella proliferazione, nella migrazione e nell'adesione cellulare (per esempio, legando e concentrando i fattori di crescita e le chemochine) (si veda Fig. 1.15 C).

Glicoproteine adesive e recettori di adesione. Sono molecole diverse dal punto di vista strutturale, coinvolte in interazioni cellula-cellula, cellula-ECM, e ECM-ECM (Fig. 1.17). Prototipi di glicoproteine adesive sono la *fibronectina* (un componente principale della ECM interstiziale) e la *laminina* (il maggiore componente della membrana basale). Le *integrine* sono esempi tipici di recettori di adesione, noti anche come molecole di adesione cellulare (Cell Adhesion Molecules, CAM); le CAM comprendono anche membri della famiglia delle immunoglobuline, caderine e selectine.

- La *fibronectina* è un grande eterodimero (450 kDa) unito da ponti di disolfuro, presente in forma tissutale e plasmatica; è sintetizzata da diverse cellule, come i fibroblasti, i monociti

e l'endotelio. La fibronectina possiede domini specifici che possono legare diversi componenti della ECM (come collagene, fibrina, eparina e proteoglicani), oltre che attaccarsi alle integrine (Fig. 1.17 A). Nelle ferite in via di guarigione, la fibronectina tissutale e plasmatica fornisce il substrato per la deposizione della ECM, per l'angiogenesi e la riepitelizzazione.

- La *laminina* è la glicoproteina più abbondante nella membrana basale. Si tratta di un eterodimero di 820 kDa a forma di croce che mette in connessione le cellule a componenti della ECM sottostante, come il collagene di tipo IV e l'eparan-solfato (Fig. 1.17 B). Oltre a mediare l'adesione alla membrana basale, la laminina è anche in grado di modulare la proliferazione, la differenziazione e la motilità cellulare.
- Le *integrine* sono una grande famiglia di glicoproteine eterodimeriche transmembrana (composte da subunità α e β); queste consentono alle cellule di aderire a componenti della ECM come la laminina e la fibronectina e, pertanto, di creare un legame funzionale e strutturale tra il citoscheletro intracellulare e l'ambiente esterno. Le integrine facilitano anche le interazioni di adesione cellula-cellula; sui leucociti, fungono da mediatori tra la ferma adesione e la migrazione attraverso l'endotelio e l'epitelio nei siti di infiammazione (Cap. 3); e svolgono inoltre una funzione cruciale nell'aggregazione piastrinica (Cap. 4). Le integrine si possono legare a componenti della ECM interagendo con un tripeptide costituito da residui di arginina-glicina-acido aspartico. Oltre a fornire un punto centrale di adesione ai substrati sottostanti, il legame attraverso i recettori integrinici attiva una serie di eventi di segnalazione a cascata che modulano il movimento, la proliferazione, la morfologia e la differenziazione delle cellule (Fig. 1.17 C).

