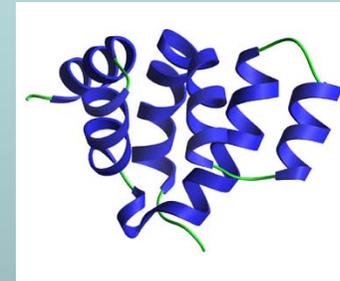
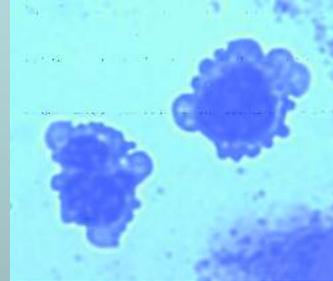


L'APOPTOSI



www.fisiokinesiterapia.biz

**PLURICELLULARITÀ:
differenziazione cellulare nei vari tessuti e specializzazione regionale delle diverse
aree del corpo**

**RETE INFORMATIVALE:
scambi di molecole aventi funzione di segnale**

Si affermano nelle cellule complessi apparati di ricezione

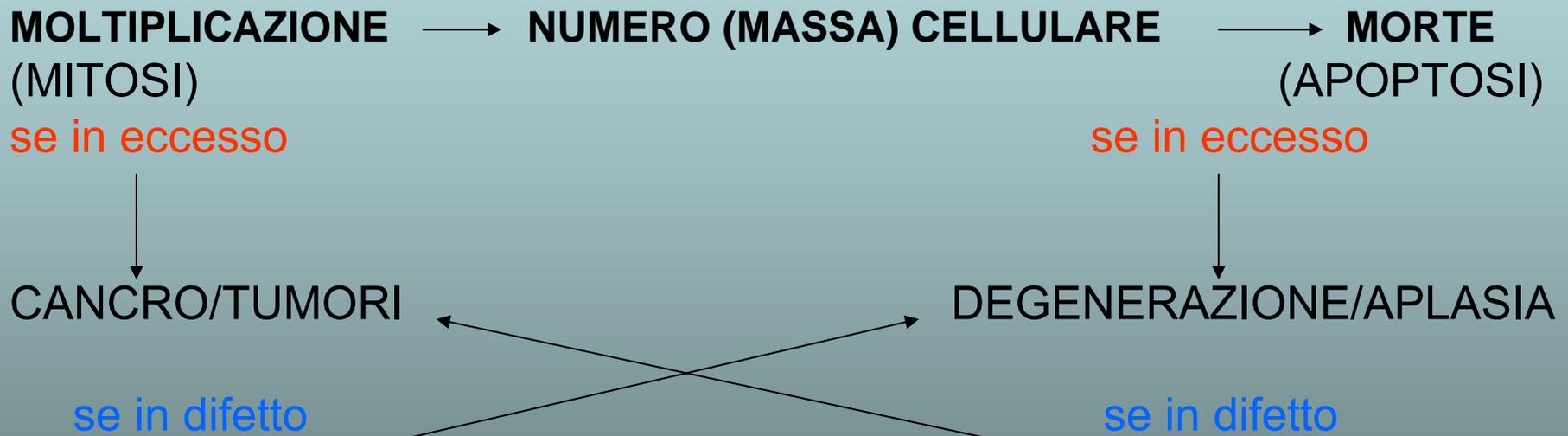
Attivazione di specifici pacchetti di geni

Esecuzione di uno dei programmi di attività cellulare

- Proliferazione**
- differenziamento**
- arresto e quiescenza**
- morte cellulare**

Omeostasi cellulare e apoptosi

L'omeostasi cellulare è frutto di un sottile equilibrio, finemente regolato, tra proliferazione e morte cellulare



Molte cellule sembrano contenere nel genoma un programma di suicidio, la cui soppressione è indispensabile per la continua sopravvivenza

La soppressione del programma di suicidio si attua attraverso fattori e segnali esterni (fattori di sopravvivenza, attacco al substrato, ecc.) che determinano un **controllo sociale** delle cellule

MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

- **NECROSI**

- Evento accidentale
- Passivamente subito dalle cellule
- Interessa gruppi di cellule
- Dovuto a trauma, veleno, anossia, ecc
- La lisi della cellula causa fenomeni di infiammazione e di autoimmunità

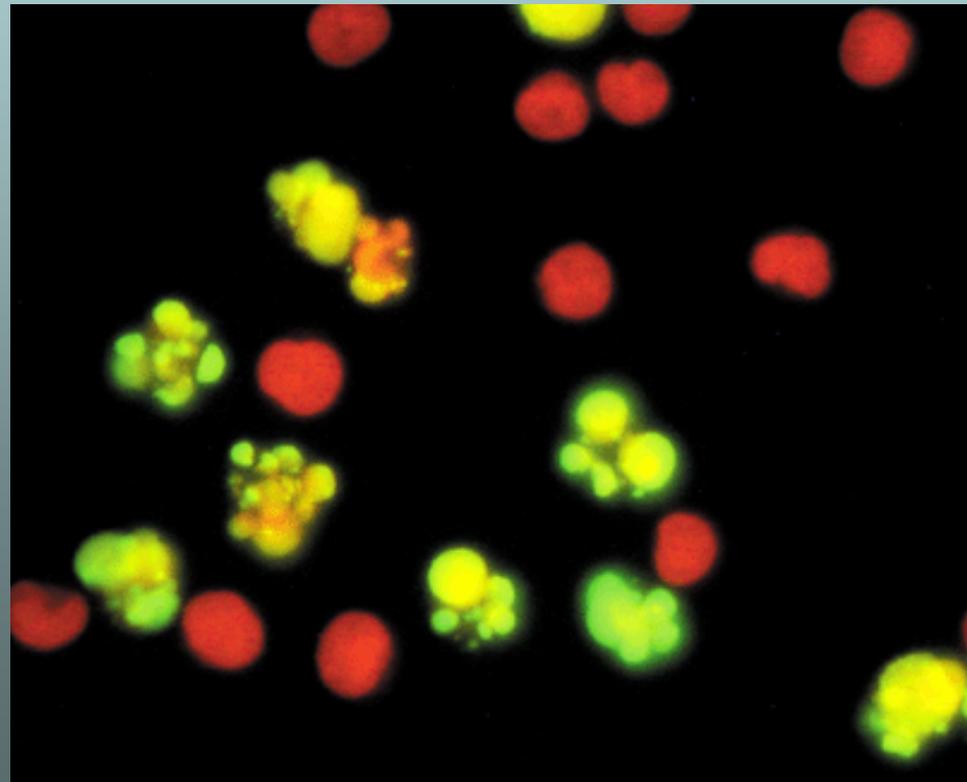
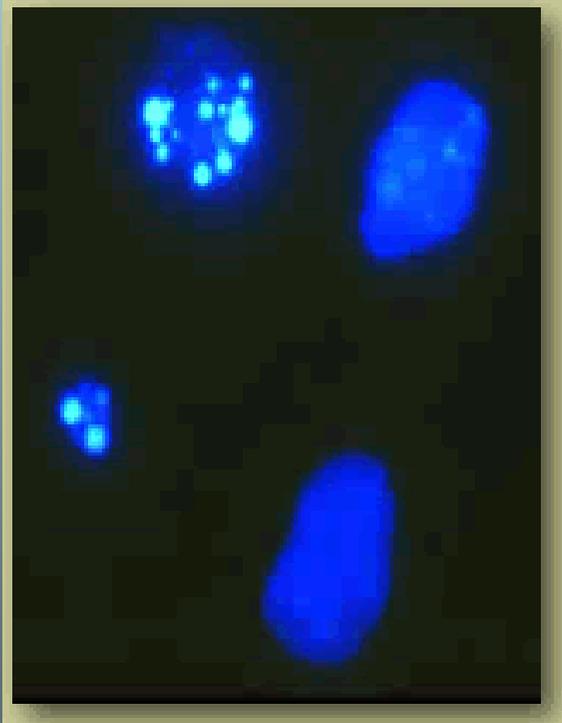
- **APOPTOSI**

- Evento programmato
- Attivamente realizzato dalle cellule
- Interessa cellule singole
- Realizzato di norma in condizioni fisiologiche
- La frammentazione della cellula e le modificazioni di superficie favoriscono la fagocitosi

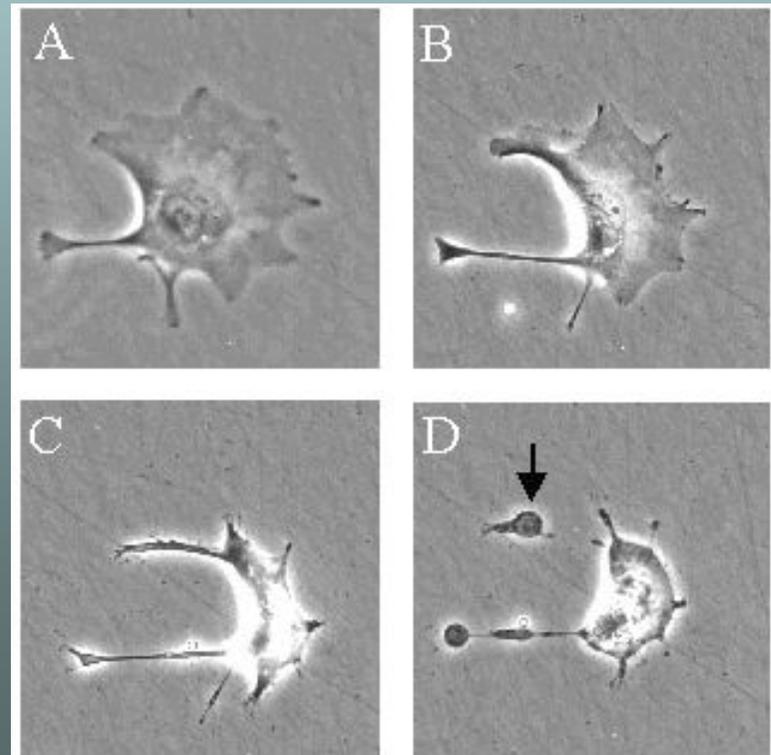
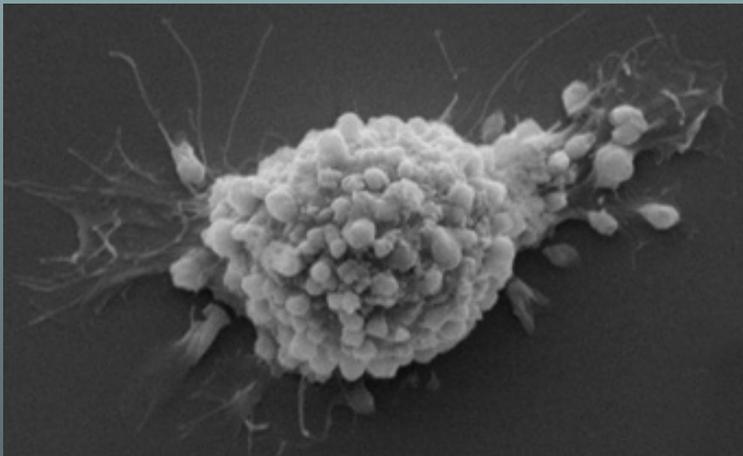
APOPTOSI: morte cellulare programmata o “suicidio cellulare”

- È una modalità di morte cellulare “attiva”, tipica di cellule di organismi pluricellulari
- È una forma di “suicidio altruista”: spesso la cellula “si sacrifica” per il bene dell’intero organismo
- Le modalità della morte sono finalizzate a evitare l’instaurarsi di fenomeni di **INFIAMMAZIONE** e di **AUTOIMMUNITÀ**
- Il fatto che non dia luogo a fenomeni di infiammazione fa sì che la morte cellulare non sia avvertita dall’organismo (morte indolore)

La cellula in apoptosi subisce modificazioni morfologiche e biochimiche che portano alla sua frammentazione e ne favoriscono la fagocitosi



