

APOPTOSI

L'apoptosi è un meccanismo di **morte cellulare programmata**, strettamente regolato mediante il quale, le cellule che durante il check point hanno presentato un danno al DNA, vengono selettivamente eliminate.

La degradazione cellulare consiste nella formazione di frammenti, detti **corpi apoptotici**, avvolti da membrana e contenenti materiale cellulare, che vengono ingeriti dai **macrofagi** che però non attivano una risposta infiammatoria; quindi **non disturba il tessuto** in cui avviene ed è un **processo fisiologico** utile a:

- Eliminare cellule **alterate genomicamente**: verso cellule danneggiate che non sono riuscite a mettere in atto meccanismi di riparazione al danno del DNA e che quindi sono potenzialmente dannose perché potrebbero trasmettere una mutazione alle cellule figlie;
- Elimina cellule che hanno subito **danni mitocondriali**;
- Eliminare **cloni di linfociti T self-reactive**: se messi in circolo potrebbero innescare risposte autoimmunitarie.
- **Modellamento morfologico durante l'embriogenesi**: gli embrioni utilizzano l'apoptosi per esempio per eliminare tutti quei neuroblasti che non sono entrati a far parte di una rete neuronale. Quando si sviluppa durante la vita embrionale il sistema nervoso, vengono prodotti dei neuroblasti; questi formano sinapsi con altri neuroblasti vicini formando delle RETI NEURALI; grazie a quest'ultime, i neuroblasti riescono a scambiarsi fattori neurotrofici di crescita e sopravvivenza neuronale (**NGF**). Questo permette loro di sopravvivere e differenziarsi;
- **Effetto citolitico di linfociti T citotossici**: verso cellule bersaglio infettate da virus o potenzialmente pericolose;
- **Modellamento tissutale**: le cellule che non ricevono più fattori di crescita o sopravvivenza che non sono dunque necessari ad un tessuto vengono eliminate.

Pertanto, un'alterazione dei meccanismi di controllo dell'apoptosi risulta molto pericolosa e patologica.

Le caspasi sono degli **enzimi proteolitici cistein aspartasi**; il nome "caspasi" deriva da: "**c**" che sta per **cisteina**, perché le caspasi nel loro sito attivo hanno delle cisteine ed "**asp**" che sta per **acido aspartico**, perché le proteine bersaglio vengono tagliate in corrispondenza di specifici residui di acido aspartico.

Apoptosi: FASE EFFETTRICE

L'apoptosi ha inizio con l'attivazione delle **caspasi** in conseguenza a segnali di diverso tipo che indicano tutti la necessità che una cellula venga eliminata per apoptosi.

L'attivazione delle caspasi è resa possibile dall'innescamento di una **cascata di eventi molecolari** che possono essere indotti in modi differenti.

Le fasi in cui può essere suddivisa l'apoptosi sono quindi due:

- la **fase di inizio**, di attivazione delle caspasi; avviano il processo apoptotico
- la **fase effettrice**, dove le caspasi agiscono per causare la vera e propria morte cellulare. Attivano le caspasi a monte e inducono la cellula a morte, tramite apoptosi. → processo a catena.

Tra i bersagli vi sono un gran numero di proteine citoplasmatiche e nucleari incluso alcuni **inibitori di DNasi**.

Come faccio a capire se una cellula sta morendo per apoptosi o per necrosi?

- **Necrosi:** questo causa la dissoluzione di tutte le strutture cellulari, riversamento all'esterno di tutti gli enzimi litici e innesco dei processi infiammatori.

Apoptosi: degradazione selettiva; la **fosfatidilserina** viene trasferita all'esterno della membrana e ogni struttura cellulare viene frammentata in corpi apoptotici. La presenza di fosfatidilserina è un segnale per i macrofagi che vanno a fagocitare questi frammenti ma non attivano il processo infiammatorio; quindi, non rilasciano una serie di mediatori dell'infiammazione. Tramite separazione elettroforetica, possiamo notare una frammentazione tipica del DNA in multipli di 180 bp (quantità del DNA nel nucleosoma). Ciò significa che le proteine istoniche non sono degradate e quindi la degradazione è molto selettiva.

