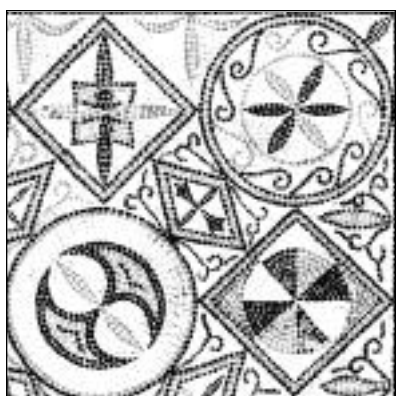


ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

Italiano



Francesca Zazzeroni
Paola Muzi
Mauro Bologna



Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma



Direttore Responsabile
Sergio Rassu



100

 **MEDICAL
SYSTEMS S.p.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1996

F. Zazzeroni, P. Muzi, M. Bologna

*Il gene oncosoppressore p53:
un guardiano del genoma*

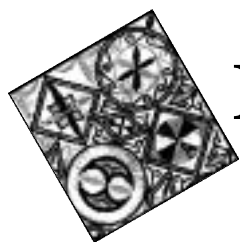
Caleidoscopio



Francesca Zazzeroni
Paola Muzi
Mauro Bologna

Italiano

*Università degli Studi dell'Aquila
Dipartimento di Medicina Sperimentale
67100 L'Aquila*



Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma



Direttore Responsabile
Sergio Rassu

100

 **MEDICAL
SYSTEMS S.p.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1996

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 e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie 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, fax ed indirizzo di E-mail) 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 (in bianco e nero eccetto 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 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, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e 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. Per le 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 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 spediti al Direttore Responsabile con 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 Rassa
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Abbiamo raggiunto con questo numero l'incredibile numero cento della collana Caleidoscopio nell'edizione italiana. Sento ancora una volta il bisogno di ringraziare singolarmente tutti gli Autori che hanno contribuito a questo. Sono 248 che in maniera del tutto disinteressata hanno collaborato dimostrando una disponibilità, un amore per la didattica e un sacro desiderio di comunicare la ricchezza delle loro conoscenze che rende tutti noi particolarmente fieri di aver dato tutto il nostro impegno e passione a questa impresa.

Quando iniziammo nel 1983, con un programma di due numeri l'anno, ed il Cav. Marco Pater, Amministratore Unico della Medical Systems che ha supportato completamente queste iniziative senza interferire nella politica generale della collana e nelle monografie, mi disse che avremmo festeggiato insieme il numero cento, con un rapido calcolo mentale, sorrisi escludendo questa eventualità per ragioni "naturali". E mi sbagliai. Con una lungimiranza ed una intuizione che gli "invidio" aveva già visto quello che poi si è realizzato, incluse le edizioni in lingua inglese e spagnola e le altre riviste che hanno fatto seguito.

Il terzo elemento chiave di questa impresa siete stati voi lettori, colleghi che con mille telefonate, lettere e richieste ci avete confermato la bontà di quello che facevamo. Ed abbiamo fatto non poco. Sono state stampate e distribuite oltre settecentomila copie, nella prima edizione, della versione italiana. A ciò vanno aggiunte le ristampe (a volte anche tre dello stesso numero) che sono state fatte per soddisfare le enormi richieste che alcuni numeri hanno avuto. Distribuite tutte gratuitamente.

Il quarto elemento chiave sono tutte coloro che hanno collaborato materialmente al lavoro, le mie efficienti collaboratrici che hanno imparato in breve (sopportando a volte anche la mia maniacale ricerca della soluzione migliore), tutto lo staff della Sig.na Alessandra Pater senza la cui abilità non avremmo potuto fare, economicamente e materialmente, tutto quanto è stato fatto e tutti quanti coloro che per brevità non cito ma che sono singolarmente nella mia mente riconoscente.

Sono sicuro che tutti noi abbiamo fatto qualcosa di buono per l'aggiornamento che è un elemento chiave della professione di noi sanitari e questo ci rende tutti orgogliosi perché la vostra soddisfazione è anche la nostra. Grazie a tutti per averci dato questa opportunità.

Vediamo adesso questo bellissimo ed attualissimo volume che ben interpreta il nostro spirito.

L'omeostasi della cellula dipende dal bilanciamento del processo di proliferazione, arresto della crescita e morte cellulare programmata (apoptosi).

La proliferazione cellulare segue un preciso programma: il ciclo cellulare. Questo viene regolato da complessi proteici composti di cicline e chinasi cicline-dipendenti. Questi complessi esercitano la loro funzione regolatoria con la fosforilazione di proteine chiave coinvolte nel processo del ciclo cellulare. A loro volta, due importanti classi di geni regolano, attraverso queste proteine, la normale proliferazione delle cellule: i proto-oncogeni e gli onco-soppressori.

L'attivazione dei proto-oncogeni e l'inattivazione dei geni onco-soppressori per una mutazione di un allele può determinare la crescita incontrollata della cellula.

Proprio la mutazione del gene onco-soppressore p53 è una delle più frequenti alterazioni genetiche che sia stata dimostrata associarsi ad una neoplasia nell'uomo. Sebbene meno frequente in alcune neoplasie quali la leucemia linfocitica cronica, è comunque presente in numerose neoplasie sia sporadiche che ereditarie che vanno dal carcinoma del colon a quello della mammella, dal carcinoma epatocellulare a quello dell'ovaio ed agli astrocitomi maligni dove la frequenza della mutazione è di circa il 40%. La mutazione del gene onco-soppressore p53 determina la perdita della funzione di questo gene, che viene ben sottolineato nel titolo di questa monografia, di "guardiano del genoma".

Infatti gli agenti che danneggiano il DNA inducono la p53 che, a sua volta, causando l'arresto della crescita, permette la riparazione del DNA prima della sua replicazione. Meccanismo che, appunto, viene perso nelle mutazioni di questo gene, con conseguenti anomalie cromosomiche, come l'amplificazione genica, che sono caratteristiche della progressione tumorale.

Tuttavia il significato di questi geni pare superare questi stessi aspetti in quanto la mutazione e l'alterata espressione dei loro prodotti sembra abbia un significato clinico che si correla spesso con la prognosi in particolari tipi di cancro e queste osservazioni stanno stimolando lo sviluppo di nuove strategie nel tumultuoso campo della terapia sostitutiva genica.

Vediamo infine, rapidamente, gli Autori di questa monografia.

La dottoressa Francesca Zazzeroni, laureata in Scienze Biologiche nell'Università dell'Aquila con una tesi sperimentale proprio su questo argomento è ora impegnata nel Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale presso la Cattedra di Patologia Generale; è una studiosa dotata di notevoli capacità e di vivacissimo spirito di osservazione che non mancheranno di garantirle un futuro ricco di risultati scientifici di notevole valore.

La dottoressa Paola Muzi, biologa, è Tecnico Laureato presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale della stessa Università, ha una lunga esperienza nel campo della biologia cellulare dei tumori ed una consolidata attività di ricerca con utilizzo delle tecniche di immunoistochimica applicate a varie tematiche sperimentali di patologia umana. E' autrice di oltre quaranta pubblicazioni nei settori dell'immunologia, dell'oncologia e della biologia cellulare normale e patologica.

Il Professor Mauro Bologna, caposcuola di questo attivo gruppo di ricerca, è medico chirurgo, Professore Associato di Patologia Generale presso l'Università dell'Aquila.

Abbiamo avuto modo di conoscere ed apprezzare in questa collana il lavoro del Prof. Bologna con la magistrale monografia dedicata proprio agli Oncogeni e siamo ben felici di averlo ancora nella nostra nutrita famiglia.

Il Prof. Bologna ha maturato una importante esperienza internazionale frequentando 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 120 pubblicazioni scientifiche su argomenti di immunologia, oncologia, malattie infettive, chemioterapia e patologia ha soprattutto una grande capacità comunicativa e didattica che gli permette di rendere comprensibile, immediatamente, nozioni complesse. E' pertanto un Autore ideale che ha interpretato perfettamente lo spirito di questa collana.

Sergio Rassa

I geni oncosoppressori: il freno della crescita cellulare

La carcinogenesi è il processo attraverso il quale una cellula normale diventa neoplastica, ovvero diventa capace di crescere in modo incontrollato e disorganizzato, e di invadere i tessuti circostanti.

Una cellula diventa tumorale quando i meccanismi di controllo che regolano il ciclo cellulare vengono in qualche modo modificati. Si possono avere mutazioni che riguardano i geni coinvolti nell'attivazione del ciclo cellulare oppure mutazioni che colpiscono i geni che sopprimono la duplicazione della cellula. In ogni caso, le origini del cancro sono sempre dovute ad una serie di alterazioni che riguardano i geni dello stesso individuo che sviluppa la malattia.

Gli oncogeni, ossia i geni che controllano l'attivazione e la progressione del ciclo cellulare, sono stati i primi geni ad essere messi in relazione con il cancro. Essi codificano proteine che possiedono effetti dominanti nella trasformazione neoplastica. Cambiamenti genetici in questi siti possono dare origine a cellule incapaci di regolare la propria attività proliferativa in risposta a stimoli inibitori sulla crescita. Cellule con mutazioni a carico di uno o più oncogeni possono perciò essere capaci di proliferare in modo del tutto incontrollato, dando così origine ad un tessuto neoplastico.

Negli ultimi anni è stata scoperta una classe notevolmente diversa di geni correlati al cancro: i geni oncosoppressori. Essi non agiscono nelle cellule normali promuovendo la proliferazione cellulare, ma sopprimendola; la loro inattivazione, dovuta ad alterazioni geniche, determina quindi la perdita dei normali meccanismi di "freno" della crescita cellulare e permette alla cellula che porta geni oncosoppressori mutati di trasformarsi in cellula neoplastica.

La ricerca sui geni oncosoppressori è oggi molto intensa. Mutazioni a carico di questi siti genici sono state trovate in un'ampia varietà di tumori umani: sembra sempre più fondata l'ipotesi che siano proprio queste le alterazioni genetiche più importanti nella carcinogenesi.

I geni oncosoppressori, al momento della loro scoperta, erano stati denominati antioncogeni, perché i loro prodotti proteici si comportavano in maniera opposta rispetto alle proteine oncogeniche. In realtà, la proteina di un antioncogene non ha sempre un'azione diretta su un oncogene, ma può agire sul blocco della proliferazione cellulare con meccanismi diversi; per questo motivo la denominazione di antioncogene non è apparsa più giustificata ed è stata quindi abbandonata.

I geni oncosoppressori finora clonati agiscono a diversi livelli della via di trasduzione del segnale, a partire dalla membrana cellulare fino al nucleo; in alcuni casi sono risultati agire come regolatori negativi dell'espressione di determinati oncogeni.

L'esistenza dei geni oncosoppressori fu dimostrata per la prima volta alla fine degli anni sessanta da Henry Harris. Lui e i suoi collaboratori fusero cellule normali murine con cellule tumorali sempre di topo. Gli ibridi ottenuti dovevano necessariamente contenere sia i geni "tumorali", sia i geni "wild type". Inoculando queste cellule ibride sottocute a dei topi, i ricercatori non notarono alcuno sviluppo di tumore, cosa che accadeva invece in seguito ad inoculo negli stessi animali delle cellule tumorali. Questa era una chiara dimostrazione che i geni coinvolti nell'espressione del fenotipo tumorale erano geni recessivi (geni oncosoppressori) (1).

Le prime mutazioni nei geni oncosoppressori sono state scoperte in diversi tipi di tumori infantili. Il comportamento epidemiologico e clinico di questo tipo di neoplasie del bambino poteva essere spiegato solo ammettendo che la causa dell'insorgenza di questo fenotipo tumorale fosse una doppia mutazione a carico di entrambi gli alleli di una medesima regione cromosomica. Si trattava, cioè, di tratti genetici recessivi; l'inattivazione delle due copie di un gene oncosoppressore era perciò alla base della trasformazione maligna. Si aveva, quindi, una situazione con "perdita di un carattere", mentre la tipica mutazione di un oncogene determina invece abitualmente una "eccessiva espressione" di un carattere (2).

Una caratteristica fondamentale, oltre alla diversa funzione rispetto al ciclo cellulare, distingue gli oncogeni dai geni oncosoppressori. Gli oncogeni studiati finora sono sempre attivati tramite mutazioni di tipo somatico, cioè alterazioni genetiche che avvengono in una qualsiasi cellula dell'organismo ma che non si riscontrano nelle cellule germinali. Oncogeni mutanti attivati non vengono dunque di solito trasmessi dal genitore alla progenie.

Al contrario, forme mutanti dei geni soppressori della crescita possono essere effettivamente trovate nelle cellule germinali (spermatozoi o cellule uovo) e possono pertanto essere trasmesse da una generazione all'altra. Ovviamente, un bambino che, al momento del concepimento, eredita un gene oncosoppressore mutato e sia quindi eterozigote per una mutazione germinale avrà una maggiore probabilità di sviluppare un tumore nel corso della vita (2).

Alla base della maggior parte dei tumori ereditari c'è, in effetti, uno stato di eterozigosi per un gene oncosoppressore, che costituisce una condizione di rischio per lo sviluppo di neoplasie che coinvolgono quel gene.

Il primo gene oncosoppressore scoperto: il gene del retinoblastoma

Il primo gene oncosoppressore ad essere scoperto è stato il gene Rb del retinoblastoma, un raro tumore dell'occhio che colpisce circa un bambino su 20.000 nati e che è provocato da due mutazioni consecutive che interessano entrambe le copie del gene Rb nella stessa cellula retinica (2).

I retinoblasti sono i precursori delle cellule della retina, che rappresenta il tessuto nervoso sensibile alla luce situato nella parte posteriore dell'occhio. Le cellule che formano un retinoblastoma sembrano essere quelle normalmente destinate a costituire una delle due classi di cellule fotorecetrici, i coni (l'altra classe sono i bastoncelli). Quando un retinoblasto si differenzia completamente, a formare una cellula specializzata della retina, perde la capacità di dividersi e quindi non può più dare origine ad un tumore. Questo fatto spiega la distribuzione dei casi di retinoblastoma in relazione all'età dei soggetti: casi di questo tumore non si osservano mai nei bambini di età superiore agli 8-10 anni e negli adulti.

Già all'inizio degli anni '70, Knudson ipotizzò che nelle cellule colpite da retinoblastoma esistessero due diverse mutazioni, in quanto egli osservò che le forme bilaterali del tumore, spesso ereditarie, si riscontravano in età più giovanili rispetto alle forme unilaterali, non ereditarie (3). L'ipotesi avanzata da Knudson era che nel retinoblastoma di tipo familiare una mutazione fosse presente già nello zigote e che fosse quindi stata ereditata da uno dei genitori e poi diffusa a tutte le cellule somatiche del bambino, comprese le cellule della retina; una seconda mutazione doveva poi intervenire poco dopo la nascita a livello somatico in uno dei molti retinoblasti già portatori della mutazione presente in modo congenito. Nelle forme non familiari, o sporadiche, di retinoblastoma, Knudson ipotizzò che entrambe le mutazioni necessarie per la formazione del tumore avvenissero a livello somatico e locale, in sequenza ravvicinata, in una singola cellula retinica che poi si espandeva e formava il tumore (2) (Fig. 1).

Alcuni anni più tardi, Yunis osservò che cellule provenienti da diversi retinoblastomi presentavano spesso una delezione nel braccio lungo (q) del cromosoma 13. Generalmente in tale cromosoma mancava qualche porzione della banda 14. Ulteriori analisi cromosomiche dimostrarono che in alcuni bambini affetti da retinoblastoma di tipo ereditario le delezioni sul cromosoma 13 erano presenti oltre che nelle cellule tumorali anche in tutte le altre cellule somatiche normali e nelle cellule somatiche di uno dei due genitori. Quando una delezione veniva scoperta nei casi di tumore sporadico, invece, era invariabilmente circoscritta alle sole cellule tumorali e

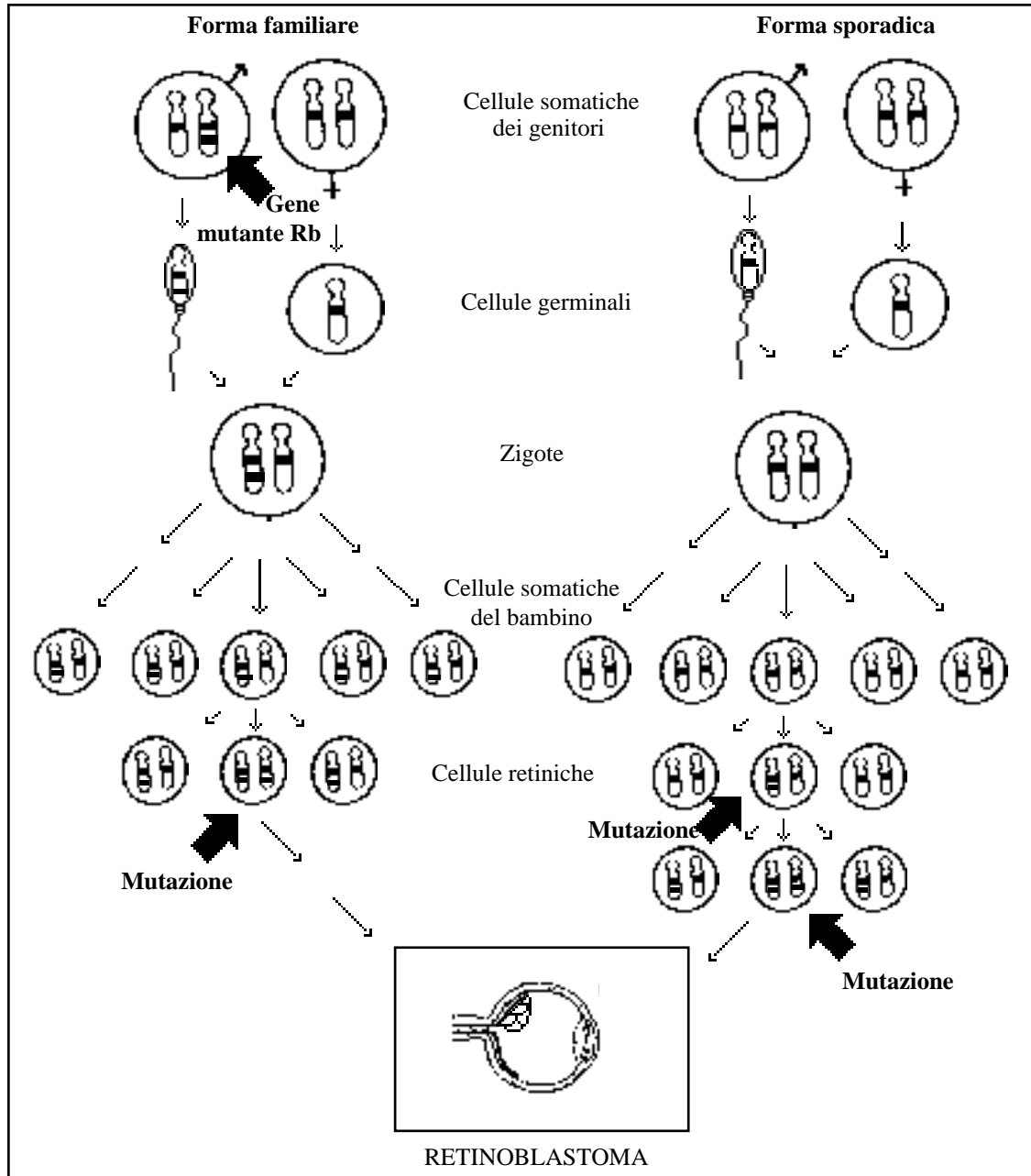


Figura 1. Ereditarietà dei geni oncosoppressori: un esempio paradigmatico è rappresentato dal gene Rb isolato dal retinoblastoma umano. La forma familiare del retinoblastoma prevede una mutazione ereditata ed una mutazione somatica avvenuta nell'individuo ammalato; la forma sporadica prevede invece due mutazioni somatiche avvenute in rapida sequenza nell'individuo ammalato, prima del compimento del dodicesimo anno d'età.

non se ne trovava traccia nelle cellule dei genitori (2). Queste scoperte confermavano, perciò, la validità dell'ipotesi teorica della doppia mutazione proposta da Knudson per spiegare l'origine del retinoblastoma.