Immagini di cellule in apoptosi



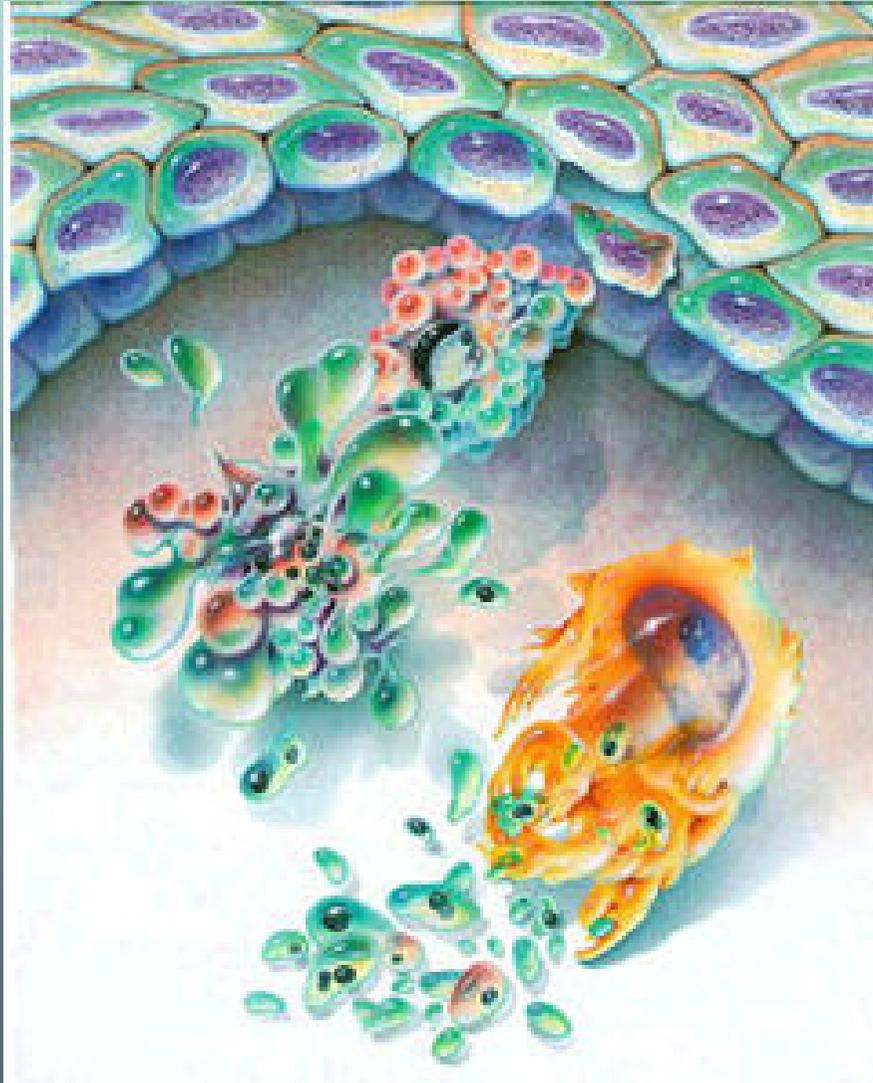
Filmati e video sull'apoptosi

- <http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/mito.html>
- http://itgmv1.fzk.de/www/toxikologie/Thema1b_mov.htm
- <http://www.hhmi.org/research/investigators/korsmeyer.html>
- <http://www.ucsf.edu/cvttl/prev/gallery.html>
- http://www.cellnucleus.com/Actin_Movies.htm

PERCHÉ SI PARLA DI *PROGRAMMA* APOPTOTICO

- VIENE PORTATO AVANTI
ATTIVAMENTE, CIOÈ CON DISPENDIO DI
ENERGIA
- È INNESCATO DA INDUTTORI
SPECIFICI
- RICHIEDE L'AZIONE DEI PRODOTTI
SPECIFICI DI ALCUNI GENI

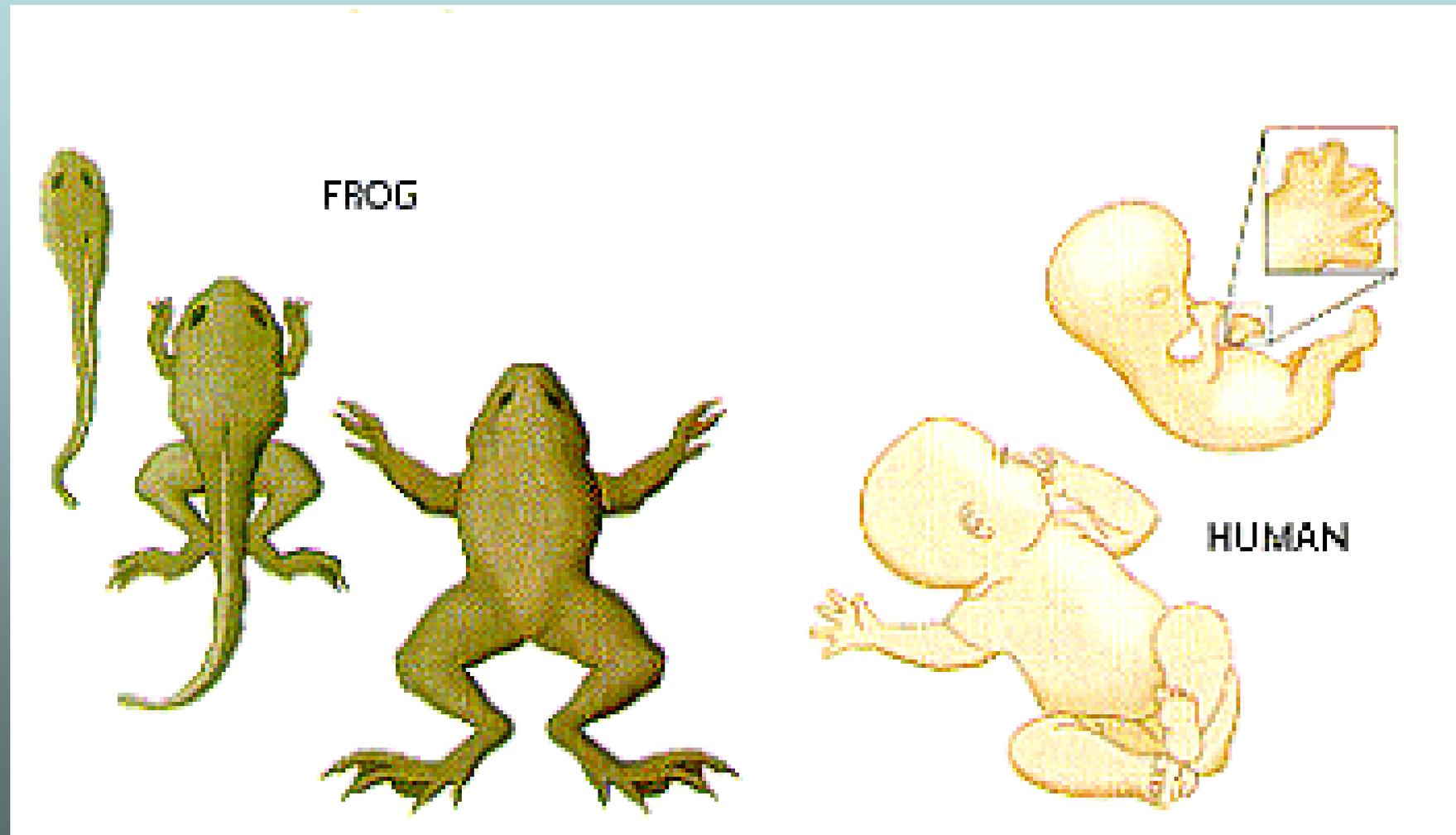
L'apoptosi è in genere seguita dalla fagocitosi della cellula morta



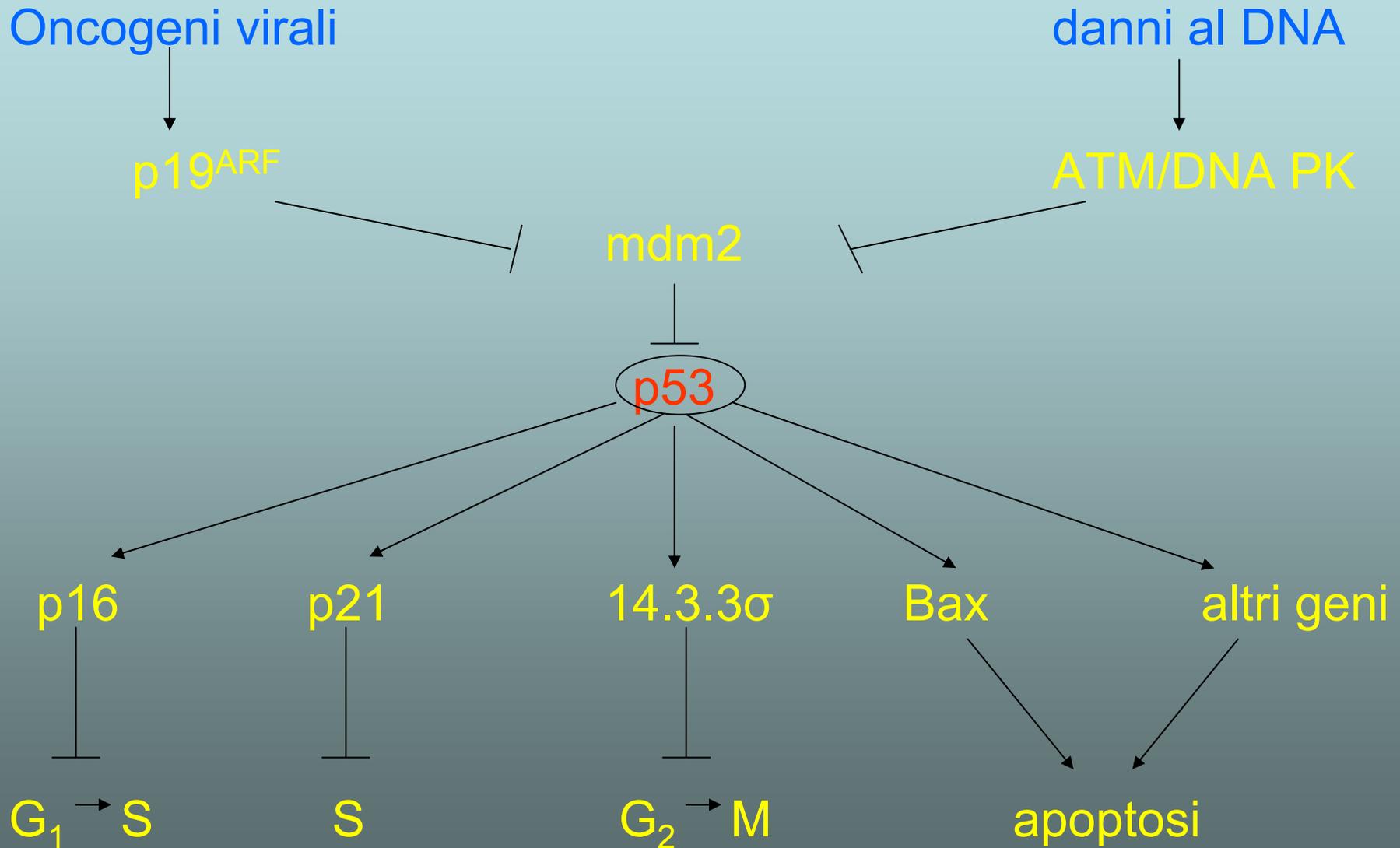
CIRCOSTANZE IN CUI SI OSSERVA APOPTOSI

- SVILUPPO EMBRIONALE/FETALE E METAMORFOSI
- NORMALE TURN-OVER TISSUTALE
- ONTOGENESI E OMEOSTASI DEL SISTEMA IMMUNITARIO
- ATROFIA ORMONE-DIPENDENTE
- DEPRIVAZIONE DEI FATTORI DI CRESCITA
- PERDITA DEL CONTATTO CELLULA-CELLULA E CELLULA-SUBSTRATO
- TOSSINE, FARMACI
- RADIAZIONI
- INFEZIONI VIRALI
- CITOTOSSICITÀ CELLULO-MEDIATA

Sviluppo embrionale/fetale e metamorfosi



Danno cellulare e apoptosi: alcuni aspetti (semplificati) delle funzioni di p53



CARATTERISTICHE PRINCIPALI DEI GENI DELL'APOPTOSI

- SONO CONSERVATI NEL CORSO DELL'EVOLUZIONE
- RISPONDONO A PIÙ STIMOLI
- APPARTENGONO A UNA DELLE SEGUENTI CATEGORIE:
 1. recettori di membrana (Fas/APO1/CD95, TNF, TRAIL)
 2. adattatori (FADD, APAF-1, *ced-4*)
 3. modulatori (anti-apoptotici, come Bcl-2 e *ced-9*, pro-apoptotici come Bax e *egl-1*)
 4. effettori (caspasi, endonucleasi, *ced-3*)
 5. inibitori (CrmA, cFLIP, survivin...)
 6. *induttori (p53, c-myc, reaper)*
 7. *della fagocitosi (flippasi)*

1. RECETTORI DI MEMBRANA CHE INDUCONO L'APOPTOSI

- Ne sono noti almeno cinque, tra cui il recettore per il TNF e il Fas/Apo1/CD95
- Rispondono a segnali di tipo omeostatico, generati da altre cellule dello stesso organismo
- Quando il ligando (TNF o FasL) si è associato alla porzione extracellulare del recettore, questo trimerizza e la porzione intracellulare* dirige la formazione di un complesso proteico, contenente i prodotti di geni “*adattatori*”
- I segnali generano una “cascata di attivazione” di enzimi proteolitici specifici, detti *caspasi*

*La porzione intracellulare è caratterizzata da un dominio DD (Death Domain)

2. ADATTATORI

- Sono proteine che mediano i segnali pro-apototici provenienti dai recettori di membrana o dai mitocondri lesionati
- Il loro compito è quello di innescare una “cascata di caspasi”
- Gli adattatori che riconoscono i recettori di membrana sono caratterizzati da un dominio DD che si lega al corrispondente dominio DD dei recettori e da un dominio DED che riconosce il corrispondente dominio delle caspasi 1, 4, 8, 10
- Gli adattatori della “via mitocondriale” sono caratterizzati da un dominio CARD, che riconosce il corrispondente dominio delle caspasi 2, 3, 9