APOPTOSI MITOCONDRIALE- VIA INTRINSECA

Nel **mitocondrio** può essere innescata in seguito al danno dello stesso o quando il **DNA** subisce danno non riparabile oppure, un'altra particolarità che hanno i **linfociti T** è quella di poter rilasciare una piccola proteina, **perforin**, che fa dei multimeri tra le membrane e questi creano un **poro** dal quale può entrare **granzyme B** e può andare ad attivare le caspasi e quindi la morte apoptotica.

I **mitocondri** oltre produrre energia sotto forma di ATP necessaria per i metabolismi cellulari, (al loro interno si svolge il ciclo di Krebs) e la fosforilazione ossidativa (gradiente di elettroni che permette il funzionamento dell'ATP-sintasi), sono anche coinvolti nel processo di apoptosi.

Esso è avviato dal **citocromo C**, un fattore proteico che risiede normalmente nello spazio intermembrana, a cavallo tra la membrana interna ed esterna ed è coinvolto anche nel processo di respirazione cellulare.

Quando il citocromo C si trova all'interno del **mitocondrio**, esso è fondamentale per il trasporto degli elettroni attraverso la catena mitocondriale fino all'O₂; quando viene rilasciato nel **citiosol** si lega ad una proteina adattatrice, chiamata **APAF1** (apoptotic protease activating factor 1). Questa oligomerizza in un eptamero a forma di ruota chiamato **apoptosoma**. Le proteine Apaf1 dell'apoptosoma poi reclutano **proteine procaspasi iniziatrici 9**; esse attivano le **procaspasi esecutrici** a valle per indurre l'apoptosi.

L'uscita del citocromo C dalle membrane mitocondriali, però, è anche regolato anche da alcune proteine che sono:

- **ANTI-APOPTOTICHE:** **Bcl2 (B-cell linfoma 2)** → è un oncogene visto per la prima volta in cellule B tumorali. Questo riduce la propensione delle cellule ad andare incontro ad apoptosi e quindi causa lo sviluppo di linfomi. (prevenzione dell'apoptosi)
- **Bcl-XL** → controllano la permeabilità del mitocondrio impedendo la fuoriuscita del citocromo C che resta sequestrato nello spazio intermembrana.
- **PRO-APOPTOTICHE:** **Bax** che polimerizzando contribuiscono a formare un **poro** nella membrana mitocondriale esterna da cui può fuoriuscire il citocromo C e la cellula viene indotta a morire per apoptosi. (innesco apoptosi)

L'apoptosi mitocondriale può essere regolata da:

- **Rapporto stechiometrico 1:1:** tra proteine Bax e Bcl-2;
- Dal **legame di Bcl-2 a Bax:** quando Bcl2 è presente in quantità maggiore rispetto a Bax, essa lega la stessa Bax, impedendole di multimerizzare e formare il poro attraverso il quale far fuoriuscire il citocromo C;
- La **fosforilazione:** un'altra molecola pro-apoptotica è **BAD**; quando questa è fosforilata, non è in grado di legare Bcl2; quando non è fosforilata, lega Bcl2, sottraendola così al legame con Bax che sarà quindi libera di indurre l'apoptosi.

In seguito a danno a DNA la proteina **p53**, che è un fattore trascrizionale, si stabilizza e induce aumento della trascrizione di geni bersaglio come **p21** che è un **inibitore delle CDK**, e quindi blocca la cellula nella fase 1, poi recluta geni quali **GAT45** ed altri, che servono a riparare il DNA.

Nel frattempo viene reclutata anche un'altra proteina: **mdm2**, che va a degradare la stessa p53.

Se il danno non viene prontamente riparato, la cellula inizia ad accumulare **mutazioni**. In particolare assistiamo alla formazione di un **danno genotossico** causato dall'accumulo di p53 che a sua volta recluterà una notevole quantità di proteine Bax. Esse andranno a multimerizzare, formare il poro, liberare citocromo C che legherà Apaf1 e che porterà all'attivazione delle caspasi 9 che indurranno la cellula in apoptosi.

Fattori trofici

La regolazione dei meccanismi dell'apoptosi, che riguardano la via mitocondriale, dipendono dall'interazione tra Bax e Bcl2 e dalla fosforilazione di Bad.

Bad può legare Bcl-2 in modo esclusivo (→ se Bcl2 lega Bad non lega Bax), ma la sua capacità di legare dipende dal suo stato di fosforilazione.