Il gene del cromosoma 13, ovviamente coinvolto nell'insorgenza di questo tipo di tumore, è stato chiamato Rb (da Retinoblastoma). Esso è stato identificato per la presenza di una delezione estesa di tale cromosoma, che è visibile talvolta addirittura al microscopio ottico. Una lesione cromosomica così vasta rappresenta tuttavia soltanto uno dei numerosi meccanismi mutazionali per mezzo dei quali il gene Rb potrebbe essere inattivato. Delezioni molto più piccole, senza effetto sulla struttura visibile del cromosoma, possono inattivare la funzione genica altrettanto bene.

Le moderne tecniche di biologia molecolare hanno permesso, infatti, di dimostrare che in tutte le cellule di retinoblastoma esiste una piccolissima delezione, non visibile all'analisi del cariotipo, che riguarda entrambe le copie del cromosoma 13 ed è localizzata nella banda cromosomica 13q14.2.

Il passo successivo fu quello di cercare di capire a livello molecolare in che modo il gene Rb potesse agire per limitare o inibire la crescita cellulare.

La proteina codificata dal gene Rb è una proteina fosforilata di 928 aminoacidi, con peso molecolare di 105 Kd, che ha una localizzazione nucleare e che si lega al DNA in modo aspecifico (Fig. 2).

Da un punto di vista strutturale, la proteina Rb può essere suddivisa in quattro domini. Il dominio N, che si trova all'estremità aminica, è responsabile dell'oligomerizzazione della proteina in vitro. I domini A e B, detti "A/B pocket", sono responsabili del legame di Rb a vari fattori trascr-

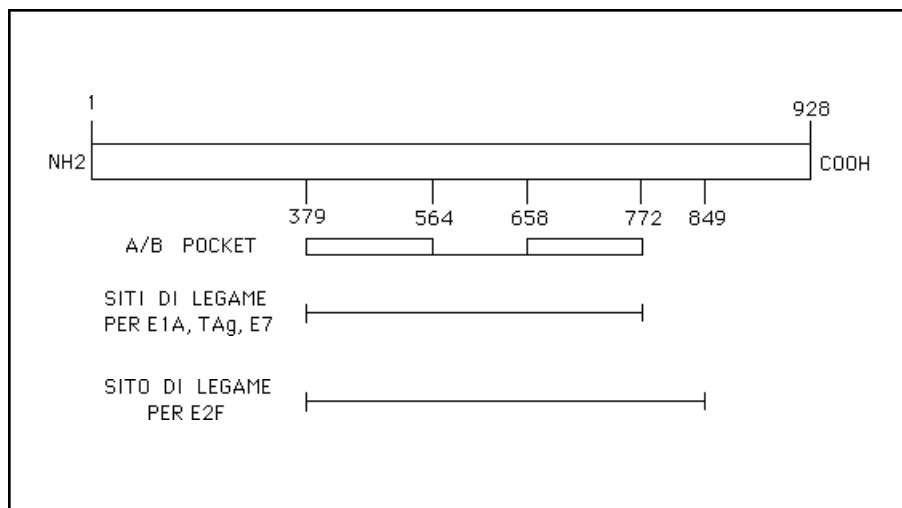


Figura 2. La Proteina Rb.

zionali, come E2F e varie oncoproteine virali, e risultano spesso mutati in vari tumori. Il quarto dominio, detto "C pocket", si trova all'estremità carbossilica della proteina; è stato dimostrato recentemente che questo dominio è un sito di legame per c-Abl (il prodotto di un altro oncogene coinvolto nella proliferazione cellulare, mutato soprattutto nelle leucemie).

Molte proteine nucleari hanno una funzione nel controllo dell'espressione genica. Che anche la p105Rb svolgesse un ruolo di questo tipo fu ipotizzato in seguito a studi sugli adenovirus, virus tumorali che producono un'oncoproteina detta E1A (4). Questa oncoproteina virale forma un complesso con la proteina p105Rb, che in questo modo viene inattivata. Dato che la proteina E1A è un regolatore diretto dell'espressione genica, si pensò che anche la proteina codificata dal gene Rb potesse essere direttamente coinvolta nella modulazione dell'espressione genica. Oltre alla proteina E1A, la proteina p105Rb si complessa anche con altri fattori proteici virali, come l'antigene "large T" di SV40 e l'oncoproteina E7 del papilloma virus umano 16 (HPV-16) (Tab. 1).

Recentemente, è stato dimostrato da diversi laboratori di ricerca che la proteina Rb sopprime la crescita cellulare legandosi a fattori trascrizionali importanti per l'induzione dello stato proliferativo della cellula; il legame di Rb determina una inibizione di tali fattori (5). In particolare, la p105Rb si complessa con il fattore trascrizionale E2F, che normalmente attiva importanti geni del ciclo cellulare. Il dominio di Rb che lega i fattori trascrizionali è detto "A/B pocket", come abbiamo già accennato, ed è lo stesso dominio che lega le oncoproteine virali.

La proteina p105Rb si lega al fattore E2F quando si trova nello stato non fosforilato. Questi complessi si formano nello stadio G1 del ciclo cellulare e agiscono come repressori trascrizionali. Il fattore E2F è stato inizialmente identificato come un attivatore del promotore E2 degli adenovirus, con la dimostrazione che riconosceva in questo promotore la sequenza TTTCGCGC. Recentemente, è stato dimostrato che sequenze del tutto identiche a quella del promotore E2 sono importanti per la regolazione della trascrizione di geni cellulari come *myc*, *myb*, *cdc2* ed *EGF* (6).

L'attività oncosoppressiva della p105Rb viene regolata attraverso la fosforilazione di alcuni residui aminoacidici della proteina. In fase G0 e G1 la proteina si trova in uno stato non fosforilato, e prima che la cellula inizi a proliferare (fase S del ciclo cellulare), la p105Rb viene fosforilata. I gruppi fosfato vengono, poi, nuovamente persi durante la mitosi.

Esistono sei siti principali di fosforilazione nella proteina; studi recenti hanno dimostrato che la chinasi *cdc2* (una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare) sarebbe responsabile della fosforilazione della p105Rb. La fosforilazione determina una modificazione conformazionale tale che la p105Rb si dissocia dai fattori trascrizionali, che divengono così attivi (Fig. 3).

PROTEINA ONCOSOPPRESSIVA	PROTEINA VIRALE	PROTEINA CELLULARE	COMMENTI
p53	SV40 Large T Ag		p53 fu originariamente identificata per la sua interazione con SV40 large T Ag
p53	Polyoma Large T Ag		Il legame determina l'inattivazione di p53
p53	Adenovirus E1B		Il legame determina l'inattivazione di p53
p53	HPV16 e 18 E6		Si lega alla p53 con una affinità piuttosto bassa
p53		Heat Shock p70	Si lega ad alcune ma non tutte le forme mutate di p53
p53		MDM2	Lega ed inattiva p53
p105Rb	SV40 large T Ag		Lega ed inattiva Rb
p105Rb	Polyoma large T Ag		Lega ed inattiva Rb
p105Rb	HPV16 e 17 E7		Lega ed inattiva Rb
p105Rb	Adenovirus E1A		Lega ed inattiva Rb

Tabella 1. Legame ed inattivazione di p53 e di p105Rb da parte di proteine cellulari e virali.

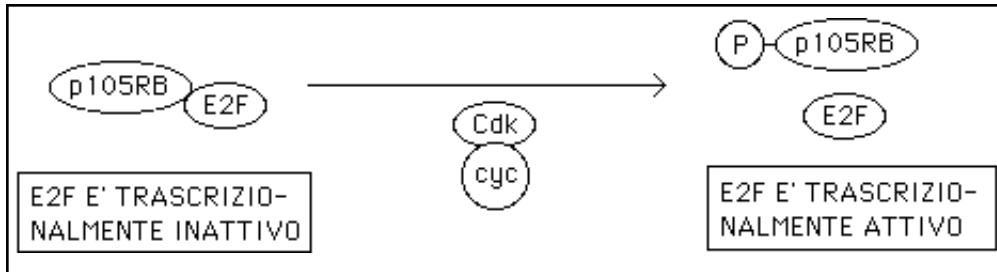


Figura 3. Fosforilazione di Rb mediata dalle chinasi ciclino-dipendenti e attivazione del fattore trascrizionale E2F.

Prove a conferma del fatto che la fosforilazione modula l'attività della proteina Rb sono state ottenute dimostrando che l'inibitore della crescita TGF- β previene la fosforilazione della proteina Rb, arrestando così la crescita in fase G1 (7).

La fosforilazione di p105Rb è mediata dai complessi ciclina-chinasi ciclina-dipendenti (Cdk) ed è un evento chiave per il passaggio dalla fase G1 alla fase S (8). Il TGF- β blocca il ciclo cellulare prima della fosforilazione della proteina Rb in quanto blocca la sintesi di Cdk4, e quindi la formazione dei complessi ciclina D-Cdk4, e inibisce la formazione dei complessi ciclina E-Cdk2.

Esistono, quindi, tre modi per inattivare funzionalmente la proteina Rb:

- 1) le mutazioni dell'"A/B pocket" che annullano la capacità di Rb di legare i fattori trascrizionali come E2F;
- 2) l'occupazione del dominio "A/B pocket" da parte delle oncoproteine virali;
- 3) l'iperfosforilazione della proteina Rb, che è un fenomeno fisiologico reversibile di regolazione negativa (Fig. 4).

E' stato recentemente dimostrato che Rb ha anche un effetto inibitorio su c-Abl. c-Abl è un prodotto genico con azione di tirosin-chinasi nucleare capace di trans-attivare proteine come VP16 ed E2F, e capace di legare il DNA (come si è detto è coinvolta soprattutto nello sviluppo di alcune leucemie).

In fase G1, la proteina Rb lega c-Abl attraverso il suo dominio "C pocket", inibendone l'attività tirosin-chinasica. Nel passaggio dalla fase G1 alla fase S, la proteina Rb viene inattivata mediante un processo fosforilativo, e c-Abl riacquista la sua attività enzimatica. c-Abl è quindi attiva in fase S, ed è possibile che partecipi alla regolazione dei geni che avviano la duplicazione del DNA. c-Abl viene poi fosforilata e inattivata durante il passaggio da G2 ad M, e alla fine della mitosi sia la proteina Rb che c-Abl vengono defosforilate per azione delle fosfatasi, con il ripristino quindi della situazione iniziale con Rb che lega e inattiva c-Abl (Fig. 5).

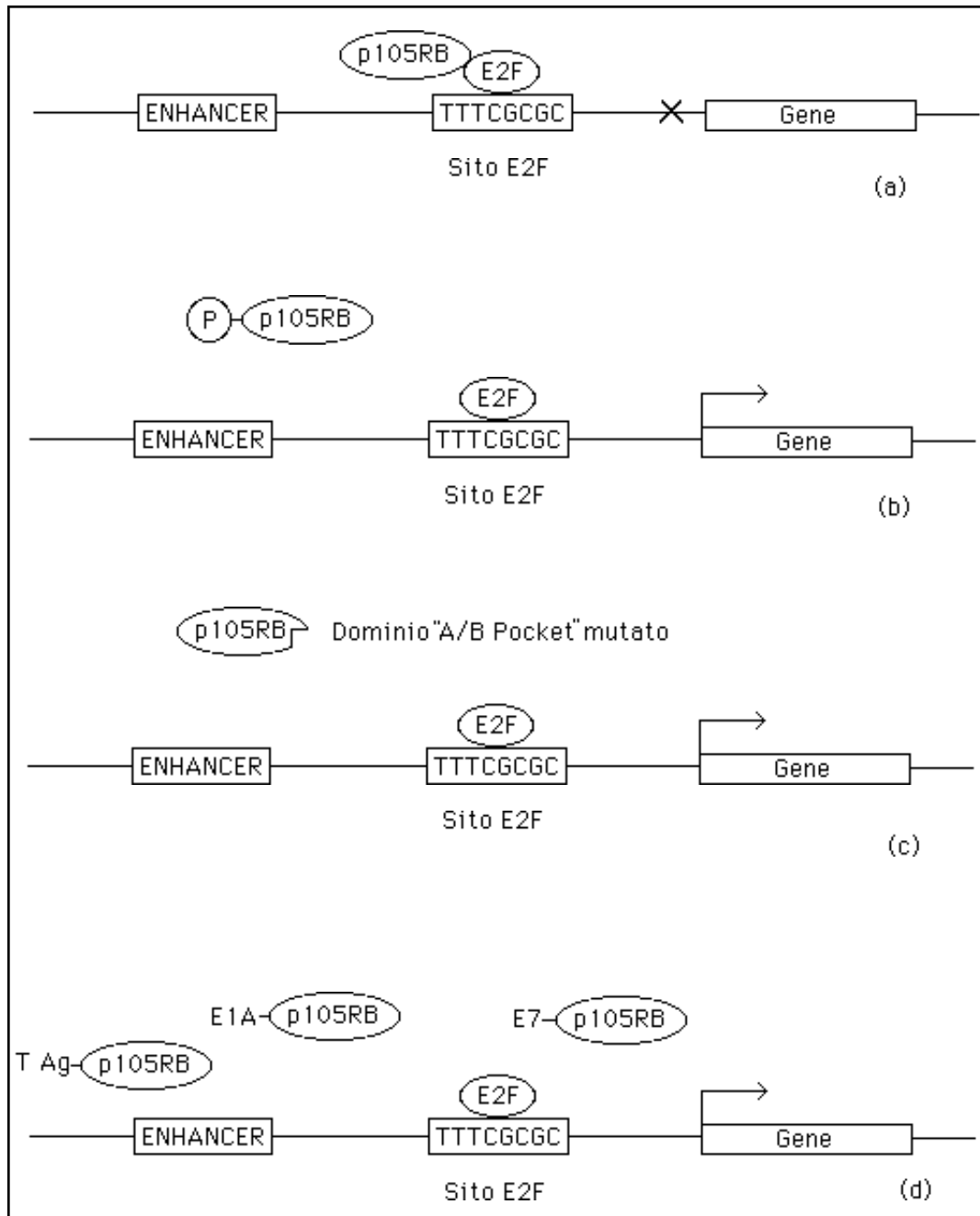


Figura 4. Meccanismi di inattivazione di Rb: a) RB ipofosforilata funzionale; b) RB iperfosforilata inattiva; c) RB mutata inattiva; d) RB legata ad oncoproteine virali inattiva.

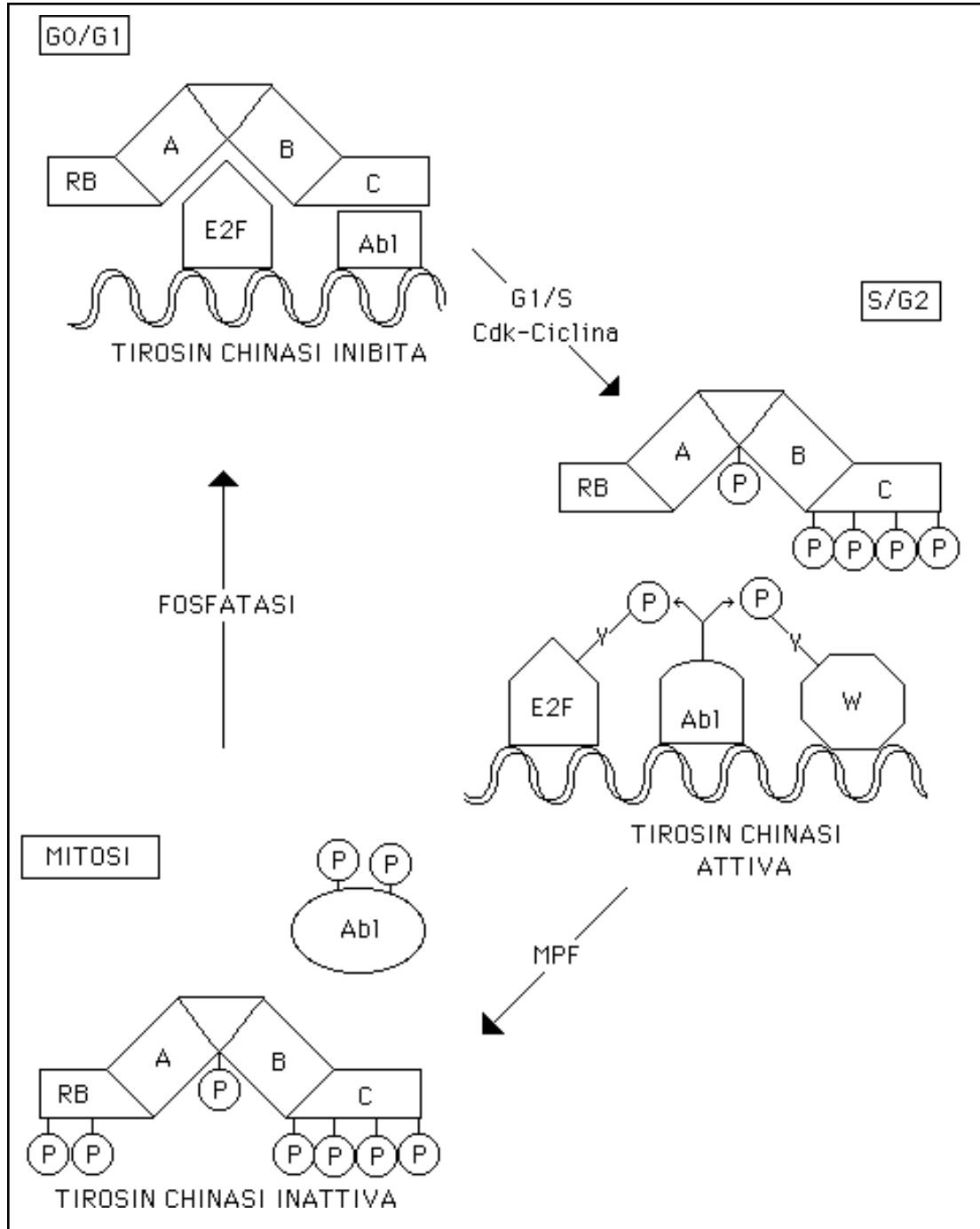


Figura 5. Inibizione dell'attività tirosin chinasi di c-Abl da parte di RB.

Per quanto riguarda il ruolo fisiologico della p105Rb, studi su topi transgenici hanno dimostrato che animali omozigoti concepiti da genitori eterozigoti per una mutazione Rb muoiono prima dei sedici giorni di vita fetale a causa di malformazioni all'encefalo e al sistema ematopoietico. Questi esperimenti permettono di concludere che Rb è un gene di importanza fondamentale per lo sviluppo e che le mutazioni che lo colpiscono sono recessive sia nei confronti dello sviluppo che dell'effetto oncogeno (5, 9).

Inizialmente si era pensato che il gene Rb fosse correlato solo con l'insorgenza del retinoblastoma. Studi successivi hanno, invece, evidenziato che mutazioni del gene Rb sono presenti anche in altre forme tumorali, come gli osteosarcomi, i carcinomi polmonari, i carcinomi mammari e i carcinomi prostatici (10).

La penetranza del genotipo mutato è però molto alta nel caso del retinoblastoma e di gran lunga più bassa nel caso di altri tipi di neoplasia.

Poiché il gene Rb è espresso in tutte le cellule ed ha un ruolo importante nella normale fisiologia cellulare, non è del tutto chiaro perché le sue alterazioni siano così fortemente associate soltanto con il retinoblastoma. Probabilmente, in altri tessuti diversi dalla retina esistono altri meccanismi regolatori che devono essere inattivati perché si abbia lo sviluppo di una neoplasia. Nel prossimo futuro assisteremo con altissima probabilità alla scoperta di numerosi altri geni oncosoppressori che saranno in stretta correlazione con molte neoplasie differenti (vedi anche pagina 34).