3. MODULATORI DELL'APOPTOSI

- Localizzandosi sulla membrana esterna del mitocondrio, favoriscono (se pro-apoptotici) o rendono meno facile (se anti-apoptotici) la formazione di megacanaloni e la conseguente fuoriuscita di molecole pro-apoptotiche
- Sono strutturalmente simili tra loro (domini BH1-4 + dominio transmembrana)
- Anti-apoptotici: Bcl-2, Bcl_{XL}, ced-9
- Pro-apoptotici: Bad, Bax, Bak, egl-1
- Stimoli endogeni ed esogeni agiscono sulla propensione all'apoptosi della cellula alterando la loro quantità, localizzazione e stato di attività

4a. EFFETTORI DELL'APOPTOSI: CASPASI

- C = cisteina nel centro reattivo; ASP = riconoscono un residuo di acido aspartico nell'ambito di una sequenza di 4 amminoacidi; ASI = sono enzimi proteolitici
- I substrati da essi tagliati sono enzimi della riparazione del DNA, proteine strutturali del nucleo, proteine del citoscheletro, I-CAD
- Le caspasi "iniziatrici" (2, 8, 9, 10) sono attivate dagli "adattatori"; a loro volta attivano le caspasi "effettrici" (3, 6, 7). (La caspasi 1, 4, 5 sono coinvolte nella maturazione di citochine).
- L'attivazione consiste nel taglio proteolitico, con formazione di due frammenti; i 2 frammenti brevi e i 2 frammenti lunghi di due caspasi uguali formano un tetramero
- Il gene *ced-3* è il gene prototipo di *C. elegans*

4b. EFFETTORI DELL'APOPTOSI: ENDONUCLEASI

- **CAD**. Legato all'inibitore I-CAD, viene attivato quando l'inibitore viene tagliato dalle caspasi. Tipicamente responsabile dei tagli inter-nucleosomici. È localizzato nel nucleo.
- **AIF**. Liberato dai mitocondri quando si forma il megacanalale, determina la formazione di frammenti ad alto peso molecolare.
- **Endo-G**. Liberato dai mitocondri quando si forma il megacanalale, determina tagli a singolo filamento.

5. INDUTTORI DELL'APOPTOSI

- Alcuni induttori si attivano in base ad un “orologio interno” (es. *reaper* di *Drosophila*)
- Altri si attivano quando la cellula percepisce uno scompenso tra segnali di proliferazione e momento in cui tali segnali vengono inviati (es. *myc*)
- Altri ancora quando la cellula non riesce a compiere correttamente le tappe del ciclo cellulare a causa di danni al DNA (es. *p53*)
- Agiscono determinando uno sbilanciamento tra modulatori anti- e pro-apototici a favore dei secondi.

6. INIBITORI DELL'APOPTOSI

- Possono essere di origine virale (CrmA)
- Possono essere presenti naturalmente (c-FLIP) o essere indotti in cellule tumorali. Spesso si tratta di molecole “esca”: possiedono un dominio, es. DD, ma mancano dell'altro, es. DED e quindi competono con gli adattatori completi.
- Altri inibitori (IAP, survivin) si legano alle caspasi, impedendone l'attivazione; sono a loro volta inattivati da un fattore di origine mitocondriale (Smac/DIABLO)

FASI DELL'APOPTOSI- 1

FASE DI INDUZIONE

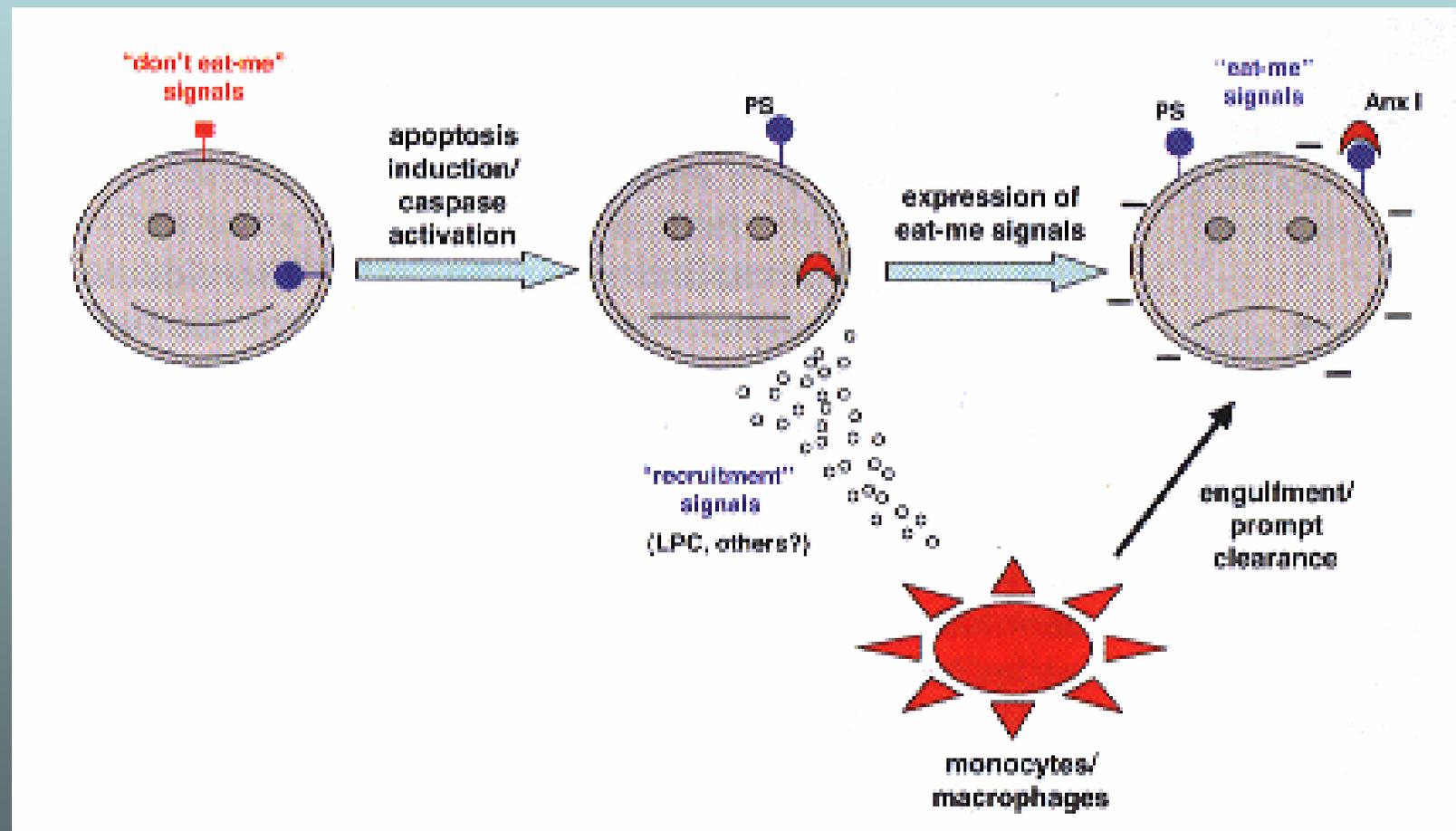
- I diversi stimoli ed eventi apoptogeni seguono due (o forse più) distinte pathways: una attivata dai "segnali di morte" che giungono ai recettori di superficie, l'altra attivata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio.
- Si ritiene che tali pathways siano regolabili e reversibili fino al momento in cui convergono nell'attivazione delle **caspasi**.
- La segnalazione **specific**a dell'apoptosi si avvale per lo più di interazioni tra domini omeotipici e non richiede attivazione genica né sintesi proteica *de novo*.

FASI DELL'APOPTOSI- 2

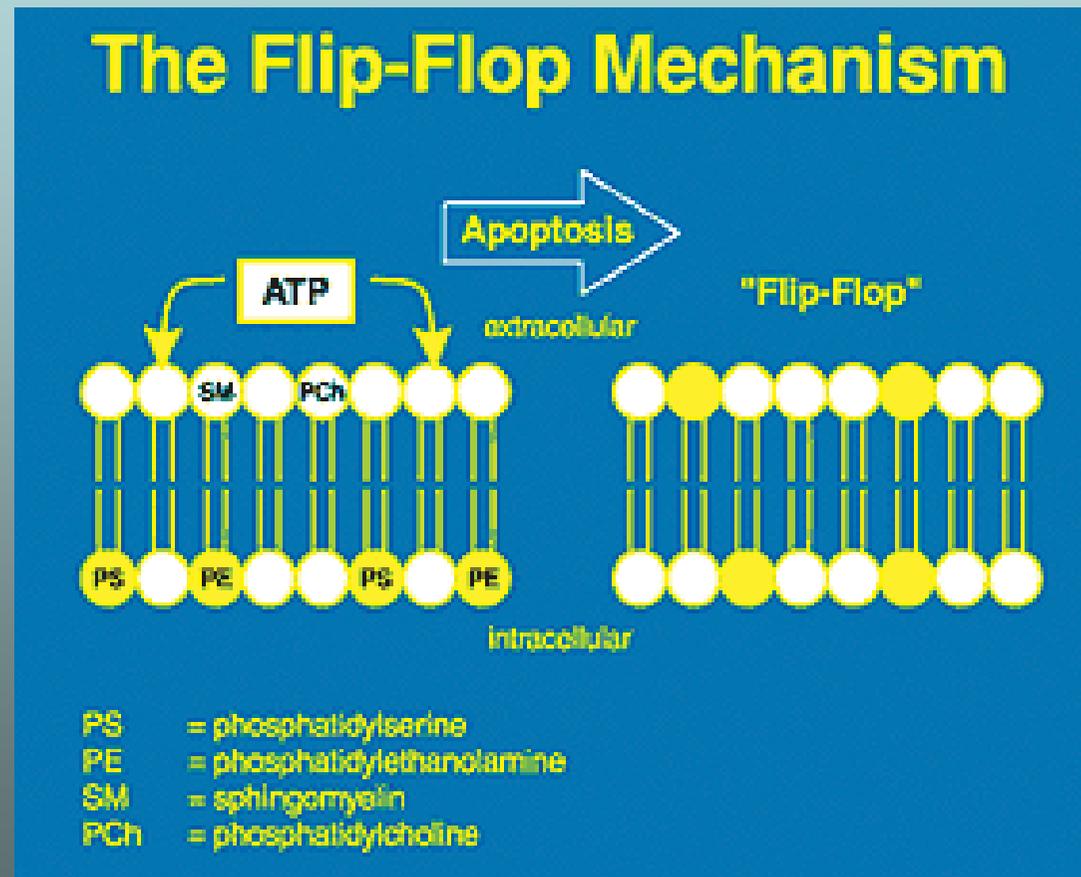
FASE DI ESECUZIONE

- L'attivazione delle caspasi è determinata da un evento proteolitico e determina a sua volta un'ulteriore cascata di eventi proteolitici e nucleolitici preordinati, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi.
- La finalità è quella di predisporre la cellula ad essere facilmente fagocitata in assenza di fuoriuscita di materiale potenzialmente pro-infiammatorio o immunostimolante; questa finalità viene perseguita in modo metabolicamente attivo.

