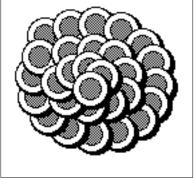
Caleidoscopio



Mauro Bologna Leda Biordi Stefano Martinotti

Gli oncogèni

Prefazione del Prof. Luigi Frati

Cattedra di Patologia Generale Dipartimento di Medicina Sperimentale Facoltà di Medicina e Chirurgia Università degli Sudi L'Aquila

Direttore Responsabile Sergio Rassu

63



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. (010) 83. 401 Stampato a Genova 1991.

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



Informazioni generali. Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

Testo. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

Frontespizio. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono e fax) responsabile della corrispondenza.

Bibliografia. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

- 1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.
- 2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione della monografia. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con una lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu Via Pietro Nenni, 6 07100 Sassari

Editoriale

La prima descrizione della identificazione dei geni coinvolti in una traslocazione caratteristica di un linfoma africano risale al 1982.

Da allora le ricerche e gli studi sugli oncogèni hanno avuto un impulso notevole ed i dati accumulati sono cresciuti dando un significativo contributo alla conoscenza della patogenesi dei tumori ma sopratutto rivoluzionando la loro interpretazione patogenetica.

Se prima infatti si pensava e si distinguevano i processi carcinogenetici da agenti virali, da agenti fisici e da agenti chimici, oggi si è affermata l'ipotesi che in effetti tutti gli agenti noti quali causa di tumore agiscano attraverso la modificazione dell'informazione genetica delle cellule che porta ad una crescita non più controllata per la modificazione di geni normalmente presenti nella cellula e che svolgono funzioni importantissime nei normali processi di crescita e differenziazione.

Il rilievo di queste ricerche e l'affermarsi di questi risultati sono stati di tale rilevanza che hanno portato all'assegnazione del premio Nobel per la Medicina ai Professori Harold Varmus e Michael Bishop nel 1989, per i loro contributi nel settore.

Per parlare di questo argomento abbiamo invitato il Prof. Mauro Bologna, della Cattedra di Patologia Generale del Dipartimento di Medicina Sperimentale nell'Università dell'Aquila.

Il Professor Mauro Bologna, medico chirurgo, è attualmente Professore Associato di Patologia Generale presso l'Università dell'Aquila.

Ha frequentato in qualità di Post-doctoral Fellow il Dulbecco Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, in California e quindi in veste di Visiting Scientist lo stesso prestigioso Laboratorio.

Autore di oltre 100 pubblicazioni scientifiche su argomenti di immunologia, oncologia, malattie infettive, chemioterapia e patologia, è ancora direttore del gruppo di traduttori del famoso Merck Manual e del Dorland Medical Dictionary ed ha pubblicato un libro dal significativo titolo: "Il cancro si può evitare".

La dottoressa Assunta Leda Biordi laureatasi in Medicina e Chirurgia presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi dell'Aquila ha usufruito di una borsa di studio AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) per un progetto di ricerca sul carcinoma prostatico, con particolare riferimento alla clonazione degli ibridomi nel processo di selezione degli anticorpi monoclonali e per il loro screening su campioni di tessuti umani normali e patologici, al fine di identificare nuovi reagenti utili per la diagnosi e la terapia del carcinoma prostatico.

Partecipa alle attività di ricerca nel settore chemioterapico e nel settore oncologico (diagnosi precoce del carcinoma prostatico mediante colture cellulari, crescita e dif-

ferenziamento dell'epitelio prostatico *in vitro*) nel laboratorio della Cattedra di Patologia Generale, vincendo quindi un posto per il dottorato di ricerca in Medicina Sperimentale dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza". In questo volume ha collaborato al capitolo intitolato "Moltiplicazione cellulare".

Il dottor Stefano Martinotti ha frequentato in qualità di "summer student" il laboratorio del Tumor Cell Biology diretto dal Dr. Robert Gallo presso i National Institutes of Health (NIH) a Bethesda negli Stati Uniti. Ha successivamente vinto una borsa di studio nell'ambito del programma di scambi culturali Italia-USA (Ministero della Pubblica Istruzione) che gli ha permesso di lavorare in qualità di "guest worker" presso il laboratorio del Dr. Gallo all'NIH sotto la supervisione del Dr. Riccardo Dalla-Favera.

Nell'ambito di un progetto di ricerca sull'identificazione di sequenze oncogeniche umane genera numerosi dati di mappaggio e analisi strutturale genica, da cui sono scaturite alcune pubblicazioni su riviste internazionali.

Frequenta quindi l'Istituto di Patologia Generale di Roma e si unisce al gruppo del Dr. Vittorio Manzari, dove porta avanti uno studio sul ruolo biologico e sulla caratterizzazione di specie virali HTLV-simili in campioni leucemici umani, continuando in parallelo gli studi sull'effetto biologico degli oncogeni. In questa monografia ha collaborato ai capitoli sugli "Oncogeni come fattori di crescita", "Oncogèni come elementi della trasduzione del segnale" e "Oncogeni come elementi nucleari di regolazione della espressione dei geni".

Sergio Rassu

Prefazione

La ricerca oncologica fa registrare progressi quotidiani, con contributi di numerosi ricercatori che concorrono a spiegare le basi biologiche delle neoplasie.

In tempi recenti, i contributi più significativi hanno riguardato certamente la genetica del cancro e lo studio delle basi molecolari della trasformazione neoplastica, grazie alla scoperta ed alla caratterizzazione degli oncogèni e dei geni oncosoppressori.

L'esauriente trattazione su questo argomento che è contenuta nel presente volume, svolta da Mauro Bologna, Professore associato di Patologia Generale nel Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università dell'Aquila, e dai suoi collaboratori, Dottori Stefano Martinotti e Leda Biordi, analizza le tappe che hanno portato alla scoperta degli oncogèni e le pone nella prospettiva più idonea per una corretta interpretazione delle cause del cancro e della indispensabile opera di prevenzione che può risolvere almeno una parte del problema costituito dalla crescente incidenza dei tumori.

E' con vivo piacere che presento quest'opera, perchè tratta con accuratezza uno dei temi di maggiore interesse nella ricerca biomedica moderna e perchè tale tema coincide anche con uno di quelli maggiormente sviluppati, al momento attuale, nel nostro gruppo di Medicina Sperimentale.

Prof. Luigi Frati
Ordinario di Patologia Generale
Direttore del Dipartimento di Medicina Sperimentale
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Introduzione

Cosa sono gli oncogèni

Gli oncogèni sono i geni che determinano o che comunque permettono la moltiplicazione e la crescita delle cellule tumorali. Questa definizione è tuttavia eccessivamente semplificante, come avremo modo di illustrare nel seguito, perché è ormai più che accertato il fatto che questi stessi geni svolgono una nutrita serie di funzioni fondamentali anche e soprattutto nelle cellule normali, tutte le volte che esiste la necessità di una proliferazione delle cellule stesse. Un oncogène rappresenta una lieve variante, per struttura o per funzione, di un gene cellulare normale (Baltimore 1987).

Continuare a chiamare questi geni così importanti per le funzioni fondamentali delle cellule viventi con il nome di oncogèni non sembra ormai particolarmente appropriato, ma questo nome rimarrà invariato nell'uso corrente, con ogni probabilità, perché da un lato è troppo largamente usato e dall'altro rispecchia la storia della scoperta di queste unità genetiche.

Innanzi tutto riteniamo che valga la pena di spendere qualche parola in merito alla terminologia oncologica più elementare, anche se questo potrà risultare superfluo per alcuni lettori. Il termine "oncologia", che denomina la disciplina che studia i tumori, deriva dal greco ó s (gonfiore, tumefazione) ed ha dunque lo stesso significato del latino "tumor", da cui deriva l'italiano "tumore". La parola tumore viene impiegata il più delle volte per indicare una malattia neoplastica, ma tale parola non significa automaticamente tumefazione maligna: essa identifica invece più semplicemente una qualsiasi tumefazione, quale può essere anche quella provocata da una infiammazione ("tumor" è infatti uno dei cinque sintomi cardinali dell'infiammazione stessa, insieme a rubor, calor, dolor e functio laesa). Una tumefazione legata ad una nuova produzione di tessuto viene più propriamente definita una neoplasia. Nell'uso corrente, tuttavia, i termini di tumore e di neoplasia hanno finito con il coincidere, tanto che anche in questa breve trattazione li useremo scambievolmente, come sinonimi. La parola cancro, invece, tanto usata anche nel linguaggio comune, deriva dal latino "cancrus" (granchio) e identifica esclusivamente le neoplasie maligne con la loro tipica tendenza ad insinuarsi nei tessuti circostanti, appunto come le zampe e le chele di un granchio si dipartono dal corpo dell'animale (qui assimilato al nucleo centrale della neoplasia). Una etimologia identica ha la parola carcinoma (derivante dal greco í s, granchio), la quale però identifica, nel linguaggio medico corrente, le sole neoplasie maligne derivate da un tessuto epiteliale.

Abbiamo in qualche modo già anticipato il concetto secondo il quale i geni che determinano l'insorgenza delle neoplasie sono contenuti in tutte le cellule normali. Questa straordinaria e, se vogliamo, sconvolgente scoperta è il frutto delle recenti acquisizioni in campo oncologico che hanno fruttato ad Harold Varmus ed a Michael Bishop il Premio Nobel della Medicina per il 1989. Ma se può essere sconvolgente

scoprire che il germe capace di far sviluppare il cancro è normalmente presente dentro tutte le cellule normali, anche quelle del nostro corpo, è pur vero che queste scoperte non solo aprono fenomenali orizzonti di diagnosi e terapia, ma sottolineano anche l'importanza basilare della prevenzione delle cause evitabili del cancro. E' infatti soprattutto a causa di un continuato insulto alla integrità di questi geni così importanti che si innesca il processo patologico che conduce allo sviluppo di una neoplasia.

Un simile concetto era impensabile anche solo venti anni or sono, quando i libri di testo su cui molti di noi hanno studiato ipotizzavano l'esistenza di "un virus obbligato per ogni tipo di tumore" (Florey 1977) e consideravano, a quel momento, giustamente ben distinta la carcinogenesi da agenti chimici, quella da agenti fisici e ancor più quella da agenti virali. Ora possiamo invece finalmente ricondurre tutte le cause note dei tumori ad un unico processo di alterazione dell'informazione genetica della cellula, processo che è in grado di determinare una crescita incontrollata (Monografia Le Scienze, Autori vari 1989). Possiamo e dobbiamo anche, nella difficoltà di individuare forme di terapia semplici ed efficaci per ciascun tumore, sottolineare energicamente l'importanza di opportune misure preventive che impediscano il verificarsi dei danni genetici che sono alla base del cancro.

Breve storia della scoperta degli oncogèni

I presupposti e la scoperta del primo oncogène

Nel corso della ricerca sui tumori, grandi energie sono state dedicate alla comprensione dei motivi biologici che potessero far sì che una cellula normale si trasformasse in una cellula tumorale. La ricerca delle "proteine trasformanti", cioè di quelle proteine capaci di realizzare la transizione da cellula normale a cellula neoplastica, ha impegnato a lungo i ricercatori di tutto il mondo. Ma il più delle volte nelle cellule tumorali non si ritrovavano proteine diverse da quelle solitamente presenti nelle cellule normali: si trovavano semmai quantità insolitamente alte di alcune proteine che erano presenti anche nelle cellule normali corrispondenti. Ben presto si concentrarono le attenzioni sui virus capaci di provocare alcuni tumori, o virus oncògeni, nei quali necessariamente la proteina trasformante doveva essere presente e/o doveva essere codificata da uno specifico gene.

Si andò dunque alla ricerca di proteine nuove, di cui si riscontrasse la produzione nelle cellule infettate dai virus tumorali. Gli esperimenti richiedevano la conoscenza delle tecniche della virologia e delle colture cellulari e tissutali che si erano venute raffinando negli anni '60. I virus tumorali con genoma a RNA (retrovirus) erano quelli che con maggiore rapidità risultavano capaci di trasformare le cellule in coltura.

Il virus del sarcoma di Rous, un retrovirus capace di indurre il sarcoma nei polli, è stato il primo ad essere studiato in modo approfondito, dopo che David Baltimore e

Howard Temin scoprirono che questo virus dotato di un genoma a RNA era in grado di integrarsi nel DNA della cellula infettata grazie alla produzione dell'enzima "trascrittasi inversa", la quale poteva produrre una copia di DNA a partire da una matrice di RNA virale. I virus tumorali a RNA, per potersi replicare, devono dunque trascrivere "a ritroso" il loro RNA in DNA: da qui il nome di retrovirus (Figura 1).

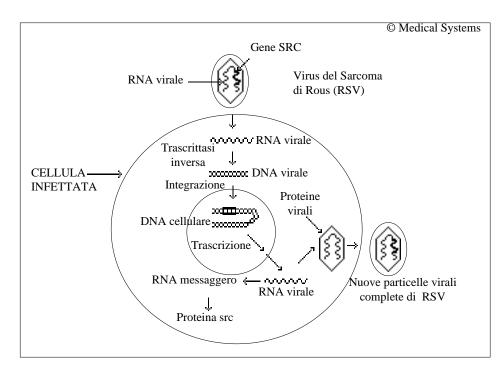


Figura 1. Ciclo vitale di un retrovirus tipico: il Rous Sarcoma Virus (RSV), che possiede l'oncogène src.

Il Rous Sarcoma Virus (RSV) fu sottoposto per primo all'analisi dei geni, per individuare la sua proteina trasformante ed il tratto di acido nucleico che la codificava. Vari studiosi contribuirono a studiare il virus di Rous e arrivarono ad identificare il gene responsabile della trasformazione delle cellule infettate: il gene fu chiamato "src", da sarcoma, e fu prodotto in vitro in molte copie assieme agli altri geni virali. Fu poi possibile indurre la produzione di anticorpi contro la proteina codificata dal gene "src" e si arrivò dunque a purificare la proteina stessa. Si scoprì così che essa aveva un peso molecolare di circa 60.000 ed era fosforilata (aveva alcuni gruppi fosfato aggiunti ad alcuni aminoacidi della sua molecola). In base a tali caratteristiche si coniò per la proteina il nome di PP60v-src, per indicare che essa era il prodotto proteico fosforilato del gene virale "src".

Ben presto fu possibile accertare la funzione della PP60v-src: la proteina aveva una attività enzimatica che attaccava ioni fosfato agli aminoacidi di altre proteine substrato,

in una reazione nota come fosforilazione; si trattava dunque di un enzima della classe delle proteino-chinasi. La sua specificità di enzima era particolarmente diretta a fosforilare residui aminoacidici di tirosina, mentre altri enzimi analoghi rivolgevano la loro azione fosforilante soprattutto agli aminoacidi serina e treonina.

Le reazioni di fosforilazione delle proteine cominciarono ad essere considerate di grande importanza da quando risultò chiaro che esse potevano influenzare notevolmente l'attività della moltiplicazione cellulare. La PP60v-src nella cellula si trova sul versante interno della membrana cellulare (Figura 2) e protende la sua porzione dotata di attività enzimatica all'interno del citoplasma. La scoperta e la caratterizzazione del primo oncogène segnò un primo momento fondamentale nella comprensione dei meccanismi di trasformazione cellulare (Bishop 1982).

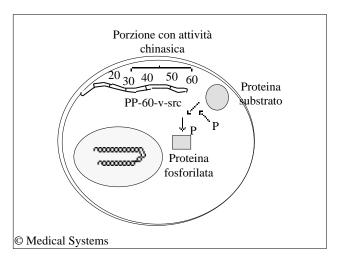


Figura 2. Localizzazione della PP60v-src sul versante interno della membrana cellulare dove svolge la sua azione fosforilante su proteine substrato citoplasmatiche.

Successivamente, le osservazioni si estesero a molti altri tumori, con l'identificazione di numerosi altri oncogèni: quelli finora descritti ed isolati raggiungono addirittura un numero attorno a cinquanta (Marx 1987a) e potrebbero crescere ancora nel futuro.

E' necessario dunque procedere con un certo ordine, suddividendo gli oncogèni in gruppi più o meno omogenei.

Le principali classi di proteine trasformanti

Col susseguirsi delle ricerche, sono state identificate, in tumori differenti, numerose proteine che operano la trasformazione cellulare. Esse possono essere raggruppate in almeno quattro classi principali (Hunter, 1984), in base alla loro funzione (Figura 3).

| CLASSE | Oncogèni | Funzione proteica | Localizzazione |
|------------|--------------------------|--|------------------------------------|
| CLASSE I | src, erb-B, yes, abl | Proteinochinasi, anche accoppiate a recettori di su- perficie | Versante interno della membrana |
| CLASSE II | sis, fgf | Fattori di crescita | Extracellulare |
| CLASSE III | ras | G-proteins-simile | Membrana |
| CLASSE IV | myc, fos, myb, erb-A, | Regolatori della espressione genica | Nucleo |

Figura 3. Elenco delle classi principali di oncogèni e funzione delle proteine da essi codificate.

La prima classe è quella che comprende, oltre la PP60v-src, varie altre proteine oncogeniche, come yes, abl, fes e fps: essa è composta da prodotti genici dotati di attività proteinochinasica specifica per la tirosina, che risiedono sul versante citoplasmatico della membrana cellulare. In questa sede tali proteine enzimatiche possono agire su numerosi substrati proteici che si trovano nel citoplasma della cellula e che subiranno la fosforilazione delle loro tirosine. Affine a questi oncogèni sarebbe anche il prodotto del gene erb-B, che corrisponde alla regione intracitoplasmatica del recettore per l'Epidermal Growth Factor (EGF), presente sulla membrana di molte cellule epiteliali.

La seconda classe di proteine trasformanti comprende il prodotto proteico del gene sis, isolato nel sarcoma della scimmia; la proteina sis possiede un'elevata somiglianza strutturale e funzionale con il Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Al contrario degli altri prodotti degli oncogèni, questa è una proteina che viene secreta all'esterno delle cellule tumorali e che può stimolare la crescita sia delle cellule circostanti dotate di recettori per il PDGF sia delle stesse cellule produttrici, perché anch'esse possiedono il recettore. Questo è stato uno dei primi esempi di stimolazione cosiddetta "autocrina" della cellula tumorale. Altri esempi recenti sono stati individuati nei carcinomi polmonari umani, nei quali esiste un meccanismo autocrino mediato dalla bombesina, un ormone-neurotrasmettitore dotato di azioni molteplici e di grande importanza (Cuttitta et al. 1985; Bologna et al. 1989).

La terza classe delle proteine trasformanti comprende una serie di fattori proteici isolati da sarcomi di ratto. Gli oncogèni ras (H-ras, Ki-ras ed Ha-ras) codificano per alcune proteine che si localizzano sul versante citoplasmatico della membrana cellulare e legano il GTP (G-proteins). Nella stessa sede esistono numerose proteine dotate di questa funzione, che sono coinvolte nella trasmissione all'interno della cellula del segnale di eccitazione recepito dalle molecole recettoriali di membrana. Le proteine oncogèniche sarebbero però meno efficienti di quelle normali in questa funzione e consentirebbero una più lunga persistenza del segnale di eccitazione cellulare.

La quarta classe di proteine trasformanti comprende infine alcune molecole, presenti nel nucleo delle cellule tumorali, che sono capaci di interagire direttamente con il DNA (oncogèni fos, myc, myb, erb-A ed altri). Queste proteine sono in alcuni casi coinvolte con l'azione di recettori ormonali (steroidei - fos - e tiroidei - erb-A -) (Weimberg et al. 1986; Sap et al. 1987; Sharp 1989) e possono interferire con il meccanismo di duplicazione del DNA, facendo entrare le cellule in una fase di proliferazione continua che può renderle immortali. Altre volte sono stati assimilati a fattori di trascrizione (jun) che interagiscono direttamente con il DNA. In realtà si è capito poi che alcune di queste proteine nucleari agiscono in collaborazione (fos e jun per esempio), perché le loro strutture sono in parte complementari e permettono l'assemblaggio di elementi multiformi per il controllo di una serie numerosa di geni sul DNA (Sharp 1989; vedi anche pag. 45).

Una delle osservazioni di base al riguardo degli oncogèni sembra indicare che le proteine codificate da essi possono contribuire alla formazione di tumori maligni conferendo un vantaggio selettivo di crescita nelle cellule in cui le proteine stesse vengono espresse (Marx 1987a).

I geni delle proteine trasformanti

Per qualche tempo si è creduto che i geni che provocano il cancro fossero presenti esclusivamente nei virus tumorali e nelle cellule infettate da tali virus. Era questa l'epoca (prima metà degli anni '70) in cui si pensava di poter affrontare il problema della prevenzione del cancro con mezzi vaccinali o farmacologici diretti a combattere i virus. Si sapeva anche, però, che tra il momento dell'infezione con il virus oncògeno ed il momento in cui le cellule diventavano effettivamente neoplastiche poteva trascorrere anche molto tempo e si riteneva che l'azione di sostanze cancerogene potesse accelerare questo processo di manifestazione del fenotipo tumorale. In questo momento si inserisce la straordinaria e semplice idea di Harold Varmus e Michael Bishop (Bishop 1982): essi si chiesero se anche in cellule normali si potessero trovare copie dei geni tumorali, magari perché in alcuni casi le cellule potevano aver subìto infezioni virali precedenti che fossero ancora in fase di latenza. Con enorme stupore di tutta la comunità scientifica, risultò chiaro che in tutte le cellule normali, nell'uomo, nei mammiferi, nei pesci e

persino nella *Drosophyla* (il moscerino della frutta) e nei lieviti (esseri unicellulari procarioti) esistono copie dei geni oncògeni.