Il più importante dei geni oncosoppressori: il gene p53

Le mutazioni del gene oncosoppressore p53 sono le più comuni alterazioni genetiche associate ai tumori umani, per quanto si è potuto accertare fino ad oggi. Esse avvengono con alta frequenza in quasi tutte le neoplasie ereditarie e sporadiche finora studiate, compresi il carcinoma del colon, il carcinoma della mammella, il carcinoma epatocellulare, i tumori del polmone e dell'esofago, i tumori cerebrali, le leucemie e i linfomi, il tumore della vescica e quello dell'ovaio.

Mutazioni germinali in uno dei due alleli p53, inoltre, determinano un'alta predisposizione allo sviluppo di tumore; è questa una condizione familiare nota come sindrome di Li-Fraumeni (11). In questi ultimi anni si è iniziato a chiarire che l'inattivazione della funzione soppressiva della crescita del gene p53 è una tappa quasi universale nello sviluppo dei tumori umani, in quanto sembra che la funzione fisiologica della proteina p53 sia essenziale per il mantenimento del fenotipo normale, non neoplastico, delle cellule.

Il fatto che il gene p53 sia così frequentemente mutato nei tumori umani suggerisce che il ripristino della normale attività del gene p53, ad esempio attraverso trasfezione genica, potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica anti-tumorale.

La proteina p53 fu identificata per la prima volta alla fine degli anni '70 in cellule infettate dal virus SV40 (simian virus 40) come una fosfoproteina che co-immunoprecipitava con l'antigene "large T". Si classificò, così, la p53 come antigene tumorale (12, 13). Poiché questa proteina sembrava non condividere determinanti antigenici con l'antigene "large T" di SV40 e poiché la proteina fu in seguito isolata anche da cellule di carcinoma embrionale murino non infettate da SV40, si concluse che la p53 è codificata invece da un gene cellulare, e non da un gene virale (14) (Vedi Tab. 1 pag. 11).

Si dimostrò poi che la sequenza aminoacidica della p53 è altamente conservata nelle diverse specie di vertebrati; questo fatto indicava che la proteina doveva svolgere un importante ruolo nella fisiologia cellulare.

Studi successivi hanno stabilito che la proteina p53 è presente in piccole concentrazioni nelle cellule normali, e che questa concentrazione è significativamente molto più alta nelle linee cellulari tumorali coltivate in vitro e nei tessuti tumorali in vivo (12). La base molecolare di questo aumento dei livelli di p53 nelle cellule tumorali è da attribuire probabilmente ad un fenomeno di stabilizzazione post-trascrizionale, dovuta a cambiamenti nell'ambiente cellulare, o a formazione di complessi con altre proteine cellulari o virali. Il risultato è, in ogni caso, un aumento del tempo di emivita della

proteina, che causa l'accumulo della proteina stessa e dunque un aumento della sua concentrazione (15, 16, 17). Anche la maggior parte delle mutazioni della sequenza genica che codifica per la p53 hanno lo stesso effetto (13, 12).

L'osservazione che molte cellule trasformate contengono più p53 rispetto alle corrispondenti cellule normali ha fatto pensare che questa proteina potesse giocare un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare e che l'aumentata espressione di p53 portasse ad un aumento della proliferazione cellulare. In altre parole, si pensò che la p53 fosse il prodotto proteico di un oncogene (14).

Osservazioni successive che indicavano che il gene p53 è in grado di cooperare con l'oncogene ras nella trasformazione dei fibroblasti di embrione di ratto continuarono a sostenere l'ipotesi che il p53 fosse un oncogene dominante e che contribuisse alla tumorigenesi fornendo uno stimolo per la crescita cellulare quando era iperespresso (12).

Nel 1989 Hind e coll. hanno dimostrato che in realtà molti degli studi in cui il gene p53 era stato cotrasfettato con il gene ras erano stati realizzati con cloni di p53 mutante. Quando questi esperimenti di cotrasfezione furono ripetuti con cDNA del gene p53 "wild type" (non mutato), non si ebbe trasformazione dei fibroblasti (14).

Questi risultati hanno permesso di stabilire, quindi, che il p53 è un gene oncosoppressore che normalmente inibisce la crescita cellulare; alcune mutazioni che colpiscono questo gene possono, in alcuni casi, dare origine a proteine p53 mutanti che non solo perdono la loro normale funzione di "freno" sulla duplicazione cellulare ma che acquistano anche una nuova attività di tipo oncogenico, ossia stimolatoria nei confronti della crescita della cellula. Questa particolare caratteristica di alcuni mutanti p53 ha reso più difficoltosa e più confusa la classificazione del gene p53 come gene oncosoppressore.

Ora, a distanza di 15 anni dalla sua prima identificazione, la p53 è diventata una molecola di enorme interesse. Nel 1992, la rivista "Time" ha attribuito a questa proteina il secondo posto tra gli argomenti scientifici di maggiore interesse; nel 1993 la p53 è stata dichiarata "molecola dell'anno" dalla rivista "Science", una delle più autorevoli riviste scientifiche del mondo (18, 19).

Caratteristiche biochimiche della proteina p53 "wild type"

Il gene p53 è localizzato sul cromosoma umano 17p13.1 ed è composto di undici esoni (il primo dei quali non codificante)(20), per una lunghezza complessiva di circa 20 Kb. Il gene p53 è espresso praticamente in tutti i tessuti ed è altamente conservato in tutte le specie di vertebrati.

Il prodotto proteico del gene p53 è una fosfoproteina nucleare formata da 393 aminoacidi (PM 53 Kd) che è coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare.

La proteina presenta un dominio acido (residui 1-80), un dominio idrofobico (residui 75-150) e un dominio basico (residui 319-393) (Fig. 6).

Il dominio acido è responsabile della funzione di attivazione trascrizionale della p53, ed è molto simile al dominio acido osservato in vari fattori di trascrizione ben caratterizzati. Se il dominio acido della p53 viene fuso con la regione che lega il DNA della proteina Gal-4, la proteina chimerica risultante può agire attivando la trascrizione dell'operone Gal-4. L'attivazione trascrizionale dovuta a questa proteina chimerica non si realizza in presenza di proteine p53 mutanti, della proteina adenovirale E1B, dell'antigene "large T" di SV40, della proteina E6 dell'HPV-16 o dell'antigene EBNA-5 del virus di Epstein-Barr (21); (22); (23). In cellule trasformate da questi virus tumorali, infatti, la proteina p53 si trova complessata con antigeni virali che ne inibiscono l'attività oncosoppressiva (Vedi Tab. 1 a pag. 11).

Il dominio che attiva la trascrizione è stato mappato nella regione compresa tra i codoni 20 e 42.

L'estremità carbossiterminale basica presenta una regione che permette il legame della p53 al DNA. Questo stesso dominio è anche richiesto per l'oligomerizzazione della proteina p53 (residui 324-356) e inoltre lega covalentemente una molecola di RNA 5,8 S che rappresenta un segnale di localizzazione nucleare per la proteina. Il dominio codificato dall'esone 11, infine, è un sito di regolazione negativa che modula la capacità della p53 di legarsi al DNA in modo sequenza-specifico (24).

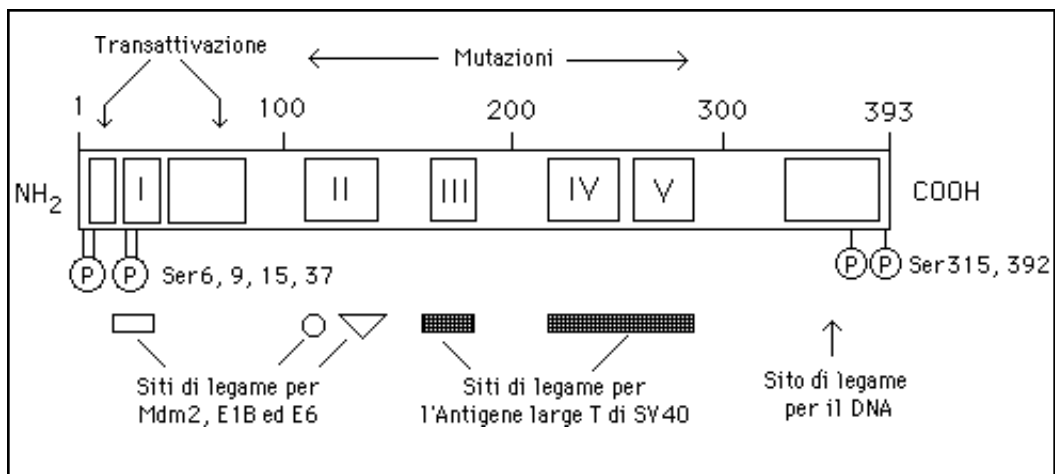


Figura 6. Struttura della proteina p53.

L'oligomerizzazione della proteina p53, soprattutto in tetrameri di forma allungata, è fondamentale per la sua funzione oncosoppressiva (25). Infatti, già nel 1983 era stato dimostrato che la proteina "wild type" si lega in modo non specifico al DNA e si è poi visto che questo legame può essere anche sequenza-specifico (26, 16, 15, 17).

I siti del DNA che legano la proteina p53 sono stati mappati. Ognuno di essi contiene due copie del decanucleotide 5'Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(A/T)-G-Py-Py-Py-3' separate da 13 coppie di basi con sequenza casuale. I siti che legano la p53 hanno, quindi, un'ovvia simmetria (quattro copie dell'emisito 5'-(A/T)-G-Py-Py-Py-3' sono orientate, a due a due, in direzione opposta a formare una struttura palindromica) (16). Questo suggerisce che la proteina p53 può legarsi a questi siti come tetramero; risultato, questo, confermato anche da studi biofisici che indicano che la p53 in soluzione è tetrameric (17, 15).

La conformazione della proteina p53 è strettamente correlata alla sua funzione: la p53 nella conformazione "wild type" è un repressore della crescita cellulare, mentre alcune forme mutanti di p53 hanno una conformazione tale che conferisce loro un'attività promotrice della duplicazione cellulare.

La struttura terziaria della proteina p53 "wild type" sembra essere stabilizzata dalla chelazione di residui conservati di cisteina con ioni metallici, probabilmente con ioni zinco (27). Due probabili domini di legame per lo ione zinco (Cys135-X₅-Cys141-X₃₄-Cys176-X₂-His179 e Cys238-X₃-Cys242-X₃₂-Cys275-X₁-Cys277) possono formare un ponte tra i domini II, III, IV e V, e questo spiegherebbe come mutazioni lontane anche più di 150 aminoacidi risultino avere un effetto simile sulla struttura terziaria (27).

Un altro fattore importante che influenza lo stato conformazionale della proteina p53, e quindi la sua funzione biologica, è il suo stato di fosforilazione (28). Varie chinasi, tra cui la cdc2 chinasi, la protein-chinasi C e la casein-chinasi II, aggiungono fosfati a vari residui di serina della p53. E' stato dimostrato (24) che la fosforilazione aumenta la capacità di tetrameri p53 in forma latente di legarsi al DNA. L'attività biologica della p53 è, infatti, strettamente correlata alla capacità della proteina di legarsi al DNA e di agire come fattore trascrizionale (29).

Anche la rimozione del dominio carbossi-terminale codificato dall'esone 11 del gene p53, dominio capace di inibire il legame della p53 stessa al DNA, è un meccanismo molecolare che modifica il funzionamento della proteina. Sembra infatti che nei fibroblasti dei roditori (30) possano avvenire "splicing" differenziali dell'RNA in relazione al ciclo cellulare, che portano alla formazione di varie molecole di p53 che non presentano il dominio regolatorio carbossi-terminale (24).

Un recente lavoro di T.R. Hupp e D.P. Lane ha dimostrato che i tetrameri della proteina p53 possono essere presenti in una forma latente o in una forma attivata, e che la conversione da una forma all'altra dipende da mo-

dificazioni del sito regolatorio carbossi-terminale. In questo studio, gli autori hanno visto che lo stato latente è dovuto ad interazioni di tipo cooperativo tra i domini regolatori carbossi-terminali delle subunità di p53, in quanto delezioni di questo sito regolatorio determinano una attivazione costitutiva della p53. Modificazioni conformazionali di questi siti, dovute a fosforilazione, determinano l'attivazione delle forme tetrameriche latenti.

Hupp e Lane hanno utilizzato un anticorpo monoclonale, il PAb421, che si lega al tetramero p53 in corrispondenza del sito bersaglio della protein chinasi C e determina la transizione da stato latente a stato attivo. Il legame di questo anticorpo provoca, quindi, una modificazione conformazionale nella p53 tetramericata simile a quella osservata dopo fosforilazione. Sono necessarie due molecole di anticorpo bivalente o quattro frammenti Fab per saturare i quattro siti regolatori carbossi-terminali e per neutralizzarne, quindi, l'azione regolatoria negativa (Fig. 7). Sempre in questo studio, Hupp e Lane hanno individuato un altro anticorpo, ICA-9, che si lega al sito bersaglio della casein chinasi II e che può inibire allostericamente la capacità della p53 di legarsi al DNA (24).

La p53 è, in conclusione, un tetramero regolato in modo allosterico, che normalmente si trova in una forma latente e che può essere attivata con un meccanismo ATP-dipendente dalla protein chinasi C o dalla casein chinasi II. Lo stato di attivazione è, inoltre, reversibile (24). Scoperte di questo tipo sono di enorme importanza da un punto di vista terapeutico, perché aprono le porte alla caratterizzazione di tutta una serie di molecole che potrebbero modulare il legame della p53 al DNA, e in particolare di quelle che potrebbero attivare proteine p53 mutanti e potrebbero dunque consentire di ricondurre ad una regolazione proliferativa normale le cellule tumorali.

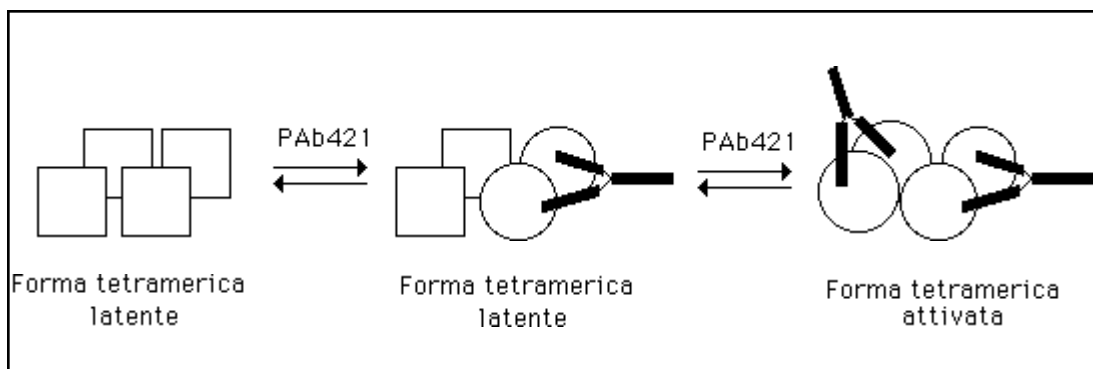


Figura 7. Attivazione della forma tetramericata latente di p53.

Come la p53 sopprime la crescita cellulare

Negli ultimi due anni, lo scopo del lavoro di molti ricercatori è stato quello di chiarire come la p53 “wild type” possa realizzare la sua attività soppressiva della crescita. Si è visto che la proteina p53 è coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, nella riparazione e nella sintesi di DNA, nel differenziamento cellulare, nel mantenimento dell'integrità genomica e nella morte cellulare programmata (apoptosi).

E' stato dimostrato, infatti, che la p53 “wild type” si lega sia al DNA a doppio filamento sia a quello a singolo filamento; che direttamente o indirettamente agisce sull'origine della replicazione del DNA; che ha un ruolo nel metabolismo dell'RNA in quanto catalizza sia la chiusura ad anello sia cambiamenti conformazionali dell'RNA stesso; che, infine, si lega a specifici tratti del DNA che presentano la sequenza di consenso 5'Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(A/T)-G-Py-Py-Py-3'.

Se la p53 lega sequenze specifiche di DNA (dominio carbossiterminale) e contiene un dominio acido aminoterminale di attivazione genica, dovrebbe agire come fattore trascrizionale specifico. Ciò è stato dimostrato unendo la sequenza genica che lega la p53 a monte di un piccolissimo promotore e di un gene “reporter”, e poi analizzando quali fossero gli effetti della p53 sull'espressione di questo gene. Questi esperimenti sono stati realizzati sia in vivo sia in colture di cellule di lievito e umane, e ciò che si è osservato è stata una forte attivazione specifica.

E' opinione comune che molte delle funzioni della p53 siano dovute alla regolazione di geni bersaglio cellulari. Mercer e coll. hanno dimostrato che la soppressione della crescita indotta dalla p53 è accompagnata dalla diminuzione dell'espressione del gene proliferating-cell nuclear antigen (PCNA). Il PCNA codifica per una proteina nucleare che interagisce con la DNA polimerasi come cofattore. Anche l'espressione dell'oncogene *B-myb* e del gene per la DNA polimerasi diminuiscono in relazione al blocco del ciclo cellulare mediato dalla p53. Si pensa che la p53 controlli l'espressione del *B-myb* direttamente e che la proteina di questo oncogene regoli a sua volta la trascrizione del gene PCNA e del gene per la DNA polimerasi (15).

Altri geni regolati positivamente dalla p53 sono: il gene MCK (muscle creatine kinase); l'oncogene MDM2, che codifica per una proteina capace di formare un complesso stabile con la p53; il gene *c-erbA*, che codifica per il recettore dell'ormone tiroideo; il gene *Thy-1* marker di differenziamento; il gene GADD45, la cui espressione è indotta da danni al DNA dovuti a radiazioni ionizzanti ed è associata al blocco del ciclo cellulare in fase G1; il gene p53 stesso; e ultimo, ma di grande interesse, il gene WAF-1/CIP-1 che codifica per una proteina inibitrice delle chinasi ciclina-dipendenti.

La proteina p53 “wild type” può anche reprimere la trascrizione genica, in particolare di quei geni regolati da promotori che contengono sequenze

TATA-box o CAAT-box, probabilmente interagendo con i fattori trascrizionali che si legano a tali sequenze (31).

La proteina p53 interagisce non solo con questi fattori trascrizionali ma anche con molte proteine cellulari, tra cui l'oncoproteina MDM2. Il significato di questa interazione è stato recentemente chiarito: la proteina MDM2 si lega alla p53 a livello del suo dominio acido di attivazione trascrizionale, che in questo modo viene "nascosto" al complesso di trascrizione. L'MDM2 è quindi un regolatore negativo dell'attività soppressiva della crescita della p53 (32, 33, 34).

Poiché la concentrazione intracellulare di MDM2 aumenta in relazione alla presenza di p53, in quanto quest'ultima regola positivamente l'espressione del gene MDM2, ciò che si realizza è un meccanismo di feedback negativo che permette una fine regolazione dell'attività della p53 nella cellula (35, 20).

Nel 30% dei sarcomi umani si ha amplificazione dell'oncogene MDM2, che è localizzato sul cromosoma 12q12-13. La conseguente alta concentrazione di proteina MDM2 porta all'inattivazione funzionale della proteina p53 e all'insorgenza della neoplasia. In questi casi, la p53 non è inattivata da mutazioni geniche, ma dal legame con un'altra proteina cellulare (36, 37).

Oliner e Vogelstein (35) hanno ipotizzato che i tumori che esprimono in maniera anormale alti livelli di MDM2 potrebbero essere trattati introducendo nelle cellule tumorali peptidi che hanno la stessa sequenza aminoacidica del dominio acido aminotermine della p53. In questo modo, i peptidi potrebbero competere con la proteina p53 per il legame con l'MDM2, con la conseguenza che la cellula tumorale riacquisterebbe gran parte della funzione oncosoppressiva della p53. Le cellule tumorali, cioè, potrebbero in questo modo riacquistare il fenotipo normale (35).

Ma se la proteina p53 è un fattore trascrizionale specifico, da un punto di vista funzionale quale è il suo meccanismo d'azione?