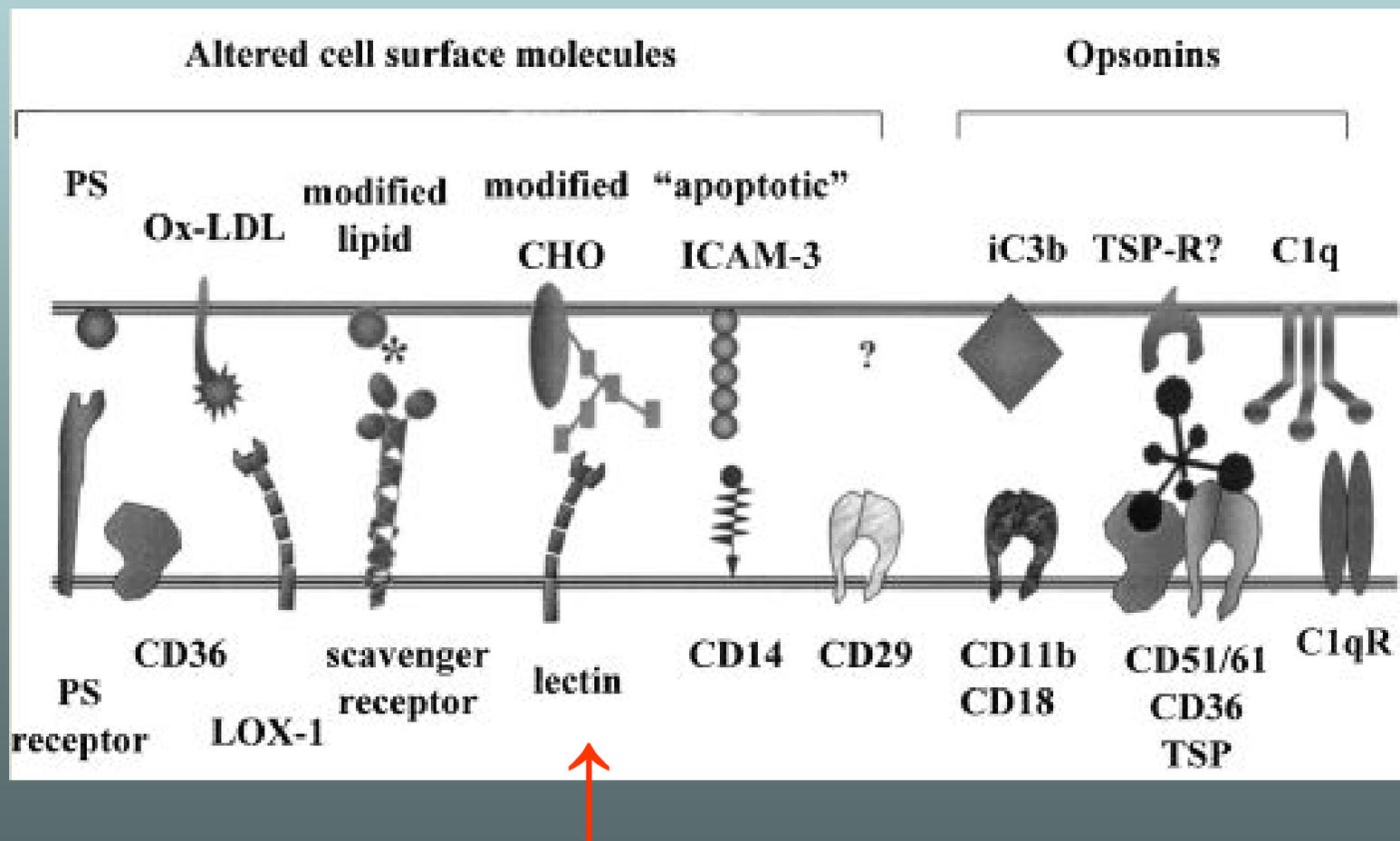
7. Fagocitosi: segnali “eat-me” nelle cellule di mammifero



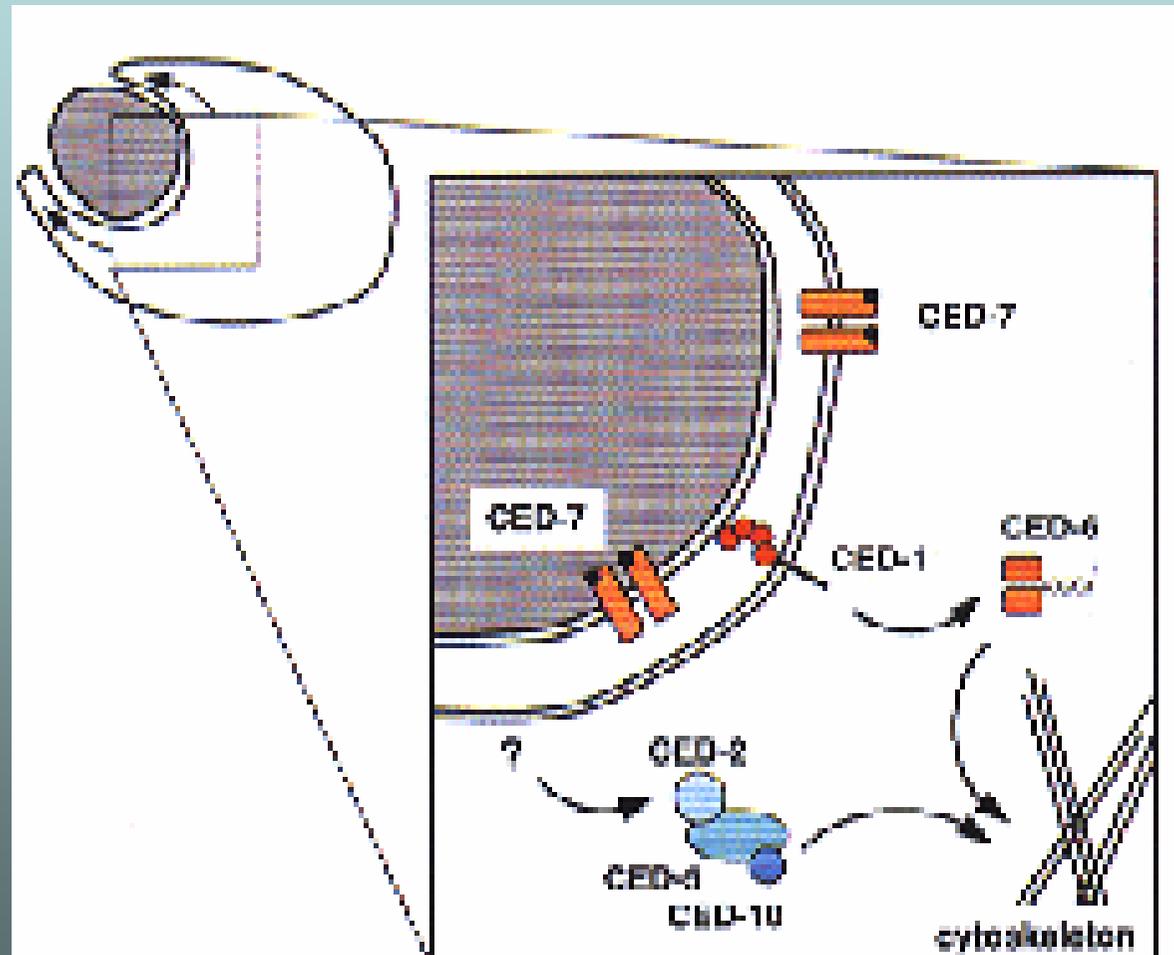
Modificazioni della superficie cellulare: esposizione della fosfatidilserina



Molecole di superficie coinvolte nel riconoscimento delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi



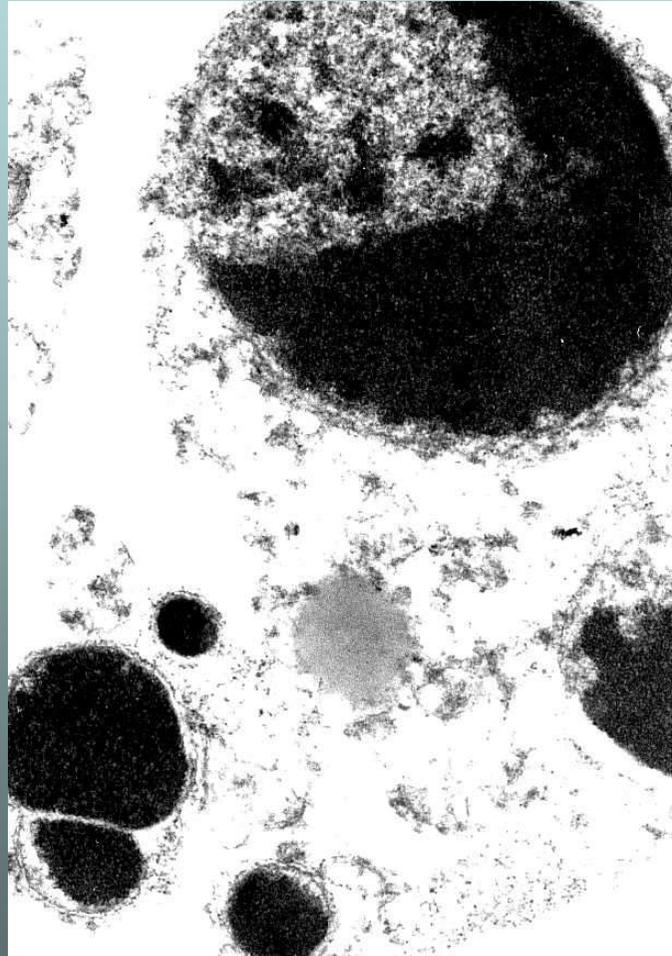
CED-1 e il modello molecolare di “eliminazione dei cadaveri” in *C. elegans*



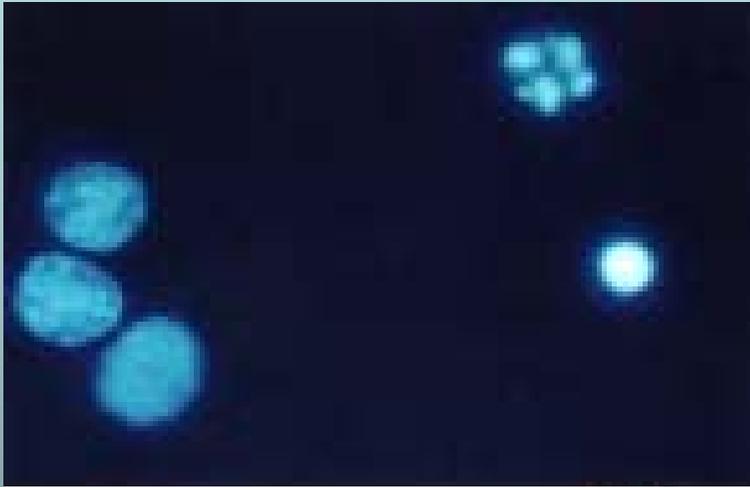
Alcune tecniche di studio dell'apoptosi:

- Microscopia elettronica
- Microscopia ottica a fluorescenza
- Elettroforesi del DNA
- TUNEL
- Citofluorimetria a flusso
- KO di geni dell'apoptosi

CELLULA APOPTOTICA AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

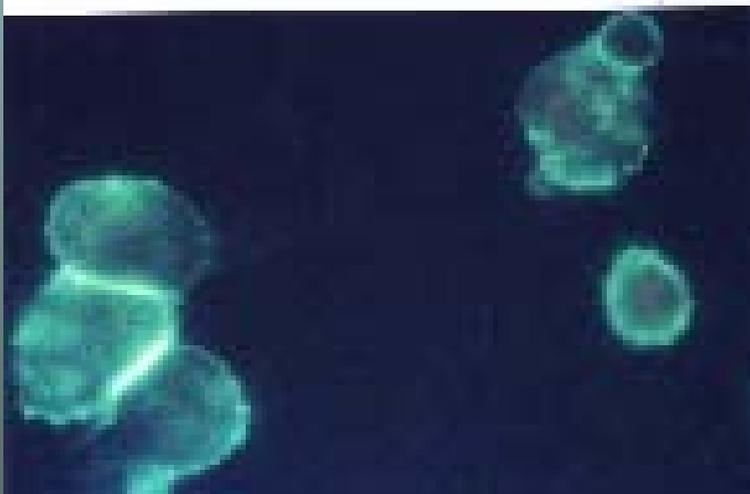


H33342 – FITC EC



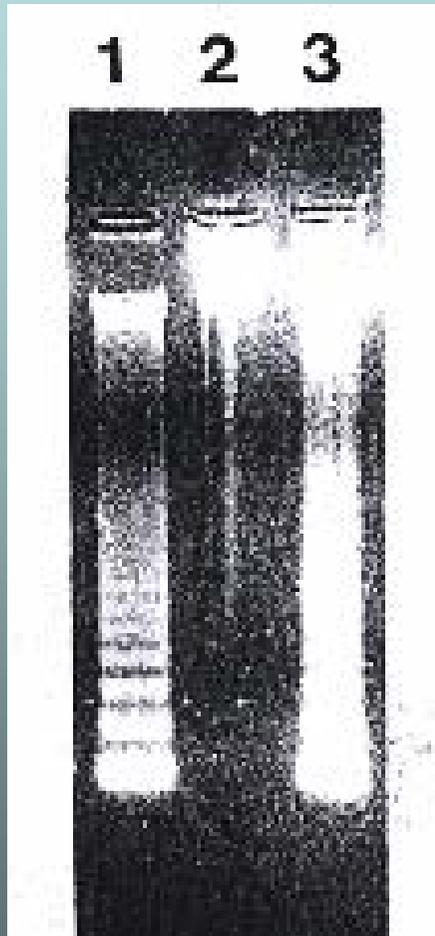
3 linfociti normali a sinistra e 2 apoptotici a destra.