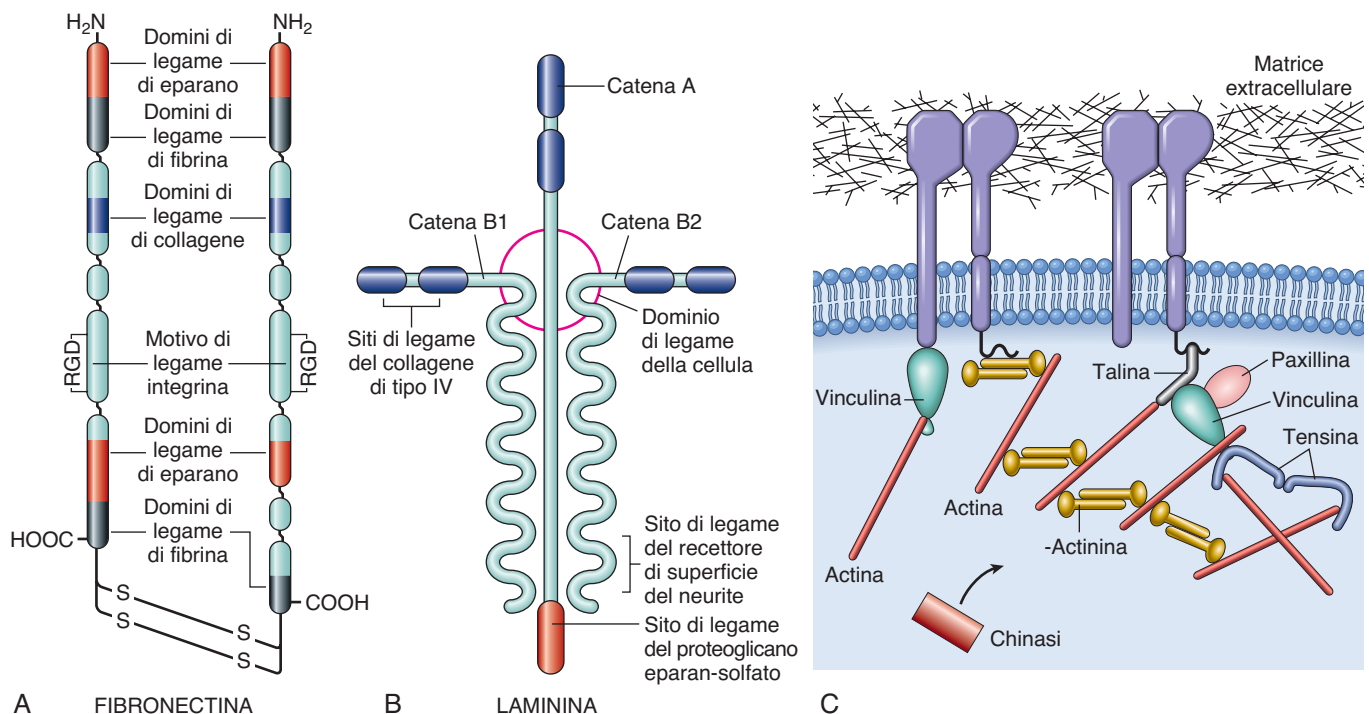


Figura 1.17 Interazioni tra cellula e matrice extracellulare (ECM); glicoproteine adesive e via di segnalazione delle integrine. **A.** La fibronectina è costituita da un dimero legato da un ponte disolfuro, con vari domini che le consentono di legarsi alla ECM e alle integrine, a queste ultime mediante una sequenza di arginina-glicina-acido aspartico (RGD). **B.** La molecola di laminina a forma di croce è uno dei componenti principali delle membrane basali; la sua struttura multi-dominio consente interazioni tra il collagene di tipo IV, altri componenti della ECM e recettori di membrana. **C.** Le integrine e gli eventi di segnalazione da loro attivati nei complessi di adesione focale. Ogni recettore integrinico eterodimerico α - β è un dimero transmembrana che si connette alla ECM e al citoscheletro intracellulare. I complessi di adesione focale includono molecole di collegamento (come la vinculina e la talina) che possono reclutare e attivare chinasi e, a loro volta, avviano cascate di vie di segnalazione a valle.

MANTENIMENTO DELLE POPOLAZIONI CELLULARI

Proliferazione e ciclo cellulare

La proliferazione cellulare è un processo fondamentale che assicura lo sviluppo dell'organismo e il mantenimento dell'omeostasi tissutale in condizioni fisiologiche, così come la sostituzione delle cellule morte o danneggiate. Gli elementi fondamentali della proliferazione cellulare sono una corretta replicazione del DNA, la sintesi coordinata di altri componenti cellulari e un'uguale ripartizione del DNA e degli organelli alle cellule figlie attraverso i processi di mitosi e citocinesi.

La sequenza di eventi che determinano la proliferazione cellulare è denominata *ciclo cellulare* e consiste nelle fasi G_1 (gap 1), S (sintesi del DNA), G_2 (gap 2) e M (mitotica); le cellule quiescenti sono nello stato G_0 (gap 0) (Fig. 1.18). Le cellule che si trovano nella fase G_1 possono derivare da un gruppo di cellule quiescenti in fase G_0 o da cellule che hanno terminato un ciclo di mitosi. Ogni stadio richiede che sia stata completata la fase precedente, e l'attivazione di fattori necessari per la progressione del ciclo (si veda oltre); una replicazione non corretta del DNA o l'assenza di un cofattore può arrestare il processo proliferativo in fasi diverse.

Il ciclo cellulare è regolato da attivatori e inibitori. La progressione del ciclo cellulare è accompagnato da proteine denominate *ciclina* (così chiamate per la natura ciclica della loro produzione e degradazione) e da enzimi associati alle ciclina denominati *chinasi ciclino-dipendenti* (Cyclin-Dependent Kinases, CDK) (Fig. 1.19). Le CDK sintetizzate costitutivamente acquisiscono attività chinastica, ossia la capacità di fosforilare substrati proteici dopo aver formato complessi con le ciclina specifiche. Un incremento transitorio della sintesi di una particolare ciclina

determina una maggiore attività chinastica della CDK a cui è legata; quando la CDK porta a termine il ciclo di fosforilazione, la ciclina associata va incontro a degradazione e l'attività della CDK si riduce. Di conseguenza, quando i livelli di ciclina aumentano e/o diminuiscono, anche l'attività delle CDK associate si incrementa e/o si riduce.

Sono state identificate oltre 15 ciclina: le ciclina D, E, A e B compaiono in sequenza durante il ciclo cellulare e si legano a una o più CDK. Il ciclo cellulare a questo punto somiglia a una staffetta in cui ogni tappa è regolata da una serie differente di ciclina: quando un gruppo di ciclina lascia la pista, subentra il seguente.

All'interno del ciclo cellulare sono inseriti meccanismi di controllo atti a percepire eventuali danni del DNA o dei cromosomi. Questi *checkpoint* utilizzati per il controllo di qualità garantiscono che le cellule con alterazioni genetiche non portino a termine la replicazione. Di conseguenza, i punti di controllo della fase G_1 -S monitorano l'integrità del DNA prima che vengano irreversibilmente destinate risorse cellulari alla replicazione del DNA. In una fase successiva del ciclo cellulare, il punto di controllo G_2 -M assicura che avvenga una replicazione genetica corretta prima dell'effettiva divisione cellulare. Quando le cellule rilevano irregolarità nel DNA, l'attivazione dei meccanismi di controllo ritarda la progressione del ciclo cellulare e attiva i meccanismi di riparazione del DNA. Se le alterazioni genetiche sono troppo gravi per essere corrette, le cellule vanno incontro a morte apoptotica, oppure entreranno in una fase non replicativa chiamata *senescenza*, grazie principalmente all'azione della proteina p53 (si veda oltre).

Il compito degli *inibitori delle CDK* (CDKI) consiste nel far rispettare i diversi livelli di controllo del ciclo cellulare attraverso la modulazione dell'attività del complesso CDK-ciclina. Esistono diversi CDKI:

- Una famiglia di CDKI composta da tre proteine, denominate p21 (CDKN1A), p27 (CDKN1B) e p57 (CDKN1C), inibisce molteplici CDK.