Quando c'è un recettore per un **fattore neurotrofico ingaggiato**, abbiamo una serie di attivazioni di trasduzione del segnale, tra cui quello della **fosfotidilinositolo-3-chinasi (PIK-3)**; questo attiva un'altra chinasi che si chiama **chinasi dipendente dall'inositolo fosfato** che attiva un'altra chinasi che si chiama **AKT** che **fosforila Bax** e la sua fosforilazione gli impedisce di legare Bcl2.

Se viene meno il fattore neurotrofico, Bad non verrà più fosforilato perché la cascata non è attiva e a questo punto è in grado di interagire con Bcl2 e sottrae questo dall'interazione con Bax, quindi a questo punto si libererà abbastanza Bax da poter permettere l'apoptosi.

Esistono altri meccanismi di controllo: è possibile ad esempio intervenire **bloccando le caspasi** tramite degli inibitori chiamati **IAP** (inhibitor of apoptosis proteins).

Queste permettono che le caspasi vengano liberate solo nei momenti e nelle condizioni opportune. Quando abbiamo bisogno delle caspasi, bisogna andare ad inibire gli inibitori delle caspasi. Essi possono essere neutralizzati da **proteine anti-IAP**; due note nei mammiferi sono **Smac** e **DIABLO**.

L'apoptosi è quindi utile per:

- Rimuovere cellule che sono genomicamente aberranti;
- Rimuovere cloni self reattivi;
- Al modellamento morfogenico durante l'embriogenesi;
- Omeostasi tissutale (epiteli proliferanti);
- Morte di leucociti fagociti durante l'infiammazione.

Tutti questi meccanismi pro e anti-apoptotici possono essere dall'esterno attivati o inibiti per scopi terapeutici e soprattutto per la **cura di tumori**.

APOPTOSI DA SEGNAI EXTRACELLULARI

Ci sono dei ligandi che possono attivare la trasduzione e attraverso solo una tappa, tramite solo un intermedio, possono andare ad attivare le caspasi.

Questo è il caso del **Fas** che ha un ligando che si chiama **Fas Ligand**. Quando questo clusterizza vari ligandi, la porzione intracellulare lega una proteina che si chiama **FADD** (Fas associated with death domain) che va a legarsi a una caspasi attivando direttamente l'apoptosi.

Un caso raro quello del **TNF** (tumor necrosis factor) in cui la cellula può interpretare il segnale del **TNF receptor** attivato in due modi completamente opposti a seconda di quanto esprima

alcuni mediatori, trasduttori del TNF receptor attivato che a sua volta può essere dipendente da fattori ormonali o altri stimoli che possono determinare l'espressione di sistemi di trasduzione del segnale del TNF receptor attivato.

Quest'ultimo può essere trasdotto e interpretato o attraverso la via che, con **FADD** attiva poi le caspasi.

TNFR1 va a legare **TRADD** che può o attivare FADD, il quale va ad **attivare le caspasi 8** e quindi la via dell'apoptosi, oppure lega una proteina adattatrice che attiva una cascata di chinasi e attiva **NFkb** che va nel nucleo a stimolare la trascrizione di molte proteine tra cui **Bcl-2**.

- **TRADD: apoptosi**
- **NFkb: sopravvivenza**

Quindi nel caso in cui la cellula abbia più TRADD che FADD come trasduttore del TNF, la cellula sopravvive, in caso contrario la cellula muore e quindi il destino finale non dipende dal ligando ma da come la cellula interpreta il segnale.

Rilascio da parte dei linfociti T di ligandi: che legano dei recettori specifici di membrana sulla cellula bersaglio che a loro volta attraverso vie intrinseche attivano le caspasi.

Tra i ligandi secreti dai linfociti T ci sono:

- **Perforina:** che multimerizza nella membrana della cellula da uccidere formando un poro;
- **granzima B:** che invece è una proteasi che entra nel poro di perforina andando a clivare ed attivare le caspasi nel citoplasma della cellula bersaglio;
- **FasL.**

INFIAMMAZIONE

(**FLOGOSI:** dal greco= fuoco)

L'infiammazione è un processo che ci permette di **proteggerci da agenti nocivi** ma che può anche essere essa stessa causa di danno cellulare e quindi diventare un meccanismo patogenetico; è una risposta dei tessuti vascolarizzati ad insulti provocati da agenti lesivi (**flogogeni**) il suo scopo è quello di **eliminare la causa dell'insulto e riparare il danno**.