In alto: un colorante fluorescente che si lega al DNA evidenzia la cromatina condensata tipica delle cellule in apoptosi



In basso: un colorante fluorescente che si lega alla membrana plasmatica evidenzia la presenza di un'estroflessione (*bleb*) della membrana di una cellula apoptotica

Elettroforesi del DNA di cellule in apoptosi



1- DNA di cellule in apoptosi: si può osservare il *ladder* (*scaletta*), formato da frammenti di peso molecolare discreto (multipli di nucleosomi)

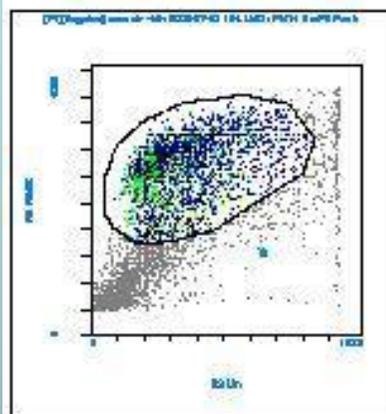
2- DNA ad alto peso molecolare di cellule integre

3- DNA di cellule in necrosi: i frammenti sono di peso molecolare vario, per lo più piccolo

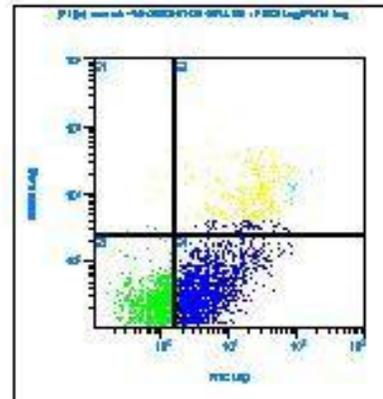
La tecnica TUNEL evidenzia, in questo embrione di *Xenopus*, le cellule in apoptosi



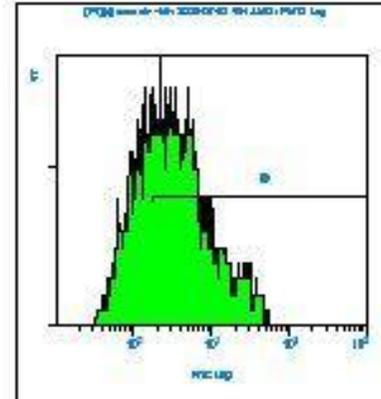
Cellule in coltura con bassa (sopra) o alta (sotto) percentuale di apoptosi. Il citofluorimetro evidenzia il legame della membrana con una lectina (sin) e con l'annessina-V (dx); entrambe aumentano con l'apoptosi



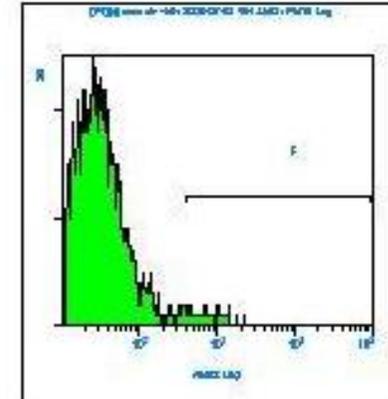
(F1)[Ungated] maa ctr -14h 2003-07-02 16
 Region Number %Total %Gated X-M
 a 5000 58.05 58.05 372



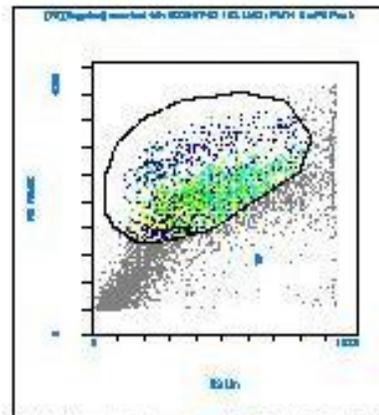
(F1)[a] maa ctr -14h 2003-07-02 161.LMD :
 Region Number %Total %Gated X-M
 E1 24 0.28 0.48 0.8
 E2 592 6.87 11.84 26.
 E3 1399 16.24 27.98 1.0
 E4 2985 34.66 59.70 6.6



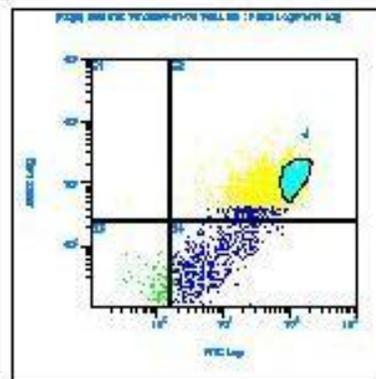
(F1)[a] maa ctr -14h 2003-07-02 161.LMD :
 Region Number %Total %Gated X-M
 D 3352 38.92 67.04 10.



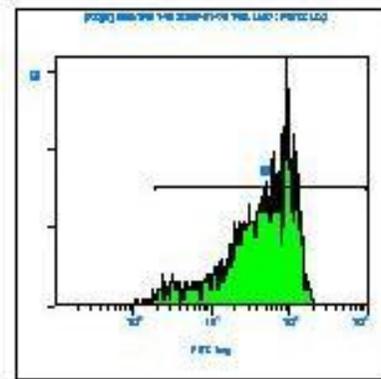
(F1)[a] maa ctr -14h 2003-07-02 161.LMD :
 Region Number %Total %Gated X-M
 F 471 5.47 9.42 13.



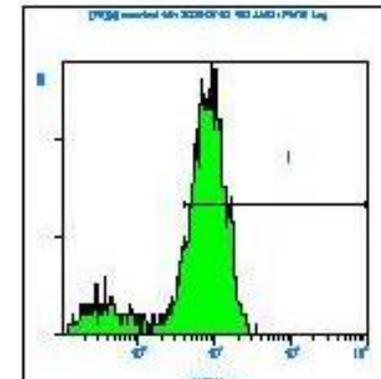
(F2)[Ungated] maa trat 14h 2003-07-02 16
 Region Number %Total %Gated X-M
 b 5000 50.56 50.56 424



(F2)[a] maa trat 14h 2003-07-02 162.LMD : PM1
 Region Number %Total %Gated X-Mean
 G1 2 0.03 0.06 1.0
 G2 3876 39.20 77.52 68.8
 G3 153 1.55 3.06 1.1
 G4 968 9.78 19.36 10.2
 J 1378 13.93 27.56 110.5

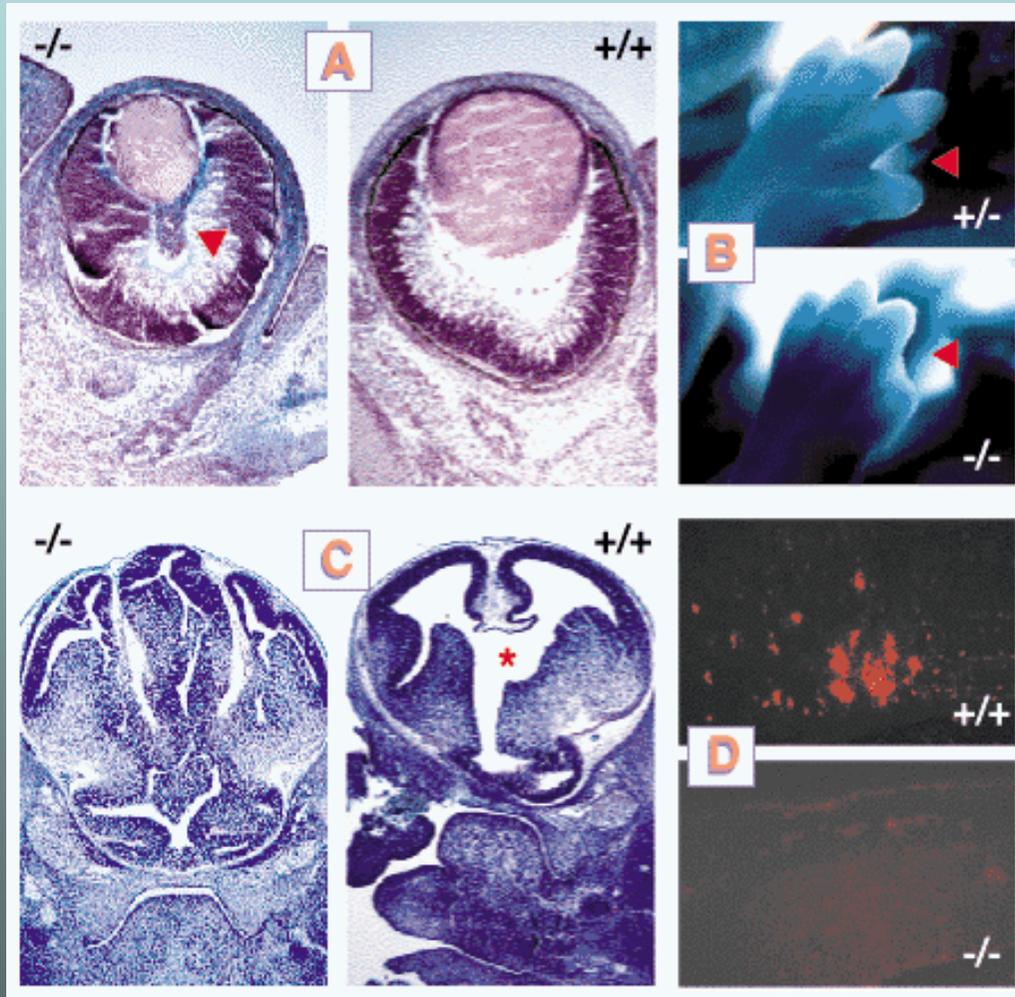


(F2)[a] maa trat 14h 2003-07-02 162.LMD :
 Region Number %Total %Gated X-M
 H 4811 48.65 96.22 57.



(F2)[a] maa trat 14h 2003-07-02 162.LMD :
 Region Number %Total %Gated X-M
 I 3517 35.56 70.34 10.

Effetto del knock-out di APAF-1, l'adattatore che fuoriesce dal mitocondrio



A- iperplasia retinica con eccesso di membrana ialoide

B – mancato riassorbimento della membrana interdigitale

C- masse ectopiche nell'encefalo

D- mancata attivazione della caspasi-3 in aree cerebrali

Trasduzione del segnale di apoptosi e pathways apoptotiche

- La cellula riceve di continuo informazioni, segnali e stimoli che ne condizionano la sopravvivenza
- segnali di sopravvivenza e segnali di morte vengono integrati all'interno della cellula

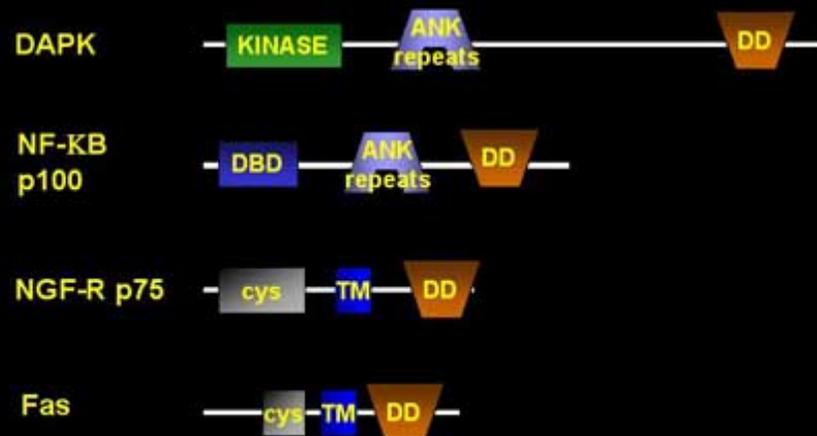
- I ligandi possono essere solubili o esposti sulla membrana di altre cellule
- La cascata del segnale si avvale di interazioni omeotipiche tra domini presenti su recettori di membrana, adattatori e caspasi
- Il segnale di membrana può influire anche sulla permeabilità del mitocondrio

PATHWAYS:

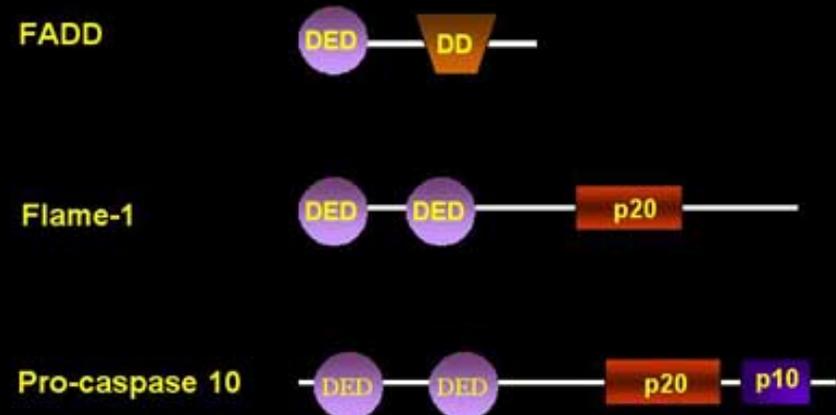
- segnalazione mediata da recettori di membrana
- alterazione del rapporto tra modulatori anti e pro-apoptotici a favore dei secondi, dovuta a stress ossidativo o a danni genotossici
- introduzione di granzyme B, una caspasi pre-formata, rilasciata dai CTL