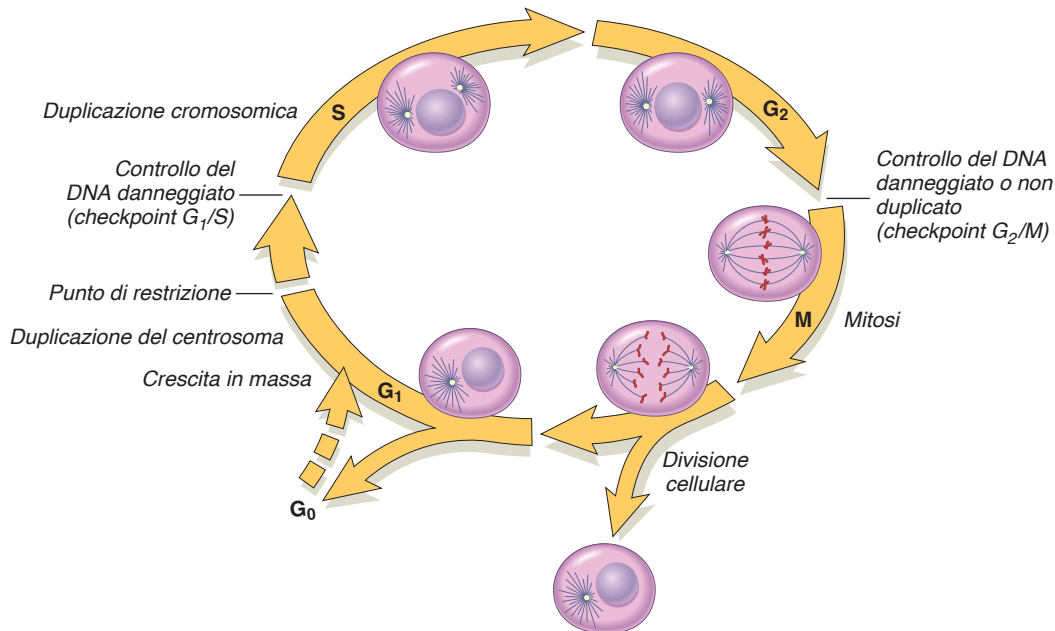


Figura 1.18 Tappe fondamentali del ciclo cellulare. La figura presenta le fasi del ciclo cellulare (G_0 , G_1 , G_2 , S e M), la localizzazione del punto di controllo (punto di restrizione) della fase G_1 e i punti di controllo delle fasi G_1/S e G_2/M . Il punto di restrizione G_1 si trova nella fase in cui la cellula si impegna ad avanzare ulteriormente nel ciclo cellulare senza aver più bisogno del segnale di crescita che ha avviato la divisione cellulare. Le cellule dei tessuti labili come l'epidermide e il tratto gastrointestinale possono dividersi costantemente; le cellule stabili come gli epatociti sono quiescenti, ma possono entrare nel ciclo cellulare dopo appropriati stimoli; le cellule-perenni come i neuroni e i cardiomiociti hanno perso la capacità proliferativa. (Modificata da Pollard TD, Earnshaw WC: Cell Biology. Philadelphia, 2002 Saunders)