Questi geni devono essere dunque preposti ad alcune delle funzioni più essenziali ed elementari dei sistemi biologici, altrimenti la loro conservazione evolutiva non sarebbe stata così elevata e sistematica. Oggi, alla luce di molte osservazioni successive, sappiamo che essi sono geni normali coinvolti nella embriogenesi, nella proliferazione di tutte le cellule e nel differenziamento (Marx 1987b). D'altra parte possiamo facilmente costatare quanto numerose siano le caratteristiche strutturali che accomunano le cellule tumorali trasformate da oncogèni e le cellule mitotiche normali (Marx 1989a).

Una nuova concezione dei virus

Ma allora, è mai possibile che tutte le cellule normali degli esseri viventi più disparati siano infettate da virus? E' possibile che un gene presente in tutte le specie biologiche sia responsabile soltanto di una malattia progressiva ed implacabile come il cancro?

La scoperta di Varmus e Bishop (cui peraltro dettero contributi anche altri importanti studiosi, da Weimberg a Basilico, da Hunter a Sefton, da Baltimore a Witte, ed altri ancora) aprì davvero una nuova era, che portò a concetti totalmente nuovi. Se gli oncogèni erano presenti in tutte le cellule normali, necessariamente essi dovevano servire a funzioni estremamente importanti e fondamentali e la loro presenza nei virus era da considerarsi un evento secondario.

Dunque i virus tumorali non erano più da considerarsi entità biologiche comparse prima delle cellule eucariotiche, ma al contrario dovevano costituire una forma biologica evolutasi successivamente, per favorire lo scambio di informazioni genetiche tra diverse specie animali e vegetali (Dulbecco 1984). Gli oncogèni allora, pur essendo stati individuati attraverso lo studio dei virus oncògeni, non sono geni esclusivi dei virus, ma si trovano nel genoma virale perché sono stati prelevati dal virus stesso in una cellula eucariote infettata in precedenza e da quella sono stati trasportati nelle successive cellule infettate, le quali potrebbero anche trarre vantaggi evolutivi grazie a questo tipo di trasferimento dell'informazione genetica. E' ormai del tutto accertato che sono stati i proto-oncogèni cellulari normali che hanno dato vita ai geni trasformanti dei virus a RNA, i quali in origine erano incapaci di trasformare le cellule infettate. Le sequenze dei proto-oncogèni sarebbero così ricadute sotto il controllo dei potenti elementi regolatori del genoma virale e sarebbero successivamente andate incontro a mutazioni (Peehl e Stamey 1986).

Fino ai primi anni '80 esistevano in molti istituti di ricerca alcuni laboratori chiamati di "Virologia dei tumori". Ma attorno al 1983-84, quando si scoprirono e si diffusero i concetti che sono stati qui esposti, si ribattezzarono quegli stessi laboratori -dove peraltro il lavoro continuava ancor più intenso, sulla scia delle nuove acquisizioni- come laboratori di "biologia molecolare e di virologia", proprio per rispecchiare il cambiamento fondamentale che si era verificato nella prospettiva biologica del problema.

Mentre i virus oncògeni a RNA (retrovirus) contengono sequenze oncogèniche simili a quelle di geni cellulari (proto-oncogèni) i virus oncògeni a DNA (che non sono mai acutamente trasformanti e che dimostrano la loro azione tumorigena solo in condizioni sperimentali molto particolari) possiedono geni che non assomigliano notevolmente a geni cellulari: la loro azione si esplica soprattutto per una capacità di inserirsi nel DNA cellulare in regioni critiche, le quali possono contenere alcuni proto-oncogèni (Levine 1988). L'azione di un virus tumorale a DNA (che spesso è assai limitata, come dimostrano i casi del Citomegalovirus, CMV, e del virus dell'epatite B, HBV, i quali pur essendo molto diffusi ed infettanti provocano tumori solo di rado) si esplicherebbe allora per la aumentata frequenza di mutazioni che si riscontra nel DNA cellulare delle cellule infettate, per l'inserimento di un elemento regolativo virale (p.es. un promotore) in una regione di DNA cellulare contenente proto- oncogèni oppure per altri meccanismi non ancora chiariti (Levine 1988).

Anche se queste implicazioni sulla natura dei virus sconfinano nel campo della filosofia della scienza ed esulano dagli obiettivi principali del presente saggio, investendo tra l'altro anche il concetto stesso della vita ed il processo basilare della trasmissione dell'informazione biologica, riteniamo importante riferirne brevemente per comprendere appieno l'importanza storica della scoperta degli oncogèni nell'ambito del progresso delle conoscenze biologiche e mediche.

Le principali modalità delle alterazioni riscontrate negli oncogèni

Un oncogène può rendere neoplastica una cellula attraverso una delle seguenti quattro modalità (Figura 4):

- a) perché esiste una mutazione nella sequenza dell'oncogène;
- b) perché esistono molte copie dell'oncogène (perché si è verificata una amplificazione genica);
- c) perché esiste una alterazione nella localizzazione o nella funzione dei geni che regolano l'espressione dell'oncogène (traslocazione da una regione cromosomica ad un'altra o inserimento di un elemento attivo di natura virale vedi anche Figura 12);
- d) perché esiste un difetto a livello post-trascrizionale che riduce la degradazione dello RNA messaggero della proteina dell'oncogène.

In tutti i casi suddetti, il risultato delle alterazioni genetiche porta ad una modificata (eccessiva) funzione della proteina dell'oncogène, vuoi perché si tratta di una proteina modificata (a) (alterazione qualitativa), vuoi perché si determinano alcune alterazioni quantitative (b, c, d): si può avere un eccesso di produzione di proteina per la presenza di molte copie del gene (b), perché la produzione non obbedisce ai segnali di spegnimento (c) o ancora perché il metabolismo dello RNA messaggero è rallentato (d) (Cole 1985; Peehl e Stamey 1986; De Wolf 1989; Maroder et al. 1990).

- a) Mutazioni nella sequenza nucleotidica dell'oncogène
- b) Aumento del numero di copie dell'oncogène
- c) Alterata espressione dell'oncogène (traslocazione o inserimento di un promotore)
- d) Difetto post-trascrizionale (alterato metabolismo del messaggero)

Figura 4. Modalità con cui si può arrivare ad una alterazione della espressione degli oncogèni nelle cellule tumorali.

In tutti i casi si tratta dunque di modificazioni del patrimonio genetico della cellula che rendono inefficaci i meccanismi di controllo e di spegnimento delle funzioni che dovrebbero prevalere nel momento in cui la cellula entra in una fase di quiescenza, di non proliferazione (Cole 1985).

A dimostrazione di ciò esistono molte prove sperimentali. L'inserimento di un protooncogène attivato in una cellula normale produce la trasformazione neoplastica. Anche l'inserimento di DNA purificato da cellule tumorali - il quale contiene oncogèni attivati - produce lo stesso risultato (Peehl e Stamey 1986).

L'inserimento di sequenze virali in prossimità di oncogèni cellulari è un'altra delle modalità comprovate della carcinogenesi (Durst et al. 1987). A questo proposito è stato osservato anche che i retrovirus con azione trasformante lenta (che sono privi di un oncogène virale nel loro codice genetico) sono capaci di inserirsi nel DNA delle cellule infettate proprio nelle vicinanze di oncogèni cellulari e di attivarli (Slamon 1987). Al contrario, tutti i retrovirus trasformanti acuti contengono già nel proprio genoma oncogèni virali specifici che sono responsabili del potere oncògeno immediato dei virus stessi, indipendentemente dalla sede di inserzione del DNA virale entro il DNA della cellula infettata (Slamon 1987).

Quando si è poi andati a verificare se le cellule normali potessero per caso contenere qualche sequenza simile a quelle dei geni trasformanti dei virus oncògeni (l'ipotesi da verificare era quella della esistenza o meno di infezioni virali latenti) si è scoperto con grande sorpresa di tutta la comunità scientifica che tutte le cellule normali (dai lieviti fino ai mammiferi ed all'uomo) contengono naturalmente tutte le sequenze dei geni trasformanti virali. Era possibile che tutte le cellule di tutte le specie animali fossero infettate da questi virus? Certo che no! Era invece ampiamente possibile che i virus tumorali prelevassero alcune sequenze geniche presenti nelle cellule infettate e le facessero proprie durante i loro cicli di infezione cellulare (Slamon 1987).

Un'ulteriore dimostrazione del coinvolgimento di geni nella trasformazione neoplastica è venuta dalle osservazioni di alterazioni cromosomiche (delezioni, traslocazioni, ecc.), che sono frequentissime nei tumori maligni: gran parte di queste anomalie cromosomiche si verifica in prossimità della sede di oncogèni già noti (Slamon 1987). Altri oncogèni possono tuttavia essere ancora sconosciuti: il loro numero è passato da poche unità negli anni settanta fino agli oltre cinquanta di oggi.

L'attivazione dei geni può avvenire attraverso vari meccanismi: uno di questi è la perdita della metilazione delle citosine. Alcuni esperimenti hanno dimostrato come la metilazione di un oncogène possa ridurre la sua attività e dunque il suo potere trasformante (Borrello et al. 1987).

Esistono tuttavia anche altre ipotesi sui geni del cancro: Peter Duesberg ne ha avanzata una secondo la quale sarebbero soltanto alcune rare ricombinazioni geniche ed alcuni troncamenti anomali dei geni a produrre i geni patologici delle cellule cancerose e dei virus tumorali (Duesberg 1987).

L'espressione degli oncogèni può peraltro essere modulata da fattori esterni. In alcuni sistemi si è osservato che la presenza di cellule normali accanto a quelle neoplastiche può inibire la proliferazione delle cellule trasformate (La Rocca et al. 1989), il che testimonia dell'esistenza di meccanismi autocrini di inibizione della proliferazione cellulare (Newmark 1987).

Lo sviluppo della neoplasia può tuttavia richiedere il coinvolgimento di più oncogèni, come risulta da recenti studi. In particolare occorre la cooperazione di almeno due oncogèni con funzioni differenti, come è stato riscontrato in casi di un *ras* mutato e di un *myc* iperespresso, ma occorre anche il contributo di ulteriori eventi somatici per la piena espressione del fenotipo trasformato (Sinn 1987).

Si incominciano inoltre ad evidenziare alcune interazioni tra prodotti di oncogèni e prodotti di geni oncosoppressori (v. pag. 48) (Werness et al., 1990).

Le modalità complessive del processo di trasformazione neoplastica della cellula geneticamente alterata risulteranno più chiare dopo aver passato in rassegna le funzioni delle principali proteine degli oncogèni, che saranno illustrate con maggiori dettagli molecolari nei capitoli successivi (pagg. 28-47).

Cosa sono gli antioncogèni (o geni oncosoppressori)

Analogamente a quanto era stato a suo tempo scoperto a proposito dei primi oncogèni, si è osservato di recente che alcuni tumori presentavano la mancanza completa di una proteina normale e che proprio la mancanza di detta proteina era responsabile dello stato trasformato. In questo caso la proteina mancante si comporta all'opposto di una proteina codificata da un oncogène: è dunque la proteina di un antioncogène o, più propriamente, di un gene oncosoppressore. La reintroduzione della proteina dell'anti- oncogène nelle cellule tumorali è in grado di rendere reversibile lo stato di trasformazione neoplastica.

Gli oncogèni codificano proteine che possiedono effetti dominanti nella trasformazione neoplastica. Gli antioncogèni invece codificano proteine la cui mancanza può produrre l'insorgenza del cancro. L'attivazione di un antioncogène potrebbe, ad esem-

pio, segnalare il differenziamento terminale di una cellula, sicché la mancanza di un siffatto segnale potrebbe determinare la proliferazione continua ed anomala di un determinato tipo cellulare (Sharp 1989).

Gli antioncogèni sono stati scoperti in tempi recentissimi: il primo di essi è rappresentato dal gene RB del retinoblastoma (Hansen e Cavenee 1988). Man mano che si procede con le ricerche, aumentano sia il numero degli antioncogèni scoperti sia il numero dei tumori in cui si riscontra l'importanza della funzione degli antioncogèni. Una descrizione più dettagliata degli antioncogèni si può trovare a pag. 48 (Vedi anche Figura 13).

Il punto della situazione

Dallo studio degli oncogèni e dei geni onco-soppressori (o anti-oncogèni) è derivata la descrizione di una fitta rete di meccanismi di controllo della moltiplicazione cellulare che Bishop ha giustamente definito una "mappa delle strade biologiche" che vanno dalla superficie della cellula fino al nucleo (Bishop 1985). I prodotti degli oncogèni si trovano strategicamente agli incroci di questa mappa stradale: sono fattori di crescita (PDGF, FGF, ecc.; vedi pag. 28), sono recettori per fattori di crescita (EGF receptor, ecc.; vedi pag. 32), sono elementi di trasduzione del segnale biologico a livello della membrana plasmatica e del citoplasma (G-proteins, ecc.; vedi pag. 34) e sono elementi nucleari effettori che ricevono il segnale di attivazione e lo applicano agli elementi della mitosi (vedi pag. 40). Una descrizione particolareggiata di questa mappa biologica della moltiplicazione cellulare è illustrata a partire da pag. 19, mentre uno schema generale della mappa è delineato nella figura 5.

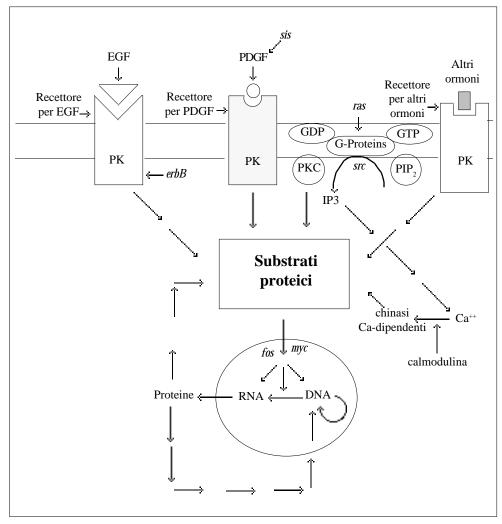


Figura 5. Mappa delle strade biologiche dell'attivazione cellulare con indicazione dei punti di azione dei prodotti dei principali oncogèni (erb-B; sis; ras; src; fos; myc). PK =Proteinchinasi; PKC= Proteinchinasi C; EGF = Epidermal Growth Factor; PDGF = Platelet-Derived Growth Factor; PIP $_2$ = Fosfatidilinositolo difosfato; IP $_3$ = Inositolo trifosfato.

La moltiplicazione cellulare

Avendo acquisito il concetto di oncogène ed avendo accertato la presenza degli oncogèni nelle cellule normali, si è cercato dunque di capire quale fosse la funzione normale di questi geni così altamente conservati nell'evoluzione delle specie, essendone stati trovati alcuni molto simili in una gamma di specie viventi molto estesa, come abbiamo visto (dai lieviti sino all'uomo) (Woolf 1986). Doveva trattarsi di funzioni molto elementari ed importanti, comuni a tutte le cellule.

Tra i numerosi contributi scientifici che hanno permesso di collegare e di approfondire i meccanismi molecolari del processo di attivazione cellulare, le ricerche sugli oncogèni sono state sicuramente quelle di maggior rilievo. Ancora oggi però non possiamo dire di conoscere nel massimo dettaglio tutti i vari passaggi necessari perché una cellula venga stimolata a proliferare ed a moltiplicarsi. Da molto tempo si conoscevano fenomeni come la mitosi, la stimolazione ormonale, il ciclo cellulare, e gli altri fenomeni collegati con la moltiplicazione cellulare, ma è stato grazie alla ricerca sugli oncogèni che alcune delle numerose tessere del mosaico dell'attivazione cellulare si sono potute mettere insieme, per descrivere le varie tappe che un segnale di attivazione cellulare deve compiere per arrivare all'effetto biologico finale (trasduzione del segnale).

Lo schema dell'attivazione della moltiplicazione cellulare è riassunto nella Figura 5. Il primo evento che colpisce la cellula destinata a moltiplicarsi è un messaggio esterno, che giunge sotto forma di molecola attivatrice solubile (spesso chiamata ormone o fattore di crescita) che trova sul versante esterno della membrana cellulare un recettore specifico con il quale si lega. Il legame ormone-recettore determina un cambiamento conformazionale della molecola recettoriale che si trasmette all'interno della membrana cellulare (tutti i recettori di superficie sono molecole proteiche che si ancorano sulla membrana, talvolta attraversandola interamente, e che interagiscono con le altre molecole che compongono la membrana stessa). Il cambiamento di forma del recettore trasferisce il segnale all'interno della cellula in vari modi: influenzando il legame tra G proteins e GTP o attivando un enzima come l'adenilato-ciclasi, che produce l'AMPciclico (secondo messaggero), o attivando una proteino-chinasi che fosforila altre proteine citoplasmatiche (Pennington 1987). A questo punto l'informazione si trasferisce in qualche modo nel compartimento citoplasmatico della cellula, ma per avviare la proliferazione il messaggio deve arrivare infine nel nucleo, dove è situato il DNA. Sappiamo che alcune proteine fosforilate possono agire da elementi regolatori della sintesi del DNA, ma qui ancora sono da chiarire numerosi passaggi biochimici; ad ogni buon conto il messaggio finisce col determinare la derepressione di alcuni geni e l'avvio di una particolare funzione cellulare, come ad esempio la proliferazione. Altri ormoni liposolubili, come gli steroidi, anziché agire su recettori di membrana, sono capaci di attraversare liberamente le membrane stesse e reagiscono con molecole recettoriali citoplasmatiche, ma arrivano comunque a trasmettere un messaggio nel nucleo, che termina con l'attivazione di una serie specifica di geni. In pratica tutte le funzioni

conosciute degli oncogèni si collocano entro il processo della generazione o della trasduzione dei segnali biologici di attivazione della proliferazione cellulare.

La divisione cellulare rappresenta il momento fondamentale per la vita di tutti gli organismi. Il processo della divisione cellulare è composto dalla divisione nucleare (mitosi) e dalla divisione citoplasmatica (citochinesi), ma prima che una cellula possa dividersi essa deve raddoppiare la propria massa e duplicare i componenti necessari a dare inizio al ciclo di crescita cellulare. Il ciclo cellulare è raffigurato nella figura 6.

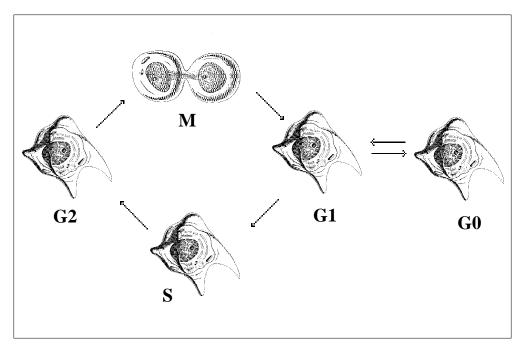


Figura 6. Il ciclo cellulare, con le sue fasi.

La maggior parte dei costituenti cellulari viene prodotta in maniera continua durante il periodo dell'interfase, perciò non è semplice individuare stadi distinti nella progressione della crescita cellulare durante l'interfase stessa. L'unico evento facilmente evidenziabile è rappresentato dalla sintesi del DNA, che avviene solo durante un periodo limitato dell'interfase denominato fase S del ciclo cellulare. L'altro stadio ben distinto del ciclo è naturalmente costituito dalla divisione cellulare. Lo stadio della divisione cellulare è denominato fase M (da mitosi). Il periodo che intercorre tra la fase M e l'inizio della sintesi del DNA è detto fase G1 (Gap1) mentre il periodo intercorrente tra il completamento della sintesi di DNA e la successiva fase M è detto fase G2 (Gap2). Il termine "gap" significa intervallo vuoto, perché ancora oggi sappiamo poco di queste fasi rispetto alla fase S ed alla mitosi. L'interfase (che rappresenta la somma delle fasi G1, S e G2)comprende normalmente il 90% o più del tempo complessivo del ciclo cellulare. Il ricambio dei materiali costitutivi è una caratteristica generale dei sistemi biologici: essi si trovano in una situazione di permanente rinnovamento ma, nonostante un ricambio

rapidissimo, la quantità dei materiali e la loro attività sono mantenuti a livelli stabili e costanti, in relazione alle condizioni ambientali ed alle prestazioni richieste. L'equilibrio dinamico tra rinnovamento e stabilità è regolato da meccanismi di controllo.

La moltiplicazione cellulare nei diversi tessuti: strutture con cellule labili, cellule stabili o cellule permanenti

A seconda delle caratteristiche di rinnovamento distinguiamo tre tipi di tessuto: ad elementi labili, stabili e permanenti.

Gli elementi cellulari dei tessuti labili sono provvisti di un compartimento germinativo, cioè di un insieme di cellule di rimpiazzo o di rifornimento da cui il sistema stazionario prende origine. Il compartimento germinativo è formato da cellule meno differenziate. Le cellule si moltiplicano continuamente, mantenendo però costante il loro numero globale, perché ugualmente elevata è la velocità di scomparsa delle cellule mature, caratterizzate da una vita media piuttosto breve. Gli elementi labili sono rappresentati per esempio da granulociti, cellule dell'epidermide, globuli rossi, cellule della mucosa intestinale e cellule seminali.

Gli elementi cellulari dei tessuti stabili li ritroviamo invece laddove manca un compartimento germinativo: si tratta di tessuti che abitualmente non si moltiplicano ma che non hanno perso definitivamente tale capacità. Queste cellule protraggono il loro silenzio mitotico per tutta la vita o meglio presentano un ciclo mitotico medio dello stesso ordine di grandezza della vita dell'individuo, avendo però la possibilità di rientrare in cicli mitotici molto ravvicinati se vengono specificamente stimolate a farlo. Tali sono le cellule epatiche, che normalmente hanno una durata di vita comparabile a quella dell'animale che le possiede, ma che entrano in attività mitotica, anche molto intensa, dopo epatectomia parziale o per diminuzione della massa epatica dovuta ad altre cause patogene. Le cellule sono sensibili ad un complesso sistema di regolazione che le colloca nuovamente in una duratura fase G0 qualora si ristabiliscano le condizioni normali.