Interazione di domini proteici nell'apoptosi

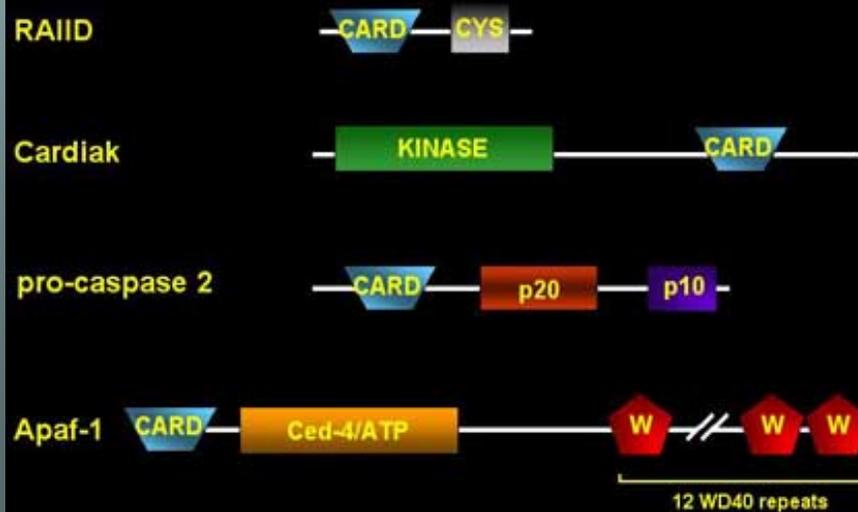
Examples of domain proteins



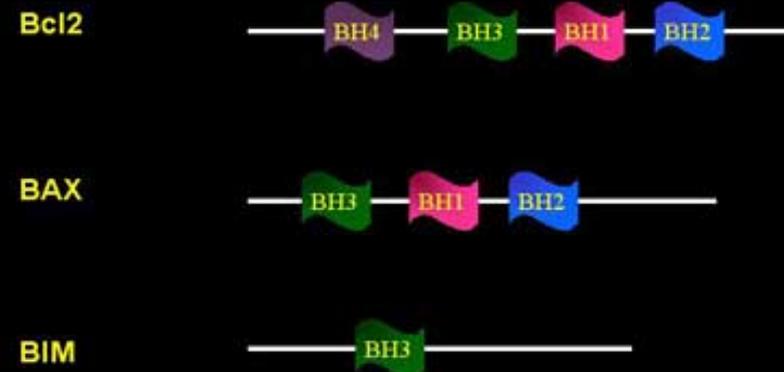
Examples of domain proteins



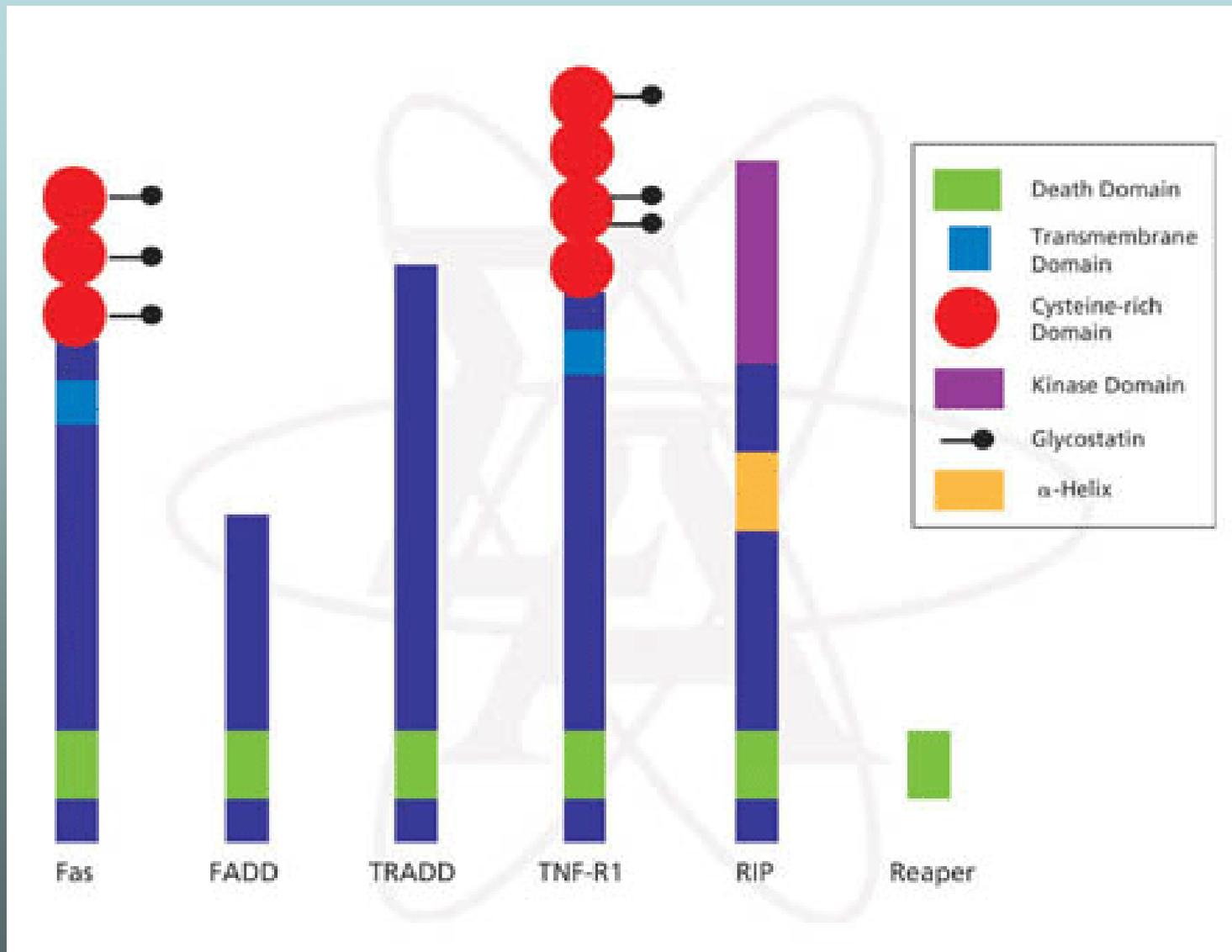
Examples of domain proteins

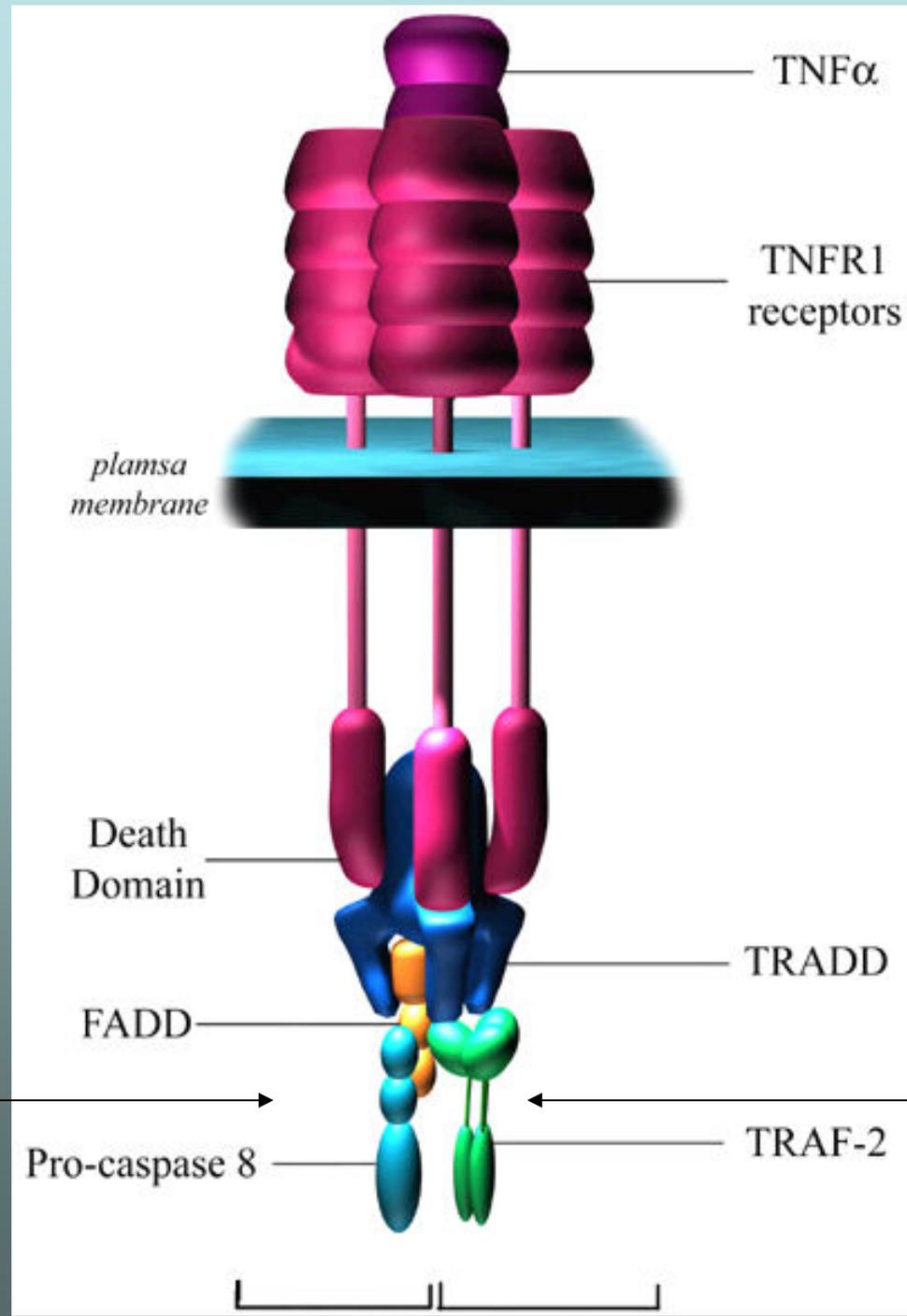


Examples of domain proteins



Struttura di alcuni recettori e adattatori di membrana

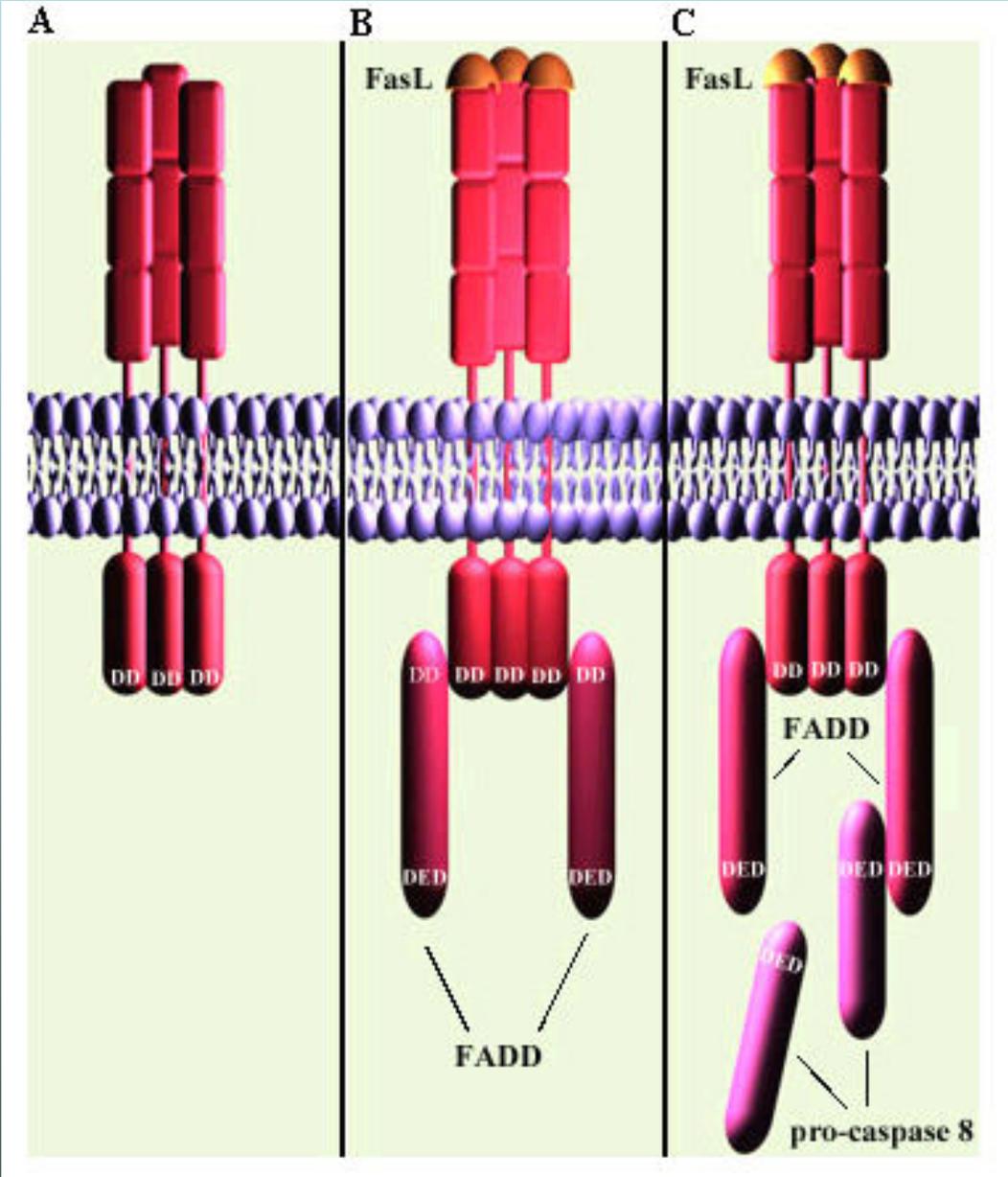