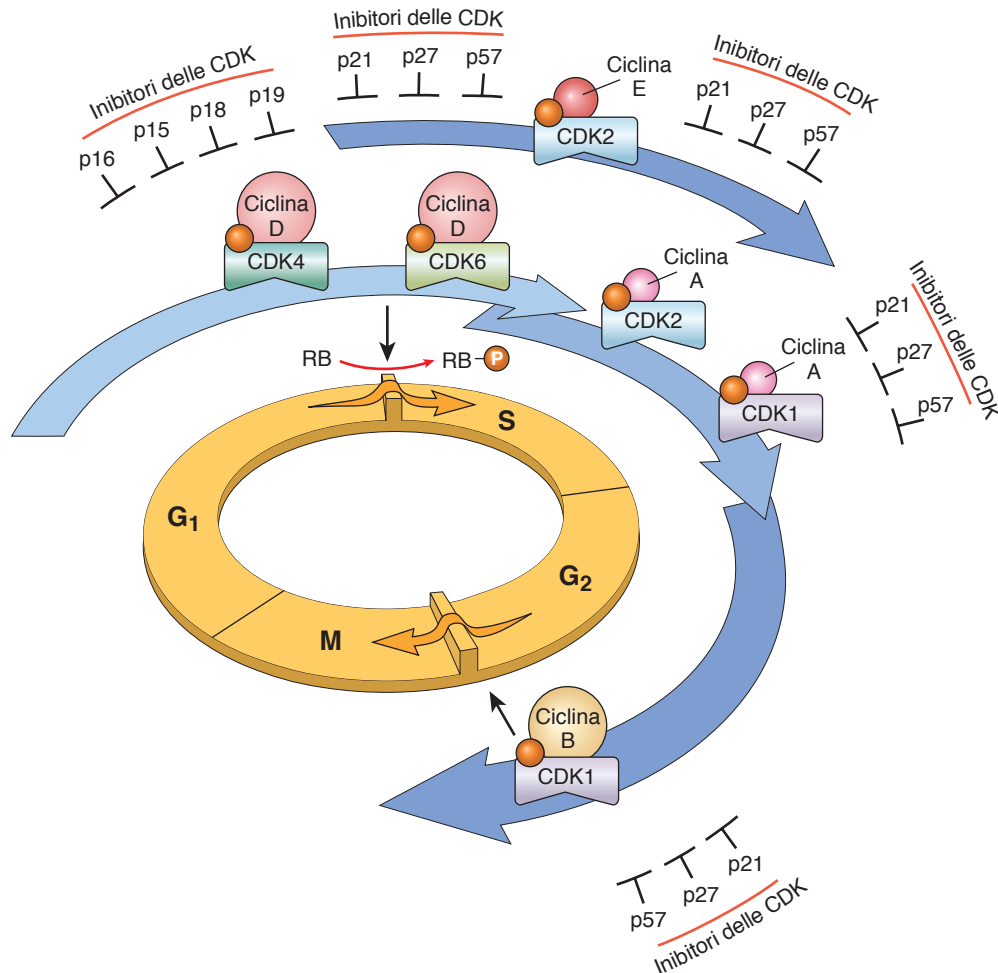


Figura 1.19 Ruolo delle cicline, delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK) e degli inibitori delle CDK (CDKIs) nella regolazione del ciclo cellulare. Le frecce di colore giallo scuro rappresentano le fasi del ciclo cellulare durante le quali sono attivi specifici complessi di ciclina-CDK. Come si può osservare, i complessi ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 e ciclina E-CDK2 regolano la transizione da G₁ a S mediante la fosforilazione della proteina Rb (pRb). I complessi ciclina A-CDK2 e ciclina A-CDK1 sono attivi nella fase S. Il complesso B-CDK1 è fondamentale per la transizione da G₂ a M. Due famiglie di inibitori delle CDK possono bloccare l'attività delle CDK e la progressione del ciclo cellulare. I cosiddetti inibitori INK4, composti da p16, p15, p18 e p19, agiscono sui complessi ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6. L'altra famiglia formata da tre inibitori, p21, p27 e p57, può inibire tutte le CDK.

- L'altra famiglia di CDKI esercita un controllo selettivo sulla ciclina CDK4 e sulla ciclina CDK6; queste proteine si chiamano p15 (CDKN2B), p16 (CDKN2A), p18 (CDKN2C) e p19 (CDKN2D).
- Le cellule che hanno un difetto delle proteine di controllo CDKI e presentano un danno al DNA vanno incontro a divisione cellulare generando cellule figlie mutate a rischio di mutazioni maligne.

Un aspetto altrettanto importante della crescita e della divisione cellulare è la biosintesi delle membrane, delle proteine citosoliche e degli organelli necessari per generare due cellule figlie. L'attivazione della via di trasduzione del segnale mediata dal recettore per il fattore di crescita oltre a stimolare la progressione del ciclo cellulare, attiva anche eventi che promuovono i cambiamenti metabolici che supportano la crescita. Primo tra questi è il passaggio alla glicolisi aerobica (con la riduzione conseguente della fosforilazione ossidativa), chiamato anche *effetto Warburg*. Queste alterazioni nel metabolismo cellulare sono un elemento importante nella crescita delle cellule tumorali e sono discusse più dettagliatamente nel Capitolo 7.

Cellule staminali

Le cellule staminali hanno la duplice proprietà di potersi auto-rinnovare e di dare origine a cellule e tessuti differenziati. Nel corso dello sviluppo le *cellule staminali totipotenti* danno origine a tutta una serie di diversi tessuti differenziati; nell'organismo adulto, le cellule staminali adulte sostituiscono le cellule danneggiate e mantengono stabile la popolazione cellulare all'interno dei tessuti in cui risiedono. Ci sono anche popolazioni di cellule staminali tra questi estremi con capacità variabili di differenziarsi in linee cellulari multiple (ma limitate). Quindi, a seconda della fonte e dello stadio di sviluppo, ci sono limiti al tipo cellulare che una "cellula staminale" può generare.

Nei tessuti normali - in cui non avvengono il processo di riparazione, la degenerazione o la trasformazione neoplastica delle cellule - c'è un equilibrio omeostatico tra la replicazione, l'auto-rinnovamento e differenziazione delle cellule staminali e la morte di cellule mature differenziate (Fig. 1.20). La relazione dinamica tra le cellule staminali e il parenchima terminalmente

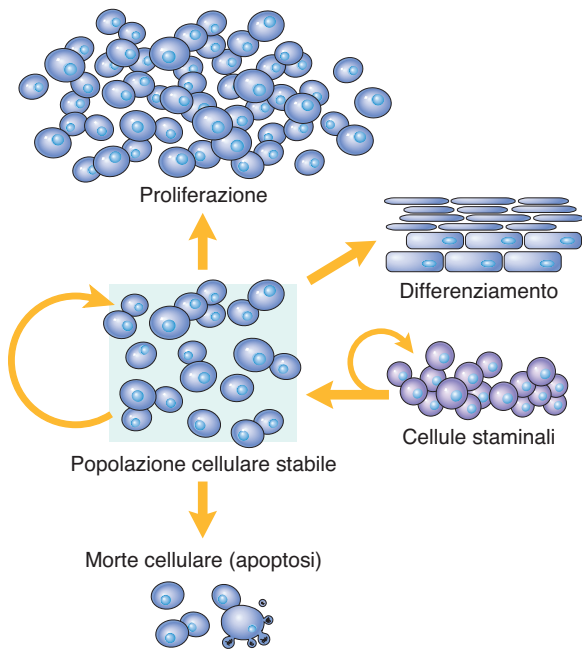


Figura 1.20 Meccanismi che regolano le popolazioni cellulari. La quantità di cellule può essere modificata da maggiore o minore immissione di cellule staminali, da morte cellulare causata da apoptosi o da alterazioni dei ritmi di proliferazione o di differenziazione. (Modificata da McCarthy NJ, et al: Apoptosis in the development of the immune system: growth factors, clonal selection and bcl-2. Cancer Metastasis Rev 11:157, 1992)

differenziato è particolarmente evidente nella continua divisione dell'epitelio cutaneo. Quindi, le cellule staminali nello strato basale dell'epitelio si dividono e le loro cellule figlie progressivamente si differenziano e migrano verso gli strati superiori dell'epitelio stesso, prima di morire ed esfoliare.