I tessuti permanenti sono costituiti infine da cellule che non si moltiplicano perché hanno perso definitivamente tale capacità e si trovano in una permanente fase intermitotica (fase G0). Queste cellule si sono moltiplicate solo durante il periodo embrionale, hanno raggiunto poi un numero fisso e non possono più dividersi né possono sostituire gli elementi perduti; l'unica variazione possibile in questi tessuti è rappresentata quindi da una eventuale diminuzione numerica per morte cellulare. Tali sono ad esempio le cellule del sistema nervoso e del tessuto muscolare.

I meccanismi proliferativi normali sono comunque ordinati e regolati, rispondendo appieno alle esigenze particolari dell'organismo nei vari momenti della sua vita.

Segnali di attivazione per la cellula

Le cellule presenti nei diversi tessuti necessitano, al fine di attivare il processo di moltiplicazione e talvolta anche per la loro stessa sopravvivenza, di una certa quantità di specifici fattori di crescita. Differenti tipi cellulari richiedono inoltre, per gli stessi scopi, composizioni e quantità diverse di fattori di crescita. Questi fattori possono essere proteine o piccole molecole come brevi peptidi o steroidi; alcuni di essi sono ormoni circolanti nel sangue, altri invece agiscono probabilmente come mediatori chimici locali.

Tra i fattori di crescita più studiati ricordiamo il fattore di crescita epidermico (EGF) e il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF) i quali trasmettono il loro segnale legandosi a molecole proteiche specifiche che sono contenute nella membrana plasmatica e che fungono da recettori (vedi figura 5).

La trasduzione del segnale

Le cellule sono macchine biologiche fondate su meccanismi chimici. I segnali di avvio e di arresto della macchina cellulare sono tutti di natura chimica e devono essere trasmessi come tali dall'origine sino alla destinazione finale. In questo tragitto esistono tutta una serie di tappe (liberazione del messaggio, trasporto, ricezione ed attuazione del messaggio stesso) che sono globalmente conosciute con il termine comprensivo di "trasduzione" del segnale biologico. Un segnale biologico è costituito per esempio dalla liberazione di EGF. Le cellule che possiedono alla loro superficie l'opportuno recettore saranno capaci di rispondere al segnale inviato.

Il recettore proteico per l'EGF è stato identificato e purificato da Stanley Cohen. Il recettore si estende attraverso tutta la membrana plasmatica: la parte che sporge al di fuori della cellula riconosce l'EGF, mentre la regione catalitica all'interno della cellula opera una reazione chimica che consiste nella fosforilazione di proteine substrato, realizzata da attività enzimatiche chiamate proteinchinasi. Il legame con l'EGF trasmette il segnale dall'esterno all'interno della cellula, dove provoca l'aumento dell'attività proteinchinasica della regione catalitica. Il recettore per il PDGF è dotato di analoga funzione enzimatica e lo stesso avviene anche per altri ormoni polipeptidici: l'attivazione della proteinchinasi è ormai considerata una proprietà generale dei recettori per i fattori di crescita.

Si è visto che aggiungendo EGF o PDGF a cellule con recettori adatti vi è un aumento del livello di fosfotirosina nelle proteine di queste cellule; questo significa che il segnale di divisione potrebbe essere trasmesso a partire dal recettore occupato all'interno della cellula mediante fosforilazione dei residui di tirosina di una o più proteine bersaglio che si trovano dentro la cellula (Hunter 1984).

L'evoluzione degli organismi pluricellulari si è basata sulla capacità delle cellule di

comunicare con le altre. La comunicazione tra cellule è necessaria per regolare lo sviluppo e l'organizzazione nei tessuti, per controllare la loro crescita e divisione e per coordinare le loro diverse attività. L'importanza e la complessità della comunicazione tra le cellule implicano che una certa proporzione dei geni negli esseri pluricellulari sia coinvolta in questi processi di coordinamento.

I segnali chimici che provengono da alcune cellule e ne raggiungono altre trasmettono messaggi precisi e possono essere suddivisi come segue. (1) Messaggi locali: la maggior parte degli elementi cellulari secerne uno o più segnali chimici che agiscono come mediatori locali, i quali vengono rapidamente captati o distrutti. (2) Messaggi ad ampio raggio: cellule endocrine specializzate secernono ormoni che attraverso il circolo sanguigno influenzano a distanza cellule bersaglio variamente distribuite nell'organismo. (3) Messaggi specifici e selettivi: le cellule nervose sviluppano sinapsi chimiche con le cellule bersaglio e secernono neurotrasmettitori che agiscono solo sulle cellule bersaglio adiacenti alle giunzioni sinaptiche. Le modalità fondamentali di questa trasmissione dei segnali mediante elementi secretori sono illustrate nella figura 7.

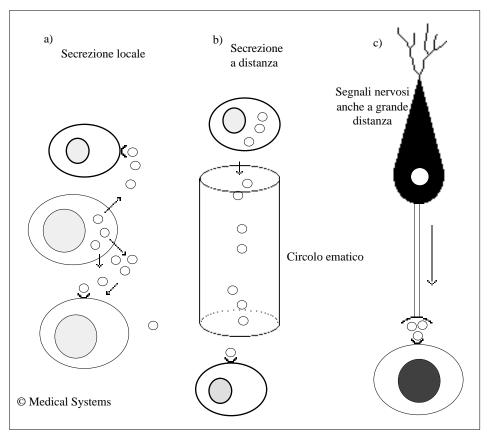


Figura 7. Modalità di trasmissione dei segnali intercellulari. a) messaggi locali tra cellule adiacenti o vicine; b) messaggi ad ampio raggio tra cellule di ghiandole secretorie (endocrine) e tessuti bersaglio distanti; c) messaggi specifici e selettivi tra cellule specializzate.

La capacità di una cellula di rispondere ad una particolare molecola segnale extracellulare dipende da specifiche proteine situate sulla membrana plasmatica, dette recettori, che legano le molecole segnale. Nell'animale adulto la maggior parte delle cellule è specializzata per svolgere una funzione primaria; le cellule contengono un caratteristico corredo recettoriale che permette loro di rispondere ad ognuno dei differenti segnali che provocano o modulano le loro funzioni. La maggior parte dei segnali chimici influenza le cellule bersaglio stimolando la sintesi di proteine preesistenti o iniziando la sintesi di nuove proteine.

La maggioranza dei fattori ormonali ampiamente circolanti nell'organismo è costituita da ormoni polipeptidici e da ormoni steroidei. Gli ormoni steroidei attraversano liberamente la membrana cellulare ed agiscono direttamente all'interno delle cellule collegandosi ad una proteina (steroidorecettore) solo prima di penetrare nel nucleo per esercitare la propria influenza sulla sintesi di RNA e di DNA. Gli ormoni peptidici ed i fattori di crescita agiscono invece in maniera diversa: essi infatti si fissano come si è detto a specifici recettori della membrana plasmatica ed esplicano i loro effetti all'interno della cellula bersaglio utilizzando uno o più secondi messaggeri.

Alcuni utilizzano come secondo messaggero l'adenosinmonofosfato ciclico (AMP-c), altri invece utilizzano una combinazione di secondi messaggeri comprendente ioni calcio, inositoltrifosfato (IP3) e diacilglicerolo.

Vi sono inoltre due vie principali attraverso le quali i secondi messaggeri svolgono la loro azione: in una il messaggero agisce direttamente legandosi alla componente regolatrice della proteina recettoriale e provocando un cambiamento conformazionale, nell'altra il secondo messaggero deve prima attivare un enzima, una proteinchinasi, che poi a sua volta fosforila altre proteine provocandone il cambiamento di forma e l'influsso su altre vie metaboliche.

L'AMP-c interagisce prima con una specifica proteina di legame (proteinchinasi AMP-c dipendente) costituita da 2 subunità regolatrici e da 2 subunità catalitiche. L'AMP-c si lega alle subunità regolatrici permettendo la liberazione delle subunità catalitiche e la conseguente fosforilazione di un'ampia varietà di substrati proteici. La risposta dell'AMP-c ai segnali degli ormoni peptidici diventa più complessa con l'introduzione delle proteine G tra le componenti dei sistemi recettoriali. Queste proteine guaninonucleotidiche di legame costituiscono un insieme eterogeneo di molecole proteiche cellulari che interviene nella trasduzione del segnale ormonale. Le due proteine G meglio caratterizzate (Gi e Gs) sono accoppiate da una parte a recettori della superficie cellulare destinati a fissare ormoni peptidici specifici e dall'altra all'adenilciclasi. La proteina Gs stimola l'attività dell'adenilciclasi ed induce in tal modo un aumento dei livelli intracellulari di AMP ciclico. La Gi, invece, inibisce l'attività dell'adenilciclasi e determina quindi una diminuzione o una inibizione della formazione intracellulare di AMP ciclico. Un'altra classe di secondi messaggeri (regolati sempre dalle G proteins) costituisce la via del fosfoinositolo (PI), originariamente descritta da Michael J. Berridge negli anni 60. In questo sistema alcuni recettori per gli ormoni peptidici sono legati ad una proteina G definita GP, a sua volta collegata ad un enzima denominato fosfolipasi C che opera la scissione di un lipide di membrana, il fosfatidilinositolo 4-5 bifosfato (PIP2) in inositolo trifosfato (IP3) ed in diacilglicerolo. Il diacilglicerolo resta fissato alla membrana plasmatica e agisce come cofattore, insieme

al calcio, nella attivazione di un enzima definito proteinchinasi C (PKC). La proteinchinasi C è stata descritta originariamente in Giappone da Yasutomi Nishizuka agli inizi degli anni 80 e sembra essere localizzata all'interno della membrana cellulare finché non si verifica la liberazione di diacilglicerolo in risposta ad un segnale esterno. Questo enzima è in grado sia di determinare che di influenzare molte funzioni cellulari. L'inositoltrifosfato, l'altro secondo messaggero, diffonde liberamente nell'interno delle cellule e non sembra attivare o inibire alcun enzima cellulare; esso è però in grado di agire da ionoforo del calcio, cioè di favorire la liberazione degli ioni calcio dal reticolo endoplasmico e dai calciosomi determinando un aumento dei livelli intracellulari di calcio libero. Gli ioni calcio intracellulari liberi possono interagire con il diacilglicerolo, determinando una attivazione diretta della proteinchinasi C, e possono legarsi alle proteine calcioleganti, come la calmodulina. Questa può legarsi a molti enzimi bersaglio differenti: possiede quattro regioni di legame con il calcio e a seconda del sito che ha legato il calcio stesso può attivare una diversa proteina bersaglio.

Il messaggio biologico, seguendo queste complesse ed articolate vie di trasmissione, giunge alfine - attraverso altri passaggi non del tutto chiariti - ad influenzare l'attività dei geni e quindi le funzioni cellulari. Lo schema complessivo degli eventi è illustrato nella figura 8.

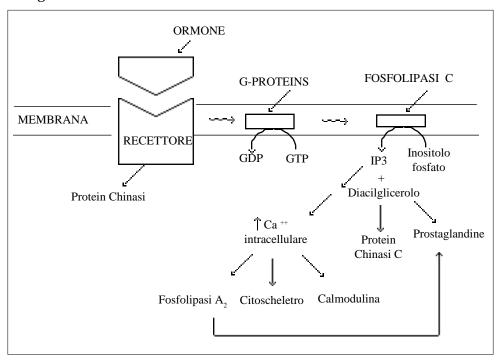


Figura 8. Schema di dettaglio della trasduzione del segnale. Il ruolo del Calcio, della calmodulina e dell'inositolo si intersecano nella attivazione di numerose funzioni cellulari, con aumento del metabolismo dei fosfolipidi e con effetti sul citoscheletro, sulla sintesi di prostaglandine e sulla attivazione delle proteino chinasi.

In un sistema biologico multicellulare, le comunicazioni sono essenziali per un buon funzionamento globale dell'organismo, proprio come nella nostra vita contemporanea è importante mantenersi vigili ed informati per reagire prontamente alle stimolazioni od alle circostanze ambientali.

La proliferazione ed il differenziamento nell'embrione e nell'individuo adulto

Uno dei fenomeni più evidenti in cui si nota l'importanza dei messaggi intercellulari è costituito dallo sviluppo embrionale. Qui occorre che la moltiplicazione cellulare, dalla fase di singola cellula zigote fino alla fase di individuo completo formato da parecchi miliardi di cellule, costituisca un processo rapido, ordinato e soprattutto coordinato. I messaggi tra cellule sono fondamentali per determinare il fatto che la popolazione cellulare che vada a costituire un determinato organo sia numericamente adeguata e funzionalmente efficiente. Le turbe della comunicazione intercellulare possono produrre infatti malformazioni fetali ed errori dello sviluppo e del differenziamento tissutale. Le cellule debbono prima moltiplicarsi coordinatamente e poi maturare, differenziandosi, per assumere le funzioni caratteristiche dei vari organi e tessuti.

Per quanto riguarda il ruolo degli oncogèni nelle cellule normali e nell'embrione, numerosi studi in vitro eseguiti su colture cellulari e su embrioni di varie specie in vivo hanno dimostrato che l'espressione delle proteine codificate da molti oncogèni avviene in momenti specifici del ciclo cellulare o dello sviluppo embrionale ed in particolare quando c'è bisogno di una rapida moltiplicazione delle cellule di un tessuto, come può avvenire in occasione della riparazione di una ferita o come deve avvenire in tempi e modi prefissati nel corso della formazione di un nuovo individuo. In condizioni di normalità, tuttavia, l'attivazione dell'oncogène è transitoria: trascorso il momento in cui è importante la sua funzione, il gene viene represso e non si trova più traccia della sua espressione. In altre parole, nelle cellule normali l'attivazione degli oncogèni è ordinata (avviene in determinati momenti dello sviluppo embrionale o tissutale) ed è regolata (può essere repressa od attivata in circostanze specifiche). Ad esempio sappiamo che l'oncogène myc viene espresso soprattutto nelle cellule epiteliali di embrione umano intorno alla fine del primo trimestre di gestazione (Pfeifer-Ohlsson et al. 1985). Un altro esempio singolare è costituito dall'oncogène int-1, che è stato isolato da tumori mammari di topo e che gioca un ruolo importante anche nello sviluppo embriologico delle ali nella Drosophyla (Marx 1987b).

La proteina PP60c-src, il prodotto del gene cellulare corrispondente al primo oncogène virale scoperto, ha di recente riservato ulteriori sorprese: essa è coinvolta anche nello sviluppo cerebrale, nel nucleo striato e nell'ippocampo. Si dimostra così che anch'esso è il prodotto di un gene importante nello sviluppo e nel differenziamento neuronale (Cartwright et al. 1988).

Come si vede gli esempi sono numerosi: molti altri analoghi se ne possono citare ed altri ancora compariranno presto nelle riviste scientifiche.

In condizioni normali dunque l'attivazione degli oncogèni cellulari avviene soprattutto nelle fasi di proliferazione, è reversibile ed è controllata.

Nelle cellule tumorali, invece, l'attivazione degli oncogèni risulta costante e non passibile di controllo (si parla dunque di attivazione "costitutiva"): il risultato di ciò lo osserviamo con una crescita progressiva e costante di un tessuto che chiamiamo neoplasia.

Avendo presenti le varie tappe della trasduzione del segnale biologico di attivazione cellulare, vediamo con maggiori dettagli molecolari il meccanismo d'azione degli oncogèni meglio conosciuti sino ad oggi, suddividendoli secondo la loro collocazione sulla "mappa biologica" di cui s'è detto.

Oncogèni come fattori di crescita

I processi proliferativi delle cellule eucariotiche sono sotto lo stretto controllo di fattori di crescita esogeni. In assenza degli appropriati stimoli mitogeni, le cellule abbandonano il ciclo cellulare per stabilizzarsi quiescenti nella fase cosiddetta G0 del ciclo stesso (vedi Figura 6). Nei processi neoplastici, le cellule trasformate facilmente sfuggono ai controlli del ciclo cellulare per seguire un criterio di proliferazione permanente che prescinde dall'uso di fattori di crescita esogeni. Tale proprietà, cioè l'indipendenza da fattori mitogeni, è la più comune caratteristica delle cellule tumorali che contribuisce a deregolare il loro meccanismo di controllo della crescita) (vedi Figura 9).

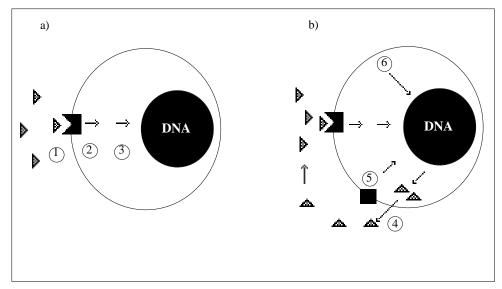


Figura 9. Meccanismo della mitogenesi nelle cellule normali (a) ed in quelle tumorali (b). 1= fattore di crescita,; 2= recettore per il fattore di crescita; 3= messaggio mitogenico; 4= produzione endogena di fattori di crescita; 5= fattori che simulano l'attivazione di un recettore; 6= fattori che simulano messaggi mitogenici.

Alcune informazioni sui meccanismi molecolari di trasformazione neoplastica sono emerse dagli studi sui proto-oncogèni cellulari; numerose "sequenze trasformanti" sono state isolate in questi ultimi tempi e sono state definite per omologia con sequenze note di retrovirus oncogèni animali, oppure sono state identificate come sequenze trasformanti di tumori solidi attraverso esperimenti di trasferimento di DNA su cellule normali "target". Gli oncogèni virali presenti nel genoma retrovirale hanno avuto origine, come si è già detto, da una trasduzione di sequenze cellulari normalmente presenti e fisiologicamente importanti nell'economia del metabolismo cellulare. La funzione di molti di questi proto-oncogèni è ancora oscura; tuttavia per alcuni si

comincia a delineare la funzione biologica, legata alla regolazione della proliferazione cellulare. Questa visione ha trovato evidenze sperimentali che assegnano il ruolo degli oncogèni a differenti compartimenti del complesso meccanismo della proliferazione cellulare. Pertanto dall'interazione con fattori di crescita fino alla trasduzione del segnale ogni processo di veicolazione dell'informazione mitogenica passa attraverso varie classi di oncogèni fino a regolare finemente la fisiologia cellulare e l'economia funzionale dell'organismo vivente.

Cominceremo con l'illustrare alcune evidenze sperimentali in favore del fatto che l'indipendenza da fattori di crescita e la crescita autonoma delle cellule tumorali è la conseguenza dell'espressione costitutiva, incontrollata, di uno o più fattori di crescita, alcuni dei quali rientrano sicuramente nella famiglia dei proto-oncogèni cellulari. In particolare discuteremo del Platelet-Derived Growth Factor (codificato dall'oncogène c-sis) e dell'EGF.

Fattori di crescita come proteine trasformanti

Le prime evidenze del fatto che un oncogène possa codificare per un fattore di crescita sono venute dagli studi sulla struttura del PDGF, il mitogeno derivato dalle piastrine. Una sequenza parziale delle catene polipeptidiche del PDGF (catene A e B) ha mostrato che gli ultimi 109 residui aminoacidici N-terminali della catena B sono pressoché identici rispetto alla sequenza polipeptidica del prodotto dell'oncogène sis, denominato p28 sis (Waterfield et al. 1983). Soltanto tre sostituzioni aminoacidiche sono emerse confrontando la sequenza della scimmia e dell'uomo. Inoltre studi di omologia tra le due catene hanno mostrato che la catena A detiene il 65% di omologia con la catena B; pertanto è plausibile pensare che negli eucarioti il PDGF derivi da un gene ancestrale comune, trasdotto in v-sis nei retrovirus e duplicatosi durante l'evoluzione.

L'analisi del prodotto cellulare *sis* in cellule eucariotiche infettate con il virus SSV (Simian Sarcoma Virus) ha dimostrato che la proteina p28 viene velocemente dimerizzata in un prodotto di peso 56 KD, ulteriormente modificato per azione proteolitica di proteasi specifiche. Questo meccanismo post-traslazionale riflette lo stesso tipo di processo metabolico che porta alla sintesi del PDGF, anch'esso costituito da un dimero disulfidico del tipo A/B o dagli omodimeri A/A, B/B (Antoniades et al. 1979, Deuel et al. 1981, Raines e Ross 1982). Apparentemente il prodotto p28sis è identico al PDGF, omodimero B/B. L'identità virtuale tra la p28 e la catena B implica che il retrovirus SSV ha acquisito per trasduzione sequenze contenute nel gene cellulare della catena B. Quest'ultimo infine, denominato come appartenente al locus c-*sis*, è un altro esempio di proto-oncogène identificato per omologia di sequenza con il gene virale *sis*. Il gene è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 22 (Dalla Favera et al. 1982) e non contiene omologie o additivi di sequenza del gene della catena A del PDGF. Anzi è ormai dimostrato che il gene per il PDGF A è localizzato su di un altro cromosoma.