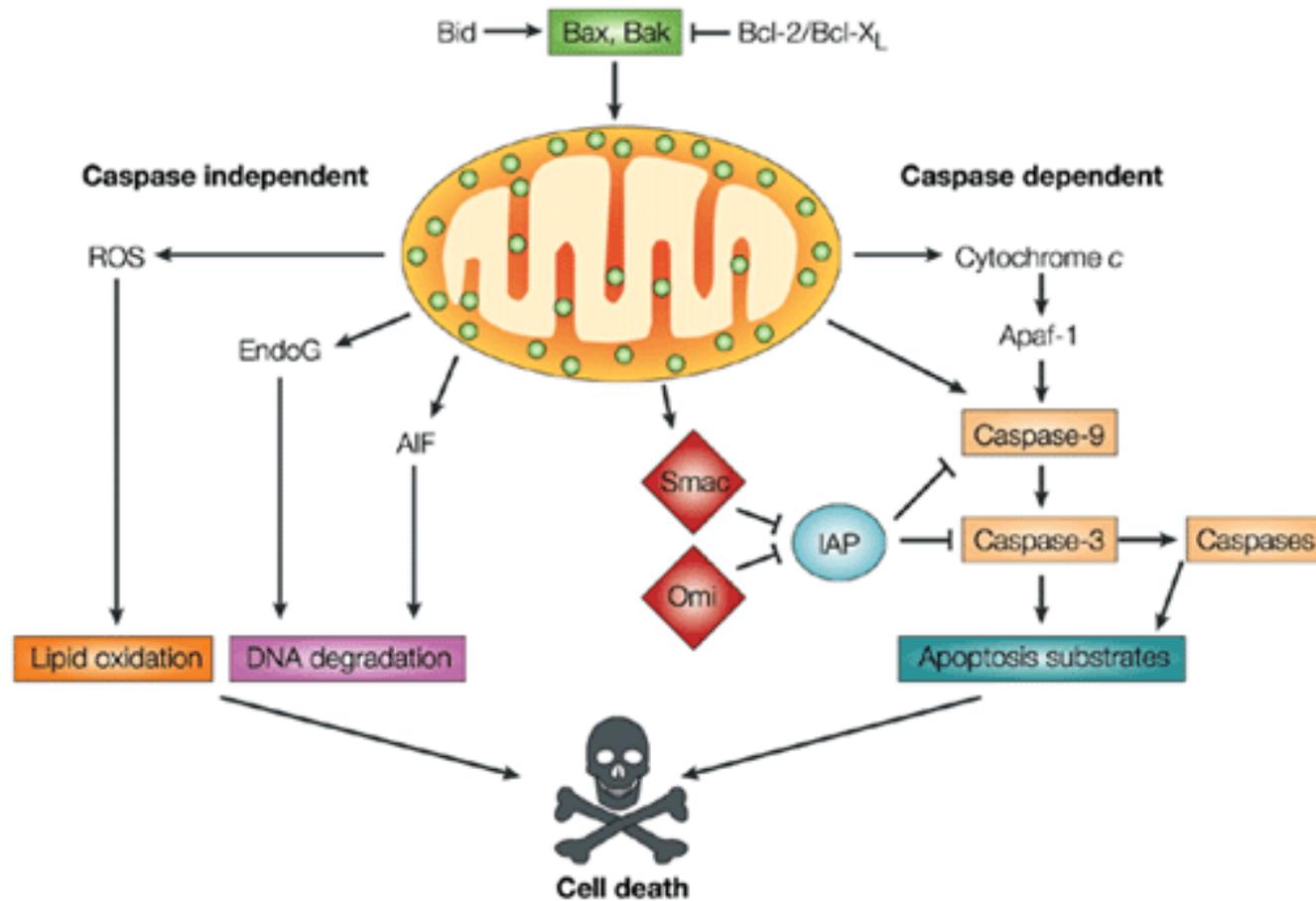
attivazione dell'apoptosi

Segnalazione via NF- κ B e pathway JNK/Ap-1

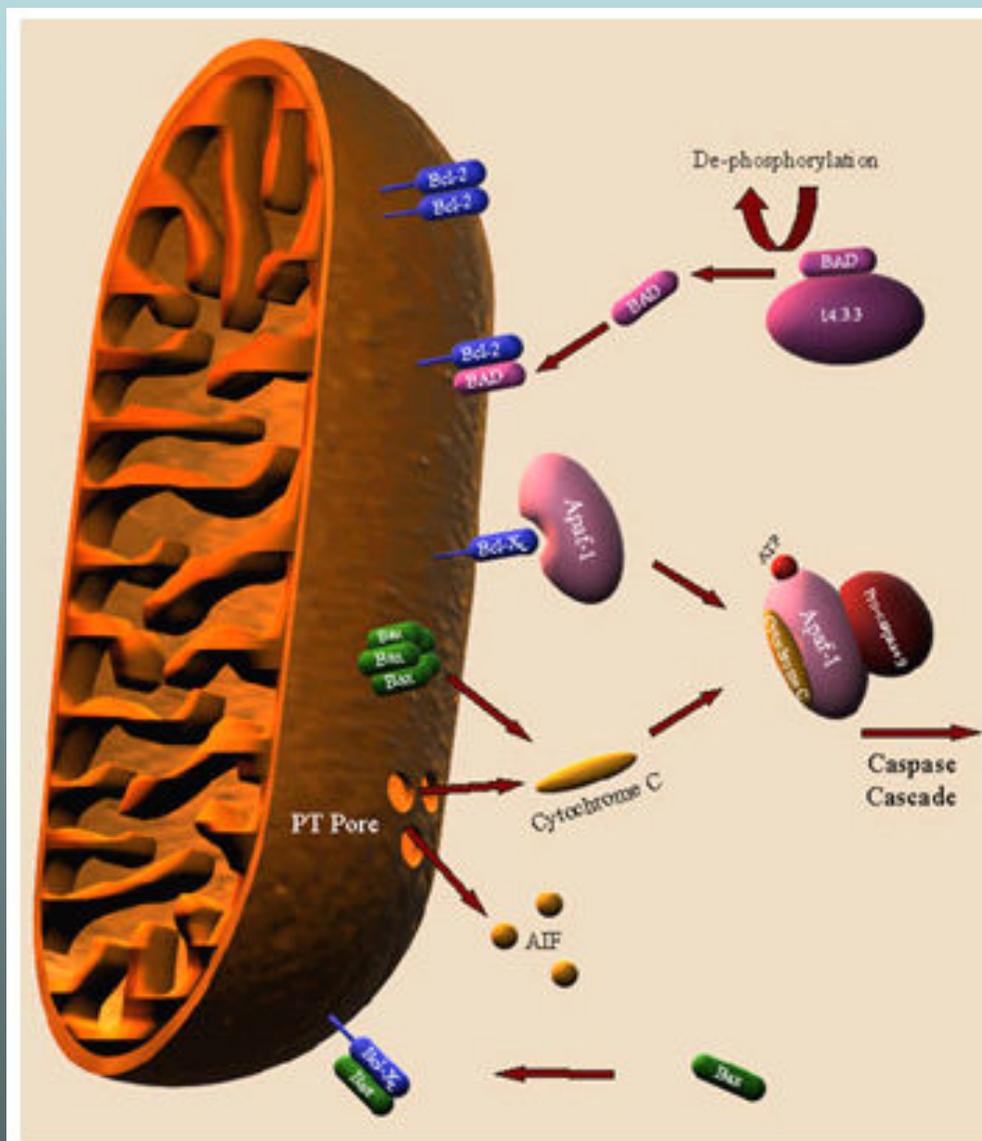
La segnalazione di Fas/FasL



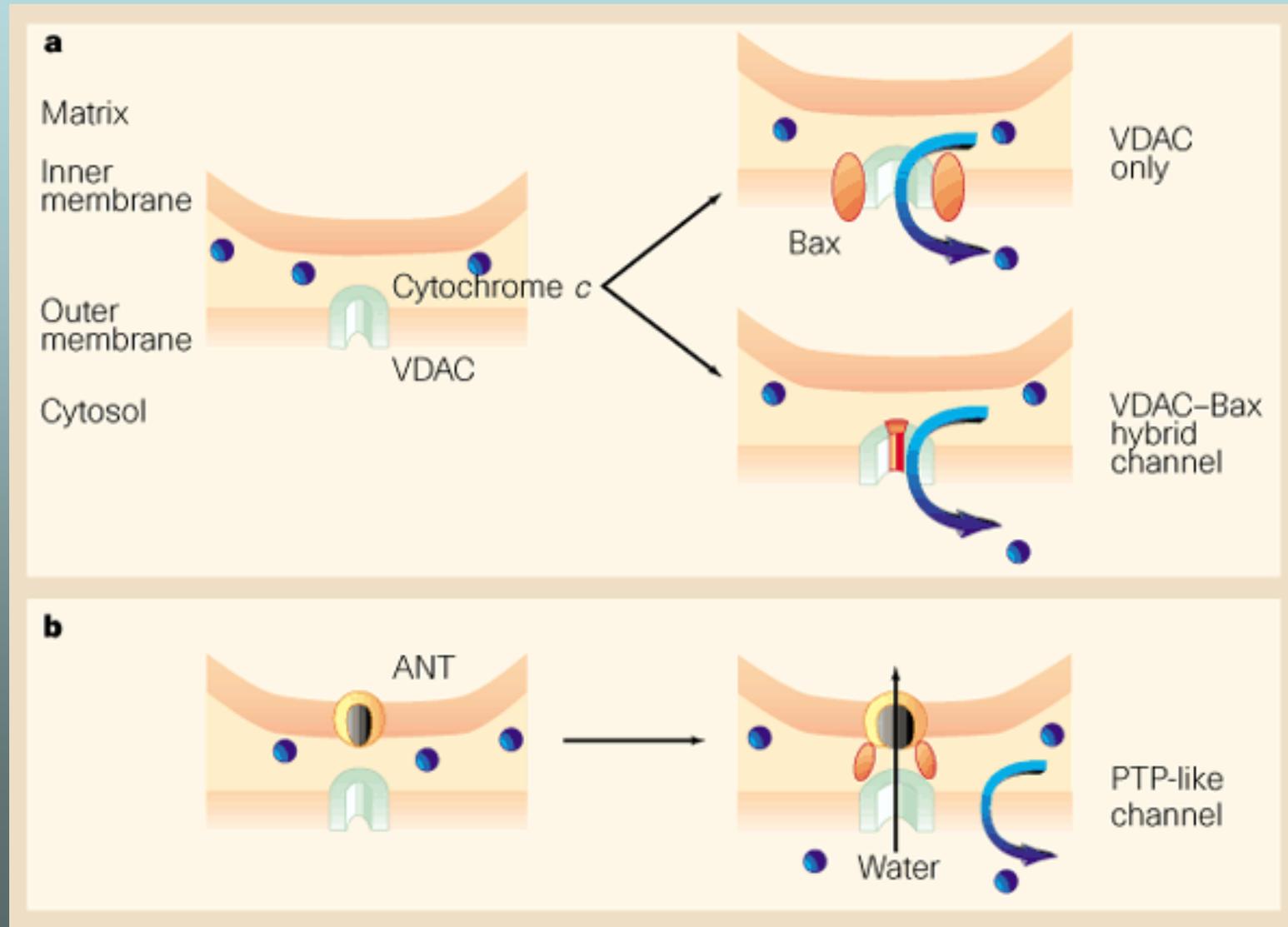
La via di segnalazione mitocondriale



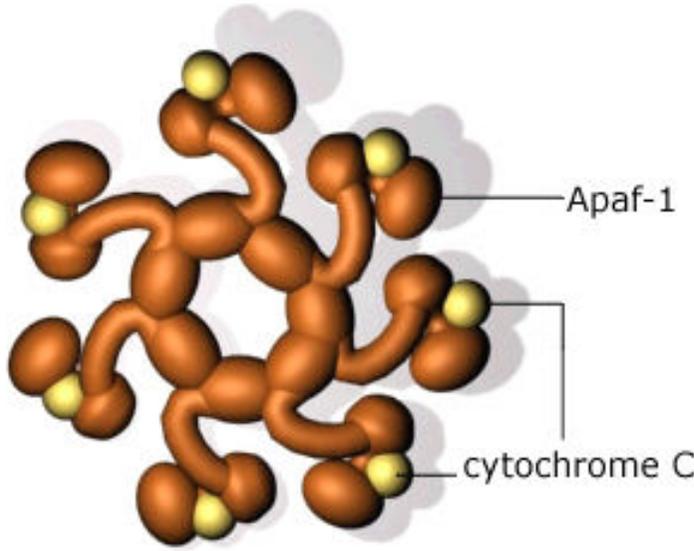
il ruolo del mitocondrio



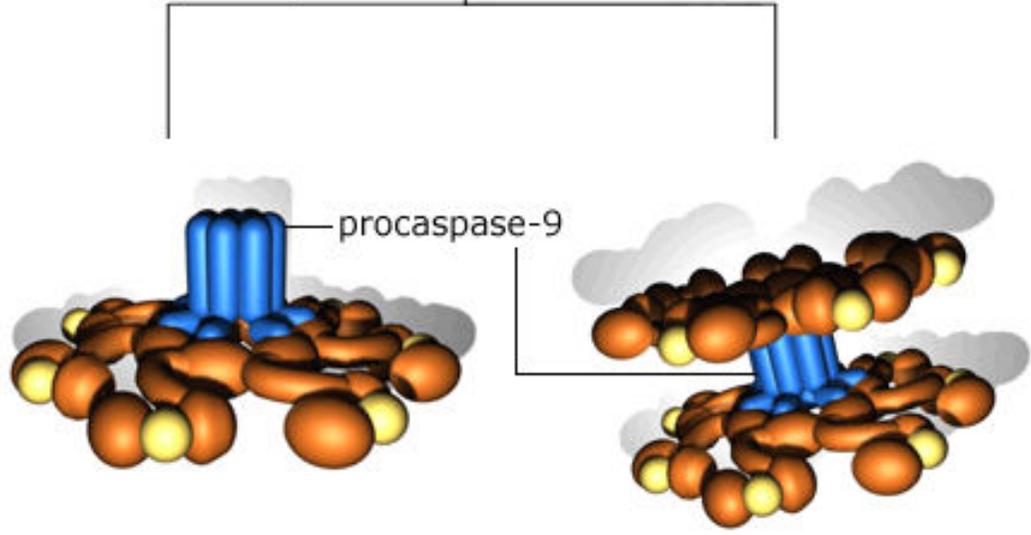
Apertura del poro mitocondriale: due delle ipotesi alternative