In condizioni di omeostasi, le cellule staminali sono mantenute dall'auto-rinnovamento, che può coinvolgere due tipi di divisione cellulare:

- La *divisione asimmetrica*, che si riferisce alla replicazione cellulare in cui una cellula si differenzia e genera cellule mature, mentre un'altra rimane indifferenziata e conserva la propria capacità di auto-rinnovamento.
- La *divisione simmetrica* si verifica quando entrambe le cellule figlie mantengono la capacità di auto-rinnovamento. Tale replicazione si verifica all'inizio dell'embriogenesi – quando le popolazioni di cellule staminali si stanno espandendo – e in condizioni di stress, come nel ripopolamento del midollo osseo dopo chemioterapia ablativa.

Sebbene in letteratura ci sia la tendenza a suddividere le cellule staminali in molteplici sottoclassi differenti, ne esistono fondamentalmente solo due tipi:

- Le *cellule staminali embrionali (cellule ES)* sono quelle maggiormente indifferenziate. Sono presenti nella massa cellulare interna delle blastocisti, possiedono una capacità di rinnovamento virtualmente illimitata e possono generare ogni singola cellula dell'organismo; per tali caratteristiche sono denominate *totipotenti* (Fig. 1.21). Sebbene le cellule ES possano essere mantenute per lunghi periodi senza che vadano incontro a differenziazione, in condizioni di coltura adeguate possono essere indotte a generare cellule specializzate di tutti e tre gli strati di cellule germinali.
- Le *cellule staminali tissutali* (denominate anche *cellule staminali adulte*) sono presenti in stretta associazione con le cellule differenziate di un dato tessuto. In genere sono protette in microambienti tissutali specializzati chiamati *nicchie delle cellule staminali*. La presenza di simili nicchie è stata riscontrata in molti organi, incluso il midollo osseo, dove le cellule staminali ematopoietiche tipicamente si riuniscono in nicchie perivascolari, e nell'intestino, dove le cellule staminali epiteliali sono confinate nelle cripte. Altre nicchie di cellule staminali includono

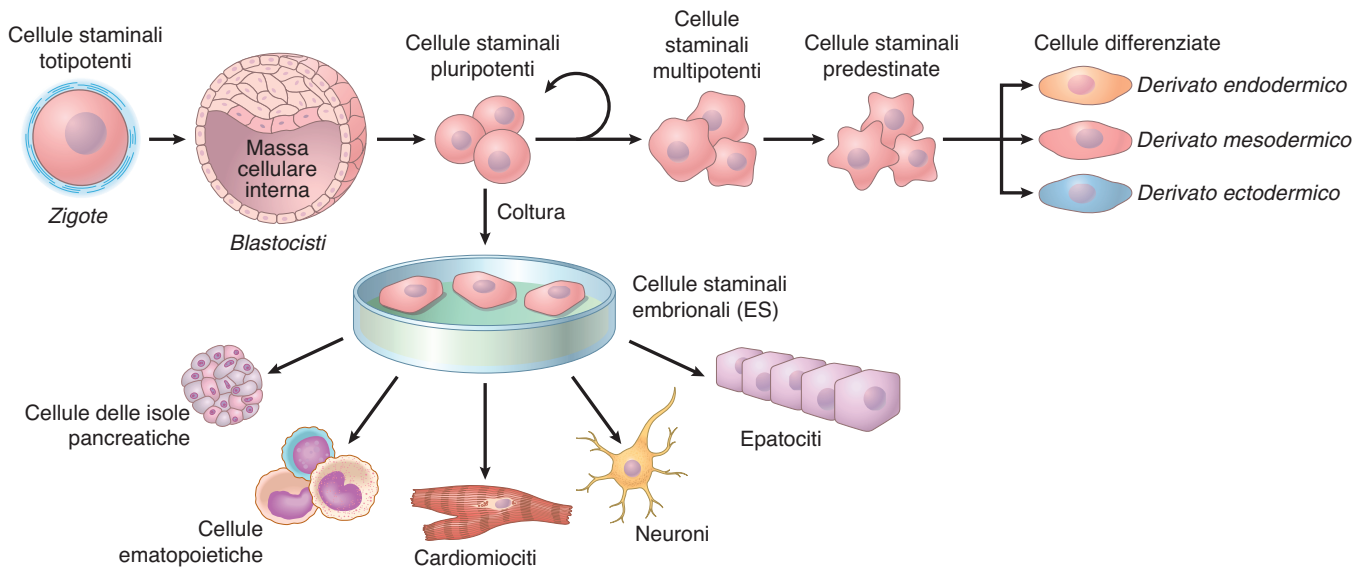


Figura 1.21 Cellule staminali embrionali (ES). Lo zigote, formato dall'unione tra spermatozoo e ovulo, si divide per produrre blastocisti, e la massa cellulare interna della blastocisti genera l'embrione. Le cellule pluripotenti della massa cellulare interna, conosciute come ES, possono essere indotte a differenziarsi in linee cellulari molteplici. Nell'embrione, le cellule staminali pluripotenti possono dividersi in maniera asimmetrica per produrre una popolazione residua e stabile di cellule ES oltre a generare popolazioni che progressivamente presentano una potenzialità proliferativa e differenziativa più limitata, generando infine cellule staminali che sono destinate solo a generare linee differenziative cellulari specifiche. Le cellule ES possono essere coltivate in vitro e indotte a differenziarsi in cellule caratteristiche dei tre strati germinali ectodermico, endodermico o mesodermico.