In virtù di questa stretta omologia il prodotto p28 può biologicamente essere

inquadrato come un agonista del PDGF, dal momento che l'omodimero B/B mantiene la stessa capacità mitogena dell'eterodimero PDGF. In cellule trasformate dal virus SSV, il prodotto citoplasmatico viene secreto al di fuori delle cellule ed interagisce con il recettore del PDGF (rPDGF) per innescare l'induzione proliferativa. E' stato anche visto che anticorpi anti-PDGF neutralizzano il prodotto citoplasmatico del sis (Deuel et al. 1981). Non è del tutto chiaro, però, se la proteina del sis riesca ad interagire con il rPDGF a livello intracellulare o se invece debba essere comunque secreta all'esterno per agire come fattore solubile. Un altro punto importante è se il prodotto oncogènico racchiuda o meno altre proprietà biologiche o "trasformanti" non condivise dal fattore PDGF. Se ciò non fosse si potrebbe ipotizzare che la sola aggiunta di PDGF ad un sistema cellulare quiescente in coltura possa provocare un chiaro innesco del meccanismo trasformante. Effettivamente, l'aggiunta di siero e di PDGF purificato a popolazioni cellulari di fibroblasti quiescenti tipo 3T3 induce proprietà fenotipiche proprie delle cellule trasformate, quali l'arrotondamento dei margini cellulari, l'assemblaggio di strutture pluricellulari rotondeggianti e la formazione di microfoci di proliferazione. Inoltre nei fibroblasti e nelle cellule gliali, l'aggiunta di PDGF provoca la riorganizzazione dei filamenti di actina e la formazione di interdigitazioni della membrana plasmatica ("ruffles"), tutte proprietà tipiche delle cellule neoplastiche (Mellstrom et al. 1983).

Successivamente è stato dimostrato che certi tumori secernono PDGF, o molecole altamente omologhe rispetto ad esso, nei mezzi di coltura e in prossimità degli organi dove si sviluppano. Il primo esempio riguarda una linea cellulare di osteosarcoma denominata U- 2 OS, capace di produrre un fattore di crescita denominato ODGF (osteosarcoma-derived growth factor). L'ODGF è classificato come un fattore di crescita PDGF-simile perché ha delle proprietà fisico-chimiche che lo fanno cross-reagire con il recettore del PDGF e con anticorpi anti-PDGF. Più recentemente tali fattori di crescita sono stati trovati nel terreno condizionato di altri tipi di neoplasie, quali il glioma ed il rabdomiosarcoma (Nister et al. 1984). Pertanto la sintesi di PDGF o di fattori strettamente associati da parte di sarcomi o gliomi è un marker essenziale di una deregolata espressione del gene c-sis/PDGF che può contribuire all'induzione della trasformazione neoplastica. Il coinvolgimento diretto del gene sis in alcune forme di neoplasie umane e animali è dato soprattutto dalla costante alta espressione di mRNA che si riscontra in linee cellulari derivate da sarcomi e gliomi. Tale incontrollata espressione può scaturire da un meccanismo aberrante di riarrangiamento genico che altererebbe la regolazione trascrizionale a vantaggio di una sintesi incontrollata (Martinotti et al. 1984).

Alcuni oncogèni codificano inoltre per fattori di crescita simili al Fibroblast Growth Factor (FGF/hst) e sono coinvolti nei fenomeni della angiogenesi, che tanta importanza riveste nella vascolarizzazione e dunque nella crescita e nella diffusione tumorale (Marx 1987a). Questo oncogène, isolato dal gruppo di Claudio Basilico, è espresso anche nel sarcoma di Kaposi e nei carcinomi dello stomaco umani (human stomach, hst) e presenta una modalità d'azione autocrina (Talarico et al. 1990).

Una osservazione interessante, pubblicata recentissimamente dallo stesso gruppo di ricerca, ha riguardato la possibilità di proteggere i topi dalla crescita tumorale mediante una immunizzazione contro lo stesso fattore di crescita codificato dall'oncogène K-fgf/hst (Talarico et al. 1990). Uno schema riassuntivo dei fattori di crescita più importanti è contenuto nella figura 10.

| FATTORE | ORIGINE | P.M. | STRUTTURA |
|--|--|----------|---|
| PDGF (Platelet Derived Growth Factor) | Piastrine umane | 28-31 kd | Due catene polipeptidiche |
| ODGF (Osteosarcoma Derived Growth Factor) | Terreno di cellule U-2 OS | 31 kd | Due catene polipeptidiche |
| FDGF (Fibroblast Derived Growth Factor) | Terreno di cellule | - | - |
| EGF (Epidermal Growth Factor, Urogastrone) | Urina (EGF umano) Ghiandola salivare (EGF di topo) | 6 kd | Una catena polipeptidica |
| TGF (Transforming Growth Factor) | Cellule trasformate | 7 kd | Sequenza aminoa- cidica analoga all'EGF |

Figura 10. I principali fattori di crescita, con informazioni in merito alle loro origini, ai pesi molecolari ed alla struttura molecolare.

Oncogèni come recettori modificati o come proteino-chinasi associate alla membrana

Una relazione strutturale tra recettori per fattori di crescita ed oncogèni è stata stabilita grazie all'osservazione del fatto che il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGF) ha una forte omologia di sequenza aminoacidica con la proteina oncogènica denominata gp65-erbB, prodotto trasformante del virus della eritroblastosi aviaria (AEV). Parecchie analisi di sequenza hanno stabilito una omologia conservata per il 90% tra recettore dell'EGF e proteina oncovirale. Apparentemente però l'oncogène virale derivato per trasduzione dal locus del gene per il recettore conserva omologia solo con sequenze della porzione intramembranaria e citoplasmatica, mentre manca completamente della porzione extracellulare di legame con il fattore di crescita. Pertanto il gp65-erbB corrisponde ad una versione tronca del recettore con una possibile capacità autocatalitica e autoattivante sulla eventuale trasduzione del segnale.

L'esistenza di una relazione funzionale fra fattori di crescita e prodotti oncogènici è documentata dal fatto che parecchi recettori e parecchie proteine codificate da oncogèni sono caratterizzati da una notevole attività tirosinchinasica. Di conseguenza questa attività enzimatica, che è decisamente poco comune nei polipeptidi delle cellule normali a riposo, si associa con la proliferazione cellulare indotta sia da fattori di crescita che dalla capacità trasformante di alcuni retrovirus. La funzione chinasica dei vari recettori di membrana è di fatto parte integrante della struttura del recettore medesimo: in più, la auto-attivazione della proteinochinasi porta necessariamente alla fosforilazione tirosinica di altri substrati cellulari. Dal momento che la porzione ("domain") del recettore che realizza il legame con il fattore è al di fuori del versante plasmatico della membrana, mentre il "domain" della stessa molecola recettoriale che è dotato di attività chinasica è all'interno, il meccanismo di attivazione si attua attraverso un cambiamento conformazionale dell'unità strutturale del recettore che è conseguenza diretta dell'interazione con il ligando. A sostegno di questa tesi sono stati effettuati degli studi in cui si è visto che l'attivazione del recettore dell'EGF può essere la conseguenza di una mera esposizione della molecola a una semplice sostanza, quale il DMSO (dimetilsulfossido), che sia capace di indurre il cambiamento conformazionale delle proteine.

Studi sulla localizzazione subcellulare delle proteine oncogèniche ad attività tirosinchinasica hanno rivelato che quasi tutte sono strettamente associate alla membrana plasmatica. La proteina dell'oncogène v-abl sembra essere una proteina interamente integrata all'interno del doppio strato lipidico; inoltre il prodotto pp60src del gene src è associato alla membrana particolarmente nelle placche di adesione focale. E' interessante notare che sia il pp60src che il prodotto del gene abl contengono strutture lipidiche a cui sono covalentemente legati e che in definitiva rappresentano i punti di contatto con il doppio strato lipidico della membrana. Anche il prodotto dell'oncogène fps (p130), che è abbondantemente presente nella frazione citoplasmatica, risulta associato in certe regioni della membrana quando esplica la sua funzione tirosinchinasica; pertanto è da ritenere ovvio che tutti i meccanismi di autofosoforilazione e di fosforilazione dei

residui tirosinici avvengano a ridosso della membrana cellulare o siano parte integrante del doppio strato. Da tali meccanismi si innescano poi le prime tappe che avviano la trasduzione del segnale biologico di attivazione della moltiplicazione cellulare.

Per quanto riguarda la sequenza aminoacidica delle proteine codificate dagli oncogèni a funzione chinasica, quasi tutti denunciano forti gradi di omologia tra di loro. L'omologia è più forte nelle porzioni dei geni che codificano per i "domain" tirosinchinasici, e cioè al 3' per gli oncogèni src, yes, fes, fps e fgr e al 5' per l'oncogène abl. Per quanto riguarda la specificità di substrato delle tirosinchinasi con proteine oncogèniche e con recettori di fattori di crescita, è stato dimostrato che peptidi sintetici di 10 o 12 aminoacidi derivati dal sito autofosforilante della proteina pp60 rappresentano il substrato per il recettore dell'EGF, del PDGF o dell'insulina, ma anche di altri prodotti oncogènici ad attività chinasica. D'altra parte altri peptidi derivati da altri "domain" catalitici sono risultati substrati per la pp60 o per altri recettori di membrana. Sembra pertanto ovvia l'esistenza di una catena di eventi che prevede la fosforilazione di più substrati, a loro volta capaci di veicolare l'informazione biologica intesa come trasduzione di un segnale recettoriale che è conseguenza dell'interazione primaria tra il recettore ed il suo ligando extracellulare, come è stato anticipato a pag. 19 e nella figura 5.

In cellule intatte, sia la stimolazione con EGF che l'infezione con il virus del sarcoma di Rous (RSV) portano alla fosforilazione di una medesima proteina di peso 36 kilodalton (kd). Questa proteina viene attivata anche dopo stimolazione da parte del PDGF in colture fibroblastiche di topo del ceppo Swiss 3T3. Tuttavia in altre situazioni cellulari esistono certe differenze tra stimolazione di fattori e infezione retrovirale. Ad esempio, nel caso della linea A431, la stimolazione con EGF determina la fosforilazione di una proteina con peso 81 kd, mentre l'infezione da parte di RSV non provoca lo stesso effetto. Ancora, in cellule 3T3 soltanto la trasformazione retrovirale innesca una fosforilazione tirosinica su tre substrati proteici che non coincidono con l'effetto del PDGF su altre componenti proteiche.

L'oncogène c-erb-B2 è stato ritrovato in forme amplificate nei carcinomi mammari umani. La sua somiglianza con il recettore delle cellule epiteliali per il fattore di crescita EGF lo rende particolarmente importante come elemento causale o concausale della eccessiva proliferazione dell'epitelio mammario tumorale (Zhou et al. 1987). In particolare esso sembra poter costituire un fattore prognostico importante, perché è stato dimostrato che una elevata espressione della proteina codificata dal gene c-erb-B2 si riscontra nei tumori estrogeno-negativi e metastatici (Querzoli et al., 1990).

La proteina fosforilata dell'oncogène *src* (PP60*src*) viene espressa anche nel cervello dell'embrione ed è certamente coinvolta anche nella crescita normale dei neuroni (Cartwright et al. 1988).

In conclusione, sono state ormai dimostrate alcune similitudini nella specificità di substrato di recettori di fattori di crescita e prodotti oncogènici; tali osservazioni lasciano pensare che esista nelle cellule eucarioti una possibile e comune via metabolica unitaria che viene attivata sia nella stimolazione della crescita normale che nella trasformazione neoplastica.

Oncogèni come elementi della trasduzione del segnale

Negli ultimi anni molti sforzi sono stati compiuti per delineare i meccanismi biochimici che assicurano la trasduzione del segnale, a cominciare dall'interazione recettore-ligando e giungendo poi fino alla modulazione della fisiologia cellulare. Una complessa ed eterogenea famiglia di proteine capaci di legare ed idrolizzare il GTP (guanosintrifosfato) sono state scoperte ed analizzate. Queste GTPasi rappresentano un sistema di interazione enzimatica a più substrati capace di essere sollecitato da uno stato di "on" a uno stato di "off" a seconda del legame o del rilascio di una molecola di GTP; l'idrolisi di GTP a GDP da parte dell'enzima fornisce una spinta energetica capace di mediare innumerevoli funzioni cellulari, quali la sintesi di proteine ribosomiali, l'interazione tra ormoni e ligandi, la traslocazione di proteine nascenti verso il reticolo endoplasmatico, il controllo della proliferazione e del differenziamento e la guida di particelle vescicolari all'interno dei compartimenti cellulari.

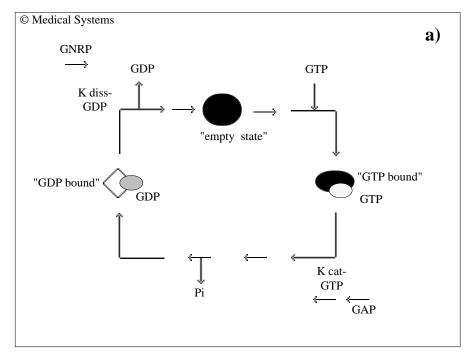
Pertanto più che di una classe di molecole, si tratta di una vera e propria superfamiglia di GTPasi, della quale alcuni membri sono ancora in fase di caratterizzazione. Solo studi complessi di cristallografia permetteranno di chiarire sempre di più il ruolo e la funzione di queste proteine. L'aggancio fisiopatologico con la famiglia degli oncogèni, che sono argomento di questo articolo di rassegna, è legato alla recente osservazione che ha dimostrato come un'importante classe di proto-oncogèni, la famiglia ras, che comprende proteine ubiquitarie negli eucarioti, annovera elementi capaci di legare molecole di GTP e di idrolizzarle secondo un processo enzimatico proprio delle GTPasi. L'oncoproteina p21ras attivata nel fenomeno neoplastico per mutazione puntiforme all'interno di uno o più codoni rappresenterebbe un sistema di trasduzione capace di essere iperattivato per alterazione conformazionale della GTPasi p21ras. Vedremo nel corso di questo capitolo come varia lo stato di attivazione della p21 e quali possono essere le conseguenze fisiologiche della mutazione patologica.

Prima però sarà bene definire in termini molto generali il meccanismo di azione del sistema GTPasico.

Il ciclo del legame e dell'idrolisi del GTP

Tutte le GTPasi (G-proteins) passano attraverso un medesimo ciclo di reazioni (Figura 11 a).

Il legame e l'idrolisi del GTP dà vita a tre stati di transizione: uno stato di legame con il GDP ("GDP-bound status"), uno stato di non legame ("empty status"), e uno stato di legame con il GTP ("GTP-bound"). Lo stato di non legame serve come transizione



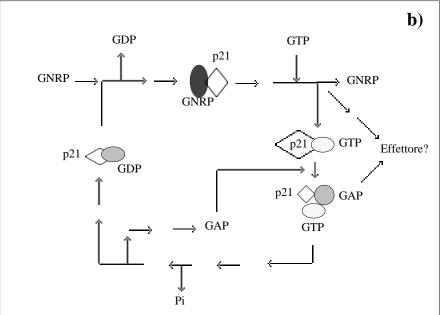


Figura 11. Attivazione delle G-proteins: (a) meccanismo generale di attivazione di una GTPasi; (b) attivazione della p21-ras. Per abbreviazioni e descrizione, vedi testo. (Da Bourne et al, 1990, modificata).

intermedia tra il distacco del GDP e l'arrivo del GTP nel sito GTP binding dell'enzima GTPasi. Una volta che il GTP è legato, il complesso va irreversibilmente verso la fase di idrolisi, con rilascio di un fosforo e la riformazione di una molecola GDP-bound.

Per motivi intrinsecamente termodinamici lo stato GDP-bound è noto anche come stato inattivo, mentre lo stato GTP-bound rappresenta invece lo stato di attivazione della GTPasi.

Per molte GTPasi il numero di molecole GTP-bound dipende dalla velocità relativa di due reazioni: la reazione di dissociazione della forma GDP-bound verso l'empty status e la velocità di idrolisi della forma GTP-bound. Queste due velocità di reazione sono regolate da due costanti, la costante di dissociazione o $k_{\text{diss,GDP}}$, e la costante di idrolisi o $k_{\text{cat}GTP}$. Pertanto è possibile scrivere l'equazione:

GTPasi-GTP / GTPasi-GDP =
$$k_{diss,GDP}$$
 / $k_{cat,GTP}$

L'equazione indica che la proporzione di proteine nello stato attivo GTP-bound può essere aumentato o accelerando la \mathbf{k}_{diss} o diminuendo la \mathbf{k}_{cat} . Per molte GTPasi ci sono alcune specifiche proteine che regolano queste costanti e queste velocità di reazione.

Le proteine che fanno aumentare la $k_{diss,GDP}$ sono anche chiamate "guanine nucleotide exchange proteins" o GNRP, mentre le proteine che fanno aumentare la $k_{cat,GTP}$ sono note come GAP. Dopo questa premessa biochimica importante, entriamo più in dettaglio a descrivere il meccanismo di azione delle oncoproteine della famiglia ras (vedi Figura 11 b).

Le oncoproteine ras

Le proteine dell'oncogène ras sono diventate oggetto di attenti studi da quando si è scoperto che certe mutazioni puntiformi all'interno dei codoni del gene causano trasformazione neoplastica di alcune specie cellulari. La proteina ras, o meglio le proteine codificate dagli oncogèni della famiglia ras sono di piccolo peso molecolare; la p21ras rappresenta la specie più nota e quella meglio studiata, ma esiste un insieme di piccoli prodotti tra 20K e 35K che sono stati isolati e che hanno tutti caratteristiche biochimiche e strutturali paragonabili con quella della proteina p21. L'analisi di questi prodotti ha dimostrato che tutte le proteine ras hanno attività GTPasica e pertanto sono da annoverare come membri importanti della superfamiglia. Inoltre la p21 è il prodotto dell'espressione di almeno tre oncogèni, noti come H-ras, K-ras ed N-ras. Questi tre geni hanno gradi di omologia più o meno variabili con l'oncogène virale v-ras del sarcoma delle scimmie; inoltre il prodotto N-ras è stato anche isolato per trasfezione molecolare da DNA tumorale derivato dal carcinoma della vescica. L'analisi molecolare ha rivelato poi che l'N-ras è presente nei carcinomi sempre mutato in uno o più punti e rappresenta

una specie attivata e trasformante di oncogène. Da un punto di vista fenotipico, la p21 promuove la trasformazione neoplastica nei fibroblasti, la maturazione negli ovociti di Xenopus e il differenziamento cellulare nella linea di feocromocitoma PC12. In ciascuno di questi casi, sembra che il persistere della forma attivata di ras GTP-bound sia responsabile dell'effetto (Bourne et al. 1990).

In-vitro, la proteina p21 ha una lenta k_{diss} ed una altrettanto lenta k_{cat} : ciò lascia ipotizzare che esistano proteine GNRP e GAP per meglio controllarne il ciclo GTPasico (vedi Figura 11 b). Infatti, in questi ultimi due anni ben tre gruppi di ricercatori hanno identificato sia proteine GNRP che una proteina GAP per la p21 ed hanno caratterizzato da un punto di vista molecolare i rispettivi geni.

Alcune mutazioni oncogèniche che avvengono a livello dei codoni della proteina ras hanno dimostrato l'importanza fisiologica della stimolazione GTPasica da parte di GAP. E' stato dimostrato che una di queste mutazioni, spesso associate a tipi diversi di neoplasie, immobilizza la p21ras verso lo stato attivo GTP-bound. A questo punto la p21 si lega al GAP ma impedisce che aumenti la velocità di idrolisi del GTP. Quindi la p21 ras attivata diviene resistente alla GAP e si accumula nello stato "GTP-bound" con importanti riflessi fisiologici e metabolici. Una seconda classe di mutazioni provoca invece un grande aumento della velocità di dissociazione verso la stato "empty", che presumibilmente genera una rapida attivazione della forma "GTP-bound". Il ruolo fisiologico della o delle proteine GAP non è del tutto chiaro. Ci sono alcuni dati che indicano che la GAP agisca come un regolatore negativo della p21, inattivando la proteina per induzione a facilitare l'idrolisi del GTP; altri dati sperimentali sembrano invece dimostrare il fenomeno opposto.

Comunque alcune osservazioni documentano la proteina GAP come il principale regolatore negativo della p21. Infatti, la GAP umana attiva la funzione GTPasica della p21 e fa diminuire la funzione stimolatoria sull'adenililciclasi di lievito quando ambedue le proteine sono espresse in *S. cerevisiae*. Ancora nei fibroblasti, la trasfezione del gene GAP annulla l'effetto trasformante indotto dalla proteina *ras*. Altre recenti osservazioni hanno stabilito che la GAP è il principale regolatore della p21 nella forma "GTP-bound" in linfociti T: in questo caso l'attivazione del "T-cell receptor" fa aumentare il numero di molecole "GTP-bound"; l'attivazione della proteinchinasi C determina lo stesso effetto e insieme attenua l'abilità della GAP di spingere verso l'idrolisi del *ras* GTP-bound, mantenendo lo stato attivato.

Per concludere questa dissertazione, possiamo chiaramente definire la proteina GAP come il regolatore negativo della p21ras; di difficile risoluzione è invece la comprensione del meccanismo biochimico che si trova a valle di questo sistema. Tuttavia è da considerare anche che con molta probabilità altre proteine, oltre alla GAP, possano mediare l'idrolisi del GTP e la disattivazione della proteina p21.

Un certo interesse ha destato recentemente l'ipotesi di un possibile meccanismo d'azione del sistema ras, scoperto e analizzato in cellule di lievito. Il gene ras è conservato durante l'evoluzione ed è presente nei lieviti sotto forma di due proteine denominate Ras1 e Ras2. I prodotti dei due geni stimolano l'adenilciclasi e di rimando regolano la sintesi e l'accumulo di cAMP. Esperimenti su varie forme di mutanti Ras1- e Ras2- hanno dimostrato che l'aggiunta di proteine purificate ras ad estratti di membrana stimola la

sintesi di cAMP secondo un criterio di attività GTPasica. Non è tuttavia chiaro se le proteine *ras* stimolino la adenilciclasi direttamente o attraverso intermedi proteici. Alcune evidenze genetiche indicano che il prodotto del gene cdc25 funziona come proteina GNRP capace di stimolare la dissociazione del GDP e di favorire l'attacco di GTP sul sito reattivo del Ras1 o del Ras2. Per tale motivo la presenza del prodotto cdc25 è necessaria per avviare la sintesi di cAMP, ad eccezione di ceppi di lievito dove l'azione di una proteina Ras1 o Ras2 attivata attenua la fase di idrolisi mantenendo una forte concentrazione di specie attive (Bourne et al. 1990).