Già dal 1984 si sapeva che il trattamento di cellule con raggi UV induce l'accumulo della proteina p53 "wild type" attraverso un meccanismo di stabilizzazione post-trascrizionale. Lo stesso effetto si osserva anche in seguito a trattamento con raggi γ e con farmaci chemioterapici che agiscono sul DNA, con inibitori della topoisomerasi o con sostanze che in qualche modo causano uno squilibrio nel pool di nucleotidi della cellula.

Kastan e coll. hanno poi dimostrato che questo aumento della concentrazione di p53 media l'arresto del ciclo cellulare in fase G1. Al contrario, linee cellulari che non esprimono la p53 "wild type", a causa di mutazioni o delezioni nei loro geni p53, non mostrano arresto in G1 dopo somministrazione di radiazioni (17, 14, 38, 39, 40, 41).

Il modello proposto in base a questi risultati per il ruolo biologico della p53 vede coinvolta questa proteina in una via biochimica indotta dal danno al DNA (Fig. 8). La normale p53 agirebbe dunque come una sorta di "poli-

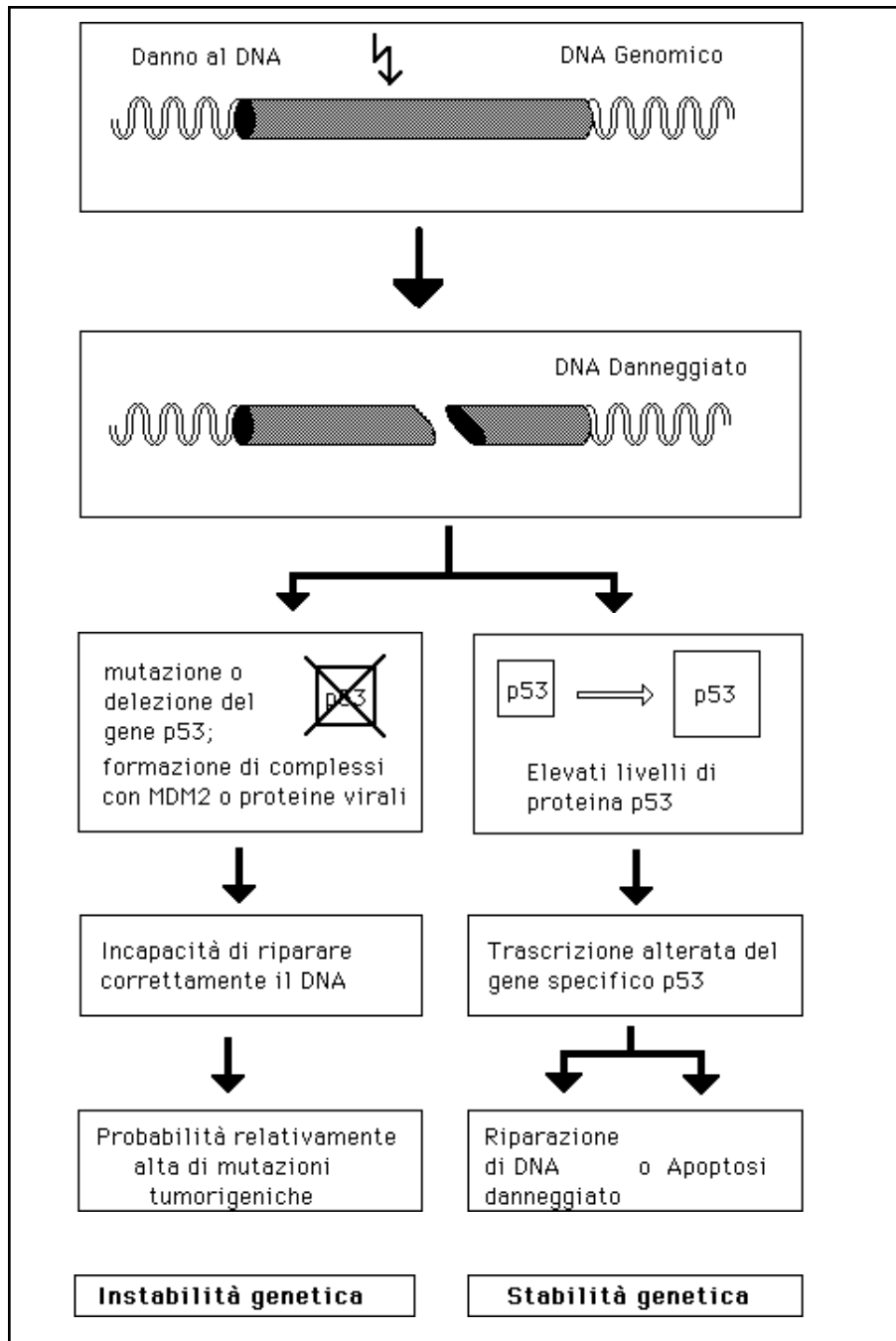


Figura 8. Ruolo dell'ap53 nel controllo dell'integrità genomica.

zitutto molecolare”, controllando l’integrità del genoma. Il danno al DNA indotto dalle radiazioni o UV porta alla stabilizzazione della proteina p53 con un meccanismo post-trascrizionale che determina specifiche modificazioni della proteina. E’ stato dimostrato che gli agenti che danneggiano il DNA e che causano un aumento della concentrazione della p53 inducono anche il legame p53-DNA, probabilmente come conseguenza dei maggiori livelli intracellulari di proteina p53 (42). L’aumentata concentrazione della p53 e il suo legame al DNA portano ad un blocco della replicazione del materiale genetico che permette alla cellula di avere il tempo necessario per riparare il suo DNA danneggiato. Il legame p53-DNA infatti può attivare i geni che arrestano la crescita e/o inibire la trascrizione dei geni che attivano il ciclo cellulare, bloccando così la replicazione del DNA.

Se la riparazione non viene effettuata, la p53 potrebbe dare l’avvio al processo di “suicidio” cellulare, detto apoptosi. Sia la riparazione corretta del DNA sia l’apoptosi sono meccanismi che proteggono l’organismo dalla sopravvivenza di cloni cellulari che presentano danni genetici.

Le cellule che presentano la p53 mutata o legata a proteine cellulari o virali, comunque inattiva, non possono realizzare questo arresto in G1. Queste cellule sono meno stabili, più soggette ad accumulare danni genetici e subiranno una rapida selezione che favorirà lo sviluppo e la propagazione dei cloni maligni.

Il ruolo chiave che la p53 svolge nel mantenimento della stabilità genetica è stato confermato con un elegante studio che mostra una chiara correlazione tra il corretto funzionamento della p53 e la soppressione dell’amplificazione genica (17).

Quando le cellule che contengono p53 “wild type” sono esposte allo N(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA), un inibitore della biosintesi dell’uridina, le cellule si arrestano in fase G1 e non presentano cloni resistenti al farmaco. Al contrario, cellule con p53 inattiva non mostrano arresto in G1 ed hanno un’alta frequenza di cloni resistenti al PALA. La resistenza al farmaco è dovuta ad amplificazione genica dell’operone che codifica per gli enzimi carbamil-P-sintetasi, aspartato transcarbamilasi, e diidroorotasi.

L’amplificazione genica è un buon indice di instabilità genetica ed è di riscontro molto frequente nelle cellule neoplastiche.

Questo esperimento mostra una chiara correlazione tra la perdita della funzione p53 e l’aumento della instabilità genetica. La p53 ha, perciò, un ruolo importante nel mantenimento dell’integrità genomica, la quale può realizzarsi sia perché la p53 potrebbe prevenire i riarrangiamenti che sono alla base dell’amplificazione genica, sia perché potrebbe inibire la crescita di cellule che hanno subito amplificazione (43)

La proteina p53 rappresenta, quindi, un “checkpoint” del ciclo cellulare. Per un corretto svolgimento del processo di duplicazione cellulare sono

necessarie tre classi di molecole: quelle che realizzano la progressione del ciclo cellulare (ciclina, chinasi ciclino-dipendenti); quelle che regolano (e sembrano addirittura "autorizzare") la risposta della cellula ai danni cellulari o ai segnali esterni (i "checkpoints"); e quelle che mediano la comunicazione tra i diversi "checkpoints" e gli effettori del ciclo e che costituiscono la via di trasduzione del segnale.

La maggior parte dei geni oncosoppressori sono "checkpoints", mentre molte oncoproteine sono componenti della via di trasduzione del segnale (recettori per gli ormoni, G-proteins, chinasi, fattori di trascrizione). Il gene p53 è effettivamente un "checkpoint" perché, come tutte le molecole di questo tipo, non è essenziale per la vitalità della cellula, ha un'azione inibitrice sulla progressione del ciclo cellulare ed assicura un'alta fedeltà del processo di duplicazione (43). In particolare, la proteina p53 è un "checkpoint" del passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Recentemente, tre gruppi di ricerca, in maniera indipendente, hanno scoperto un gene regolato dalla p53, il cui prodotto proteico media la funzione soppressiva della crescita che è connessa con l'espressione della stessa p53 (44).

Wade Harper e Stephen Elledge (45) stavano studiando le chinasi ciclino-dipendenti (Cdk), enzimi importanti nella progressione del ciclo cellulare perché, quando sono attivi, fosforilano una serie di proteine (come per esempio la p105Rb) che sono coinvolte nel processo di regolazione della duplicazione cellulare. Le Cdk sono attive da un punto di vista funzionale solo quando sono associate con le cicline, che sono viceversa proteine che agiscono come regolatori positivi delle Cdk.

Harper e Elledge stavano cercando ulteriori regolatori delle Cdk, e sono giunti ad isolare alcuni geni che codificano per proteine che si legano alla Cdk2, un enzima che permette il passaggio dalla fase G1 alla fase S. La proteina codificata da uno di questi geni, chiamato Cip1 (Cdk-interacting protein 1), era un'efficace inibitore della Cdk2 e di altre Cdk. Cip1 è, perciò, un "freno" della duplicazione cellulare: determinate mutazioni in questo gene possono essere causa di crescita neoplastica.

La proteina codificata da Cip1 ha un peso molecolare di 21 Kd, così come la proteina codificata dal gene WAF1, isolato dal gruppo di ricerca di Bert Vogelstein nello stesso periodo. Vogelstein e coll. (46) stavano studiando i geni regolati dalla p53; WAF1 ("wild type" p53-activated fragment 1) è attivato dalla p53 e quando viene introdotto in cellule tumorali inibisce la crescita cellulare così come fa il gene p53. In realtà, fu presto evidente che WAF1 e Cip1 erano la stessa proteina.

Un terzo gruppo, guidato da David Beach e Yue Xiong (47), ha pubblicato contemporaneamente a Vogelstein ed Harper un lavoro su una proteina di 21 Kd che si lega ai complessi ciclina-Cdk, inattivandoli. In questo caso

non era stato clonato il gene, ma gli autori hanno messo in evidenza che questa proteina risulta presente nei complessi ciclina-Cdk nelle cellule normali e risulta invece assente in diverse linee cellulari tumorali, comprese quelle in cui il gene p53 è inattivo. Beach ha ipotizzato, perciò, che la p53 possa regolare l'attività del macchinario di duplicazione cellulare.

Nel promotore del gene WAF1/Cip1 c'è un sito di legame per la p53 a 2,4 Kb a monte della regione codificante, e questo dimostra che WAF1/Cip1 è un gene inducibile dalla p53 (48). Inoltre, la localizzazione nucleare della proteina WAF1/Cip1 è coerente con la sua funzione inibitrice dei complessi ciclina D-Cdk4 e ciclina E-Cdk2 perché le cicline A, D ed E, che sono coinvolte nella progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, sono proteine nucleari.

La p53 promuove l'espressione del gene WAF1/Cip1; il prodotto proteico di questo gene si lega ai complessi ciclina-Cdk e ne blocca l'attività chinastica. La mancata fosforilazione di substrati critici per la progressione del ciclo, come la proteina Rb, determina quindi un blocco in fase G1 (34) (Fig. 9).

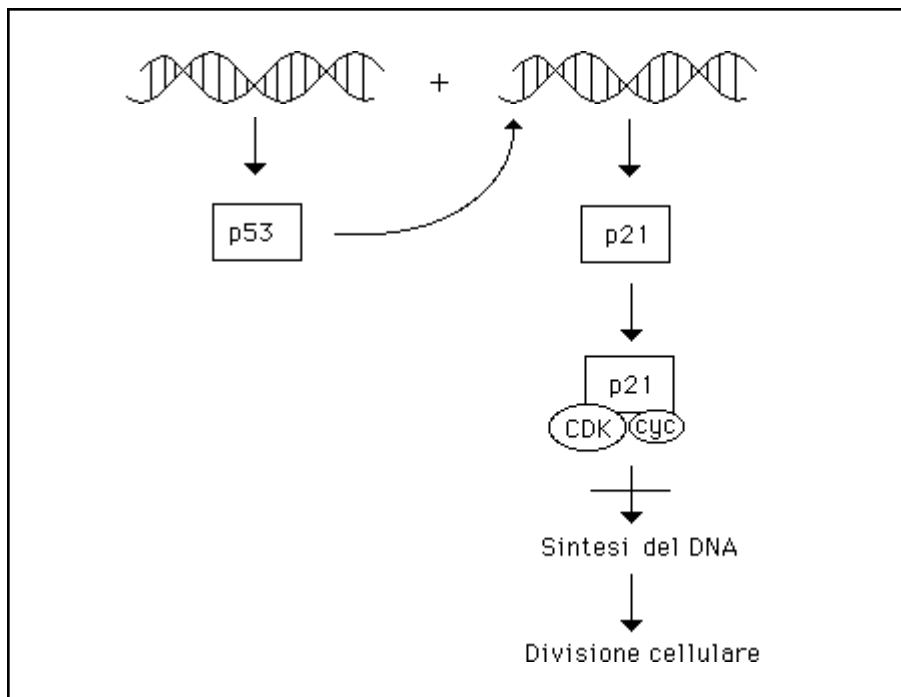


Figura 9. Attivazione p53-dipendente della trascrizione di p21 e regolazione del ciclo cellulare.

Il gene WAF1-Cip1 è inoltre identico ad un gene chiamato sdi1 (senescent cell-derived inhibitor 1) clonato da James Smith e Olivia Pereira-Smith, nel corso dei loro studi sull'invecchiamento cellulare. Il gene sdi-1 è molto più attivo nelle cellule senescenti, inibisce la sintesi di DNA e quindi induce le cellule a perdere la capacità di dividersi.

Recentemente, il gruppo di Nada ha descritto che i livelli di mRNA sdi-1 sono 10-20 volte maggiori nelle cellule senescenti e sono più elevati anche quando le cellule in crescita diventano quiescenti (48).

Studi con anticorpi che riconoscono specificamente le differenti conformazioni della proteina p53 hanno, infine, dimostrato che questa proteina può avere anche una funzione attiva di promozione della crescita cellulare. In particolare, si è visto che quando le cellule arrestate in G0 sono stimolate a riprendere la proliferazione, la p53 cambia la propria conformazione passando da "wild type" (conformazione in cui la p53 sopprime la crescita cellulare) a mutante (conformazione in cui a volte la p53 promuove la moltiplicazione cellulare). Risultati ottenuti da studi di legame della p53 con anticorpi hanno messo in evidenza che la proteina p53 "wild type" assume una conformazione di "tipo mutante" quando è legata al DNA, per via di cambiamenti conformazionali che riguardano sia il terminale aminico che quello carbossilico (49).

Oltre che nella mitosi, la p53 gioca un ruolo anche nel processo meiotico. Topi transgenici che esprimono ridotti livelli di p53, sviluppano una sindrome degenerativa che riguarda la spermatogenesi, detta sindrome degenerativa a cellule giganti. Gli spermatociti primari 4N non subiscono divisione meiotica; inoltre in queste cellule avvengono ulteriori cicli di replicazione del DNA. Si originano così cellule giganti multinucleate (50). In uno studio su questo modello sperimentale, Rotter e Levine hanno visto che, dopo irradiazione, le cellule spermatocitiche realizzano un'intensa riparazione del DNA, che avviene specificamente in fase di pachitene. Spermatociti primari che non esprimono p53 non subiscono, nelle stesse condizioni, una riparazione corretta del DNA (50).

p53 e apoptosi

Mentre in alcuni tipi cellulari l'iperespressione della p53 che si osserva in seguito ad un danno al DNA produce un blocco del ciclo cellulare in fase G1, in altri tipi cellulari la p53 attiva il meccanismo della morte cellulare programmata, o apoptosi (51) (Fig. 10).

L'apoptosi è un fenomeno generale negli organismi multicellulari e sta alla base di processi fondamentali come l'organogenesi, l'omeostasi tissutale e la selezione negativa dei cloni linfocitari autoreattivi. L'apoptosi viene

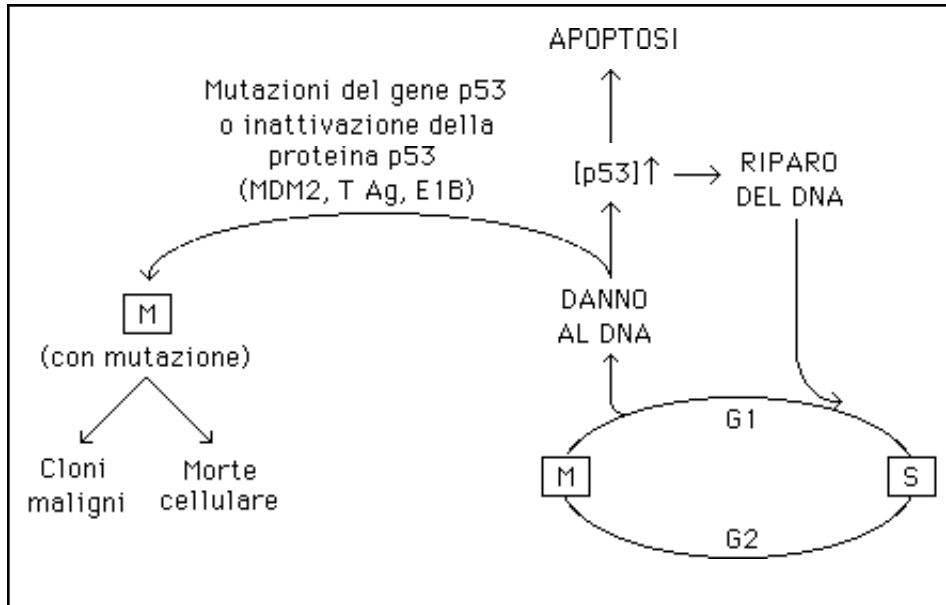


Figura 10. p53 e ciclo cellulare.

indotta non solo dai processi di controllo dello sviluppo, ma anche da insulti tossici per la cellula, ed in particolare da agenti che danneggiano il DNA. Potenti regolatori dell'apoptosi sono il gene *myc* e il gene *bcl-2*. Quando *myc* è iperespresso induce apoptosi, mentre l'iperespressione di *bcl-2* rende le cellule resistenti alla morte cellulare programmata (52).

Il ruolo del gene p53 nell'apoptosi è stato oggetto di recenti studi. Lavori sull'induzione della morte cellulare programmata nei timociti (53, 54, 55, 56) hanno dimostrato che esistono due vie di induzione dell'apoptosi, una p53-indipendente e l'altra p53-dipendente.

Si è visto, infatti, che i timociti che hanno la proteina p53 funzionalmente inattiva mostrano una normale risposta apoptotica al trattamento con glucocorticoidi, ma sono straordinariamente resistenti all'induzione del processo con radiazioni ionizzanti. Questo dimostra che la p53 è essenziale per la risposta apoptotica dovuta a radiazioni ionizzanti e che non partecipa affatto alla risposta indotta dai glucocorticoidi (55).

L'induzione dell'apoptosi da parte della p53 può agire come un meccanismo di difesa per proteggere l'organismo dalla propagazione di cloni cellulari che presentano mutazioni permanenti.