la regione della protuberanza dei follicoli piliferi, il limbus della cornea e l'area subventricolare nel cervello. Fattori solubili e altre cellule all'interno delle nicchie regolano l'equilibrio tra la quiescenza delle cellule staminali e la loro espansione e differenziazione (Fig. 1.22).

Le cellule staminali adulte possono generare un repertorio limitato (*lineage potential*) di cellule differenziate. Di conseguenza, sebbene le cellule staminali adulte possano conservare i tessuti con un turnover cellulare elevato (per esempio, cute e tratto gastrointestinale) o basso (per esempio, l'endotelio), in ogni determinato tessuto possono di solito generare solamente quelle cellule che normalmente si trovano all'interno di quel tessuto.

Le cellule staminali ematopoietiche reintegrano continuamente tutti gli elementi cellulari del sangue che vengono persi, che vanno incontro a senescenza o sono altrimenti consumati. Possono essere isolate direttamente dal midollo osseo, così come dal sangue periferico, dopo somministrazione di alcuni fattori stimolanti le colonie (CSF), che ne provocano la fuoriuscita dalle nicchie midollari. Sebbene siano generalmente rare, le cellule staminali ematopoietiche possono essere purificate per ottenere una popolazione pura, identificata sulla base dell'espressione sulle cellule di marcatori di superficie cellulare. Dal punto di vista clinico queste cellule staminali possono essere impiegate per ricostituire un midollo osseo depauperato in seguito a chemioterapia (come nel trattamento della leucemia), oppure per fornire normali precursori che correggano vari difetti delle cellule ematopoietiche (come nell'anemia, Cap. 14).

Oltre alle cellule staminali ematopoietiche, il midollo osseo, al pari di altri tessuti come quello adiposo, contiene anche una popolazione di *cellule staminali mesenchimali*. Si tratta di cellule multipotenti in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule stromali, come condrociti (cartilagine), osteociti (osso), adipociti (adipe) e miociti (muscolo). Poiché tali cellule possono espandersi in grandi quantità e possono anche generare localmente un microambiente immunosoppressivo (quindi potenzialmente in grado di prevenire il rigetto), potrebbero costituire uno strumento prontamente disponibile per produrre l'impalcatura stromale necessaria alla rigenerazione dei tessuti.

Medicina rigenerativa

Il fiorente campo della medicina rigenerativa è stato reso possibile dalla capacità di identificare, isolare, espandere e trapiantare cellule staminali. In teoria, la progenie differenziata di cellule ES o cellule staminali adulte può essere utilizzata per ricostituire tessuti danneggiati o persino per costruire interi organi che devono essere sostituiti. Vi è, quindi, un notevole interesse per le opportunità terapeutiche in grado di ripristinare i tessuti che hanno una scarsa capacità rigenerativa intrinseca, come il miocardio o i neuroni, per promuovere rispettivamente il processo di riparazione dopo un infarto miocardico o ictus cerebrale. Nonostante i progressi tecnologici per la purificazione e l'espansione delle cellule staminali, gran parte dell'entusiasmo iniziale si è affievolito per la difficoltà nell'introdurre e integrare funzionalmente le cellule di sostituzione nei siti di danno.

Un altro problema deriva dalla immunogenicità della maggior parte delle cellule staminali. Sebbene le cellule staminali mesenchimali possano essere scarsamente immunogeniche, la maggior parte delle altre cellule staminali adulte, così come le cellule ES (da blastocisti fecondate), esprimono molecole di istocompatibilità – antigene leucocitario umano (HLA) negli esseri umani (Cap. 3 e 6) – che provocano un rigetto immunologico dell'ospite dopo il trapianto. Quindi è stato fatto uno sforzo considerevole per generare cellule con le caratteristiche totipotenziali delle cellule ES da cellule, che possono essere prelevate dallo stesso singolo paziente in cui saranno impiantate. Ciò consentirebbe, in linea di principio, la generazione e il trapianto di nuovi tessuti senza timore di rigetto immunologico del trapianto. A tale scopo è stato identificato un gruppo di geni i cui prodotti possono riprogrammare le cellule somatiche così da ottenere il "potenziale staminale" delle cellule ES. Quando tali geni sono inseriti in cellule completamente differenziate (come i fibroblasti), si generano *cellule staminali pluripotenti indotte (cellule iPS)* (Fig. 1.23). Per quanto non sia ancora stato sperimentato in pratica, la loro progenie differenziata potrebbe produrre notevoli agenti terapeutici, per esempio, generando cellule β secernenti insulina in un paziente con diabete.