L'innesco dell'infiammazione avviene grazie all'interazione dell'antigene con l'anticorpo, provocando risposta immunitaria.

CAUSE PRINCIPALI

- Agenti **fisici:** temperatura (scottature, congelamenti), radiazioni (sole, raggi X), elettricità, traumi;
- Agenti **chimici:** alcali, acidi, metalli-minerali, prodotti metabolici (Ac.urico);
- Agenti **biologici:** batteri, virus, miceti, parassiti, necrosi cellulare;
- Corpi **estranei:** Polvere, polline, schegge (potrebbero veicolare invasione microbica).

La finalità del processo infiammatorio → permettere ai mezzi di dell'organismo di raggiungere il sito di infezione e rimuoverne le cause e riparare eventuale danno tissutale.

Essa si divide in:

ANGIOFLOGOSI: infiammazione acuta

- Vasodilatazione e permeabilità aumentata;
- Neutrofili;
- Cambi stromali del tessuto: sono minimi.

L'infiammazione **acuta** è caratterizzata da un **rapido esordio e breve durata** e prevede interessamento vascolare e connettivale con alterazione della microcircolazione e di fenomeni

essudativi rispetto alla risposta cellulare. Essa deve rimuovere **la causa del danno** e avviare un processo di **riparazione del danno**.

Le cellule che non sono state danneggiate devono pertanto essere in grado di **proliferare** (cosa che ad esempio non possiamo avere con i neuroni o se è stato danneggiato lo stroma). La riparazione del danno può evolvere o con la formazione di una **cicatrice**, o con una completa **restitutio ad integrum** dell'area danneggiata ripopolata dalle cellule proliferati, oppure se non viene risolta può **cronicizzare**.

ISTOFLOGOSI: infiammazione cronica

- Monociti macrofagi, Linfociti, fibroblasti (per la riparazione del danno);
- Cambi stromali del tessuto: proliferazione ad opera dei fibroblasti.

L'infiammazione **cronica** è caratterizzata dall'intensa reazione cellulare con iperproduzione di tessuto connettivo.

Sappiamo che il tessuto epiteliale poggia sulla lamina basale, che lo divide dal tessuto connettivale. Il processo infiammatorio coinvolge proprio il **tessuto connettivo vascolarizzante** formato da fibre collagene elastiche immerse in matrice costituita da GAG e in particolare fibroblasti, macrofagi, mastociti, che non sono altro che **cellule sentinelle**, che devono dirigersi verso la fonte del danno, richiamando a loro altre molecole dal sangue, come i leucociti.

Il tessuto connettivo è caratterizzato anche dalla presenza di una **rete capillare** che consente di scambiare ossigeno e sostanze nutritive (passaggio di sostanze dal capillare all'interstizio) per far sopravvivere il tessuto sano. Questi scambi sono regolati in modo preciso ma, in caso di infiammazione tale regolazione viene sovvertita.

Durante la fase acuta si innescano meccanismi tali da:

1. Aumentare il calibro dei vasi;
2. Aumentare la permeabilità capillare;
3. Permettere il passaggio di proteine;
4. Permettere il passaggio di cellule;
5. Passaggio di liquidi (edema).

SEGNI E SINTOMI DELL'INFIAMMAZIONE

- **Rubor:** iperemia, vasodilatazione;
- **Calor:** iperemia, vasodilatazione;
- **Tumor:** edema da accumulo di essudato, fuoriuscita di proteine;
- **Dolor:** stimolazione nervosa;
- **Functio Lesa:** dovuta alla tumefazione e al dolore.

SCAMBI TRA LA RETE CAPILLARE E IL TESSUTO

La rete capillare è **PERMEABILE** e lo scambio di soluti avvengono grazie all'equilibrio di due principali pressioni:

- **Pressione Idrostatica:** quella che esercita una colonna di liquido;
- **Pressione Colloidosmotica:** quella esercitata dai soluti sull'acqua.

Se ho due soluzioni separate da una membrana che permette il passaggio di acqua ma non di soluti, avremo che l'acqua tenderà ad andare verso la soluzione dove c'è la maggiore concentrazione del soluto.