L'esistenza di una via apoptotica che non coinvolge la p53 è stata dimostrata anche da studi relativi a topi transgenici p53-nulli (che sono cioè privi di entrambe le copie del gene p53). Se la proteina p53 fosse coinvolta in

tutte le vie che portano all'apoptosi, lo sviluppo di topi transgenici p53-nulli non sarebbe possibile. Invece, lo sviluppo di questi topi è possibile e produce individui apparentemente normali: essi sono vitali, fertili e immunologicamente competenti. Alcune settimane dopo la nascita, tuttavia, essi sviluppano una serie di tumori infantili in diversi tessuti, evento questo in accordo con il ruolo di mantenimento del fenotipo non tumorale delle cellule che è proprio del gene p53 (34).

L'apoptosi indotta da p53 sembra capace di modulare l'attività citotossica di alcuni farmaci antitumorali. Un recente studio (57) sulla relazione esistente tra funzione p53 e sensibilità o resistenza a vari agenti antitumorali ha dimostrato che la p53 è necessaria per la morte cellulare programmata che viene indotta indirettamente da questi farmaci. Le cellule tumorali con mutazioni p53 potrebbero, perciò, diventare addirittura resistenti agli agenti antitumorali.

Proteina p53 mutata e carcinogenesi

Il gene p53 è uno dei geni che si trovano più frequentemente mutati nei tumori umani. La perdita della funzione oncosoppressiva della p53 è in molti casi un evento tardivo associato con la progressione del tumore da neoplasia benigna a neoplasia maligna. Nei carcinomi mammari (58, 59), polmonari (60, 61), prostatici (62-72, 106) e renali (73), nel neuroblastoma (74), nei carcinomi della testa e del collo (75), nell'epatocarcinoma (76, 77) e nel melanoma (78) le mutazioni del gene p53 e l'accumulo della proteina anomala sono particolarmente rilevanti nei casi che clinicamente risultano più aggressivi e meno differenziati. Nel carcinoma esofageo e nel carcinoma ovarico, le mutazioni p53 sembrano essere, invece, eventi precoci dello sviluppo tumorale (79, 80) (Tab. 2).

Un caso particolare sembra essere il tumore del testicolo, nel quale non sono state trovate mutazioni del gene p53 (81). Probabilmente, è la disfunzione di altri geni oncosoppressori ancora sconosciuti a determinare lo sviluppo dei tumori testicolari.

Nei sieri di pazienti con carcinomi della mammella e del polmone, e in quelli di bambini affetti da linfoma B sono stati trovati anticorpi anti-p53 (82, 83). Sembra anzi che ci sia una correlazione tra sieropositività per tali anticorpi e presenza di mutazioni del gene p53. Questi anticorpi risultano però reattivi sia con la forma "wild type" della p53, sia con le forme mutate, in quanto essi reagiscono con le estremità carbossilica e aminica della proteina (regioni in cui non avvengono generalmente mutazioni di rilievo). Probabilmente, la presenza di questi anticorpi nel siero di pazienti affetti da neoplasia può essere spiegata come sviluppo di una risposta immune

TUMORE	PERCENTUALE DI CAMPIONI CON p53 MUTATA
Leucemia mieloblastica acuta	6
Tumori del cervello	10
Tumore della mammella	53-86
Linee cellulari di linfoma di Burkitt	60
Tumore coloretale	50
Carcinomi epiteliali	48
Tumori esofagei	50
Carcinoma gastrico	57
Epatoma HBV positivo	18
Carcinoma del polmone a piccole cellule	44-73
Carcinoma del polmone non a piccole cellule	45
Adenocarcinoma polmonare	57
Carcinoma a cellule squamose del polmone	34-82
Astrocitoma maligno	30
Melanoma (promario)	97
Mieloma multiplo	20
Linee cellulari di neuroblastoma	80
Linee cellulari di osteosarcoma	90
Osteosarcomi	41
Carcinomi ovarici	44
Carcinomi pancreatici	40
Rabdomiosarcomi	45
Carcinomi a cellule squamose della laringe	60
Carcinomi tiroidei	50

Tabella 2. Percentuale di mutazione del gene p53 in vari tumori umani.

indotta da una quantità di p53 non fisiologica, che viene liberata in grande abbondanza dalle cellule tumorali in necrosi.

La localizzazione e le caratteristiche delle mutazioni p53 possono inoltre rappresentare importanti indicatori dell'eziologia e della patogenesi molecolare dei tumori.

Alcune forme mutanti di p53 non solo perdono la funzione soppressiva sulla crescita cellulare propria della proteina "wild type", ma acquistano anche nuove funzioni tumorigeniche. In generale, le cellule tumorali che presentano mutazioni nei geni p53 possono essere classificate come segue.

Ad una prima classe appartengono le cellule tumorali che non esprimono affatto la proteina p53.

Una seconda classe è formata da cellule che hanno una delezione ereditaria di un allele p53 (condizione, questa, nota come sindrome di Li-Fraumeni) cui si aggiunge una mutazione somatica nel secondo allele; è questo un caso di perdita di eterozigosi che determina l'espressione da parte della cellula di un mutante p53 funzionalmente inattivo.

Le cellule di queste prime due categorie sono spesso sensibili alla reversione del fenotipo tumorigenico con l'introduzione e l'espressione di p53 "wild type" esogena.

Una terza classe comprende tutte quelle cellule tumorali che esprimono un mutante p53 dominante-negativo (84). Queste proteine mutanti hanno la capacità di interferire con la funzione della p53 "wild type", probabilmente perché formano con la p53 "wild type" etero-oligomeri inattivi, incapaci di attivare la trascrizione dei geni bersaglio della p53. L'osservazione, tuttavia, che la maggior parte dei tipi cellulari tumorali che presentano mutazioni nel gene p53 hanno anche perduto l'altro allele p53 "wild type" sembra indicare che le mutazioni dominanti negative siano in realtà piuttosto rare.

Di grande interesse sono invece le mutazioni che portano ad un "acquisto di funzione" da parte della proteina p53. Questi mutanti hanno la capacità di stimolare il fenotipo tumorale in quanto, oltre ad aver perso la capacità di sopprimere la crescita, hanno anche acquistato una funzione di tipo oncogenico dominante.

L'iperespressione della p53 mutante in cellule di colture primarie di ratto porta ad immortalizzazione delle cellule stesse, mentre la coespressione di p53 mutante e di oncogeni attivati determina la trasformazione neoplastica (p. es. in fibroblasti primari di ratto). In realtà, non tutti i mutanti hanno lo stesso potere tumorigenico. La natura della mutazione, la capacità di formare oligomeri e la localizzazione cellulare della proteina sono tutti fattori che influenzano la capacità trasformante dei mutanti p53 (25).

Tutti i mutanti p53, comunque, sono incapaci di sopprimere la crescita cellulare. Il loro potere oncogeno sembra essere una conseguenza diretta dell'inefficiente legame con il DNA, piuttosto che della mancata oligomerizzazione (25).

Le mutazioni riscontrate nel gene p53 sono generalmente mutazioni puntiformi di senso, che danno origine ad una proteina alterata. Queste mutazioni sono state trovate, nella vasta serie dei tumori esaminati, particolarmente concentrate in quattro regioni della proteina p53, che sono altamente conservate nell'evoluzione. Queste regioni comprendono i codoni 117-142, 171-181, 236-258 e 270-286. Ci sono, nella fattispecie, tre residui che appaiono come "punti caldi" di mutazione ("hot spots" situati nei residui n. 175, 248 e 273 del peptide) (85), che in uno studio che ha esaminato più di duecento mutazioni puntiformi sono risultati essere coinvolti in circa il 30% dei casi (Fig. 11). La frequenza e la distribuzione di questi "hot spots" varia

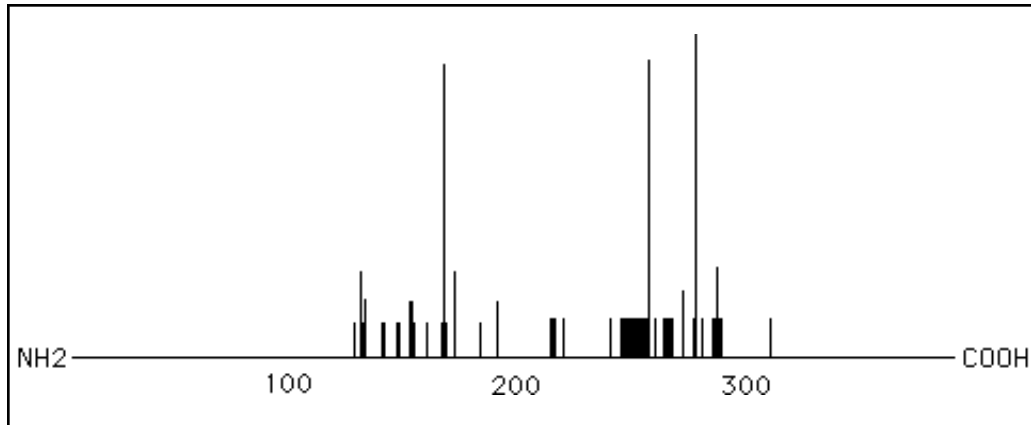


Figura 11. Distribuzione delle mutazioni nel gene p53 umano.

nei diversi tipi tumorali, probabilmente in relazione al tipo e alla quantità di mutagene che può raggiungere il tessuto ed anche in relazione alle diverse pressioni selettive sulla crescita cellulare alle quali il tessuto è sottoposto (86).

Oltre alle mutazioni puntiformi, che sono quelle che intervengono più frequentemente nell'inattivazione del gene p53, sono state trovate anche piccole delezioni o inserzioni nel gene, nonché alterazioni della proteina dovute al legame con oncoproteine virali o cellulari, che inibiscono la capacità della p53 "wild type" di legarsi al DNA e di attivare la trascrizione genica.

Le forme mutate di p53 hanno alcune caratteristiche generali che le contraddistinguono dalla p53 "wild type". In particolare, hanno un tempo di emivita molto maggiore e di conseguenza una concentrazione intracellulare molto più elevata; hanno una conformazione diversa e quindi espongono epitopi non presenti nella conformazione "wild type"; hanno perso la capacità di legarsi a polipeptidi virali come l'antigene "large T" di SV40; si legano alla componente hsc70 delle heat shock proteins; ed inoltre non sono capaci di regolare i promotori dei geni attivati dalla p53 "wild type" perché non si legano in modo efficace al DNA. Bisogna, tuttavia, sottolineare che queste caratteristiche dei mutanti p53 pur essendo generali non sono assolute. Esistono, ad esempio, forme di p53 mutata che conservano la capacità di legarsi ad oncoproteine virali come l'antigene "large T" di SV40.

Lo spettro di mutazioni del gene p53 può dare informazioni sui particolari carcinogeni e sui meccanismi biologici che intervengono nella formazione di uno specifico tumore. Infatti, differenti carcinogeni causano varie mutazioni caratteristiche. Ad esempio, le radiazioni UV determinano transizioni a livello di siti dipiridinici sul DNA; l'esposizione

all'aflatossina B1 è correlata a trasversioni da G:C a T:A che portano ad una sostituzione aminoacidica del residuo 249 della p53 nel carcinoma epatocellulare; l'esposizione al fumo di sigaretta provoca trasversioni da G:C a T:A nei carcinomi del polmone, della testa e del collo e uroteliali (87, 75, 88).

Lo spettro mutazionale del gene p53 può anche rivelare un coinvolgimento di meccanismi mutagenici endogeni nella formazione del tumore. Ad esempio, l'alta frequenza di transizioni da C a T in siti dinucleotidici CpG nel carcinoma del colon è molto probabilmente dovuta a meccanismi di deaminazione endogena.

Queste conoscenze sul tipo e sul numero di mutazioni che riguardano il gene p53 e sulla specifica relazione tra mutazione ed esposizione ad un particolare carcinogeno sono di grande interesse, perché permettono di identificare tra i soggetti sani le persone ad alto rischio per lo sviluppo di una neoplasia, e possono permettere di ottenere, in questo modo, una diagnosi precoce che dovrebbe consentire un miglioramento dell'approccio terapeutico alla malattia.

Inoltre mutazioni di questo genere potrebbero avere diverse e precise connotazioni prognostiche e terapeutiche nelle varie forme neoplastiche in campo clinico.

Altri geni oncosoppressori

Esiste ormai un lungo elenco di tumori che sembrano essere causati dalla perdita di entrambe le copie di un gene oncosoppressore.

Nel processo di carcinogenesi che porta al tumore della mammella, per esempio, è coinvolto un gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13; nel nefroblastoma, o tumore di Wilms, è interessato un gene sul cromosoma 11, e il carcinoma polmonare a piccole cellule è apparentemente dovuto alla mancanza di un gene sul cromosoma 3. In tutti questi casi, sembra che entrambe le copie di uno specifico gene vengano frequentemente perse o rese inattive durante l'evoluzione del clone di cellule tumorali. Questa specificità tissutale (ossia l'associazione della perdita di certi geni con specifici tipi di tumore) fa pensare che ciascuno di questi geni sia normalmente coinvolto nella limitazione della crescita di una ristretta gamma di tipi cellulari (2) (Tab. 3).

GENE ONCOSOPPRESSORE	LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA	NEOPLASIA
RB1	13q14	Retinoblastoma, Sarcomi
WT1	11p13	Tumore di Wilms
p53	17p13	Sarcomi, gliomi e carcinomi
NF1	17q11	Sarcomi e gliomi
NF2	22q12	Tumori del nervo acustico, Meningiomi, Schwannoma
VHL	3p25	Feocromocitoma e Carcinoma renale
APC	5q21	Carcinoma del colon
DCC	18q21	Carcinoma del colon
p16	9p21	Sarcomi, gliomi e carcinomi
BRCA1	17q21	Carcinoma mammario e ovarico
BRCA2	13q12-13	Carcinoma mammario

Tabella 3. Principali geni oncosoppressori.

Il tumore di Wilms è stato il secondo tumore, dopo il retinoblastoma, per il quale è stata riconosciuta l'esistenza di due forme, una ereditaria e una sporadica. Il tumore di Wilms è una neoplasia renale embrionale (89) che colpisce circa un bambino su 10.000. Il gene oncosoppressore WT1, la cui delezione è associata con la formazione di questo tipo di tumore, è localizzato sul cromosoma umano 11p13 (90, 91). Il prodotto proteico di questo gene è un fattore trascrizionale nucleare (92).

I pazienti che presentano mutazioni costitutive o delezioni del gene WT1 non sembrano essere predisposti all'insorgenza di altri tipi di neoplasie.

Come il gene Rb, anche WT1 è un gene recessivo letale per lo sviluppo, mentre la condizione eterozigote aumenta fortemente la probabilità di sviluppo di tumore. Il tumore di Wilms si differenzia, però, dal retinoblastoma per altri aspetti. Mentre il gene Rb sembra essere il solo gene coinvolto, se mutato, nell'insorgenza del retinoblastoma, nel caso del tumore di Wilms solo il 10-20% delle neoplasie può essere attribuita a mutazioni WT1. Una malattia ereditaria rara, la sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS), determina anch'essa l'insorgenza di questo tumore. Il gene BWS non è stato ancora clonato, ma sembra che non sia propriamente un gene oncosoppressore. Questo gene è localizzato nella regione cromosomica 11p15, a considerevole distanza da WT1. In questa stessa regione è localizzato il gene per il fattore di crescita insulino-simile di tipo 2 (IGF2), il cui prodotto proteico è espresso in quantità elevate sia nel rene fetale che nel tumore di Wilms, ma non nel rene dell'adulto. Inoltre, è stato dimostrato che la proteina codificata dal gene WT1 può reprimere la trascrizione del gene IGF2 in vitro, legandosi alla regione regolatoria 5' di quest'ultimo. Sembra, perciò, che nello sviluppo del tumore di Wilms siano coinvolti almeno due geni in equilibrio tra loro; la mutazione dell'oncogene BWS porta ad iperespressione di un fattore di crescita per le cellule renali, mentre la mutazione del gene oncosoppressore WT1 determina la perdita della regolazione negativa della trascrizione del gene BWS (5).

I geni p53, Rb e WT1 codificano tutti per fattori trascrizionali nucleari. L'attività delle proteine oncosoppressive non è, però, limitata solamente al nucleo. La localizzazione dei prodotti genici oncosoppressori e le loro attività sono molto varie. Ad esempio, il gene DCC (Deleted in Colon Cancer) codifica per una proteina della superficie della membrana cellulare, coinvolta nell'adesione cellulare (92, 5). Questo gene è stato originariamente identificato nel carcinoma del colon, nel quale mostra un'alta frequenza di delezione. Recentemente, il gene oncosoppressore DCC è stato parzialmente clonato ed è stato localizzato sul cromosoma 18q21.3. Oltre che nel carcinoma del colon, il gene DCC è coinvolto anche nella carcinogenesi di altre neoplasie, come il carcinoma pancreatico, quello gastrico, quello esofageo e quello prostatico (93).

Il prodotto proteico codificato dal gene DCC è una molecola che ha un'alta omologia con le molecole di adesione cellulare neutre. Le molecole di adesione sono recettori di superficie che giocano un ruolo critico sia durante processi fisiologici come l'embriogenesi, la trombosi, la guarigione delle ferite e la migrazione cellulare, sia durante processi patologici come la progressione tumorale e la metastasi. E' stato dimostrato, infatti, che l'espressione del gene DCC è inversamente proporzionale al potenziale metastatico delle cellule tumorali. Nel tumore del colon, l'espressione del gene DCC è realmente ridotta durante la progressione tumorale da carcinoma intramucosale a carcinoma invasivo. Queste osservazioni dimostrano che il gene DCC può agire come un soppressore metastatico.

Un altro gene oncosoppressore, denominato NF-2 (neurofibromatosis type 2), codifica per una proteina non localizzata nel nucleo ma associata al citoscheletro (92). Il termine neurofibromatosi è associato, in realtà, con due diverse patologie, quella di tipo 1 e quella di tipo 2. Il gene NF1 predispone a vari tumori, tra cui il neurofibrosarcoma, il glioma, lo schwannoma maligno ed il feocromocitoma e, con bassa frequenza, anche a leucemie, rhabdomyosarcoma e tumore di Wilms.

Il gene NF1 è stato mappato sul cromosoma 17q11, e codifica per una proteina espressa in modo ubiquitario: la neurofibromina. La funzione della proteina codificata da questo gene è simile a quella del prodotto del gene GAP (GTPase-activating protein): la perdita della sua attività determina una mancata idrolisi del GTP a GDP da parte delle proteine RAS. Poiché le proteine RAS vengono inattivate quando il GTP viene idrolizzato a GDP, l'NF1 agirebbe come un freno dell'attività RAS. E' questo un altro chiaro esempio di inibizione di un oncogene da parte di un gene oncosoppressore (3).

La neurofibromatosi di tipo 2 è una patologia meno comune di quella di tipo 1, ed ha un'alta penetranza e una grande specificità per i tumori del nervo acustico e per i meningiomi.

Il gene NF2 invece è stato mappato sul cromosoma 22q12 ed il suo prodotto proteico codificato è un membro di una famiglia di proteine che connettono la membrana al citoscheletro (3). Il citoscheletro è formato da una rete di proteine filamentose le cui funzioni realizzano principalmente il mantenimento della forma cellulare, ma che sono anche strettamente connesse con la motilità e le attività secretorie. Questa complessa struttura è spesso disorganizzata nelle cellule tumorali; si è sempre pensato che questo fatto fosse un effetto secondario della perdita del controllo della crescita. Il ruolo del gene oncosoppressore NF2 dimostrerebbe invece il contrario: può essere anche la disorganizzazione del citoscheletro a provocare una crescita cellulare anormale (92).

Un altro gene oncosoppressore che codifica per una proteina localizzata nella membrana, o in una sede vicina ad essa, è stato clonato recentemente

da Michael Lerman e Bert Zbar. Questo gene, se mutato, causa la malattia di von Hippel-Lindau (VHL), una rara ma letale condizione che predispone gli individui affetti ad una sorprendente varietà di tumori, tra cui quelli dell'occhio, del rene e del cervello (5). Il gene VHL è localizzato sul cromosoma 3p25-26 e codifica per una proteina la cui funzione non è ancora chiara con certezza, ma che sembra essere una proteina di membrana (92).