Le proteine GNRP per tutte le altre GTPasi, comprese quelle ras nei mammiferi, stanno per essere caratterizzate e meglio definite. Un frammento c-terminale di un prodotto denominato scd25, una proteina di lievito strutturalmente simile al cdc25, riesce a catalizzare la reazione di scambio del GDP in proteine ras di tipo animale, il che lascia pensare che prodotti proteici correlati con lo sdc25 siano ubiquitari e siano preposti alla funzione GNRP nel ras. Ancora, è stato osservato che il ras dei lieviti può idrolizzare GTP condizionalmente, cioè in relazione alla attività di una proteina GAP simile come negli organismi superiori. Queste proteine GAP nei lieviti sono codificate da una classe di geni, denominata IRA. Sia da un punto di vista chimico che metabolico le proteine della classe IRA rappresentano gli analoghi delle GAP nel tipo di regolazione per l'idrolisi del ras "GTP-bound".

Nonostante questi studi avanzati e nonostante la certezza che le proteine ras rientrino nei meccanismi di trasduzione del segnale, resta tuttavia oscuro il tipo di effetto metabolico che l'idrolisi del GTP genera ai fini dell'economia funzionale delle cellule. Non è chiaro come faccia ras a modulare la proliferazione o il differenziamento cellulare. Una possibilità è che la GAP sia un enzima il cui prodotto metabolico sia responsabile di un qualche effetto sulla p21. Alcuni recenti studi sembrano evidenziare che la proteina GAP si associa e serve come substrato per la fosforilazione da parte di proteinchinasi. Comunque è difficile capire come la p21 rientri in questo schema o come possa essere coinvolta nell'interazione GAP-chinasi. Potrebbe la stessa fosforilazione GAP influenzare il grado di affinità sulla p21 o addirittura un complesso polimerico fosforilato potrebbe legarsi o avere un effetto su una molecola effettrice più a valle del sistema.

Infine non esiste nessuna chiara dimostrazione del fatto che ligandi per ormoni o chiare vie regolatorie siano gli effettori dello scambio del GTP nelle forme ras GDP-bound. In altre parole, non sono state identificate le proteine GNRP catalizzatrici della dissociazione del ras verso la forma "empty". Tuttavia è stato visto che sia in linfociti che in fibroblasti il GTP radiomarcato si lega alla p21 secondo una cinetica di circa una molecola al minuto. Questa cinetica rapida, più rapida dell'intrinseca velocità della $k_{\rm diss.GDP}$, è stata osservata in cellule non stimolate. Attivatori della proteinchinasi C, quali il TPA, non hanno effetto sulle GNRP che regolano la dissociazione del GDP, ma fanno aumentare il numero di molecole ras GTP-bound, apparentemente facendo diminuire la $k_{\rm cat.GTP}$ e inattivando la GAP. Queste scoperte riflettono l'idea prevalente che le proteine della famiglia ras siano trasduttori di segnali, analoghi alle G proteins (tipo PKC). Pertanto anche negli organismi superiori ras regolerebbe la sintesi di cAMP e attiverebbe mediatori capaci di influenzare la sintesi e la trascrizione di geni importanti nella risposta fisiologica.

Sul ras è fiorita in anni recenti una copiosa letteratura, per cui un orientamento generale è davvero difficile da raggiungere; per quanti volessero approfondire l'argomento si rimanda anche ad un recente articolo di rassegna (Marshall 1988) . Va ancora ricordato come il 20% circa di tutti i tumori umani, delle origini e dei tipi istologici più disparati, contiene oncogèni ras capaci di trasformare le cellule di topo in coltura (Sukumar 1989).

La proteina p21-ras, come abbiamo visto, è l'elemento di accoppiamento tra i recettori per alcuni fattori di crescita ed i meccanismi di produzione dell'inositolo fosfato (Wakelam et al. 1986).

Le sue mutazioni sono presenti in una ampia varietà di neoplasie umane. Di recente è stato affermato che una attivazione del *ras* derivante da mutazioni sarebbe un evento precoce nel processo di carcinogenesi, in particolare per il carcinoma polmonare a piccole cellule (Rodenhuis et al. 1987), e provocherebbe altresì una serie di cambiamenti che mantengono le proteine *ras* in uno stato di costante attivazione, impedendo loro di essere inattivate al tempo debito (Marx 1987a).

Eventi più tardivi nella storia naturale di un tumore, come ad esempio la perdita della ormonodipendenza che si riscontra nei tumori mammari avanzati, sarebbero però fenomeni genetici indipendenti dalle mutazioni di *ras* (Sukumar et al. 1988), le quali sono invece un evento precoce e addirittura pre-neoplastico (Miyamoto et al. 1990). E' stato accertato infatti che, dopo un insulto mutageno con carcinogeni chimici, le mutazioni di*ras* sono presenti nelle ghiandole mammarie di topo almeno tre mesi prima che i tumori mammari divengano palpabili (Sukumar 1989).

Ma l'espressione dell'oncogène *ras* è presente in maniera spiccata anche nelle cellule metastatiche, in cui sembra peraltro essere quantitativamente correlato con il numero delle metastasi che si producono nei modelli sperimentali, con un aumento della produzione di enzimi litici (collagenasi IV) (Liotta 1988; Hill et al. 1988).

L'oncogène ras è inoltre il bersaglio di mutazioni da parte di carcinogeni chimici: taluni studi hanno addirittura messo in evidenza l'esistenza di un quadro di specificità tra natura del carcinogeno chimico e sedi genomiche delle mutazioni (Sukumar e Barbacid 1990).

Oncogèni come elementi nucleari di regolazione della espressione dei geni

Gli oncogèni nucleari sono classificati come proteine a localizzazione e funzione prettamente nucleare. Raggruppano un nutrito numero di elementi, molti dei quali esercitano una funzione ormai nota, come è il caso del fos e del jun; altri, invece, rappresentano ancora un enigma, come il myc, nonostante siano stati isolati parecchi anni fa e nonostante la loro localizzazione e la loro struttura biochimica siano note da tempo.

Cominceremo con il parlare di quegli oncogèni che hanno la cosiddetta capacità immortalizzante su linee cellulari primarie e che possono agire come complemento di un oncogène citoplasmatico per quanto riguarda la capacità trasformante.

Proteina E1A degli Adenovirus

Dopo che un adenovirus infetta le cellule, la prima proteina virale ad essere prodotta è quella che si chiama E1A (early region 1A). Le proteine di questa regione sono state estesamente studiate, perché racchiudono funzioni importanti sia per quanto riguarda la transattivazione di altri geni, virali e cellulari, sia per la capacità immortalizzante su cellule primarie in *vitro*. Infatti è noto che il prodotto E1A attiva la trascrizione di altri geni virali necessari per l'espletamento del ciclo litico, e di altri geni cellulari che sono coinvolti nel processo di infezione virale.

L'E1A induce anche drastici cambiamenti per quanto riguarda il controllo della proliferazione cellulare. E' stato visto che l'introduzione della proteina E1A determina in cellule primarie il passaggio da uno stato quiescente verso uno stato proliferante immortalizzato. Inoltre l'E1A è in grado di indurre la trasformazione neoplastica in cellule primarie di rene di ratto se complementato con l'espressione di un oncogène citoplasmatico, tipo il ras (Ruley 1983). Insieme a queste funzioni, si è stabilita una sorta di influenza dell'E1A sulla sintesi di DNA cellulare nella cellula ospite e di sintesi di una particolare classe di growth factors.

Da un punto di vista strutturale, l'identificazione delle proteine dell'E1A è complicata dalla presenza di numerose forme polipeptidiche non processate. Si è visto che il primo prodotto della trascrizione è frammentato ("spliced") in 5 diversi RNA messaggeri, di vario coefficiente di sedimentazione (13S, 12S, 11S, 10S e 9S). Quattro di questi mRNA codificano per autentiche proteine E1A durante il ciclo litico (Stephens e Harlow 1987). Il prodotto più piccolo da 9S è stato evidenziato in vitro, ma non ancora in vivo; la struttura dello "splicing" delle prime quattro forme è tale che lo stesso fotogramma di lettura ("reading frame") delle triplette di DNA è usato per le diverse proteine, in modo

tale che queste ultime differiscono solo per la mancanza interna di alcuni aminoacidi. Oltre a questa caratteristica, parecchi gruppi di ricerca hanno evidenziato che le proteine dell'E1A subiscono notevoli cambiamenti conformazionali. Presi insieme, tutti questi fenomeni contribuiscono ad assortire sempre di più il già vasto repertorio dei prodotti dello "early viral 1A".

Da un punto di vista funzionale, numerosi studi sono stati fatti sulle azioni transattivante e trasformante della proteina.

Mutazioni e sostituzioni di singoli aminoacidi all'interno del trascritto di 13S annullano completamente l'effetto transattivante (Berck 1986); pare che tutta la funzione sia confinata entro 34 aminoacidi del secondo esone del gene. Tutti comunque ormai concordano sul fatto che transattivazione e trasformazione sono funzioni separate delle proteine E1A; infatti mutazioni che distruggono la parte di induzione alla trascrizione non hanno nessun effetto sulla trasformazione e viceversa.

Un altro approccio per definire meglio la transattivazione è quello di cercare le sequenze "target" per il legame dei prodotti E1A o di complessi sistemi trascrizionali. Numerose sequenze all'estremità 5' di geni virali e cellulari sono state isolate con consensi per l'attacco dell'E1A. Comunque anche se in genere l'attivazione di tali geni target si associa sempre con un forte aumento trascrizionale del gene per l'E1A, non sempre è dimostrata la presenza di complessi trascrizionali comprendenti l'oncoproteina.

Pertanto è possibile che l'espressione del gene determini due diversi meccanismi di azione, uno diretto sulla trascrizione, l'altro mediato da uno o più fattori.

Maggiori informazioni ci vengono invece dagli studi sulla funzione trasformante delle proteine E1A. Queste possono indurre il fenotipo trasformante solo in cooperazione con almeno un oncogène citoplasmatico, tipo il ras. Le zone del gene importanti per la trasformazione vanno dall'aminoacido 1 all'85 e dal 120 al 140. Altre zone sembrano meno importanti, dal momento che possono essere facilmente delete senza cambiare troppo la frequenza di trasformazione.

Una delle caratteristiche più interessanti osservate nel corso di questi studi è che, in quei mutanti in cui risulta distrutta l'abilità di complementazione con il ras, viene fortemente inibita anche la capacità di reprimere la trascrizione di geni suscettibili al controllo negativo da parte dell'E1A. Questa osservazione permette di ipotizzare che le due funzioni siano altamente correlate. Non è tuttavia chiaro se tale correlazione sia meramente circostanziale, oppure se cooperazione e repressione siano indirette conseguenze di una primaria attività biochimica della proteina. Una interessante possibilità potrebbe essere costituita dal fatto che la repressione di certi "enhancers" è l'obiettivo diretto dell'E1A e la trasformazione cellulare sarebbe invece una conseguenza dello spegnimento trascrizionale di certi importanti geni cellulari.

Sembrerebbe, e ciò non dovrebbe peraltro sorprendere, che le regioni dell'E1A richieste per gli eventi di progressione nel ciclo cellulare coincidano con le regioni richieste per la trasformazione. Tali regioni sono denominate regioni conservate 1 e 2. Un po' di confusione esiste invece al riguardo delle zone della proteina che sono importanti per indurre la sintesi di DNA cellulare dell'ospite infettato. Alcuni gruppi di investigatori concordano per la regione 1, altri insistono per la regione 2 dell'E1A.

La dimostrazione che due regioni distinte dell'E1A siano importanti per fenomeni di

trasformazione e repressione permette di formulare due diversi modelli per spiegare la funzione della proteina. Primo, nella struttura nativa della proteina, le regioni possono piegarsi insieme per formare un unico "domain". Questo determinerebbe che le due regioni rispondano ad una unica funzione biochimica. In un secondo modello, le due regioni rappresenterebbero invece due "domain" distinti e indipendenti che, quando sono coespressi nella stessa cellula, generano la trasformazione. Questo secondo modello sembra maggiormente compatibile con le dimostrazioni sperimentali. Infatti Moran e Zerler hanno descritto che mutanti delle regioni 1 o 2 differiscono nella loro abilità di determinare certi eventi del ciclo cellulare. Inoltre le due regioni introdotte per trasfezione da plasmidi di espressione diversi determinano il medesimo effetto di trasformazione, benché non assumano una conformazione originaria (detta "wildtype").

Per concludere, possiamo certamente stabilire che l'E1A, prodotto oncogènico virale dell'adenovirus 1A, contiene un insieme di "domain" distinti, ognuno dei quali rappresenta una certa unità funzionale. Multiple funzioni possono a loro volta essere separate in attività biochimiche distinte e studi sempre più accurati di mappaggio genico e funzionale determineranno una sempre più vasta conoscenza del meccanismo oncogènico.

La famiglia degli oncogèni myc

La famiglia *myc* contiene un certo numero di proto-oncogèni, dispersi nell'ambito del genoma: il gene c-*myc* (localizzato nell'uomo sul cromosoma 8), l'N-*myc* (localizzato sul cromosoma 2 umano) e l'L-*myc* (sul cromosoma umano 1). Il primo membro della famiglia ad essere descritto, il c-*myc*, fu isolato per omologia di sequenza con l'oncogène trasformante v-*myc* del virus della mielocitomatosi aviaria del ceppo MC29 (Sheiness e Bishop 1979).

L'identificazione dell'N-myc e dell'L-myc fu invece facilitata dalla presenza di parti di sequenza altamente omologhe tra di loro, che erano sufficientemente conservate a livello nucleotidico da permettere una certa cross-ibridizzazione. Tutti e tre i geni si sono conservati durante l'evoluzione, il che indica come essi debbano svolgere un ruolo fondamentale nei normali processi cellulari.

Il c-myc è costituito dal punto di vista strutturale da tre esoni sia nell'uomo che nel topo; recenti studi dimostrano che esso possiede una struttura relativamente conservata anche negli organismi inferiori. Il 5' e il 3' del gene consistono di sequenze trascritte, ma non tradotte; l'intero primo esone è non tradotto, ma probabilmente contiene soltanto elementi della regolazione genica. Il controllo dell'espressione del myc è stato studiato in modo molto approfondito ed avviene a vari livelli, trascrizionale, post-trascrizionale e traslazionale. La trascrizione inizia da due promotori, siti all'inizio del gene e distanti tra di loro di poche basi. Il maggiore "open-reading frame" è localizzato all'interno del 2' e del 3' esone (Battey et al. 1983). Si era pensato fino a pochissimo tempo fa che l'esone 1 non contribuisse a dare informazioni traslazionali per la proteina; invece le due forme

del prodotto *myc* risultano dall'inizio del 2' esone (64 kD), e dalla fine del 1 esone (67 kD) che genera una proteina leggermente più grande, ma presente in una piccola percentuale rispetto al totale (20%). La funzione delle due forme di proteina rimane ancora un mistero; è possibile tuttavia che la specie più grande abbia significato puramente regolatorio. Il prodotto del gene *myc* è da un punto di vista strutturale una proteina fosforilata a localizzazione nucleare. Recenti esperimenti hanno definito il *myc* associato alle particelle snRNP, costituite da piccoli ammassi di RNA a basso peso molecolare, importanti per quanto riguarda la regolazione dello "splicing" degli RNA messaggeri. Altre considerazioni, puramente biochimiche, fanno ritenere che la proteina abbia valenza di fattore trascrizionale o quanto meno possa interagire con altri fattori con capacità di legame su elementi regolatori di geni bersaglio. Infatti parte della sequenza c-terminale è costituita da un profilo a "leucine-zipper", in cui varie leucine sono separate da un numero costante di aminoacidi che realizzano una tipica configurazione ad anelli. Tale struttura sembrerebbe comune a tutti quei prodotti che interagiscono con altri fattori per determinare l'induzione trascrizionale su altri geni.

Da un punto di vista funzionale, si pensa che la proteina c- myc abbia un ruolo nel differenziamento e nella proliferazione. L'osservazione che myc sia espresso a bassissimi livelli in sistemi cellulari quiescenti e rapidamente cresca dopo stimolazione con fattori del siero o con PDGF lascia pensare che la sua espressione sia necessaria per mantenere la competenza cellulare durante le varie fasi del ciclo cellulare. In topi transgenici costruiti con un plasmide myc specificamente deregolato per il compartimento tissutale linfoide, si verifica un aumento di precursori immaturi rispetto a cellule che entrano nel compartimento differenziativo e questo in virtù della deregolata espressione del gene che spinge verso una aumentata proliferazione. Comunque la funzione biologica vera dell'oncogène non è del tutto chiara. Il ruolo nel differenziamento è suggerito da una significativa diminuzione dell'espressione del gene in colture cellulari indotte a differenziarsi mediante composti chimici, quali il DMSO o l'acido retinoico. Soprattutto in una linea cellulare promielocitica, la HL60, l'oncogène attenua la sua espressione dopo stimolo con DMSO e precede di poco la spinta irreversibile verso il differenziamento macrofagico.

Il myc mantiene anche un certo ruolo nella regolazione dell'espressione di altri geni. In aggiunta, i livelli di espressione di myc endogeno possono essere autoregolati dallo stesso prodotto myc, agendo attraverso una sorta di feed-back negativo sul suo stesso promotore. Questa "down-regulation" è associata a certi cambiamenti della struttura cromatinica; resta da stabilire però se il fenomeno sia diretto o secondario ad altri eventi.

Un ruolo importantissimo dell'oncogène *myc* nei processi oncògeni è suggerito dal fatto che il gene può essere attivato in varie classi di tumore per inserzione di altri promotori, per trasduzione virale e/o per amplificazione genica. Inoltre la deregolazione tessuto-specifica dell'espressione dell'oncogène porta alla comparsa di tumori in tessuti bersaglio, come si è visto in alcuni studi su topi transgenici. Ancora, l'effetto del *myc* in-vitro genera solitamente un fenotipo immortalizzante su sistemi cellulari primari, ma può essere complementato da un altro oncogène citoplasmatico per l'induzione del fenotipo trasformante.

Di particolare interesse patologico è la frequente attivazione del *myc* per traslocazione cromosomiale del frammento del cromosoma 8 che contiene il gene verso gli elementi

"enhancer" dei geni delle immunoglobuline nel cromosoma 14. Alcuni linfomi si associano alla traslocazione di un oncogène c-myc del tutto normale, che può tuttavia terminare sotto il controllo di regioni regolatrici iperattive, come possono essere quelle delle immunoglobuline in una cellula linfoide (Adams et al. 1985). Con questo meccanismo si spiega la patogenesi soprattutto di linfomi tipo Burkitt, in cui è coinvolto anche il virus di Epstein-Barr che favorirebbe questo tipo di riarrangiamenti genici. L'attivazione di myc appare tuttavia, in molti tumori, una condizione necessaria alla loro insorgenza ma non sufficiente: esistono numerosi esempi di tumori in cui alla alterazione di myc si associano alterazioni a carico di altri oncogèni e soprattutto a carico di Haras (Sinn et al.,1987). Tale ricombinazione (traslocazione 8-14) è un marker citogenetico importante in alcune forme di linfomi umani, tipo Burkitt (vedi Figura 12) (Battey et al. 1983).

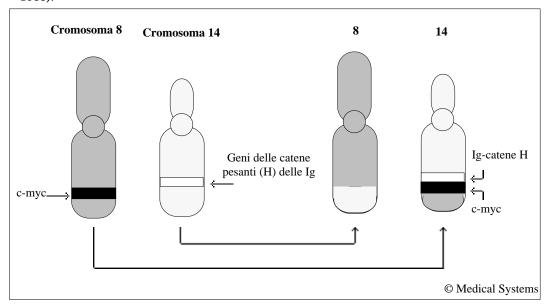


Figura 12. Traslocazione 8-14 nel linfoma tipo Burkitt. Il gene cellulare c-myc, dopo la traslocazione, viene a trovarsi sotto l'influsso del promotore del gene per le catene pesanti (H) delle immunoglobuline e risulta iperespresso nelle cellule neoplastiche.

Lo stesso fenomeno, con coinvolgimento degli stessi geni, ma con strutture cromosomiche diverse, avviene nel plasmocitoma murino, dove il *myc* trasloca dal cromosoma 12 verso il 15. Si pensa che la rottura dell'oncogène e la sua deregolazione per attivazione trascrizionale da parte degli "enhancer" delle immunoglobuline siano passi importanti per l'induzione del fenomeno neoplastico. Inoltre studi molto dettagliati hanno mostrato che anche altri livelli di regolazione del gene, quali l'allungamento del trascritto *myc*, subiscono gravi alterazioni o vengono aboliti del tutto. Si sono, infatti, dimostrate in molti casi di linfoma di Burkitt mutazioni puntiformi alla fine del primo esone del gene che impediscono la regolazione sull'allungamento del trascritto. Questa peculiare forma di regolazione che non incide a livello dell'iniziazione è particolarmente efficace

nei fenomeni di differenziamento cellulare e si può pensare che sia una condizione importante per mantenere il fisiologico controllo dell'espressione del gene.