Osservazioni conclusive. Questa panoramica su alcuni argomenti della biologia cellulare servirà da base per i successivi

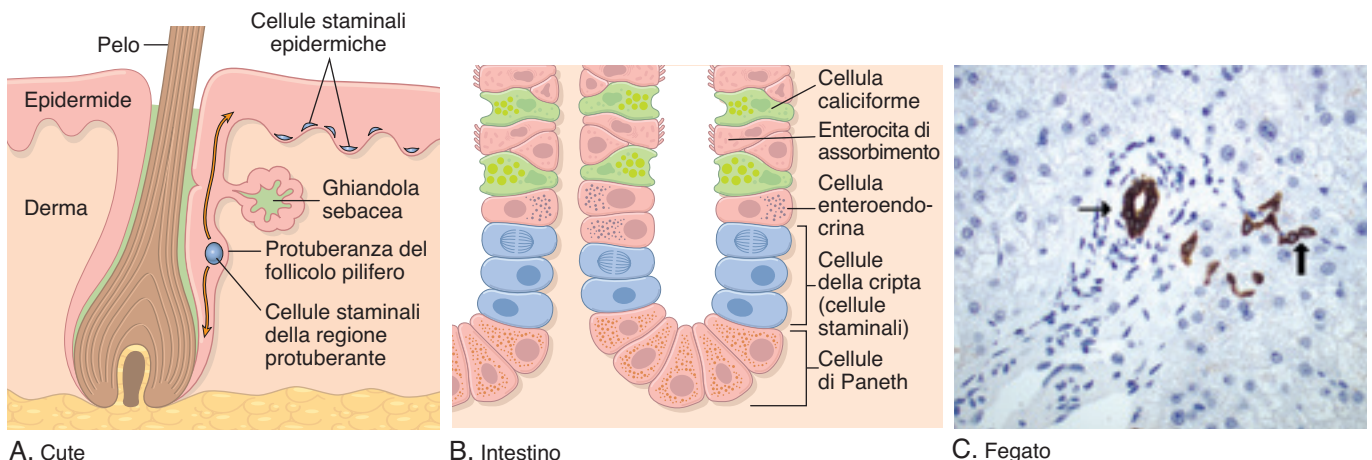


Figura 1.22 Le nicchie delle cellule staminali in tessuti diversi. **A.** Le cellule staminali della cute sono site nell'area del rigiamento dei follicoli piliferi, nelle ghiandole sebacee e nello strato inferiore dell'epidermide. **B.** Cellule staminali colonnari (CBC) della base della cripta del piccolo intestino si trovano alla base della cripta intervallate tra le cellule di Paneth. **C.** Le cellule staminali del fegato (*cellule ovali*) si trovano nei canali di Hering (*freccia spessa*), strutture che connettono le vie biliari (*freccia sottile*) con gli epatociti parenchimali. Le cellule delle vie biliari e i canali di Hering sono evidenziati dalla colorazione in immunoistochimica per la citocheratina 7. (C. Per gentile concessione di Tania Roskams, MD, University of Leuven, Belgio)

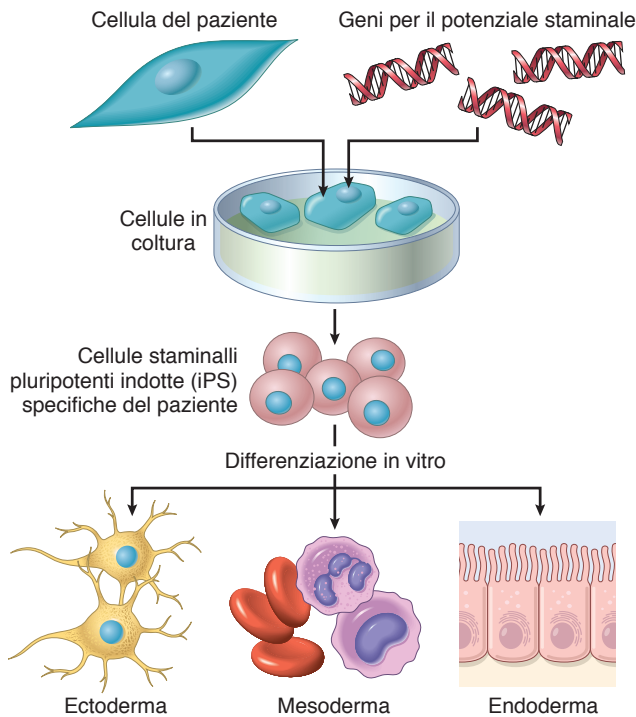


Figura 1.23 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS). I geni che conferiscono le loro peculiari proprietà alle cellule staminali sono introdotti nelle cellule differenziate isolate da un paziente, dando luogo a cellule staminali che possono essere indotte a differenziarsi in diverse linee differenziali. (Modificata da Hochedlinger K, Jaenisch R: Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 349:275-, 2003)

approfondimenti anatomico-patologici e ai quali vi faremo ancora riferimento nel corso del libro. Va tuttavia ricordato agli studenti che questa sintesi è intenzionalmente breve e ulteriori informazioni su alcuni degli argomenti affascinanti qui presentati si possono trovare facilmente in libri di testo di biologia cellulare e molecolare.