Un gene oncosoppressore il cui prodotto proteico ha una localizzazione citoplasmatica è il gene APC (adenomatous polyposis coli) (92). Persone eterozigoti per una mutazione nel gene APC mostrano una condizione ereditaria che predispone alla formazione di tumore detta poliposi adenomatosa familiare (FAP). Il gene APC è localizzato sul cromosoma 5q21 e codifica per una proteina a localizzazione citoplasmatica sulla cui funzione non si hanno ancora molte informazioni. Probabilmente essa interagisce con altre proteine citoplasmatiche, che forse possono essere il prodotto proteico di qualche oncogene (5).

Recentemente, è stato identificato un nuovo gene oncosoppressore, il p16, che sembra mostrare una frequenza di mutazione addirittura superiore a quella del gene p53 in un'ampia varietà di tumori.

Questo gene è stato scoperto studiando le condizioni di predisposizione al melanoma; il gene è stato localizzato sul cromosoma 9p21 e codifica per la proteina p16 (Fig. 12). Questa proteina è un componente del macchinario del ciclo cellulare, e in particolare si lega, inibendola, alla chinasi ciclino-dipendente 4 (Cdk4). Il gene p16 è, perciò, un gene oncosoppressore (94). Anche il prodotto proteico del gene WAF1, controllato dal gene p53, ha lo stesso tipo di attività inibitoria sulle Cdk. Sembra, infatti, che il normale controllo della crescita cellulare richieda un delicato equilibrio tra le cicline, che sono attivatori delle Cdk, e gli inibitori relativi come la p16 e WAF1. Qualsiasi fattore che determini una iperattività delle Cdk, o per produzione eccessiva delle cicline o per perdita o inibizione delle proteine "freno" come p16 e/o WAF1, causerà una crescita incontrollata che porterà allo sviluppo del tumore (95, 96).

Un altro gene oncosoppressore recentemente clonato è il gene BRCA1, il quale, se mutato, predispone le donne allo sviluppo di carcinoma mammario e ovarico. Questo gene è localizzato sul cromosoma umano 17q21 e codifica per una proteina di 1863 aminoacidi che presenta un dominio "zinc-finger" nella regione aminotermine. Le strutture "zinc finger" sono tipiche di proteine che interagiscono direttamente con il DNA e che funzionano come regolatori dell'espressione genica (fattori di trascrizione). Il gene BRCA1 consiste di 21 esoni e l'RNA messaggero trascritto può subire "splicing" alternativi che danno origine a forme diverse e tessuto-specifiche della proteina. Recenti studi hanno dimostrato che le mutazioni che riguardano questo gene non sono presenti nella maggior parte dei casi di tumore della

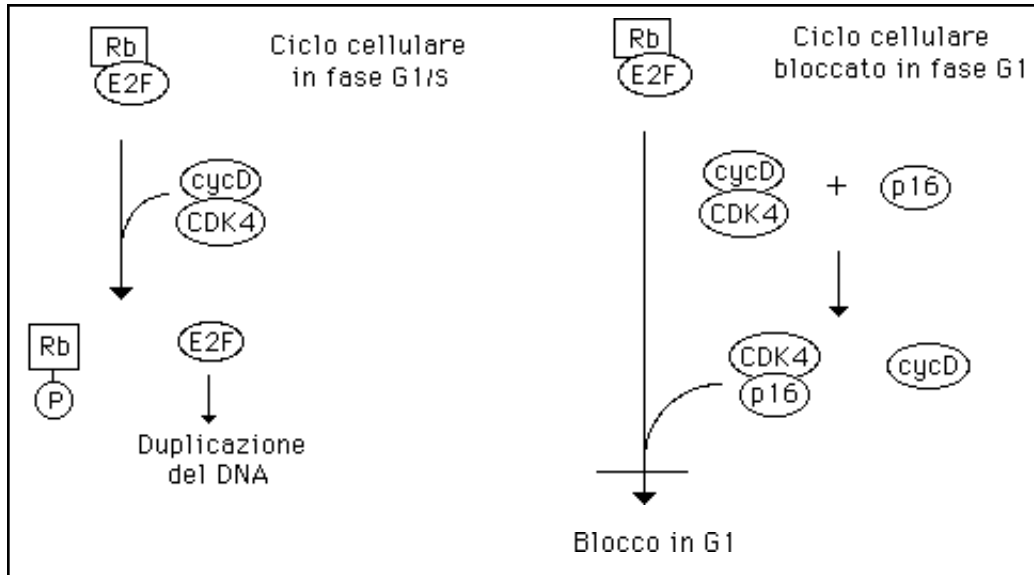


Figura 12. Meccanismo d'azione della proteina p16.

mammella e dell'ovaio di tipo sporadico. Mutazioni del gene BRCA1 sono, invece, maggiormente associate ai tumori mammari e ovarici di tipo ereditario. Questo fatto potrebbe implicare che i meccanismi molecolari che sono alla base del carcinoma ovarico e mammario di tipo sporadico sono diversi da quelli implicati nell'insorgenza delle stesse neoplasie di tipo ereditario. Ed infatti, recentemente è stato mappato un altro gene associato con il carcinoma della mammella, il gene BRCA2. Questo gene si trova sul braccio lungo del cromosoma 13 (bande 12 e 13), e differisce dal gene BRCA1 per due aspetti: esso sembra predisporre sia gli uomini che le donne al carcinoma mammario, e, a differenza del gene BRCA1, non sembra conferire predisposizione al tumore dell'ovaio (97).

La conoscenza dei geni oncosoppressori coinvolti nello sviluppo delle singole neoplasie e della loro attività è di enorme interesse, da un punto di vista terapeutico, in quanto potrebbe consentire di mettere a punto nuove strategie di trattamento sia farmacologiche, sia di ingegneria genetica. Conoscendo l'attività della proteina oncosoppressiva è possibile, infatti, progettare nuovi farmaci che ne ripristinino la funzione o che possano simularla. La conoscenza della sequenza genica dell'oncosoppressore permette, altresì, di introdurre nelle cellule tumorali copie del gene "wild type" che possono ripristinare il fenotipo normale.

Il modello della carcinogenesi del colon

Il processo in base al quale una cellula normale può trasformarsi in una cellula tumorale è detto carcinogenesi ed è stato ampiamente studiato negli animali da esperimento e nelle colture in vitro di cellule animali e umane. Questi studi hanno dimostrato che sono necessarie tre fasi perché il processo carcinogenetico si attui: l'induzione, la promozione e la progressione (per una rassegna di questi e di altri concetti di base della crescita neoplastica vedi Bologna M., 1988).

La prima fase è quella in cui un agente esterno, detto induttore tumorale, genera una mutazione nel DNA. Se la cellula sopravvive con il DNA danneggiato, e se un promotore tumorale (endogeno o ambientale) la stimola a moltiplicarsi, è possibile che la cellula perda la capacità di rispondere agli stimoli inibitori della crescita ed entri in uno stato di proliferazione continua (fase di promozione) dando origine ad un clone di cellule mutate (tumore).

A questo punto la neoplasia è insorta. Le cellule si moltiplicano in modo incontrollato e accumulano errori genetici che determinano la morte di alcune di esse e lo sviluppo di caratteristiche nuove in altre. Si creano, così, nuovi ceppi neoplastici più resistenti, che sopravvivono meglio agli attacchi immunitari dell'ospite e alle difficoltà di ossigenazione e di nutrimento e che acquistano la capacità di invadere anche a distanza i tessuti dell'ospite (metastasi). Questo processo costituisce la terza fase della carcinogenesi, la progressione, in cui si manifestano le capacità più invasive e distruttive delle cellule tumorali.

Vogelstein e coll. hanno studiato il processo carcinogenetico nel caso dei tumori coloretali. Queste neoplasie rappresentano un ottimo sistema per la ricerca e lo studio delle alterazioni genetiche coinvolte nello sviluppo di un tumore nell'uomo. E' infatti possibile ottenere campioni dei tumori coloretali a diversi stadi di sviluppo, dal piccolo adenoma fino al carcinoma metastatico, cosa non realizzabile nella maggior parte dei tumori localizzati in altri distretti corporei (98).

I tumori coloretali maligni (carcinomi) derivano quasi tutti, se non tutti, da adenomi preesistenti (tumori benigni), i quali gradualmente acquistano caratteristiche crescenti di volume, di displasia e di villosità. Lo sviluppo di un tumore coloretale prevede alcune fasi distinte. Inizialmente si ha iperproliferazione dell'epitelio, seguita poi dalla formazione di un adenoma. Quest'ultimo presenta una morfologia tissutale ancora riconoscibile ed è

piccolo nella fase di adenoma precoce, mentre aumenta di dimensioni ed è morfologicamente irregolare e disordinato nella fase di adenoma tardivo. Le fasi successive sono la formazione di un carcinoma e infine la metastasi.

Vogelstein ha dimostrato che sono necessari eventi mutazionali multipli, inclusi l'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di geni oncosoppressori, perché le cellule normali dell'epitelio intestinale diano origine ad un tumore (Fig. 13).

In circa il 50% degli adenomi e dei carcinomi coloretali è stata osservata una attivazione marcata dell'oncogene *ras*. In alcuni casi questo è l'evento iniziale; gli adenomi che presentano mutazioni *ras* possiedono una maggiore capacità di progressione rispetto a quelli che non hanno tale mutazione. In altri casi, invece, le mutazioni dei geni *ras* non rappresentano l'evento iniziale ma avvengono solo nelle cellule che formano già un adenoma.

Dopo le mutazioni *ras* si manifestano, in sequenza, 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) (98).

Nei pazienti con polipi adenomatosi familiari (PAF) esiste una mutazione ereditaria sul cromosoma 5q. In quelli senza polipi interviene comunque una mutazione a tale livello, che conferisce un atteggiamento iperproliferativo all'epitelio.

Nel 70% dei carcinomi e nel 50% degli adenomi tardivi del colon-retto si ha una delezione del cromosoma 18 che riguarda il gene DCC. Questo gene, così chiamato perché è depresso nel carcinoma del colon, codifica per una proteina formata da poco meno di mille aminoacidi che ha una sequenza molto simile a quella delle molecole di adesione cellulare (proteine che sono coinvolte nella comunicazione tra cellule). La perdita di questo gene rappresenta, perciò, una tappa importante nel processo di sviluppo tumorale, in quanto vengono alterate le normali interazioni tra cellula e cellula e tra cellula e matrice; questo fatto implica una diminuzione dei segnali inibitori della crescita che arrivano alla cellula e che sono associati a tale adesione (7).

Delezioni che riguardano il braccio corto del cromosoma 17 sono state osservate in più del 75% dei casi di carcinoma coloretale. Tale perdita è, invece, relativamente poco frequente in tutti i casi di adenoma che sono stati esaminati. Inoltre, in diversi pazienti si è visto che c'è associazione tra delezione del cromosoma 17p e progressione del tumore da adenoma a carcinoma.

La regione deleta sul cromosoma 17p riguarda in particolare la regione che contiene il gene oncosoppressore p53. Si è, inoltre, osservato che nei tumori coloretali che presentano una delezione di tale gene si hanno anche mutazioni puntiformi nel restante allele p53. Entrambe le copie del gene sono perciò funzionalmente inattive.

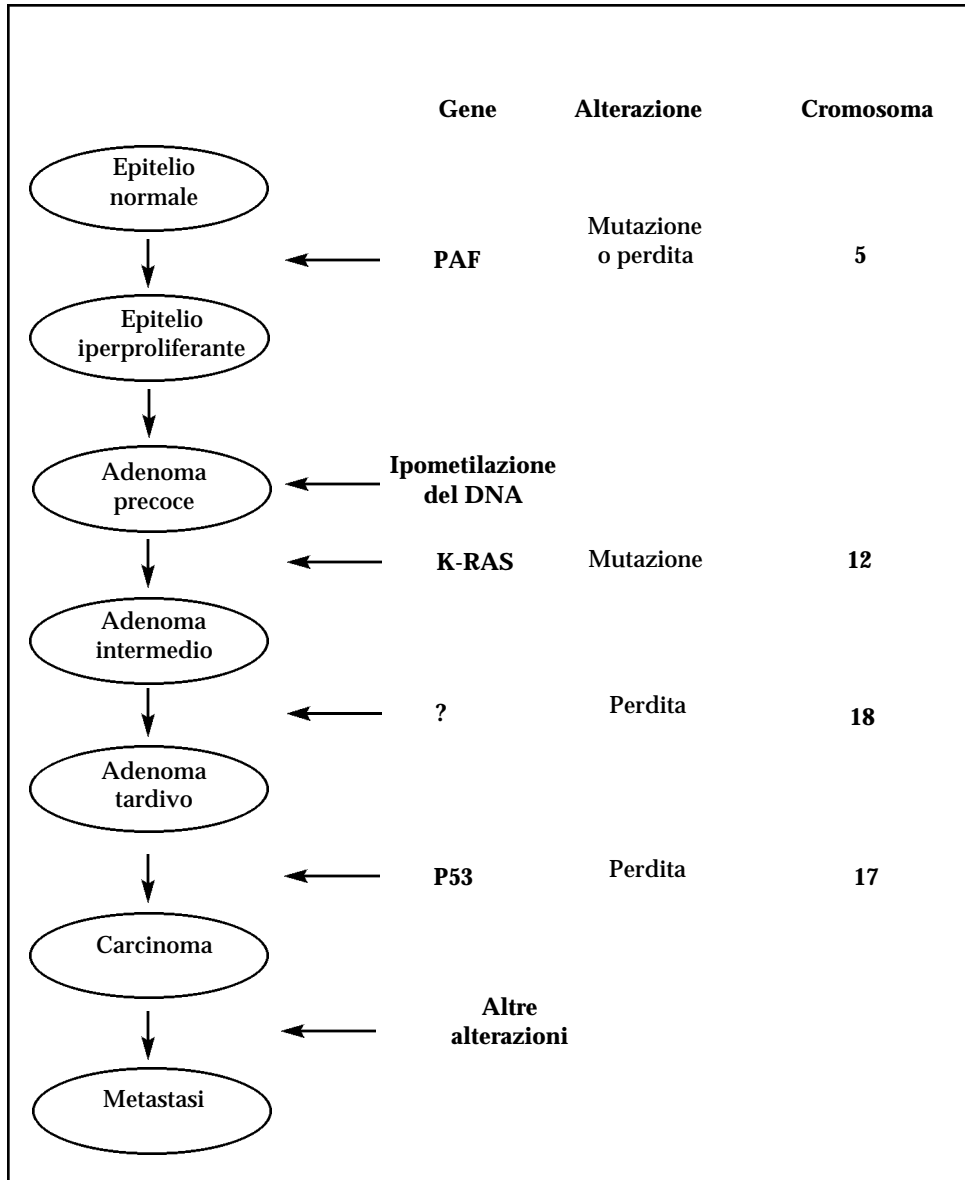


Figura 13. Fasi delle alterazioni genetiche che si instaurano nel corso della storia naturale del carcinoma del colon. (da Fearon e Vogelstein, 1990, ridisegnata).

Nei tumori coloretali, oltre alle delezioni dei cromosomi 5q, 17p e 18q, Vogelstein ha anche riscontrato l'esistenza di un'altra serie di delezioni cromosomiche che ricorrono nel 25-50% dei casi studiati, e che riguardano i cromosomi 1q, 4p, 6p, 6q, 8p, 9q e 22q. Probabilmente, alcune regioni cromosomiche, ed in particolare quelle che riguardano il 17p e il 18q, presentano delezioni nella maggior parte dei carcinomi coloretali in quanto contengono geni oncosoppressori particolarmente importanti. Altre alterazioni cromosomiche, invece, possono insorgere in vari modi. Una ipotesi è che tali delezioni non abbiano un effetto specifico sul fenotipo della cellula neoplastica, ma insorgano invece in associazione con altre alterazioni genetiche coinvolte nella carcinogenesi, ad esempio in seguito ad un evento mitotico in cui segregano cromosomi aberranti. Un'altra possibilità è che molti geni oncosoppressori siano dispersi nel genoma e che ogni cromosoma che presenta una regione deleta contenga uno di questi geni.

Un altro tipo di alterazione che avviene precocemente nella carcinogenesi del colon è una significativa perdita di gruppi metile nel DNA. L'analisi del DNA prelevato da cellule di un piccolo adenoma ha dimostrato che circa un terzo dei gruppi metile normalmente presenti nel DNA delle cellule della mucosa intestinale sono persi invece in queste cellule. E' stato dimostrato che l'ipometilazione del DNA inibisce la condensazione dei cromosomi e questo potrebbe determinare una non disgiunzione mitotica che può avere come conseguenza una perdita o un acquisto di cromosomi. Così, un cambiamento epigenetico come l'ipometilazione può contribuire all'instabilità genomica nelle cellule tumorali e può variare la velocità con cui avvengono le alterazioni genetiche (ad es. le delezioni cromosomiche).

Sebbene sia stato dimostrato che generalmente ognuna delle alterazioni genomiche avviene in fasi caratteristiche della progressione tumorale, Vogelstein ritiene che il fatto importante in questo fenomeno sia soprattutto il progressivo accumulo di alterazioni, piuttosto che il loro ordine sequenziale.

Un'altra considerazione di particolare interesse, tra quelle avanzate a questo proposito, è che le quattro alterazioni genetiche descritte (mutazioni del gene *ras* e delezioni cromosomiche 5q, 17p e 18q) avvengono (in modo abbastanza sorprendente) con frequenza simile in gruppi etnici diversi e in popolazioni geograficamente separate. Potrebbe esistere, pertanto, un qualche legame logico o funzionale tra le diverse alterazioni geniche osservate, ma la conoscenza di tale legame è un elemento che risulta al momento attuale ancora sfuggente.

Estensione del modello del cancro del colon ad altre neoplasie

Abbiamo un numero sempre più ampio di dimostrazioni, giorno dopo giorno, che ci autorizzano ad affermare che probabilmente in tutti i tumori l'attivazione di oncogeni e l'inattivazione di geni oncosoppressori sono eventi fondamentali coinvolti nel processo di sviluppo del tumore stesso.

Sebbene il modello di Vogelstein per la carcinogenesi del colon non sia stato ancor oggi dimostrato in modo completo nel caso di altre neoplasie umane, è però ragionevole pensare che anche in questi casi si realizzi un processo analogo di sviluppo tumorale. In talune neoplasie, come quelle mammarie o quelle vescicali, i tasselli disponibili del mosaico sembrano confermare in pieno il modello esposto e dimostrato per il cancro del colon.

Lo studio della carcinogenesi nei casi, ad esempio, del carcinoma della mammella, del tumore del polmone a piccole cellule, dei tumori cerebrali, e di altri tumori presenta tuttavia maggiori difficoltà, in relazione al fatto che questi sono organi assai meno facilmente esplorabili rispetto al colon-retto. E' molto più difficile, in questi altri casi, ottenere campioni di tessuto a vari stadi di sviluppo tumorale: questo fatto non permette ovviamente di studiare in modo completo la sequenza di alterazioni geniche che possono insorgere nel corso di una storia naturale che si svolge quasi sempre nell'arco di anni, o addirittura di decine di anni.

Sono tuttavia già molti gli esempi in letteratura che dimostrano la presenza di mutazioni multiple nel DNA dei tumori maligni e metastatici, tanto che si ipotizza che occorranno almeno cinque mutazioni in una stessa cellula, a carico di geni differenti, perché si espliciti a pieno una crescita incontrollata di tipo neoplastico.

Indubbiamente, attraverso le numerose conferme che stanno emergendo, sembra possibile affermare che l'insorgenza di un cancro deriva da lesioni multiple sul DNA di una singola cellula, che sono la conseguenza dell'azione ripetuta nel tempo di agenti fisici, chimici e biologici capaci di indurre mutazioni. Questo concetto dovrebbe costituire un forte stimolo ad intensificare in ogni direzione possibile le iniziative di prevenzione contro gli agenti mutageni ambientali (fumo, altri carcinogeni chimici, radiazioni ionizzanti, esposizioni ad altre forme di energia, e così via dicendo).