Infine, per concludere la descrizione di *myc*, ricordiamo che l'oncogène c-*myc* è coinvolto in varie forme di neoplasie, specie di derivazione ematopoietica, con forme di amplificazione genica che lo portano a duplicare il suo contenuto di DNA da 16 a 32 volte come nel caso della linea HL60, derivata da un paziente con leucemia promielocitica acuta. L'amplificazione del gene si associa ad una forte espressione ed alla presenza di trascritti aberranti di vario peso molecolare. Il trattamento con DMSO in *vitro*, che spinge le cellule verso il differenziamento macrofagico, attenua fortemente l'espressione, ma non modifica il grado di amplificazione genica, dando rilievo al fatto che il processo sia una tappa molto precoce avvenuta prima del completo assestamento dei vari marker di proliferazione neoplastica.

Resta da svolgere tuttavia una notevole mole di lavoro sul chiarimento definitivo del ruolo fisiologico della proteina *myc*, sul suo possibile impiego come fattore trascrizionale e soprattutto sul significato patologico, data l'alta incidenza di alterazioni geniche associate a varie forme di neoplasia animale. Grandi sforzi si stanno facendo in questo senso in diversi laboratori.

Altri oncogèni nucleari: myb, fos e jun

L'oncogène c-myb è l'omologo cellulare del gene trasformante della mieloblastosi aviaria (Baluda e Goetz 1961). E' composto da 10 esoni, e la sua porzione 5' non è stata ancora del tutto decodificata. La trascrizione produce una serie di mRNA che approssimativamente si estendono per 4.0 kb e codificano per una proteina nucleare di 78 kD. Ancora una volta varie dimostrazioni ci spingono a pensare che il proto-oncogène sia importante nei meccanismi di proliferazione e differenziamento. Infatti c'è un chiaro esempio di inserzione retrovirale in vicinanza dell'oncogène myb con sua attivazione in tessuto mieloide murino; tale attivazione provoca la trasformazione neoplastica e la continua espressione del gene. Studi strutturali hanno evidenziato che l'alto potere oncògeno del v-myb possa essere imputato alla delezione di alcune parti alle estremità 5' e 3' che invece si riscontrano sulla struttura dell'omologo cellulare. In conseguenza di ciò è stato osservato che proprio in molte forme di neoplasie ematopoietiche il coinvolgimento del myb con sua elevata espressione coincide con la delezione o la mutazione di pochi aminoacidi alle estremità 5' e 3'. E' possibile quindi che a livello di tali strutture si concentri una sorta di fase regolatoria sull'espressione genica che previene l'impiego incontrollato della proteina myb nella proliferazione e nel coinvolgimento neoplastico.

Un altro oncogène di rilievo e di grande importanza strategica, soprattutto per quanto riguarda l'attivazione trascrizionale, è sicuramente il c-fos, la cui proteina si complessa nella formazione di un eterodimero con il prodotto di un altro oncogène: il c-jun (Sambucetti e Curran 1986). L'oncogène jun è stato isolato da un sarcoma di pollo ed è posseduto da un retrovirus (avian sarcoma virus, ASV 17). La proteina codificata da jun si lega direttamente al DNA in altre sedi e funziona come un fattore di regolazione

(trans-activating factor) (Short 1987). L'interazione tra i due oncogèni ha un grande significato funzionale, perché il dimero fos/jun lega regioni di consenso sul promotore di geni attivabili dal TPA e dagli esteri del forbolo e che risultano importanti nell'innesco della proliferazione cellulare. Pertanto fos e jun rappresentano due fattori trascrizionali transattivanti, indotti ed attivati nei primissimi momenti del ciclo cellulare, nel passaggio G0 - G1; essi interagiscono intimamente, per formare un eterodimero molecolare dotato di azione di controllo della trascrizione del DNA cellulare (fattori trascrizionali) (Sharp 1989, Colotta 1990).

In condizioni quiescenti il fos è trascrizionalmente silente, mentre il jun è espresso in condizioni basali molto basse.

L'oncogène fos viene indotto rapidamente in una ampia varietà di tipi cellulari, in risposta a stimoli differenti: esso dunque sembra profondamente coinvolto nei meccanismi di base della trasduzione del segnale biologico di attivazione proliferativa (Verma e Sassone-Corsi 1987). Esso è intimamente coinvolto anche in precisi fenomeni differenziativi, come risulta da numerosi studi sul differenziamento mielo-monocitario (Colotta 1990).

L'incubazione di cellule con fattori attivanti del siero o con PDGF provoca una fortissima attivazione trascrizionale del fos, la cui proteina si accumula nell'arco di pochissimi minuti. Il jun non è indotto trascrizionalmente, ma la proteina presente in condizioni basali viene modificata e defosforilata in una posizione che permette l'attacco con il prodotto fos. Il dimero si forma pertanto stabilmente e attacca una sequenza consenso presente all'estremità 5' del promotore del jun. Tale effetto "binding" che si verifica 15 minuti dopo l'induzione da siero o PDGF provoca una drammatica crescita esponenziale del prodotto jun, che a sua volta si complessa al fos; i due insieme agiscono sulla trascrizione di quei geni importanti per la competenza della proliferazione.

Questo elegante meccanismo riassume in toto l'importante ruolo fisiologico di fos e jun nelle fasi precoci della proliferazione.

Varie zone di consenso presenti all'estremità 5' del *fos* sono state oggetto di intensi studi. In particolare sono stati identificati fattori indotti dal siero (SRF) che legano direttamente il promotore e attivano la trascrizione. Altre zone di interazione importanti riguardano il fattore DSE e il SIF, la cui sequenza bersaglio legherebbe una proteina transattivante indotta dal PDGF.

Alcuni prodotti di questi oncogèni nucleari hanno anche un controllo post-trascrizionale, come dimostrato da studi sul c-fos, che viene reso trasformante dalla rimozione di sequenze non codificanti del gene (Meijlink et al. 1985), e da studi sul c-myc, la cui espressione può essere inibita a livello post-trascrizionale da proteine regolatrici indotte da ormoni steroidei (Maroder et al. 1990).

Il prodotto dell'oncogène *erb*-A, infine, è stato identificato come recettore per gli ormoni tiroidei (Sharp 1989). In questa sede non è possibile illustrare in dettaglio le funzioni di questa proteina, ma possiamo dire senz'altro che questa ricerca apre notevoli prospettive di studio in campo endocrinologico.

Sforzi notevoli si stanno concentrando dunque nella purificazione di tutti i fattori coinvolti nella trascrizione dei geni precoci della proliferazione; la successiva clonazione genica e la caratterizzazione biochimica permetteranno di fare piena luce su un insieme di meccanismi che legati all'espressione oncogènica regolano fasi delicate della proliferazione e non permettono in condizioni normali la transizione verso aberrazioni trasformanti.

Altri oncogèni di rilievo

Uno degli oncogèni più bizzarri che siano stati scoperti è stato individuato da Barbacid e collaboratori in un carcinoma del colon ed è stato denominato *onc-D*. Esso sembra derivare da una ricombinazione somatica di loci genetici separati e una volta decodificato è risultato contenere una porzione che codifica per un peptide simile ad una tropomiosina (una proteina contrattile del citoscheletro muscolare della cellula) ed una porzione che codifica per un peptide con attività proteino-chinasica (come molti altri oncogèni connessi con le membrane cellulari). La sua funzione e la sua modalità di trasformazione restano alquanto enigmatiche (Bishop 1986).

Un altro oncogène singolare (int-1) è coinvolto nella embriogenesi della *Drosophyla*: è un fattore solubile che determina lo sviluppo ed il differenziamento delle ali dell'insetto (gene "wingless", che codifica per un fattore morfògeno ad azione intercellulare) (Marx 1987b).

Stranamente le proteine di regolazione del ciclo cellulare non avevano sino a tempi recenti lasciato intravedere legami con i prodotti degli oncogèni. Ma nel 1989 si è accertato che una di queste proteine, il "maturation promoting factor" (MPF), possiede una attività proteino-chinasica capace di fosforilare il prodotto del proto-oncogène src; quest'ultimo è dotato anch'esso di attività chinasica e sembra capace di fosforilare a sua volta il MPF: è possibile che i due fattori si impegnino in un gioco di comunicazione e di controllo reciproci, che vede coinvolti anche il proto-oncogène mos e la proteina denominata ciclina (Marx 1989a). La ciclina regolerebbe l'induzione del MPF e quindi della mitosi, con la sua concentrazione che oscilla da bassi livelli all'inizio del ciclo cellulare ad alti livelli prima della mitosi; gli alti livelli di ciclina inducono l'attivazione fosforilativa del MPF che a sua volta sarebbe il fattore determinante per lo svolgimento della mitosi stessa; dopo una mitosi, la ciclina viene degradata ed un nuovo ciclo cellulare può avere inizio (Marx 1989b).

Gli antioncogèni o geni oncosoppressori

Abbiamo già accennato nel capitolo 1 al fatto che esistono alcuni geni cellulari i cui prodotti proteici servono a mantenere le cellule in una condizione di non proliferazione.

Anche se gli oncogèni sono geni dominanti (l'inserimento di un oncogène attivato in una cellula normale è in grado di trasformare quest'ultima in cellula tumorale, pur in presenza dell'allele normale del proto-oncogène cellulare corrispondente), si è osservato successivamente che la fusione tra una cellula tumorale ed una cellula normale oppure la fusione tra due diversi tipi di cellule tumorali produceva una soppressione del fenotipo neoplastico: questo fenomeno autorizza a ritenere che esistano tratti genetici tumorali che sono reversibili ad opera di componenti cellulari complementari (Hansen e Cavenee, 1988; Della Porta et al. 1989).

Le proteine degli anti-oncogèni sarebbero dunque capaci di ristabilire il controllo normale della crescita cellulare anche in presenza di oncogèni attivati (Weinberg 1989; Della Porta et al. 1989). E' un po' come se gli oncogèni fossero l'acceleratore della macchina che realizza la moltiplicazione cellulare e gli antioncogèni ne fossero il freno.

Per spiegare il comportamento epidemiologico e clinico di alcuni tumori infantili è stata avanzata l'ipotesi che essi si realizzino per una doppia mutazione che interessi entrambi gli alleli di una medesima regione cromosomica che viene ritrovata alterata su entrambi i cromosomi omologhi delle cellule che compongono questi tumori. Si tratta dunque di tratti genetici recessivi, in cui il fenotipo tumorale insorge soltanto nel caso in cui entrambi gli alleli del gene oncosoppressore vengano inattivati. Si tratta inoltre di una condizione con "perdita di un carattere", mentre l'azione degli oncogèni è praticamente una condizione con "acquisizione" di un carattere o con "eccessiva espressione" di un carattere (Della Porta et al. 1989).

Il primo antioncogène che è stato scoperto è stato il gene RB del retinoblastoma. Già oltre venti anni fa Knudson ipotizzò che il retinoblastoma fosse provocato da due mutazioni consecutive, perché osservò che le forme bilaterali del tumore (spesso ereditarie) si riscontravano in età più giovanili rispetto alle forme unilaterali (non ereditarie). L'ipotesi era che nelle forme ereditarie una mutazione fosse presente già nello zigote (ereditata da uno dei genitori) e la seconda mutazione intervenisse poco dopo la nascita, mentre nelle forme non ereditarie entrambe le mutazioni dovessero avvenire in sequenza ravvicinata, dopo la nascita, su un genoma originalmente integro (Hansen e Cavenee, 1988). Alcuni anni più tardi si trovò che nelle cellule del retinoblastoma esisteva una minuta delezione costituzionale su entrambe le copie del cromosoma 13. Tale alterazione si osserva con difficoltà se si esegue un cariotipo, perché è molto piccola, ma si può rilevare invece facilmente con le moderne tecniche di biologia molecolare.

Nel caso del retinoblastoma si assiste dunque alla perdita di entrambe le copie di un gene situato sul braccio lungo del cromosoma 13 e capace presumibilmente di sopprimere la trasformazione neoplastica: il gene è stato quindi chiamato RB, da retinoblastoma.

La proteina codificata dal gene RB è una proteina fosforilata di 105-110kd che si ritrova nel nucleo delle cellule e che può avere un ruolo di regolazione sulla espressione dei geni (Weinberg 1989).

La clonazione del gene RB, avvenuta in tempi recenti, ha permesso di confermare che il gene è assente nelle cellule tumorali di retinoblastoma (entrambi gli alleli sono perduti o alterati) e che in uno dei genitori dei bambini colpiti esiste una perdita di uno degli alleli (od una mutazione puntiforme) compensata dalla presenza del secondo allele normale (Della Porta et al. 1989). La metodica di diagnosi, in questi casi, è la allelotipizzazione, che è capace di rintracciare il gene in esame con tecniche di biologia molecolare su entrambi i cromosomi omologhi nei componenti della famiglia: padre, madre, figlio ammalato ed eventuali altri figli sani. Nella figura 13 sono rappresentate le modalità di trasmissione del gene RB e le sue alterazioni (Friend et al. 1988).

Il gene RB sarebbe coinvolto anche nella genesi di altre forme tumorali, come gli osteosarcomi, i carcinomi polmonari, i carcinomi mammari ed i carcinomi prostatici (Bookstein et al. 1990).

Anche altri geni si comportano come il gene RB. La proteina P-53, per esempio, rappresenta un altro tipico gene oncosoppressore, che riproduce il modello del retinoblastoma, associando una delezione con una mutazione nell'allele residuo. E' un gene localizzato sul braccio corto del cromosoma 17, che si ritrova spesso mancante nei carcinomi del colon. Il gene P53 sarebbe però coinvolto anche nei tumori cerebrali, mammari e polmonari, nei quali si riscontrano delezioni analoghe (Nigro et al. 1989). Nel caso del gene della proteina P-53 la sequenza ipotizzata degli eventi prevede l'insorgenza di una mutazione su uno degli alleli durante le prime fasi della carcinogenesi e l'insorgenza di una delezione del secondo allele nelle fasi più avanzate, che sono caratterizzate dalle modificazioni citogenetiche più grossolane (delezioni) (Nigro et al. 1989). Il gene P-53 avrebbe però un comportamento lievemente diverso dal gene RB, perché il suo prodotto è un omodimero: ciascuno dei due monomeri proteici identici è sintetizzato da una copia del gene. In alcuni casi anche la mutazione di un solo allele può provocare la perdita della funzione, perché il prodotto proteico risultante non sarebbe in grado di formare l'omodimero attivo (Pierotti 1991).

Esistono inoltre numerose delezioni genetiche riscontrabili nelle neoplasie sporadiche. Alcune di queste sono attualmente allo studio, ma hanno già portato o porteranno presto alla scoperta di nuovi geni onco-soppressori, come nel caso dell'osteosarcoma (cromosoma 13), del tumore di Wilms o nefroblastoma (cromosoma 11), del rabdomiosarcoma (cromosoma 11) ed anche del carcinoma polmonare (cromosoma 3) e del carcinoma del colon (cromosoma 18) (Pierotti 1991).

A questo punto sorge anche il dubbio (e le prime dimostrazioni ne stanno confermando la legittimità) che alterazioni compresenti su oncogèni e su geni onco-soppressori possano collaborare nella patogenesi dei tumori. In particolare sembra che il prodotto del gene RB possa formare complessi stabili (attivi come fattori di trascrizione) della proteina E1A degli adenovirus e di altri prodotti dei virus a DNA (Large T del Polyoma virus, Papillomavirus, ecc.) (Werness et al. 1990). Le scoperte si susseguono e presto verranno ulteriori importanti risultati.

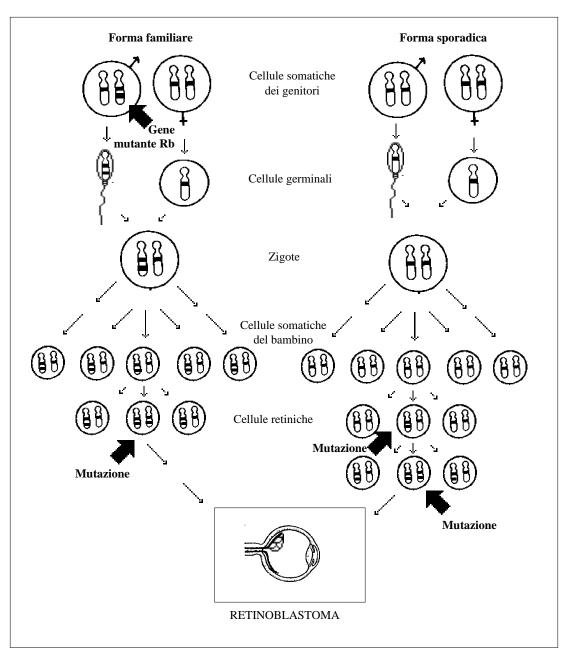


Figura 13. Ereditarietà dei geni oncosoppressori: un esempio paradigmatico è rappresentato dal gene Rb isolato dal retinoblastoma umano. La forma familiare del retinoblastoma prevede una mutazione ereditata ed una mutazione somatica avvenuta nell'individuo ammalato; la forma sporadica prevede invece due mutazioni somatiche avvenute in rapida sequenza nell'individuo ammalato, prima del compimento del dodicesimo anno d'età.

Conclusioni e note di prevenzione

Il cancro dunque consiste in una alterazione anche complessa della struttura e/o della espressione dei geni. Il danno genetico può inoltre essere dominante o recessivo (Bishop 1987).

Le alterazioni genetiche del cancro sono ancora in larga parte da scoprire (Bishop 1987) e sono il risultato di un insulto ripetuto sul DNA ad opera di una grande quantità di fattori che conosciamo solo in parte e che sono capaci di provocare danni sugli acidi nucleici (Slamon 1987; Rodenhuis et al. 1987).

Questi fattori, come sappiamo dalla oncologia generale, sono cancerogeni chimici, agenti fisici e virus tumorali. L'insulto alla integrità del DNA è continuo: viviamo in un mondo di agenti mutageni, dai raggi del sole alle radiazioni del suolo, dagli idrocarburi prodotti nelle combustioni (motori, bruciatori ecc.) fino ai numerosi prodotti dell'industria chimica che sono risultati mutageni.

Fortunatamente per noi, però, esistono anche i meccanismi di riparazione del DNA: una nutrita batteria di enzimi che, sulla base del filamento complementare sano, possono ricostruire la giusta sequenza del filamento di DNA che abbia subito le mutazioni.

Il funzionamento normale della macchina può tuttavia riparare e tollerare le mutazioni soltanto fino ad un certo punto; esiste infatti un limite all'efficienza dei meccanismi di riparazione. Se si supera tale limite, alcune mutazioni non potranno più essere riparate e, quando la cellula attiverà i geni che le possiedono, le mutazioni potranno portare alla produzione di proteine alterate. Se i geni mutati sono dei proto-oncogèni, c'è la possibilità che la cellula subisca la trasformazione neoplastica.

Che il processo di sviluppo di un cancro non sia legato ad un unico insulto genetico, ma ad una serie successiva di insulti, che finiscono poi per perpetuarsi ed amplificarsi spontaneamente in cascata, comincia a risultare chiaro da molte osservazioni scientifiche. Gli oncogèni sembrano in molti casi collaborare nella realizzazione del fenotipo tumorale completo (Weinberg 1989).

Il comportamento dei tumori, nella loro storia naturale, registra un progressivo esaltarsi della malignità e della invasività (progressione tumorale), proprio di pari passo con l'aggravarsi dello sconquasso genetico delle cellule del singolo tumore. Le interazioni tra oncogèni, antioncogèni e processi biologici normali sono sicuramente più numerose di quelle che sono state finora individuate. Ma anche con le nostre limitate conoscenze attuali possiamo spiegare in linea di massima le varie fasi della genesi dei tumori, dalla induzione (mutazioni), alla promozione (stimolazione della crescita) ed alla progressione tumorale (alterazioni genomiche multiple) (Weinberg 1989).

A questo proposito vale la pena di ricordare il fenomenale lavoro del gruppo di studiosi diretto da Bert Vogelstein. Questi ricercatori hanno infatti stabilito che la genesi del cancro del colon è riconducibile ad una numerosa serie di alterazioni genetiche distinte che essi hanno riscontrato progressivamente nelle varie forme neoplastiche, a partire da quelle più benigne e fino a quelle più avanzate e maligne (Bos et al. 1987).

Il primo evento della carcinogenesi nelle neoplasie del colon sarebbe una mutazione a carico dei geni ras (Forrester et al. 1987). Successivamente, ed in sequenza, si manifestano una delezione del cromosoma 5 (piccoli adenomi con scarse displasie), delezioni del cromosoma 18 (adenomi con focolai carcinomatosi) e delezioni del cromosoma 17 (carcinomi avanzati, che tipicamente le presentano) (Vogelstein et al. 1988; Fearon e Vogelstein 1990). Lo schema generale degli eventi che portano alla carcinogenesi nel colon è rappresentato nella figura 14.

La genesi del tumore procede attraverso una serie di fasi che coinvolgono oncogèni (ras) e geni oncosoppressori (sui cromosomi 5, 17 e 18). Le fasi di adenoma precoce, intermedio e tardivo riguardano tumori con caratteristiche crescenti di volume, di displasia e di villosità. Nei pazienti con polipi adenomatosi familiari (PAF) esiste una mutazione ereditata sul cromosoma 5. In quelli senza polipi interviene comunque una mutazione a tale livello, che conferisce un atteggiamento iperproliferativo all'epitelio. La ipometilazione del DNA può portare ad aneuploidia, con perdita di geni soppressori. Le delezioni dei cromosomi 5, 17 e 18 portano alla perdita di specifici geni oncosoppressori, alcuni dei quali sono ancora da identificare.