LETTURE CONSIGLIATE

Genetica ed epigenetica

- Batista PJ, Chang HY: Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease, *Cell* 152:1298, 2013. [Good review regarding long noncoding RNA biology].
- Cech TR, Steitz JA: The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones, *Cell* 157:77, 2014. [An excellent review of the roles played by noncoding RNAs].
- Meller VH, Joshi SS, Deshpande N: Modulation of chromatin by noncoding RNA, *Annu Rev Genet* 49:673, 2015. [Excellent overview of the roles played by noncoding RNAs in nuclear organization].
- Minarovits J, Banati F, Szenthe K et al: Epigenetic regulation, *Adv Exp Med Biol* 879:1, 2016. [A brief primer on the pathways that regulate chromatin structure and accessibility].
- Rowley MJ, Corces VG: The three-dimensional genome: principles and roles of long-distance interactions, *Curr Opin Cell Biol* 40:8, 2016. [An interesting discussion regarding the mechanisms by which three-dimensional conformations can influence nuclear transcription].
- Sun Q, Hao Q, Prasad KV: Nuclear long noncoding RNAs: key regulators of gene expression, *Trends Genet* 2017. [An up-to-date review on the role of long noncoding RNA on chromatin organization, as well as transcriptional and posttranscriptional gene expression].
- Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA: Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering, *Cell* 164:29, 2016. [A superb review on CRISPR/Cas from some of the researchers who discovered and developed its possible applications].

Servizio di pulizia cellulare

- Andersson ER: The role of endocytosis in activating and regulating signal transduction, *Cell Mol Life Sci* 69:1755, 2011. [Overview of endocytosis with specific emphasis on its role in modulating intracellular signaling].
- Choi AM, Ryter SW, Levine B: Autophagy in human health and disease, *N Engl J Med* 368:651, 2013. [Superb review concerning the physiologic and pathophysiologic aspects of autophagy].
- English AR, Zurek N, Voeltz GK: Peripheral ER structure and function, *Curr Opin Cell Biol* 21:596, 2009. [Overview of the structural and functional organization of the endoplasmic reticulum and its relationship to other cellular organelles].
- Guillot C, Lecuit T: Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis, *Science* 340:1185, 2013. [Topical discussion about cellular interactions and the mechanical basis of tissue maintenance].
- Hetz C, Chevet E, Oakes SA: Proteostasis control by the unfolded protein response, *Nat Cell Biol* 17:829, 2015. [Mechanisms underlying endoplasmic reticulum editing and cellular homeostasis].
- Kaur J, Debnath J: Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism, *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:461, 2015. [Excellent review of the mechanisms and consequences of cellular autophagy].
- Johnson DS: Establishing and transducing cell polarity: common themes and variations, *Curr Opin Cell Biol* 51:33, 2017. [A well-written overview of the intracellular architecture that directs and maintains polarity].
- Simons K, Sampaio JL: Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1, 2013. [Nice review of the general principles of membrane architecture emphasizing domain organization].
- Wong E, Cuervo AM: Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:1, 2010. [Overview of intracellular degradation pathways, specifically focusing on the elimination of aberrant or abnormal constituents].

Metabolismo cellulare e funzione mitocondriale

- Andersen JL, Kornbluth S: The tangled circuitry of metabolism and apoptosis, *Mol Cell* 49:399, 2013. [Solid review of the interplay between cell metabolism, cell proliferation, and cell death].
- Burke PJ: Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer, *Trends Cancer* 3:857, 2017. [A well-written discussion linking mitochondrial energy generation and cell death functions, with a focus on possible cancer therapeutics].
- Friedman JR, Nunnari J: Mitochondrial form and function, *Nature* 505:335, 2014. [Good overview of mitochondrial replication and response to cellular injury].
- Tait SW, Green DR: Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:621, 2010. [Review of the role of mitochondria in cell death pathways].

Attivazione cellulare

- Duronio RJ, Xiong Y: Signaling pathways that control cell proliferation, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1, 2013. [Excellent overall review of cell signaling and proliferation].
- Morrison DK: MAP kinase pathways, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1, 2012. [Review of mitogen-activated kinase signaling pathways].
- Nusse R, Clevers H: Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities, *Cell* 169:985, 2017. [Nice overview of the Wnt/ β -catenin signaling pathways, particularly focusing on their role in stem cell biology and malignancy].
- Perona R: Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors, *Clin Transl Oncol* 8:77, 2011. [Overview of signaling pathways with an emphasis on how these become dysregulated in malignancy].

Mantenimento delle popolazioni cellulari

- Alvarado AS, Yamanaka S: Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity, *Cell* 157:110, 2014. [Very good review of the fundamental concepts in stem cell biology].
- Blau HM, Daley GQ: Stem cells in the treatment of disease, *N Engl J Med* 380:1748, 2019. [Excellent review on stem cell biology and its therapeutic potential].
- De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R et al: Hallmarks of pluripotency, *Nature* 525:469, 2015. [Excellent overview of pluripotent stem cells including the molecular pathways of their renewal and differentiation capacities].

- Fuchs E, Chen T: A matter of life and death: self-renewal in stem cells, *EMBO Rep* 14:39, 2013. [Scholarly review on the conceptual framework and experimental underpinnings of our understanding regarding stem cell renewal, using cutaneous stem cells as a paradigm].
- Jang S, Collin del Hortet A, Soto-Gutierrez A: Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells: overview, current advances, applications, and future directions, *Am J Pathol* 189:502, 2019. [A focused review of applications of induced stem cell-derived endothelial cells].
- Martello G, Smith A: The nature of embryonic stem cells, *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:647, 2014. [Good comprehensive overview of cell plasticity and stemness].
- Scadden DT: Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche, *Cell* 157:41, 2014. [Well-written paper describing the role of niche in stem cell biology].
- Wu J, Izpisua Belmonte JC: Stem cells: a renaissance in human biology research, *Cell* 165:1572, 2016. [High-level review of the opportunities offered by new technologies and insights in stem cell biology in understanding human development and disease].