L'espressione del gene p53 nel carcinoma prostatico umano

La prostata è un organo muscolo-ghiandolare di forma conica situato al di sotto della vescica urinaria, che inguaina il tratto pelvico dell'uretra e contribuisce alla formazione della frazione liquida dello sperma. Il cancro della prostata è tra i più frequenti tumori nell'uomo e presenta un comportamento clinico evolutivo scarsamente prevedibile.

Questo tumore ha un'incidenza più elevata con il crescere dell'età e viene in genere diagnosticato dopo i 65 anni, spesso purtroppo in fase tardiva, per cui in questa classe di età esso finisce per rappresentare la principale causa di morte tumorale. Di solito il carcinoma prostatico viene identificato attraverso il riscontro di un ingrossamento della prostata. Tale ingrossamento può essere individuato casualmente, durante un normale check-up, o nel corso di una visita richiesta dal paziente per un'improvvisa difficoltà della minzione o talvolta per impotenza. Questi sintomi, in genere, insorgono quando ormai una massa neoplastica abbondante fa sì che la prostata comprima le strutture confinanti. Ad esempio, se il tumore schiaccia la vescica o restringe l'uretra, può causare la necessità di una minzione frequente e può provocare difficoltà a iniziare e mantenere il flusso dell'urina.

Talvolta il cancro della prostata viene diagnosticato in seguito al trattamento di una ipertrofia prostatica benigna. Questa patologia, che è costituita da un ingrossamento della prostata legata all'età del soggetto, colpisce più della metà degli uomini al di sopra dei 45 anni e può dare gradualmente origine agli stessi problemi urinari causati dal tumore. Questi problemi di ingrossamento benigno possono essere risolti chirurgicamente mediante una resezione transuretrale della ghiandola prostatica. Talvolta però l'esame istologico della prostata rimossa rivela la presenza di cellule neoplastiche.

Inoltre, autopsie eseguite su uomini deceduti per varie altre cause indicano che circa un terzo dei soggetti di oltre 50 anni presenta alcune cellule neoplastiche nella prostata e che l'incidenza di questo reperto aumenta costantemente dopo i cinquant'anni, fino ad una frequenza incredibilmente elevata negli ultranovantenni, nei quali è possibile riscontrare la presenza di cellule neoplastiche nell'organo in oltre il 90 per cento dei casi.

Lo sviluppo di questo tipo di tumore che si origina all'interno della ghiandola ed il fatto che il paziente pervenga al cospetto del medico soltanto

quando il suo ingrossamento comprime le strutture circostanti fanno sì che il tumore stesso risulti quanto mai insidioso, perché spesso la sua diagnosi viene effettuata quando la neoplasia ha già varcato i confini anatomici della ghiandola e, talvolta, presenta già una disseminazione metastatica. Pertanto, tutto ciò rende spesso impossibile la risoluzione della patologia mediante la completa rimozione chirurgica della prostata (prostatectomia radicale) (99).

Emerge, dunque, come elemento di grande importanza la diagnosi precoce del cancro della prostata, anche in soggetti asintomatici. Un semplice test ematico, che è divenuto ampiamente disponibile dal 1986, misura il livello di una glicoproteina chiamata antigene prostatico-specifico (PSA), una delle molte molecole secrete dalla prostata. Livelli plasmatici superiori a quattro nanogrammi per millilitro di sangue indicano la possibile presenza di un cancro; livelli superiori a dieci ng/ml sono considerati particolarmente indicativi.

Questo metodo, quindi, permetterebbe di evidenziare tumori prostatici quando essi sono ancora di dimensioni microscopiche. Un valore di PSA elevato non è comunque una prova assoluta della presenza di un tumore. Anche condizioni diverse dal cancro, come un'ipertrofia prostatica benigna, una prostatite o una compressione meccanica sull'organo (come quella che si esercita durante un esame diagnostico di esplorazione rettale digitale) possono provocare un innalzamento del livello di PSA. Viceversa, molti soggetti affetti da cancro presentano al momento della diagnosi livelli di PSA del tutto normali. L'esame del PSA presenta dunque livelli di sensibilità e specificità diagnostica non certo ideali.

La coltura cellulare di cellule epiteliali esfoliate e raccolte mediante massaggio prostatico (100, 101), metodo innovativo e non invasivo descritto dal nostro gruppo di ricerca, permette di evidenziare con maggiore accuratezza la presenza di cellule neoplastiche anche in soggetti asintomatici. Uno screening di massa su maschi al di sopra dei quarant'anni consentirebbe con tale tecnica una diagnosi precoce del carcinoma della prostata su vasta scala, permettendo un maggior successo della terapia che può essere paragonato a quello ottenuto con il PAP-test per i tumori della cervice uterina. I livelli di sensibilità e specificità ottenibili si sono dimostrati infatti idonei anche per l'esecuzione di uno screening di massa.

Le varie articolazioni della linea di ricerca sulla biologia del carcinoma prostatico umano hanno lo scopo di migliorare le conoscenze su questa neoplasia, al fine di ottenere una diagnosi precoce ed una prognosi meglio obiettivabile di questa malattia in base a dati di laboratorio. In questo contesto abbiamo avviato un progetto per il rilevamento di eventuali mutazioni sul gene p53 in casi clinici di carcinoma prostatico umano, nella convinzione che tali mutazioni possano essere messe in correlazione con il comportamento biologico della singola neoplasia e possano costituire

dunque un elemento importante in termini pratici, sia diagnostici che terapeutici.

Sebbene il carcinoma della prostata sia il tumore più comune nel sesso maschile, poco si conosce al riguardo degli eventi molecolari coinvolti nel processo di carcinogenesi (102). L'instabilità genetica è, comunque, un aspetto importante nel carcinoma della prostata (65) ed in molte altre neoplasie. L'anomala espressione del gene p53 è un evento comune nel carcinoma prostatico umano (43, 86). Questo evento può essere un passo estremamente importante nella sequenza di eventi genetici che conducono al carcinoma della prostata interferendo con il ciclo cellulare (34).

Mediante tecniche immunoistochimiche (tecnica avidina-biotina) è possibile localizzare la forma normale ed alcune forme mutanti della proteina p53. L'anticorpo monoclonale PAb1801 riconosce un determinante comune presente sia nella forma "wild type" che in quelle mutate, mentre l'anticorpo PAb240 riconosce un epitopo conformazionale di alcune tipiche forme mutanti della proteina p53. Noi abbiamo saggiato numerosi campioni di carcinoma prostatico umano e di ipertrofia prostatica benigna esaminando sia reperti chirurgici fissati che colture primarie da espianti nonché tre diverse linee cellulari di carcinoma prostatico umano (PC3, DU145 e LNCaP) e abbiamo ottenuto risultati compatibili con un impiego routinario di tali semplici determinazioni in associazione con altri parametri rilevabili in vitro. Una simile procedura, che consente la valutazione diagnostica e prognostica di singoli casi clinici a partire da campioni di epitelio prostatico ottenuti durante un massaggio prostatico effettuato mediante esplorazione rettale, viene praticata ora regolarmente nel nostro laboratorio ed in altri centri di ricerca statunitensi.

Per riportare alcuni nostri dati sperimentali, possiamo indicare che a tutt'oggi abbiamo analizzato tre linee cellulari prostatiche umane, undici colture primarie e tredici campioni tissutali ottenuti da iperplasie benigne e adenocarcinomi della prostata al fine di saggiare l'espressione della proteina p53 sia nella forma "wild type" che in quella mutante usando anticorpi specifici e per mezzo della tecnica della immunoperossidasi.

Tra le pochissime linee di carcinoma prostatico descritte in letteratura, abbiamo esaminato le linee cellulari DU145 (isolata da una metastasi cerebrale di un paziente affetto da carcinoma prostatico), LNCaP e PC3 (isolate da biopsie di metastasi linfonodali di carcinoma prostatico), che sono state tutte ottenute dalla American Type Culture Collection (ATCC).

Le colture primarie invece sono state eseguite a partire da frustoli di tessuto prelevati mediante resezione transuretrale o prostatectomia da pazienti affetti da carcinoma prostatico o da ipertrofia prostatica benigna, oppure sono state allestite colture a partire dalla raccolta di cellule epiteliali esfoliate secondo la tecnica non invasiva del massaggio prostatico. I campioni tissutali, rapidamente posti in terreno di coltura sterile e trasferiti

nel laboratorio di colture cellulari, sono stati sminuzzati in frammenti di 2-3 mm³. Le cellule sono poi state fatte crescere in capsule di Petri di 60 mm di diametro e in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) arricchito con Siero Fetale Bovino al 10%, siero di cavallo al 10% più 50 ng/ml di insulina e di idrocortisone, in atmosfera umida contenente 5% CO₂.

Le colonie delle colture cellulari sono state quindi fissate in acetone metanolo 1:1 per 5 minuti prima di procedere alla colorazione con la tecnica dell'immunoperossidasi.

Sezioni di 5 µm di spessore sono state tagliate da blocchetti di tessuto di campioni prostatici allestiti con reperti chirurgici fissati in formalina ed inclusi in paraffina. I campioni sono stati deparaffinati in histolemon e reidratati secondo la scala decrescente degli alcoli. La perossidasi endogena è stata inibita incubando le sezioni con perossido di idrogeno al 3% in tampone fosfato a pH 7,2 (PBS) per 30 min.

Il legame non specifico è stato bloccato mediante trattamento con siero normale di capra 1:30 (v/v) per 30 minuti. Gli anticorpi monoclonali anti-p53 PAb1801 e PAb240 sono stati gentilmente forniti dal Dr. David Lane (University of Dundee DD1, 4HN, UK). Essi sono stati applicati ai campioni e incubati in camera umida per tutta la notte a temperatura di 4°C. Dopo lavaggio in PBS, alle colonie e alle sezioni è stata aggiunta una sospensione di immunoglobuline di capra anti-topo coniugate con biotina e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo accurato lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate per 30 minuti con streptavidina coniugata con perossidasi. Dopo aver lavato via i complessi in eccesso, la localizzazione della proteina p53 è stata visualizzata come un precipitato di colore marrone, che si genera trattando i campioni per due minuti con 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro 0.02% (w/v) e perossido di idrogeno 0.03% (v/v), (che sono rispettivamente substrato e cofattore rivelatore della reazione catalizzata dalla perossidasi). I campioni sono stati infine lavati e controcolorati con ematossilina di Harris. Un controllo negativo è stato effettuato usando come anticorpo primario una proteina aspecifica da mieloma (mieloma murino PAI).

I risultati ottenuti sui campioni di colture cellulari primarie derivate da epitelio prostatico esfoliato e sui campioni tissutali di patologie prostatiche (tumore prostatico o ipertrofia prostatica benigna) sono riassunti nelle tabelle 4 e 5. Tutti i campioni sono stati saggiati per l'espressione della proteina p53 "wild type" e mutante. L'anticorpo PAb240 riconosce soltanto i prodotti della forma mutante e reagisce con un epitopo localizzato tra gli aminoacidi 156 e 335. L'anticorpo PAb1801 riconosce invece un epitopo compreso tra gli aminoacidi 32 e 79, sia nei prodotti proteici mutanti che in quelli non mutati. I controlli, eseguiti con un anticorpo monoclonale di altra specificità (PAI), sono risultati negativi in tutti i casi.

Colture	PAb 1801	PAb 240	Diagnosi
PU152	++ (n)(c)	++ (n)(c)	BPH
PU145	+ -	-	BPH
PU154	++ (n)	+	BPH
PU148	-	-	BPH
PU149		+ (n)	BPH
PU151		-	BPH
PU124	++ (n)(c)	+ (n)	BPH
PU156	+++ (n)(c)	+++ (n)	PRCA
PU142	-	+ (n)	PRCA
PU150		+++ (n)(c)	PRCA
PU142	-	++ (n)	PRCA
LNCaP *	++ (n)(c)	++ (n)(c)	PRCA
DU145 *	++ (n)	++ (n)	PRCA
PC3 *	+ -	+ -	PRCA

* linee cellulari

(n) positività nucleare

(c) positività citoplasmatica

Tabella 4. Espressione della proteina p53 su colture cellulari.

Le linee cellulari DU145, PC3 e LnCaP hanno mostrato una marcata immunocolorazione positiva sia alla forma “wild type” che a quella mutante della p53. La positività delle cellule DU145 e delle PC3 è risultata espressa come una colorazione granulare in sede nucleare, mentre le cellule LnCaP hanno mostrato una positività nucleare omogenea e diffusa assieme ad una positività citoplasmatica più debole.

Reperti chir.	PAb 1801	PAb 240	Diagnosi
PU 11	+ (n) ^o	+	BPH
PU 15	+ - (n) ^o	+ - (c) [*]	BPH
PU 16	+ (n) ^o (c) [*]	+ (c) [*]	BPH
PU 17	+ - (n) ^o	+ (c) [*]	BPH (?)
PU 7	+ -		PRCA
PU 8	-	-	PRCA
PU 9	+ -	+	PRCA
PU 18	+ -	+ (n) ^o (c) [*]	PRCA
PU 19	++ (n) ^o	++ (c) [*]	PRCA
PU 20	(n) ^o	+++ (n) ^o	PRCA
PU 21	+ - (n) ^o	+ - (c) [*]	PRCA
PU 22	+ (n) ^o (c) [*]	+ (n) ^o (c) [*]	PRCA
PU 6	++ (n) ^o (c) [*]	++ (c) [*]	PRCA

(n)^o positività nucleare acinare

(c)^{*} positività citoplasmatica stromale

Tabella 5. Espressione della proteina p53 su tessuti.

Le colture primarie ottenute dai casi diagnosticati come ipertrofia benigna (BPH) hanno rivelato una debole o nulla positività al PAb1801 e generalmente una completa negatività al PAb240. I casi PU124, PU150 e PU152, anch'essi diagnosticati come BPH, hanno mostrato una marcata positività all'anticorpo PAb240. Questi campioni tuttavia, nonostante la diagnosi istologica di benignità, hanno mostrato in coltura anomalie morfologiche ed una forte capacità replicativa che sono solitamente tipici di

campioni neoplastici maligni. Tutti i casi di carcinoma prostatico diagnosticati istologicamente sono risultati positivi sia al PAb1801 che al PAb240, con vari gradi di intensità, ad eccezione di un caso che ha mostrato soltanto immunopositività al PAb240.

Per le sezioni tissutali, nella maggioranza dei casi l'espressione della p53 è risultata della stessa intensità sia che venisse utilizzato il PAb1801 che il PAb240. I casi PU15 e PU17 sono in realtà due campioni provenienti dallo stesso paziente e prelevati da due porzioni differenti della prostata che mostravano consistenza ed aspetto macroscopico diversi. E' interessante notare che nei due campioni è risultata diversa la colorazione con l'anticorpo PAb240.

La positività al PAb1801 è stata in tutti i casi di tipo nucleare e circoscritta agli acini della ghiandola prostatica. Soltanto i casi PU16 e PU22 hanno presentato anche una positività citoplasmatica a livello stromale. La positività al PAb240, invece, è risultata prevalentemente di tipo citoplasmatico, ma presente anche a livello stromale; soltanto il caso PU20 ha presentato una marcata positività di tipo nucleare e circoscritta agli acini.

La rivelazione della proteina p53 con tecniche di immunoistochimica risulta quanto mai controversa nei numerosi articoli pubblicati negli ultimi anni a proposito di varie neoplasie. La standardizzazione del metodo e l'interpretazione dei risultati richiedono ancora molto studio. I dati in letteratura sul valore prognostico della positività alla proteina p53 e persino sulla soglia di rivelazione della proteina sono ancora in fase di discussione. Si può ipotizzare che molti studi possano aver incluso tumori con mutazioni missenso della p53 insieme con casi in cui altri meccanismi, compresa la iperespressione della p53 non mutata, partecipavano alla immunoreattività. Se nell'analisi di questi risultati compariva una iperespressione funzionale p53, risultava compromesso il significato prognostico della immunocolorazione (103).

I nostri dati sperimentali ottenuti dalle cellule prostatiche umane in coltura e dalle linee cellulari stabilizzate DU145, PC3 ed LnCaP hanno dimostrato una correlazione diretta esistente tra il grado di malignità del tumore e la positività alla proteina p53. Ogni campione ha mostrato approssimativamente lo stesso grado di positività sia al PAb1801, che riconosce tanto la forma "wild type" quanto quella mutante della p53, che al PAb240, che riconosce soltanto la forma mutata di p53. Dai dati raccolti si possono formulare tre ipotesi: può verificarsi, in primo luogo, che la proteina p53 sia espressa in una forma mutata; oppure può esistere un meccanismo capace di stabilizzare la proteina p53 non mutata con il risultato di un aumento della vita media della proteina stessa: ciò renderebbe possibile la sua visualizzazione per via immunoistochimica; oppure ancora è possibile che si verifichi una coesistenza di entrambi i suddetti meccanismi.

La marcata positività espressa dai campioni PU150, PU152 e PU124 (diagnosticati istologicamente come BPH) può essere indice di una benignità morfologica apparente che dovrebbe essere controllata nel tempo mediante un follow up clinico e di laboratorio, per verificare se in quei casi non si manifesti invece una qualche forma di progressione biologica della malattia proliferativa prostatica. D'altra parte, PU150 e PU152 esprimono una positività citoplasmatica analoga a quella ottenuta nella linea cellulare LnCaP, che è risultata appartenere ad un tumore prostatico meno invasivo rispetto alle DU145. In sottopopolazioni cellulari di tumori mammari e polmonari è stata descritta una compresenza citoplasmatica sia di proteina p53 "wild type" che di proteina p53 mutata. La localizzazione citoplasmatica delle forme mutate e non mutate della proteina p53 potrebbe risultare dal legame ad una proteina citoplasmatica alterata tumore-specifica (100).

Nelle sezioni tissutali l'ipoespressione delle forme "wild type" e mutate in alcuni tumori insieme con una marcata positività in alcune iperplasie benigne potrebbe indicare che le differenti e più intense procedure di fissazione necessarie per i tessuti solidi potrebbero denaturare la proteina p53, esponendo anche nella forma "wild type" della proteina alcuni epitopi che vengono riconosciuti dall'anticorpo diretto contro la forma mutata. Quindi la proteina normale denaturata potrebbe esporre un epitopo che viene riconosciuto dall'anticorpo anti-p53 del clone PAb240.

Risultano inoltre evidenti una positività nucleare e limitata agli acini della ghiandola per l'anticorpo PAb1801 ed una positività prevalentemente citoplasmatica ed estesa anche allo stroma per il PAb240.

La localizzazione della proteina p53, come si è visto, può essere sia nucleare che citoplasmatica. La variazione della localizzazione cellulare può dipendere dalle caratteristiche di una forma particolare di proteina mutata. In condizioni normali, la fosfoproteina p53 viene sintetizzata nel citoplasma e poi trasportata nel nucleo. La localizzazione nucleare è necessaria perché si espliciti l'attività fisiologica di fattore trascrizionale ora accertata della proteina p53. Shaulsky e coll. (104) hanno infatti dimostrato che la localizzazione della p53 mutante dipendeva dal tipo di mutazione che si verificava nella proteina. Proteine p53 che presentano mutazioni nell'estremità carbossiterminale hanno una localizzazione citoplasmatica, mentre p53 mutate a livello della estremità aminoterminale o all'interno della proteina hanno una localizzazione prevalentemente nucleare della proteina stessa. Un'altra possibile spiegazione per la colorazione citoplasmatica di alcune forme mutanti della p53 è che essa formi complessi stabili con altre proteine cellulari (per esempio le "heat shock proteins" o la proteina MDM2).