Un'altra riflessione da fare riguarda le modalità di trasmissione dei geni alterati. Le mutazioni possono insorgere nelle cellule germinali di un individuo (mutazioni predisponenti che verranno ereditate dalla prole dell'individuo stesso) o nelle cellule somatiche (mutazioni silenti o che, se produrranno un tumore non daranno predisposizione nella prole dell'individuo ammalato). Le mutazioni germinali sono rare e di fatti abbastanza rari sono i tumori ereditari come il retinoblastoma. Esse servono però a spiegare l'insorgenza delle forme tumorali ereditarie. Le mutazioni somatiche sono molto più frequenti e ad esse sono dovuti la maggior parte dei tumori clinici, che non presentano invece alcuna caratteristica di ereditarietà (Friend et al. 1988). Qualche fenomeno di concentrazione di casi tumorali in una famiglia, in un gruppo od in una categoria di persone risulta di regola spiegabile con la comune esposizione a fattori causali noti (radiazioni, carcinogeni chimici, abitudini alimentari gravemente errate, ecc.).

Visto che nel cancro le cause sono molteplici e probabilmente agiscono in modo continuato nel tempo, sarà opportuno dunque dirigere una consistente proporzione degli sforzi sanitari e sociali verso la prevenzione delle cause note: tra esse possiamo annoverare innanzi tutto i numerosi agenti mutageni di natura chimica e fisica che sono così diffusi nell'ambiente e così rappresentati nelle attività umane più comuni. Le radici del cancro sono profondamente connesse con le attività umane e con il comportamento individuale.

Il cancro esiste da lungo tempo, forse da sempre, nei sistemi biologici, come espressione di una forma grave, anche se relativamente rara, di rottura della macchina genetica della cellula. Ma in tempi recenti il cancro si è diffuso assai più estesamente in risposta all'aumento degli agenti genotossici della vita della società industriale. Questo problema, peraltro, sarà parte della vita umana per un lungo tempo, perché la possibilità di terapie specifiche su uno sconquasso genetico esteso sono senza dubbio remote (Baltimore 1987).

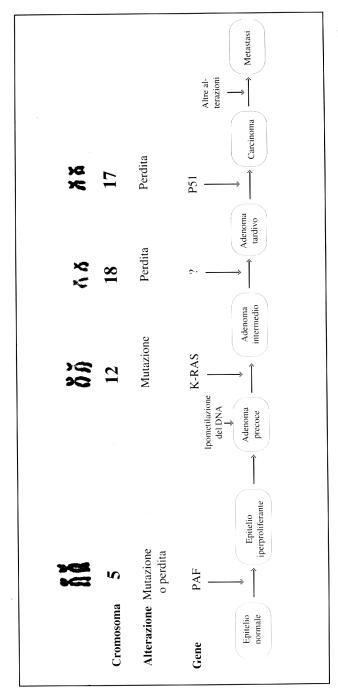


Figura 14. Fasi delle alterazioni genetiche che si instaurano nel corso della storia naturale del carcinoma del colon. (da Fearon e Vogelstein, 1990, ridise-gnata).

Le scoperte riguardanti le alterazioni degli oncogèni potranno portare a miglioramenti diagnostici, anche se il rilievo di un singolo oncogène alterato in un tessuto potrà avere solo un significato di predisposizione, visto che il processo completo richiede alterazioni genetiche multiple (De Wolf 1989).

Una diagnosi precoce e precisa in ciascuna forma tumorale (detta anche prevenzione secondaria delle neoplasie) potrà dunque risiedere soltanto nel riscontro di una combinazione di alterazioni genetiche che andrà innanzi tutto individuata come tipica di quella neoplasia (come nel caso del modello di Vogelstein nel cancro del colon).

Qualche progresso a questo proposito potrebbe tuttavia derivare dagli studi sulle peculiarità delle mutazioni indotte da carcinogeni chimici (Sukumar e Barbacid 1990), dai quali incominciano ad emergere indicazioni di una qualche possibilità di individuare addirittura il tipo di carcinogeno che può aver provocato negli oncogèni alcune mutazioni in modo specifico.

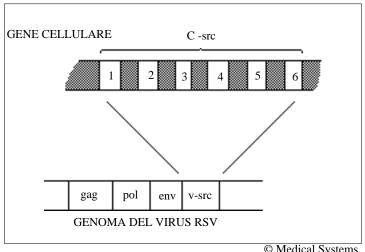
Altri importanti progressi potrebbero scaturire dalle ricerche di biologia molecolare su DNA e RNA antisenso, che costituiscono elementi di controllo estremamente importanti nella regolazione genica e che sono dotati di grande selettività. Gli oligonucleotidi antisenso potrebbero teoricamente consentire la neutralizzazione di una serie di oncogèni attivati in una popolazione di cellule tumorali (Weintraub, 1990).

Ma finché terapie concrete non saranno disponibili in campo umano, di capitale importanza rimarrà tuttavia soprattutto l'attività di prevenzione primaria delle neoplasie. I risultati delle iniziative di prevenzione potranno però produrre risultati soltanto in tempi lunghi, perché ugualmente lunghi sono i tempi della carcinogenesi, dal momento del primo insulto mutageno fino alla diagnosi clinica di una neoplasia (anche 10-20 anni). Questa lunga attesa non deve tuttavia scoraggiare dall'intraprendere iniziative serie e massicce di prevenzione (Baltimore 1987).

La prevenzione è tanto più importante perché esistono dimostrazioni anche del fatto che un singolo insulto mutageno può essere responsabile di più di un tumore, sicché anche se si risolvesse il problema clinico di un primo tumore non è escluso che la stessa causa lesiva non abbia provocato nello stesso individuo danni genetici in altre cellule di altri tessuti che produrranno anch'essi tumori in tempi successivi. E' stato dimostrato infatti che, in topi esposti ad una singola dose di carcinogeno chimico, dopo la rimozione chirurgica dei tumori mammari insorti, si assiste, dopo altri 6-10 mesi, ad un'alta incidenza di tumori renali mentre in animali di controllo ciò non avviene (Sukumar 1989).

Ancora da definire è il vero ruolo dei virus tumorali nell'incidenza delle neoplasie umane. E' proprio vero che gli oncogèni virali sono identici a quelli cellulari? La risposta è no, per almeno due ordini di motivi. In primo luogo i geni cellulari sono spesso presenti nel DNA in forma repressa, non attiva, mentre nel virus gli oncogèni sono derepressi e pronti ad entrare in azione. Il gene cellulare si trova abitualmente suddiviso in porzioni separate (esoni ed introni intercalati: vedi figura 15) e viene organizzato in forma continua solo poco prima della sua espressione.

Nel virus invece l'oncogène è pronto a funzionare. In secondo luogo, abbiamo la dimostrazione che spesso gli oncogèni coinvolti nella maggior parte dei tumori studiati presentano alcune alterazioni, anche minime, rispetto ai corrispondenti oncogèni delle



© Medical Systems

Figura 15. I geni cellulari sono spesso in forma inattiva, con l'intercalarsi di regioni codificanti (o esoni, qui in bianco) e di regioni non codificanti (o introni, qui tratteggiati). Nel genoma virale invece i geni sono continui e pronti per essere espressi. Nel genoma del virus RSV il gene gag codifica per la proteina del capside virale, il gene pol codifica per l'enzima trascrittasi inversa ed il gene env codifica per le spine glicoproteiche dell'ivolucro virale.

cellule normali. Si tratta di geni che hanno subìto modifiche che ne alterano il funzionamento: diventano di regola più insensibili ai segnali di controllo repressivo cui i geni normali obbediscono invece prontamente. Si è allora provveduto a designare gli oncogèni cellulari "normali" col nome di "proto-oncogèni" (o geni c-onc) e gli oncogèni alterati (virali o meno) col termine di oncogèni veri e propri (o di v-onc, nel caso di quelli virali). Nei tumori inoltre si trovano di regola, come abbiamo ampiamente visto, numerose e varie alterazioni genetiche: da mutazioni puntiformi (una sola base nucleotidica alterata in un gene) fino ad alterazioni estese, come la perdita parziale (delezione) o totale di un cromosoma (aneuploidia) o lo spostamento di un lungo tratto di DNA da un cromosoma all'altro (traslocazione).

L'attivazione incontrollata dei proto-oncogèni ed il conseguente sviluppo di un cancro sono nel complesso un evento raro. Se pensiamo a quante infinite volte una cellula si moltiplica nella vita di un individuo, attivando ordinatamente le sue funzioni e poi reprimendole opportunamente, e se pensiamo che ciò avviene in milioni di individui ed in migliaia e migliaia di specie biologiche, il riscontro di alcune centinaia di migliaia di casi di cancro non può che essere definito un evento raro. La macchina biologica dunque funziona egregiamente, anche se è passibile di errori o di malfunzionamenti, che derivano soprattutto dai danni riportati dal suo codice genetico. Il processo canceroso in effetti è la conseguenza di mutazioni somatiche che si verificano in specifici organi bersaglio e che trasformano in loco i proto-oncogèni in oncogèni alterati (per lo più dominanti) che incominciano ad esprimersi in modo incontrollato.

Le alterazioni degli acidi nucleici che costituiscono i geni si possono verificare in molti modi:

- -1- per l'azione di sostanze chimiche capaci di provocare mutazioni (agenti chimici mutageni),
 - -2- per l'azione di agenti fisici (radiazioni) anch'essi capaci di indurre mutazioni e
 - -3- per l'inserimento nel genoma di un virus tumorale.

La terza evenienza risulta nel complesso la più rara, in termini di frequenza, anche se è proprio attraverso lo studio dei virus che si è giunti alla scoperta degli oncogèni. Di gran lunga più importanti, in termini numerici, sono i tumori provocati da sostanze chimiche e da radiazioni, come ci dimostrano estesi studi epidemiologici (Doll e Peto 1981).

Le cellule funzionano seguendo un programma di istruzioni scritto in codice nelle molecole di DNA. Il programma è complesso, articolato, e contiene tutte le alternative possibili per fronteggiare le situazioni in cui la cellula potrà venirsi a trovare. E' un programma perfezionato ed ottimizzato attraverso milioni di anni di evoluzione biologica e di selezione che hanno eliminato le varianti svantaggiose e che hanno mantenuto ed esaltato le varianti vantaggiose, sempre in rapporto alle condizioni ambientali. Possiamo paragonare questo programma a quello di un grande computer che gestisce in modo automatizzato una grande macchina composta da molte parti, come può essere una intera fabbrica con varie catene di montaggio. Il programma prevede tutte le situazioni possibili e controlla le varie funzioni in rapporto alle condizioni delle varie componenti della struttura, come risorse, rifornimenti, materie prime, ordini, spedizioni, ecc. Se il programma si altera (per l'inserimento di istruzioni di disturbo - come quelle di un virus informatico -, o per errori di lettura o di trasmissione dei messaggi essenziali -che sarebbero gli oncogèni di questo sistema elettronico-) potranno determinarsi malfunzionamenti a catena, eccessiva velocità di alcuni processi, modifiche di altre istruzioni ed infine la paralisi dell'intero sistema (fallimento della fabbrica o morte della cellula). Numerosi dati ci dicono inoltre che ogni singolo caso di tumore, nella sua storia naturale, va incontro ad una progressiva accentuazione sia della sua invasività che delle sue alterazioni geniche. Un errore genetico iniziale può ripercuotersi su altri geni, determinando ulteriori errori di funzionamento e portando alla progressiva perdita delle regolazioni della crescita cellulare ed alla acquisizione di proprietà di sempre maggiore malignità (progressione tumorale) (Bishop 1987).

Il concetto del ripetersi nel tempo degli insulti mutageni viene confermato anche da quanto è stato dimostrato a proposito del retinoblastoma (vedi pag. 48) e del carcinoma del colon (Vogelstein et al. 1988). Tutto ciò porta a concludere che sono necessarie numerose lesioni genetiche per arrivare alla formazione di una neoplasia. Per il retinoblastoma sarebbero sufficienti due sole lesioni (una ereditata da un genitore e l'altra acquisita entro il dodicesimo anno d'età del bambino colpito) per avere la neoplasia; dopo il dodicesimo anno d'età il soggetto sarà solo un portatore del tratto genetico, nelle sue cellule germinali, perché i suoi retinoblasti si sono tutti differenziati in modo terminale in coni della retina. Così il tumore non potrà più svilupparsi, anche se sopraggiungessero altre mutazioni in quelle stesse cellule (Pierotti 1991). Nel carcinoma del colon occorrono invece molte lesioni (Vogelstein et al. 1988): è un organo in cui la proliferazione cellulare è continua per tutta la vita e che è esposto ad un quotidiano

insulto da parte di agenti mutageni presenti nella dieta. Non a caso il cancro del colon si sviluppa più spesso in soggetti adulti ed anziani (con un massimo di frequenza nella settima decade di vita), nei quali le necessarie mutazioni hanno maggiore probabilità di essersi accumulate nel tempo, per azione dei carcinogeni chimici e fisici e con il possibile contributo di qualche infezione sostenuta da virus (tumorali e non tumorali) (Sinn et al. 1987).

Ma allora, per arrivare alla soluzione del problema cancro, che cosa si può fare? Aspettare di trovare una terapia specifica? O c'è qualcosa che si può fare subito?

La ricerca biomedica prosegue il suo cammino, sempre più approfondita e con armi sempre più raffinate. Presto si disporrà di fattori di regolazione artificiali che possono influenzare l'espressione dei geni. Già oggi si dispone di geni duplicati in vitro, che possono guarire alcune malattie genetiche, anche se resta il grosso problema di far arrivare le copie dei geni normali in tutte le cellule dell'individuo adulto che ne avrebbero bisogno.

Per realizzare questo nel campo dei tumori ci vorranno ancora molti anni e forse, dato il numero e la complessità delle alterazioni genetiche delle cellule tumorali, saranno solo alcuni i tumori che sarà possibile curare in questo modo.

Se i virus tumorali non sono alla base di una grande percentuale dei tumori umani, come abbiamo visto, risulta evidente che la ricerca di terapie preventive come quella dei "vaccini" anti-cancro sarà di scarso o nullo rilievo nella ampia varietà del problema.

E' invece alla rimozione delle cause note del cancro dalla nostra vita quotidiana che ci dobbiamo rivolgere, tanto più che le statistiche unanimemente ci dicono che sono soprattutto alcune cause ben identificate a provocare (o quanto meno a contribuire come concause) per la maggiore percentuale di tutti i tumori.

Per giunta è possibile che anche altre importanti malattie derivino da alterazioni genetiche simili a quelle che sono state riconosciute nel cancro. Una ipotesi attraente indica per esempio che gli oncogèni potrebbero essere coinvolti anche nella formazione delle placche ateromasiche delle arterie. Anche l'arteriosclerosi dunque potrebbe derivare da cause che alterano la funzione dei proto-oncogèni (Scott 1987) o di altri geni ancora non identificati.

Evitare il cancro è possibile

Alla luce di quanto esposto, possiamo affermare paradossalmente, ma con grande fondamento scientifico ed in tutta tranquillità, che evitare il cancro è non solo possibile ma anche relativamente facile. Le associazioni epidemiologiche dei fenomeni ci dicono che molte neoplasie si manifestano nelle persone esposte in modo cronico ad una serie di cause ambientali o professionali precise (Figura 16).

| FATTORE | SEDE DEL TUMORE | LAVORATORI DI: |
|----------------------------|------------------------------|--|
| Amine aromatiche | Vescica | Coloranti, vernici, gomma |
| Arsenico | Polmone, cute | Pesticidi, miniere |
| Asbesto | Polmone, pleura | Miniere, isolanti e tessuti a base di amianto |
| Benzene | Midollo emopoietico | Colle e vernici |
| Cadmio | Prostata | Minerali di cadmio |
| Cloruro di vinile | Fegato, seni paranasali | Industrie chimiche, mobilifici, pellami |
| Cromo | Polmone | Cromati, pigmenti al cromo |
| Idrocarburi policiclici | Cute, scroto, polmone | Prodotti del catrame e del petrolio |
| Nichel | Seni nasali, polmone | Prodotti di nichel |
| Radiazioni ionizzanti | Polmone, ossa, midollo, cute | Miniere d'uranio, vernici fosforescenti, radiologia, radiografia |

Figura 16. Associazione tra fattori professionali ed ambientali e cancro.

Gli studi biologici e molecolari ci dicono che le alterazioni alla base del cancro derivano da lesioni anche minime (mutazioni puntiformi) del DNA degli oncogèni. Sappiamo inoltre senza ombra di dubbio che le cause note del cancro (e soprattutto le radiazioni ed i carcinogeni chimici) sono tutte capaci di provocare alterazioni dei geni (Bologna 1988). Da questi studi si è arrivati ad una stima della mortalità per cancro attribuibile alle varie cause (Figura 17).

| PERCENTUALE DELLA MORTALITA' PER CANCRO | | | | | |
|---|------------|----------------------------|--|--|--|
| CAUSE MIG | LIOR STIMA | AMBITO DI DIVERSE STIME | | | |
| Tabacco | 30 | 25 - 40 | | | |
| Alcool | 3 | 2.0 - 4.0 | | | |
| Alimentazione | 35 | 10 - 70 | | | |
| Additivi alimentari | <1 | -5.0 - 2.0 | | | |
| Attività sessuale | 7 | 1.0 - 13 | | | |
| Attività lavorativa | 4 | 2.0 - 8.0 | | | |
| Inquinamento ambie | entale 2 | 1.0 - 5.0 | | | |
| Prodotti industriali | <1 | <1.0 - 2.0 | | | |
| Medicine e pratiche | mediche 1 | 0.5 - 3.0 | | | |
| Fattori geofisici | 3 | 2.0 - 4.0 | | | |
| Infezioni | 10 ? | 1.0 - ? | | | |
| Altre cause sconosc | iute ? | ? | | | |

Figura 17. Percentuale della mortalità per cancro attribuibile alle varie cause note (da Doll e Peto, 1980, modificata).

Ma allora, perché non rimuovere subito queste cause note dall'ambiente che ci circonda? Perché tanti sforzi si rivolgono verso problemi meno importanti? Perché i medici fumano al cospetto dei loro pazienti? Perché invece gli stessi medici non dicono, con chiarezza e con la dovuta insistenza, a tutti i loro pazienti che il fumo provoca il cancro del polmone (ed anche di altri organi) in una grande percentuale di individui? Perché -seguendo le mode estetiche- andiamo ricercando la "tintarella" in tutti i periodi dell'anno, anche ai tropici, se è dimostrato che i raggi ultravioletti elevano notevolmente il pericolo del cancro cutaneo? (Glass e Hoover 1989). Perché l'alimentazione ricca di grassi e di proteine e povera di vegetali non viene energicamente combattuta, visto che si associa ad una infinità di patologie cardiovascolari, endocrine e tumorali? Perché l'industria riesce ad immettere sul mercato prodotti sintetici non adeguatamente sperimentati per la loro sicurezza sui sistemi biologici?

Ma senza voler esagerare, pur essendoci materia per molti altri quesiti analoghi, basterebbe adottare alcune semplici misure per ridurre drasticamente l'incidenza dei



Milano.

Bibliografia

- Adams J.M., Harris A.W., Pinkert C.A., Corcoran L.M., Alexander W.S., Cory S., Palmiter R.D., Brinster R.L.: The c—11, 1985 (ONCG8605).
- Adams J.M., Harris A.W., Pinkert C.A., Corcoran L.M., Alexander W.S., Cory S., Palmiter R.D., Brinster R.L.: The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. Nature, 318, 533-38, 1985 (ONCG 8606).
- Alt F.W., Kellems J.R., Bertino J.R. and Schimke, R.I.: Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate- resistant variants of cultured murine cells. J. Biol. Chem. 253: 1357, 1978.
- Antoniades H.N., Scher C.D. and Stiles C.D.: Purification of human platelet-derived growth factor. Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 1809-13, 1979.
- Baltimore D.: The impact of the discovery of oncogenes on cancer mortality will come slowly. Cancer 60, 1985-6, 1987 (ONCG 8727).
- Baluda M.A. and Goetz I.E.: Morphological conversion of cell cultures by avian myeloblastosis virus. Virology 15:185, 1961.
- Battey J., Moulding R., Taub R., Murphy W., Stewart T., Potter H., Lenoir G. and Leder P.: The human c-*myc* oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt Lymphoma. Cell 34:779, 1983.
 - Berck A.J.: Adenovirus promoters and transactivation. Annu. Rev. Genet. 20:45, 1986.
- Bernards R., Dessain S.K. and Weinberg R.A.: N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. Cell 47:667, 1986.
 - Bishop J.M.: I geni che provocano il cancro. Le Scienze, n.165, maggio 1982, 69-81 (ONCG 8404).
 - Bishop J.M.: The molecular genetics of cancer. Science 235, 305-11, 1987 (ONCG 8912).
 - Bishop J.M.: Tricks with tyrosine kinases. Nature 319, 722-23, 1986 (ONCG 8806).
 - Bishop J.M.: Viral oncogenes. Cell, 42, 23-38,1985 (ONCG 8505).
- Bologna M., Festuccia C., Muzi P., Biordi L., Ciomei M.: Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. Cancer, 1989, 63, 1714-20.
 - Bologna M.: Il cancro si può evitare. Verduci Editore, Roma, 1988.
- Bookstein R., Shew J.Y., Chen P.L., Scully P., Lee W.H.: Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. Science 247, 712-15, 1990 (ONCG 9008).
 - Borrello M.G., Pierotti M.A., Borganzone I., Donghi R., Mondellini P., Della Porta G.: DNA methylation

affecting the transforming activity of the human HA-ras oncogene. Canc. Res. 47, 75-79, 1987 (ONCG 8702).