Altri autori (105) sostengono inoltre che i metodi di fissazione possono interferire con la localizzazione cellulare. Utilizzando cellule di carcinoma

squamoso, essi hanno trovato una localizzazione nucleare usando fissativi non acquosi (metanolo, acetone, methacarn) ed una localizzazione prevalentemente citoplasmatica usando fissativi acquosi (formalina). Questo risultato non coincide tuttavia con i nostri dati sperimentali perché sia in colture cellulari che in tessuti, che prevedono metodi di fissazione differenti, abbiamo ottenuto chiare localizzazioni citoplasmatiche o nucleari a seconda dei casi esaminati, indipendentemente dal metodo di fissazione. Per la rapidità di esecuzione e per la facilità di reperimento dei campioni (massaggio prostatico), i dati ottenuti in colture cellulari fissate rapidamente sembrano più appropriati per uno studio diagnostico e preclinico del carcinoma prostatico, così come sembrano rappresentare un complemento utile alla raccolta mediante massaggio prostatico di cellule epiteliali esfoliate che vengono fatte crescere in coltura (100, 101).

Pubblicazioni recenti sembrano indicare che nel carcinoma prostatico, tuttavia, le mutazioni della proteina p53 con accumulo cellulare si presentano con maggior frequenza nelle forme metastatiche che non nelle forme localizzate della malattia (71, 72) ed avverrebbero prima dell'avvio del processo metastatico stesso. Questa osservazione, se confermata, conferirebbe alla determinazione immunohistochimica della p53 un grande valore prognostico nel carcinoma prostatico umano.

Sulla base dei nostri risultati, la rivelazione immunohistochimica della proteina p53 può essere considerata un importante parametro immunohistochimico che, insieme con altri parametri fisiologici e proliferativi ottenuti da cellule in coltura (100, 101), può contribuire alla diagnosi preclinica e alla valutazione prognostica dei singoli casi di carcinoma prostatico.

Il reale significato biologico di queste determinazioni troverà un adeguato riscontro quando, alle scadenze di 2, 5 e 10 anni dalla raccolta dei dati di laboratorio relativi ai singoli pazienti, si effettueranno le verifiche cliniche di "follow-up" dei pazienti stessi e si stabiliranno le relative correlazioni prognostiche.

Il test risulta di estrema semplicità e riteniamo che una volta verificata la sua validità clinica ed una volta standardizzate le condizioni della sua esecuzione si possa arrivare a disporre di una misurazione biologica di notevolissima utilità per la diagnosi e la prognosi di numerose malattie neoplastiche.

Conclusione

Con ogni probabilità, la rivelazione di specifici gruppi di mutazioni a carico di oncogeni e di geni oncosoppressori sarà alla base, nel futuro più prossimo, di svariate metodologie innovative mirate alla diagnosi precoce di diverse forme di neoplasie maligne ed anche all'accertamento di stati di predisposizione per il cancro in diverse categorie di soggetti a rischio.

Le scoperte della biologia molecolare del cancro descritte in questo volumetto e le altre che emergeranno nel prossimo futuro costituiranno inoltre la base per nuove metodologie di terapia oncologica.

Non si può non sottolineare, tuttavia, che le stesse scoperte indicano con precisione l'importanza enorme delle misure preventive nella lotta contro il cancro, che devono puntare in maniera sempre più energica ad eliminare dall'ambiente le cause mutagene e carcinogene. Tra queste ultime, emerge con chiarezza e con grande rilevanza statistica quella costituita dal fumo di tabacco, che alcuni lavori hanno identificato, tra l'altro, come causa di specifiche mutazioni anche della proteina p53 (87, 75, 88).

Bibliografia

- 1) Harris H., et al.: Suppression of malignancy by cell fusion. *Journal of NIH research*, 1994; 6: 62-71.
- 2) Weinberg R.: La ricerca degli anti-oncogeni. *Le Scienze*, 1988; 243: 38-46.
- 3) Knudson A.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Journal of NIH Research*, 1990; 2: 67-72.
- 4) Whyte, P., et al.: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 1988; 334: 124-129.
- 5) Knudson A.: Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*, 1993, 90: 10914-10921.
- 6) Helin K. and E. Harlow: The retinoblastoma protein as a trascriptional repressor. *Trends in Cell Biology*, 1993; 3: 43-46.
- 7) Touchette N.: Tumor suppressors: a new arena in the war against cancer. *Journal of NIH Research*, 1990; 2: 62-66.
- 8) Cobrinik D. et al.: The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *TIBS*, 1992 (17 Aug.): 312-315.
- 9) Chang C., et al.: Quantitative effects of the retinoblastoma gene on mouse development and tissue-specific tumorigenesis. *Cell Growth and Differentiation*, 1993; 4: 1057-1064.
- 10) Bologna M. and S. Sukumar: The oncogenes. *Caleidoscopio*, 1993; 3: 1-96.
- 11) Malkin D., et al.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 1990; 250: 1233-1238.
- 12) Lane D. and Benchimol S.: p53: oncogene or anti-oncogene? *Gene & Development*, 1990; 4: 1-8.
- 13) Levine A., Momand J., and Finlay C.: The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456.

- 14) Kastan M.: p53: evolutionally conserved and constantly evolving. *Journal of NIH Research*, 1993; 5: 53-57.
- 15) Stephens T., Closing in on p53's normal function. *Journal of NIH Research*, 1991; 3: 32-36.
- 16) Vogelstein B. and Kinzler K.: p53 function and dysfunction. *Cell*, 1992; 70: 523-526.
- 17) Lane D.: p53, guardian of genome. *Nature*, 1992; 358: 15-16.
- 18) The best Science of 1992. *Time*, (4 Jan): 62.
- 19) Molecule of the year - p53 sweeps through cancer research. *Science*, 262: 1958-1959.
- 20) Roemer K. and Friedmann T.: Mechanisms of action of the p53 tumor suppressor and prospects for cancer gene therapy by reconstitution of p53 function. *NYAS*, 1994; 716: 265-282.
- 21) Yew P. and Berk A.: Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, 1992; 357: 82-85.
- 22) Mietz J., et al.: The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.*, 1992; 11: 5013-5020.
- 23) Szekely L., et al.: EBNA-5, an Epstein-Barr Virus-Encoded Nuclear Antigen, Binds to the Retinoblastoma and p53 Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*, 1993; 90: 5455-5459.
- 24) Hupp T. and Lane D.: Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Current biology*, 1994; 4: 865-875.
- 25) Friedman P.N., et al.: The p53 Protein Is an Unusually Shaped Tetramer That Binds Directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 1993; 90 (8): 3319-3323.
- 26) Kern S., et al.: Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, 1991; 252: 1708-1711.
- 27) Hainaut P. and Milner J.: A Structural Role for Metal Ions in the Wild-Type Conformation of the Tumor Suppressor Protein-p53. *Cancer Res*, 1993; 53 (8): 1739-1742.

- 28) Ullrich S.J., et al.: Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in Mutant p53-Molecules from Human Tumors Is Altered Compared to Wild-Type p53. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 1993; 90: 5954-5958.
- 29) Srinivasan R., Roth J.A., and Maxwell S.A.: Sequence-Specific Interaction of a Conformational Domain of p53 with DNA. *Cancer Res.*, 1993; 53: 5361-5364.
- 30) Kulesz-Martin M., et al.: Endogenous p53 protein generated from wild-type alternatively spliced p53 RNA in mouse epidermal cells. *Mol. Cell Biol.*, 1994; 14: 1698-1708.
- 31) Frebourg T. and Friend S.H.: The Importance of p53 Gene Alterations in Human Cancer - Is There More Than Circumstantial Evidence. *J Nat Cancer Inst*, 1993; 85(19): 1554-1557.
- 32) Roemer K. and Friedmann T.: Modulation of Cell Proliferation and Gene Expression by a p53-Estrogen Receptor Hybrid Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*, 1993; 90: 9252-9256.
- 33) Perry M., Piette J., and Levine A.: The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *PNAS*, 1993; 90: 11623-11627.
- 34) Berns A.: Is p53 the only real tumor suppressor gene? *Current Biology*, 1993; 4: 137-139.
- 35) Oliner J.D., et al.: Oncoprotein MDM2 Conceals the Activation Domain of Tumour Suppressor-p53. *Nature*, 1993; 362 (6423): 857-860.
- 36) Harris C.C. and Hollstein M.: Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. *N. Engl J. Med*, 1993; 329 (18): 1318-1327.
- 37) Sheikh M.S., et al.: The p53-Binding Protein MDM2 Gene Is Differentially Expressed in Human Breast Carcinoma. *Cancer Res*, 1993; 53: 3226-3228.
- 38) Lane D.: Worrying about p53. *Current Biology*, 1992; 2: 581-583.
- 39) Lee J.M. and Bernstein A.: p53 Mutations Increase Resistance to Ionizing Radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*, 1993; 90 (12): 5742-5746.
- 40) Zhan Q., Carrier F., and Fornace A.: Induction of cellular p53 activity

- by DNA-damaging agents and growth arrest. *Molecular and Cellular Biology*, 1993; 13: 4242-4250.
- 41) Lu X. and Lane D.P.: Differential Induction of Transcriptionally Active p53 Following UV or Ionizing Radiation - Defects in Chromosome Instability Syndromes?. *Cell*, 1993; 75: 765-778.
 - 42) Tishler R.B., et al.: Increases in Sequence Specific DNA Binding by p53 Following Treatment with Chemotherapeutic and DNA Damaging Agents. *Cancer Res*, 1993; 53 (10): 2212-2216.
 - 43) Perry M. and Levine A.: Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1993; 3: 50-54.
 - 44) Marx J.: How p53 suppresses cell growth. *Science*, 1993; 262: 1644-1645.
 - 45) Harper J. and Elledge S.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 1993; 75: 805-816.
 - 46) El-Deiry W.S. and Vogelstein B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993; 75: 817-825.
 - 47) Xiong Y. and Beach D.: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 1993; 366: 701-710.
 - 48) Hunter T.: Braking the cycle. *Cell*, 1993; 75: 839-841.
 - 49) Halazonetis T., Davis L., and Kandil A.: Wild-type p53 adopts a 'mutant'-like conformation when bound to DNA. *EMBO J.*, 1993; 12: 1021-1028.
 - 50) Rotter V., et al.: Mice with Reduced Levels of p53 Protein Exhibit the Testicular Giant-Cell Degenerative Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa*, 1993; 90: 9075-9079.
 - 51) Merritt A., Lane D., and Hall P.: The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Research*, 1994; 54: 614-617.
 - 52) Williams G.T. and Smith C.A.: Molecular Regulation of Apoptosis: Genetic Controls on Cell Death. *Cell*, 1993; 74: 777-779.
 - 53) Clarke A.R., et al.: Thymocyte Apoptosis Induced by p53-Dependent and Independent Pathways. *Nature*, 1993; 362 (6423): 849-852.

- 54) Lowe S.W., et al.: p53 Is Required for Radiation-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. *Nature*, 1993; 362 (6423): 847-849.
- 55) Lane D.: A death in the life of p53. *Nature*, 1993; 362: 780-787.
- 56) Doussis I.A., et al.: An Immunocytochemical Study of p53 and bcl-2 Protein Expression in Hodgkin's Disease. *Am J. Clin. Pathol.*, 1993; 99: 663-667.
- 57) Lowe S.W., et al.: p53-Dependent Apoptosis Modulates the Cytotoxicity of Anticancer Agents. *Cell*, 1993; 74: 957-967.
- 58) Marchetti A., et al.: p53 Mutations and Histological Type of Invasive Breast Carcinoma. *Cancer Res*, 1993; 53: 4665-4669.
- 59) Riou G., et al.: Poor Prognosis of p53 Gene Mutation and Nuclear Overexpression of p53 Protein in Inflammatory Breast Carcinoma. *J Nat. Cancer Int.*, 1993; 85: 1765-1767.
- 60) Bennett W.P., et al.: p53 Protein Accumulates Frequently in Early Bronchial Neoplasia. *Cancer Res*, 1993; 53: 4817-4822.
- 61) Marchetti A., et al.: p53 Alterations in Non-Small Cell Lung Cancers Correlate with Metastatic Involvement of Hilar and Mediastinal Lymph Nodes. *Cancer Res*, 1993; 53: 2846-2851.
- 62) Carroll A.G., et al.: p53 Oncogene Mutations in Three Human Prostate Cancer Cell Lines. *Prostate*, 1993; 23: 123-134.
- 63) Navone N.M., et al.: p53 Protein Accumulation and Gene Mutation in the Progression of Human Prostate Carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1993; 85(20): 1657-1669.
- 64) Bookstein R., et al.: p53 Is Mutated in a Subset of Advanced-Stage Prostate Cancers. *Cancer Res*, 1993; 53: 3369-3373.
- 65) Effert P.J., et al.: p53 Gene Alterations in Human Prostate Carcinoma. *J Urol*, 1993; 150: 257-261.
- 66) Meyers F.J., et al.: p53 Mutations in Benign Prostatic Hyperplasia. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1993; 85: 1856-1858.
- 67) Van Veldhuizen P.J., et al.: p53 Expression in Incidental Prostatic Cancer. *Am. J. Med. Sci*, 1993; 305: 275-279.

- 68) Macoska J.A., et al.: Loss of the 17p-Chromosomal Region in a Metastatic Carcinoma of the Prostate. *J Urol*, 1992; 147: 1142-1146.
- 69) Berner A., et al.: Hormone Resistant Prostatic Adenocarcinoma - An Evaluation of Prognostic Factors in Pre-Treatment and Post-Treatment Specimens. *Br J Cancer*, 1993; 68: 380-384.
- 70) Chi S., et al.: p53 in prostate cancer: frequent expressed transition mutations. *J. Natl Cancer Inst*, 1994; 86: 926-933.
- 71) Myers R., et al.: Accumulation of the p53 protein occurs more frequently in metastatic than in localized prostatic adenocarcinomas. *Prostate*, 1994; 25: 243-248.
- 72) Kallakury B., et al.: Association of p53 immunoreactivity with high Gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum. Pathol.*, 1994; 25: 92-97.
- 73) Reiter R.E., et al.: Chromosome-17p Deletions and p53 Mutations in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3092-3097.
- 74) Vogan K., et al.: Absence of p53 Gene Mutations in Primary Neuroblastomas. *Cancer Res.*, 1993; 53: 5269-5273.
- 75) Boyle J.O., et al.: The Incidence of p53 Mutations Increases with Progression of Head and Neck Cancer. *Cancer Res.*, 1993; 53: 4477-4480.
- 76) Teramoto T. and S. Maeda: p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*, 1994; 54: 231-235.
- 77) Tanaka S., et al.: Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma May Be Mediated by p53 Mutation. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2884-2887.
- 78) Lassam N., L. From, and H. Kahn: Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma. *Cancer Research*, 1993; 53: 2235-2238.
- 79) Wang L.D., et al.: Accumulation of p53 Protein in Human Esophageal Precancerous Lesions - A Possible Early Biomarker for Carcinogenesis. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1783-1787.

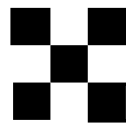
- 80) Milner B.J., et al.: p53 Mutation Is a Common Genetic Event in Ovarian Carcinoma. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2128-2132.
- 81) Peng H.Q., et al.: Mutations of the p53 Gene Do Not Occur in Testis Cancer. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3574-3578.
- 82) Lubin R. and Tredaniel J.: Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53 - Distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Cancer Research*, 1993; 53: 5872-5876.
- 83) Labrecque S., et al.: Analysis of the Anti-p53 Antibody Response in Cancer Patients. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3468-3471.
- 84) Srivastava S., et al.: Dominant Negative Effect of a Germ-Line Mutant p53 - A Step Fostering Tumorigenesis. *Cancer Res.*, 1993; 53: 4452-4455.
- 85) Mukhopadhyay T. and J.A. Roth: A Codon 248 p53 Mutation Retains Tumor Suppressor Function as Shown by Enhancement of Tumor Growth by Antisense p53. *Cancer Res.*, 1993; 53: 4362-4366.
- 86) Hollstein M., et al.: p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991; 253: 49-53.
- 87) Harris C., p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*, 1993; 262: 1980-1981.
- 88) Habuchi T., et al.: Influence of Cigarette Smoking and Schistosomiasis on p53 Gene Mutation in Urothelial Cancer. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3795-3799.
- 89) Kreidberg J.A., et al.: WT-1 Is Required for Early Kidney Development. *Cell*, 1993; 74: 679-691.
- 90) Latif F., et al.: Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene. *Science*, 1993; 260: 1317-1320.
- 91) Travis J.: New tumor suppressor gene captured. *Science*, 1993; 260: 1235.
- 92) Marx J.: Learning How to Suppress Cancer. *Science*, 1993; 261: 1385-1387.
- 93) Gao X., et al.: Frequent Loss of Expression and Loss of Heterozygosity of the Putative Tumor Suppressor Gene DCC in Prostatic Carcinomas. *Cancer Res.*, 1993; 53: 2723-2727.

- 94) Marx J.: New tumor suppressor may rival p53. *Science*, 1994; 264: 344-345.
- 95) Kamb A., N. Gruis, and M. Skolnick: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994; 264: 436-440.
- 96) Hopkin K. p16/MTS-1: all-star tumor suppressor or team player? *Journal of NIH Research*, 1994; 6: 32-36.
- 97) Ezzell C.: Breast cancer genes: cloning BRCA1, mapping BRCA2. *Journal of NIH Research*, 1994; 6: 33-36.
- 98) Fearon E. and Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759-767.
- 99) Garnick M.B.: I dilemmi posti dal cancro della prostata. *Le Scienze - Scientific American Ed.It.*, 1994; 310: 50-56.
- 100) Bologna M. and Vicentini C.: Early diagnosis of prostatic carcinoma may be achieved through in vitro culture of tumor cells harvested by prostatic massage. *European Urology*, 1993; 24: 148-155.
- 101) Bologna M. and Vicentini C.: Validation study of a new method for early diagnosis of prostatic carcinoma by in vitro culture of tumor cells harvested during digital prostatic exam. *Cancer Detection and Prevention*, 1996; in press.
- 102) Van Veldhuizen P.J., et al.: Mutant p53 Expression in Prostate Carcinoma. *Prostate*, 1993; 22: 23-30.
- 103) Battifora H.: p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Human Pathology*, 1994; 25: 435-437.
- 104) Shaulsky G. and Goldfinger N.: Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and play a role in tumorigenesis. *Molecular Cell Biology*, 1990; 10: 6565-6577.
- 105) Gusterson B. and Anbazhagan R.: Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*, 1991; 6: 1785-1789.
- 106) Fox S.B., et al.: p53 and c-myc Expression in Stage A1 Prostatic Adenocarcinoma - Useful Prognostic Determinants. *J Urol*, 1993; 150: 490-494.

Indice

Editoriale.....	» 3
I geni oncosoppressori: il freno della crescita cellulare	» 5
Il primo gene oncosoppressore scoperto: il gene del retinoblastoma.....	» 7
Il più importante dei geni oncosoppressori: il gene p53.....	» 16
Caratteristiche biochimiche della proteina p53 “wild type”	» 17
Come la p53 sopprime la crescita cellulare.....	» 21
p53 e apoptosi.....	» 27
Proteina p53 mutata e carcinogenesi.....	» 29
Altri geni oncosoppressori.....	» 34
Il modello della carcinogenesi del colon.....	» 39
Estensione del modello del cancro del colon ad altre neoplasie	» 43
L’espressione del gene p53 nel carcinoma prostatico umano.....	» 44
Conclusione.....	» 53
Bibliografia	» 54
Indice.....	» 62

Collana Caleidoscopio Ed. Italiana



MEDICAL SYSTEMS S.P.A.

...IL FUTURO HA IL CUORE AN TICO

1. Rasso S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rasso S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rasso S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rasso S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rasso S.: *L'obesità*. 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 -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 enzimologico ed immunologico ed fluorimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rasso 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.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnassi 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 Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Basaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.

74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.



Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 14, numero 100

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0360 509973
E-mail: rassu@mbox.vol.it



Editore

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater

Consulenti di Redazione

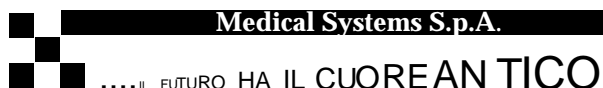
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi



Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Español, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, Pandora, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa

ALGRAPHY S.n.c.
Passo Ponte Carrega, 62 R. - GENOVA
tel. 010/8366272 - Fax 010/8358069

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Marzo 1996
Sped. in Abb. Post. 50%

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.

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