Bos J.L., Fearon E.R., Hamilton S.R., Verlaan-de Vries M., van Boom J.H., van der Eb A.J., Vogelstein B.: Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327, 293-97, 1987 (ONCG 8719).

Bourne H.R., Sanders D.A. and McCormick F.: The GTPase superfamily - a conserved switch for diverse cell functions. Nature 348, 125- 132, 1990.

Cartwright C.A., Simantov R., Cowan W.M., Hunter T., Eckart W.: pp60 c-src expression in the developing brain. PNAS 85, 3348-52, 1988 (ONCG 8811).

Cole M.D.: Regulation and Activation of c-myc. Nature, 318, 510-11, 1985 (ONCG8605).

Colotta F.: Proto-oncogèni e differenziamento mielo-monocitario. Aggiornamento del Medico, 14, 644-49, 1990 (ONCG 9031).

Coppola J.A. and Cole M.D.: Constitutive c-myc oncogene expression in MEL cell differentiation but not commitment. Nature 320:760, 1986.

Curran T., Miller A.D., Zokas L. and Verma I.: Viral and cellular *fos* proteins - a comparative analysis. Cell 36:259, 1984.

Curran T., Van Bevern C., Ling N. and Verma I.: Viral and cellular *fos* proteins are complexed with a 39,000 dalton cellular protein. Mol. Cell. Biol. 5:167, 1985.

Cuttitta F., Carney D.N., et al.: Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. Nature, 1985, 316, 823-26 (CLCL 8635).

Dalla Favera R., Gallo R.C., Giallongo A. and Croce C.M.: Chromosomal localization of the human homolog (*c-sis*) of the simian sarcoma virus *onc* gene. Science 218, 686-88, 1982.

De Wolf W.C.: This month in investigative urology - clinical implications of oncogenes. J. Urol. 142, 144-45, 1989 (ONCG 8924).

Della Porta G., Radice P. and Pierotti M.A.: Onco-suppressor genes in human cancer. Tumori 75, 329-36, 1989 (ONCG 8908).

Denel T.F., Huang J.S., Proffitt R.T., Baenziger J.V., Chang D. and Kennedy B.B.: Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. J. Biol. Chem. 256, 8896-99, 1981.

Doll R. and Peto R.: The causes of cancer. Oxford University Press, 1981.

Duesberg P.H.: Cancer genes - rare recombinants instead ofactivated oncogenes (A review). PNAS 84, 2117-24, 1987 (ONCG 8706).

Dulbecco R.: The role of retroviruses in nature. In "Retroviruses and human pathology", R.C. Gallo ed. et al. Humana Press, 1984 (RTVS 8401).

- Durst M., Croce C.M., Gissmann L., Schwarz E., Huebner K.: Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. PNAS 84, 1070-74, 1987 (ONCG 8704).
- Fearon E.R. and Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61, 759-67, 1990 (TUGN 9018).
 - Florey L.: Patologia Generale, IIa Ed. It. a cura di Dino Merlini, Piccin Editore, Padova, 1977, pag. 641.
- Forrester K., Almoguera C., Han K., Grizzle W.E., Perucho M.: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature 327, 298-303, 1987 (ONCG 8720).
- Friend S.H., Dryja T.P. and Weinberg R.A.: Oncogenes and tumor- suppressing genes. New England J. Med. 318, 618-22, 1988 (ONCG 8909).
- Gilman M.Z., Wilson R.N. and Weinberg R.A.: Multiple protein binding sites in the 5'-flanking region regulate *c-fos* expression. Mol. Cell. Biol. 6:4305, 1986.
- Glass A.G., Hoover R.N.: The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. JAMA, 1989, 262, 2097-2100 (JAIT 8949).
- Hann S.R. and Eisenman R.N.: Proteins encoded the human c-myc oncogene differential expression in neoplastic cells. Mol. Cell. Biol. 4:2486, 1984.
- Hansen M.F. and Cavenee W.K.: Tumor suppressors recessive mutations that lead to cancer. Cell, 53, 172-73, 1988 (ONCG 9032).
- Hill S.A., Wilson S. and Chambers A.F.: Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and p21 expression in H-*ras* transformed NIH 3T3 cells. J. Nat. Canc. Inst. 88, 484-90, 1988 (ONCG 8926).
 - Hunter T.: Le proteine degli oncogèni. Le Scienze, 194, 56-71, 1984 (ONCG 8503).
- La Rocca S.A., Grossi M., Falcone G. Alemà S., Tatò F.: Interaction with normal cells suppresses the transformed phenotype of v-*myc*-transformed quail muscle cells. Cell 58, 123-31, 1989 (ONCG 9002).
 - Levine A.J.: Oncogenes of DNA tumor viruses. Canc. Res. 48, 493-96, 1988 (ONCG 8907).
 - Liotta L.A.: H-ras p21 and the metastatic phenotype. J. Nat. Canc. Inst. 88, 468-69, 1988 (ONCG 8917).
- Maroder M., Martinotti S., Vacca A., Screpanti I., Petrangeli E. Frati L., Gulino A.: Post-transcriptional control of c-*myc* proto- oncogene expression by glucocorticoid hormones in human T lymphoblastic leukemic cells. Nucleic Acid Res. 18, 1153-57, 1990 (ONCG 9029).
 - Marshall C.J.: The ras oncogenes. J. Cell Sci. 10, 157-69, 1988 (ONCG 9004).
- Martinotti S., Fazio V.M., Zani M., Oppido P.A., Manzari V. and Frati L.: Molecular organization of *c-myc* and *c.sis* genes in brain tumors an epidemiological study. Serono Symposia Review, edited by Peschle and Rizzoli. 1984.
 - Marx J.L.: Oncogene action probed. Science 237, 602-3, 1987 (a) (ONCG 8910).

- Marx J.L.: Oncogene linked to fruit-fly development. Science 238, 160-1, 1987 (b) (ONCG 8911).
- Marx J.L.: The oncogene connection. Science 245, 253, 1989 (a) (ONCG 8920).
- Marx J.L.: The ell cycle coming under control. Science 245, 252-255, 1989 (b) (ONCG 8921).
- Meijlink F., Curran T., Miller A.D., Verma I.M.: Removal of a 67 base-pair sequence in the noncoding region of protoncogene *fos* converts it to a transforming gene. PNAS 82, 4987-91, 1985 (ONCG 8507).
- Mellström K., Höglund A.S., Nister M., Helding C.H., Westermark B. and Lindberg U.: The effect of platelet-derived growth factor on morphology and motility of human glial cells. J. Muscle Res. Cell Motil., 4, 589-609, 1983.
- Miyamoto S., Sukumar S., Guzman R.C., Osborn R.C., Nandi S.: Transforming c-Ki-*ras* mutation is a preneoplastic event in mouse mammary carcinogenesis induced in vitro by N-methyl-N-nitrosourea. Mol. and Cell. Biol. 10, 1593-99, 1990 (ONCG 9009).
 - Monografia Le Scienze. Autori vari: Progressi nella ricerca sul cancro. Le Scienze Editore, Milano 1989.
 - Newmark P.: Oncogenes and cell Growth. Nature 327, 101-2, 1987 (ONCG 8717).
- Nigro J.M., Baker S.J, Vogelstein B. et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 342, 705-08, 1989 (ONCG 9001).
- Nister M., Heldin C.H., Wasteson A. and Westermark B.: A glioma- derived analog to platelet-derived growth factor demonstration of receptor competing activity and immunological cross-reactivity. Proc. Nat. Acad. Sci., 81, 926-30, 1984.
- Peehl D.M., Stamey T.A.: Oncogenes, a review with relevance tocancers of the urogenital tract. J. Urol., 135, 897-904, 1986 (ONCG 8609).
 - Pennington S.R.: Cell signalling G proteins and diabetes. Nature, 1987, 327, 188-89 (ONCG 8715).
- Pfeifer-Ohlsson S., Rydnert J., et al.: Cell-type-specific pattern of *myc* proto-oncogene expression in developing human embryos. Proc. Nat. Acad. Sci., 1985, 82, 5050-54 (ONCG 8508).
- Pierotti M.: I geni oncosoppressori. Conferenza presso la Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, 23 gennaio 1991 (SEMN 9101).
- Querzoli P., Marchetti E., Fabris G., Marzola A., Ferretti S., Iacobelli S., Hazan R., King C.R., Nenci I.: Immunohistochemical expression of c-Erb-B2 in human breast cancer by monoclonal antibody Correlation with lymph-node and ER status. Tumori, 76, 461-464, 1990 (ONCG 9103).
- Raines and Ross: Platelet-derived growth factor. High yield purification and evidence for multiple forms. J. Biol. Chem. 257, 5154-60, 1982.
- Rodenhuis S., van de Wetering M.L., Mooi W.J., Evers S.G., van Zandwijk N., Bos J.L.: Mutational activation of the K-*ras* oncogene a possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. New England J. Med. 317, 929-35, 1987 (ONCG 8725).

Ruley H.E.: Adenovirus early region E1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. Nature 304:602, 1983.

Sambucetti L.C. and Curran T.: The *fos* protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. Science 234:1417, 1986.

Sap J., Mu§oz A., Damm K. et al.: The c-*erb*-A protein is a high- affinity receptor for thyroid hormone. Nature, 1986, 324, 535-40 (ONCG 8711).

Scott J.: Oncogenes in atherosclerosis. Nature, 1987, 325, 575-75 (ONCG 8707).

Sharp P.A.: Gene regulation and oncogenes. Canc. res. 49, 2188-94, 1989 (ONCG 8905).

Sheiness D. and Bishop J.M.: DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. J. Virol. 31:514, 1979

Short N.J.: An oncogene caught red-handed? Nature 330, 209-10, 1987 (ONCG 8807).

Sinn E., Muller W., Pattengale P., Tepler I., Wallace R., Leder P.: Coexpression of MMTV/v-Ha-*ras* and MMTV/c-*myc* genes in transgenic mice - Synergistic action of oncogenes in vivo. Cell 49, 465-475, 1987 (ONCG 9101).

Slamon D.J.: Proto-oncogenes and human cancer. New England J. Med. 317, 955-97, 1987 (ONCG 8724).

Stephens C. and Harlow E.: Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A in RNAs that encode 30 kd and 35 kd protein. EMBO J. 6:2027, 1987.

Sukumar S. and Barbacid, M.: Specific patterns of oncogene activation in transplacentally induced tumors. PNAS 87, 718-22, 1990 (ONCG 9006).

Sukumar S., Carney W.P., Barabacid M.:Independent molecular pathways in initiation and loss of hormone responsiveness of breast carcinomas. Science, 240, 524-26, 1988 (ONCG 9007).

Sukumar S.: ras oncogenes in chemical carcinogenesis. Curr. Top. Microb. Immunol. 148, 93-114, 1989 (ONCG 9010).

Talarico D., Ittmann M., Balsari A., Delli-Bovi P., Basch R.S., Basilico C.: Protection of mice against tumor growth by immunization with an oncogene-encoded growth factor. PNAS 87, 4222-25, 1990 (TUGN 9019).

Verma I.M. and Sassone-Corsi P.: Proto-oncogene *fos* - complex but versatile regulation. Cell 51, 513-4, 1987 (ONCG 8805).

Vogelstein B., Bos J.L. et al.: Genetic alterations during colorectal tumor development. New England J. Med. 319, 525-32, 1988 (GENE 8907). Descritto nell'editoriale di Tempo Medico 297, 20-21, nov.1988 (ONCG 8919).

Wakelam M.J.O., Davies S.A., Houslay M.D., McKay I., Marshall C.J., Hall A.: Normal p21 N-*ras* couples bombesin and other growth factor to inositol phosphate production. Nature, 323, 173-76, 1987 (ONCG 8712).

Waterfield M.D., Scrace T., Whittle N., Stroobaut P., Johnsson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C.H., Huang J.S. and Denel T.F.: Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. Nature, 304, 35-39, 1983.

Weinberg R.A.: Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Canc. Res. 49, 3713-21, 1989 (ONCG 8914).

Weinberger C., Thompson C.C., EvansR.M. et al.: The c-*erb*-A gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature, 1986, 324, 641-46 (ONCG 8710).

Weintraub H.M.: RNA e DNA antisenso. Le Scienze, 259, 28-34, 1990 (MCBL 9021).

Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M.: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with P53. Science, 248, 76-79, 1990 (ONCG 9102).

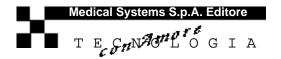
Woolf N.: Cell Tissue and Disease - The basis of pathology. Baillière Tindall, London, 1986, p. 464-475.

Zhou D., Battifora H., Yokota J., Yamamoto T., Cline M.J.: Association of multiple copies of the c.erbB-2 oncogene with spread of breast cancer. Canc. Res. 47, 6123-25, 1987 (ONCG 8815).

Indice

| Istruzioni per gli Autoripag. | 2 | |
|---|----|--|
| Editoriale» | 3 | |
| Prefazione» | 5 | |
| Introduzione» | 7 | |
| Cosa sono gli oncogèni» | 7 | |
| Breve storia della scoperta degli oncogèni» | 8 | |
| I presupposti e la scoperta del primo oncogène» | 8 | |
| Le principali classi di proteine trasformanti» | 11 | |
| I geni delle proteine trasformanti» | 12 | |
| Una nuova concezione dei virus» | 13 | |
| Le principali modalità delle alterazioni riscontrate | | |
| negli oncogèni» | 14 | |
| Cosa sono gli antioncogèni (o geni oncosoppressori)» | 16 | |
| Il punto della situazione» | 17 | |
| La moltiplicazione cellulare» | 19 | |
| La moltiplicazione cellulare nei diversi tessuti: strutture | | |
| con cellule labili, cellule stabili o cellule permanenti» | 21 | |
| Segnali di attivazione per la cellula» | 22 | |
| La trasduzione del segnale» | 22 | |
| La proliferazione ed il differenziamento nell'embrione e | | |
| nell'individuo adulto» | 26 | |
| Oncogèni come fattori di crescita» | | |
| Fattori di crescita come proteine trasformanti» | 29 | |
| Oncogèni come recettori modificati o come proteino-chinasi | | |
| associate alla membrana» | 32 | |
| Oncogèni come elementi della trasduzione del segnale» | 34 | |
| Il ciclo del legame e dell'idrolisi del GTP» | 34 | |
| Le oncoproteine ras» | 36 | |
| Oncogèni come elementi nucleari di regolazione della | | |
| espressione dei geni» | 40 | |
| Proteina E1A degli Adenovirus» | 40 | |
| La famiglia degli oncogèni myc» | 42 | |
| | | |

| Altri oncogèni di rilievo | >> |
|---|----|
| Gli antioncogèni o geni oncosoppressori | » |
| Conclusioni e note di prevenzione | |
| Evitare il cancro è possibile | |
| Bibliografia | » |
| Indice | » |
| Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio | » |
| Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio Edizione Spagnola | » |
| Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio letterario | » |
| Concorso di Pittura | » |
| Videoteca Medical Systems | » |
| Tribuna Biologica e Medica | » |

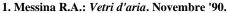


Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

- 1. Rassu S.: Principi generali di endocrinologia. Gennaio '83
- 2. Rassu S.: L'ipotalamo endocrino. Giugno '83
- 3. Rassu S.: L'ipofisi. Dicembre '83
- 4. Alagna., Masala A.: La prolattina. Aprile '84
- 5. Rassu S.: Il pancreas endocrino. Giugno '84
- 6. Fiorini I., Nardini A.: Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza). Luglio '84.
- 7. Rassu S.: L'obesita'. Settembre '84
- 8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: Aspetti morfofunzionali dell'ovaio. Novembre '84.
- 9. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (1). Dicembre '84.
- 10. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima. Gennaio'85.
- 11. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda. Febbraio '85.
- 12. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima. Aprile '85.
- 13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: Il TSH. Giugno '85.
- 14. Facchinetti F. e Petraglia F.: La β-endorfina plasmatica e liquorale. Agosto '85.
- 15. Baccini C.: Le droghe d'abuso (1). Ottobre '85.
- 16. Kubasik N.P.: Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda. Dicembre '85.
- 17. Nuti R.: Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale. Febbraio '86
- 18. Cavallaro E.: Ipnosi: una introduzione psicofisiologica. Marzo '86.
- 19. Fanetti G.: AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti. Maggio '86.
- 20. Fiorini I., Nardini A.: Toxoplasmosi, immunologia e clinica. Luglio '86.
- 21. Limone P.: Il feocromocitoma. Settembre '86.
- 22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici. Novembre '86.
- 23. Bolcato A.: Allergia. Gennaio '87.
- 24. Kubasik N.P.: Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico. Febbraio '87.
- 25. Carani C.: Patologie sessuali endocrino-metaboliche. Marzo '87.
- 26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: Le banche dati in medicina. Maggio '87.
- 27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: L'amenorrea. Giugno '87.
- 28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: Il paziente terminale. Luglio '87.
- 29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
- 30. Cingolani M.: Manuale di ematologia e citologia ematologica. Novembre '87.
- 31. Kubasik N.P.: Ibridomi ed anticorpi monoclonali. Gennaio '88.
- 32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: Diagnostica del carcinoma mammario. Febbraio '88.
- Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: Neuroendocrinologia dello stress. Marzo '88.

- 34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: La fecondazione in vitro. Maggio '88.
- 35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: Il gozzo nodulare. Giugno '88.
- 36. Baccini C.: Le droghe d'abuso (2). Luglio '88.
- 37. Piantino P., Pecchio F.: Markers tumorali in gastroenterologia. Novembre '88.
- 38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: Le leucemie acute infantili. Gennaio '89.
- 39. Sommariva D., Branchi A.: Le dislipidemie. Febbraio '89.
- 40. Butturini U., Butturini A.: Aspetti medici delle radiazioni. Marzo '89.
- 41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: Diagnostica delle neoplasie colo-rettali. Aprile '89.
- 42. Palleschi G.: Biosensori in Medicina. Maggio '89.
- 43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: HTLV-I. Giugno '89.
- 44. Fanetti G.: Emostasi: fisiopatologia e diagnostica. Luglio '89.
- 45. Contu L., Arras M.: Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie. Settembre '89.
- 46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: Immunologia dell'occhio. Ottobre '89.
- 47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: Infezioni opportunistiche in corso di AIDS. Gennaio '90.
- 48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: La coriogonadotropina umana. Febbraio '90.
- 49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: L'immunologia del diabete mellito. Marzo '90.
- 50. Cappi F.: La trasfusione di sangue: terapia a rischio. Aprile '90.
- 51. Tortoli E., Simonetti M.T.: I micobatteri. Maggio '90.
- 52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: Anticorpi antinucleo. Giugno '90.
- 53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: Le macchine in terapia intensiva. Luglio '90.
- 54. Goracci E., Goracci G.: Gli allergo-acari. Agosto '90.
- 55. Rizzetto M.: L'epatite non A non B (tipo C). Settembre '90.
- 56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
- 57. La Vecchia C. Epidemiologia e prevenzione del cancro (I). Gennaio '91.
- 58. La Vecchia C. Epidemiologia e prevenzione del cancro (II). Febbraio '91.
- 59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti. Marzo '91.
- 60. Bedarida G., Lizioli A.: La neopterina nella pratica clinica. Aprile '91.
- 61. Romano L.: Valutazione dei kit immunochimici. Maggio '91.
- 62. Dondero F. e Lenzi A.: L'infertilità immunologica. Giugno '91.
- 63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: Gli Oncogèni. Luglio '91.

Caleidoscopio Letterario



2. Pascarella S.: Sui sentieri dell'anima. Gennaio '91.

3. Mancini C.: Scarti di logica. Aprile '91.



Caleidoscopio (Ed. Española)

Piantino P. y Pecchio F.: Marcadores tumorales en gastroenterologia. Enero '91.

Bolcato A.: Alergia. Abril '91.

Cordido F., Peñalva A., De La Cruz L.F., Casanueva F.F. y Dieguez C.: *Hormona de Crecimiento*. Julio '91.

Ad ogni passo nasce un pensiero!!!!!

Abbiamo una esperienza ultradecennale. Abbiamo pubblicato riviste in italiano, inglese, francese, spagnolo, albanese...

Abbiamo distribuito le nostre riviste in tutto il mondo: dalle Americhe all'Australia, dall'Europa alla Cina, dall'Africa alla Confederazione degli Stati Indipendenti.



Editor in Chief: Dott. Sergio Rassu Via Pietro Nenni, 6 07100 Sassari Tel. e Fax 079 270464

Amministrazione: Medical Systems S.p.A. Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy) Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 8 01005 (senza prefisso); Telex 270310 Ideal I. Telefax (010) 803498- 809070.



EDITORE

Abbiamo deciso di mettere a Vostra disposizione la nostra esperienza, la nostra passione, le nostre tecnologie per la pubblicazione di Atti di Congressi, per la ideazione e realizzazione di riviste scientifiche, per la pubblicazione di libri e monografie, per la raccolta e stampa di articoli scientifici.......

Consultateci!!!!!!

Caleidoscopio



Rivista mensile di Medicina anno 9, numero 63

Direttore Responsabile

Sergio Rassu Via Pietro Nenni, 6 07100 Sassari Tel. Fax e Modem (079) 270464



Consulenti di Redazione

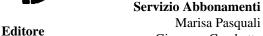
Giancarlo Mazzocchi ed Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Fiorella Gaggero

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater



Giuseppe Gambetta



Via Rio Torbido, 40 16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso); Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 809737-802257.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola-Caleidoscopio letterario, Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice.

Stampa

ATA-Azienda Tipografi Associati Via G. Torti, 32 C Rosso 16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84 Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa nº 2661 del 2 Settembre 1989

> Finito di stampare: Luglio 1991 Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI

Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da: "L'ECO DELLA STAMPA" Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/ 8/6 DPR 627/78)