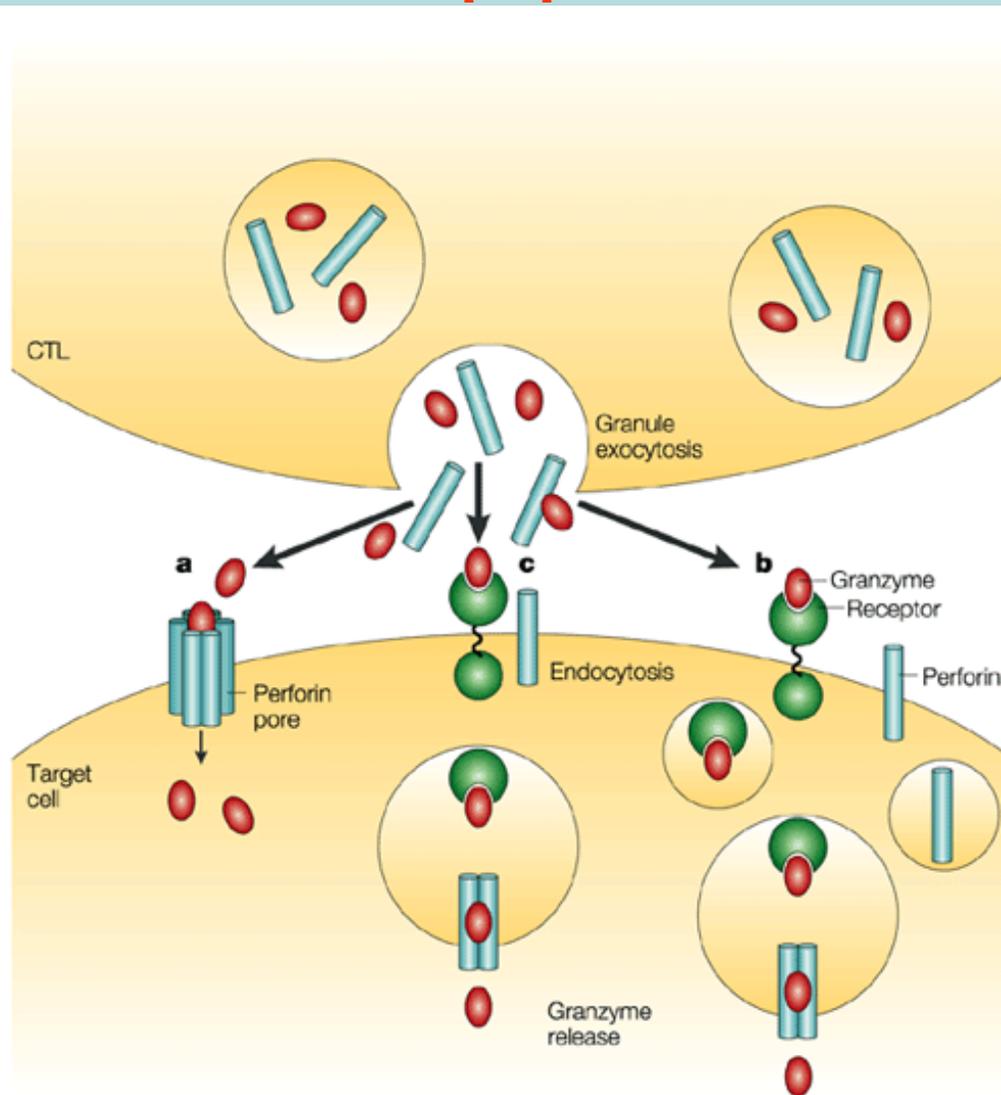
First stage of apoptosome formation



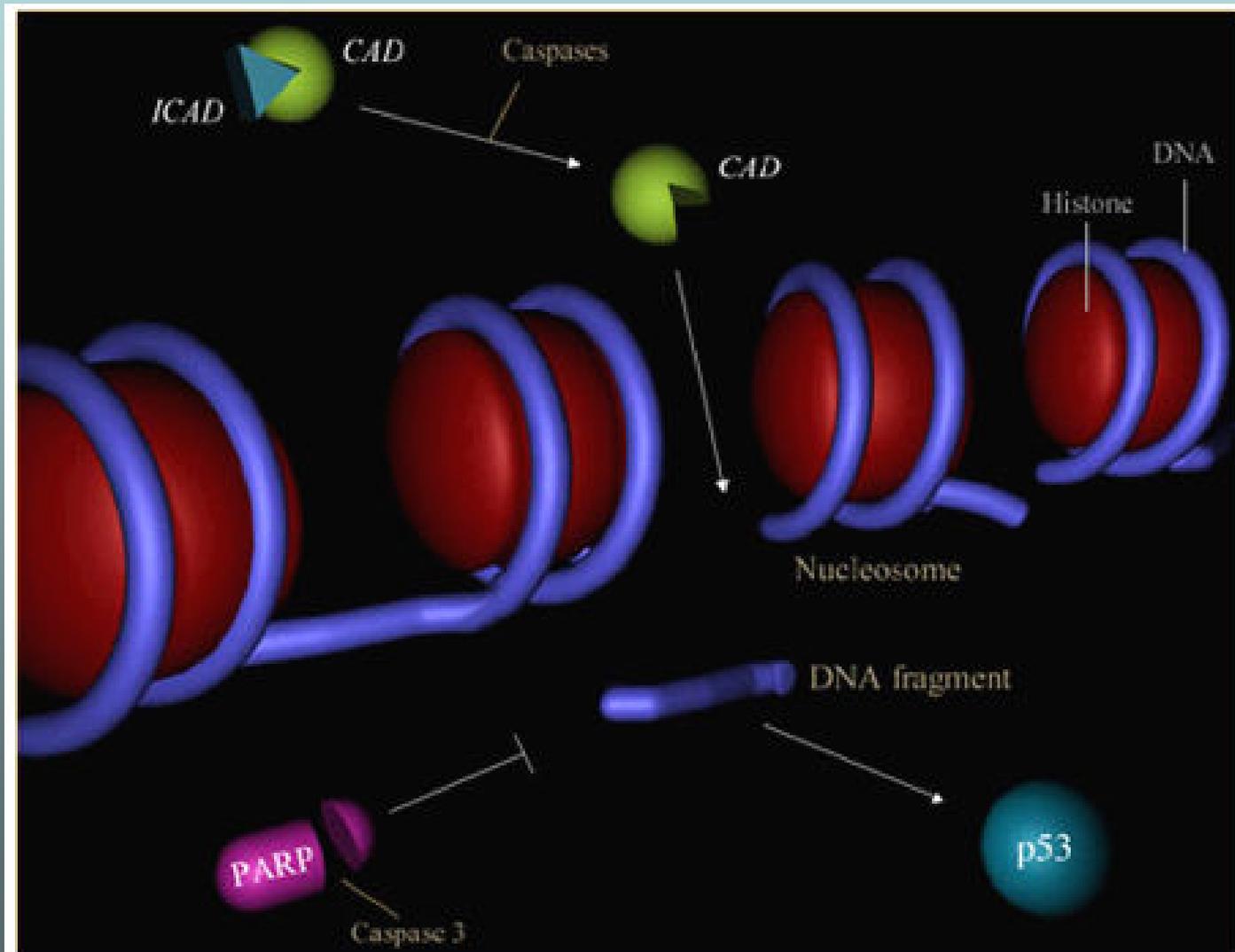
Recruitment of procaspase-9



Il granzyme B, una caspasi già attiva, viene inserita da linfociti citotossici nella cellula bersaglio, inducendone l'apoptosi

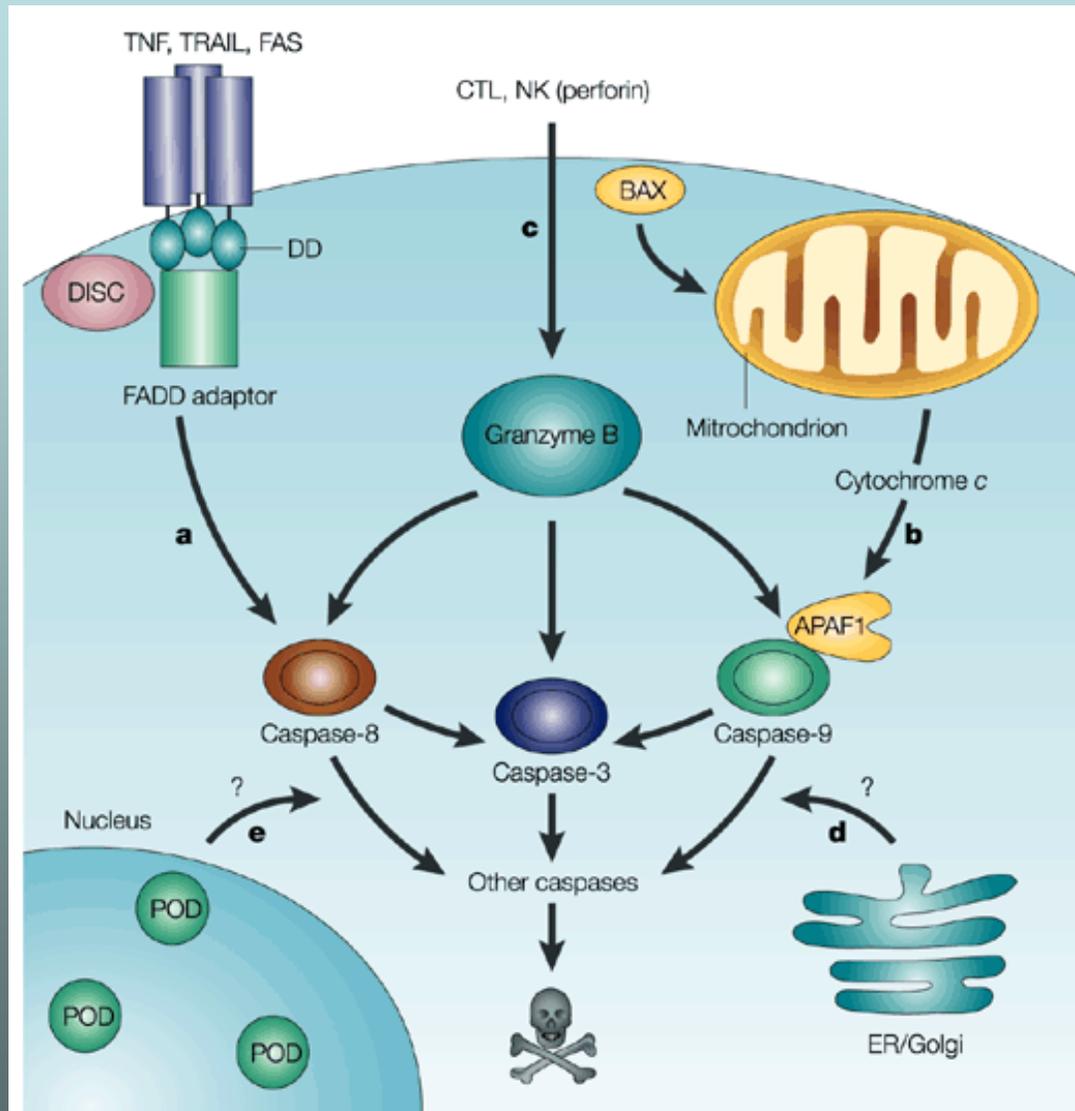


effetti a livello del nucleo



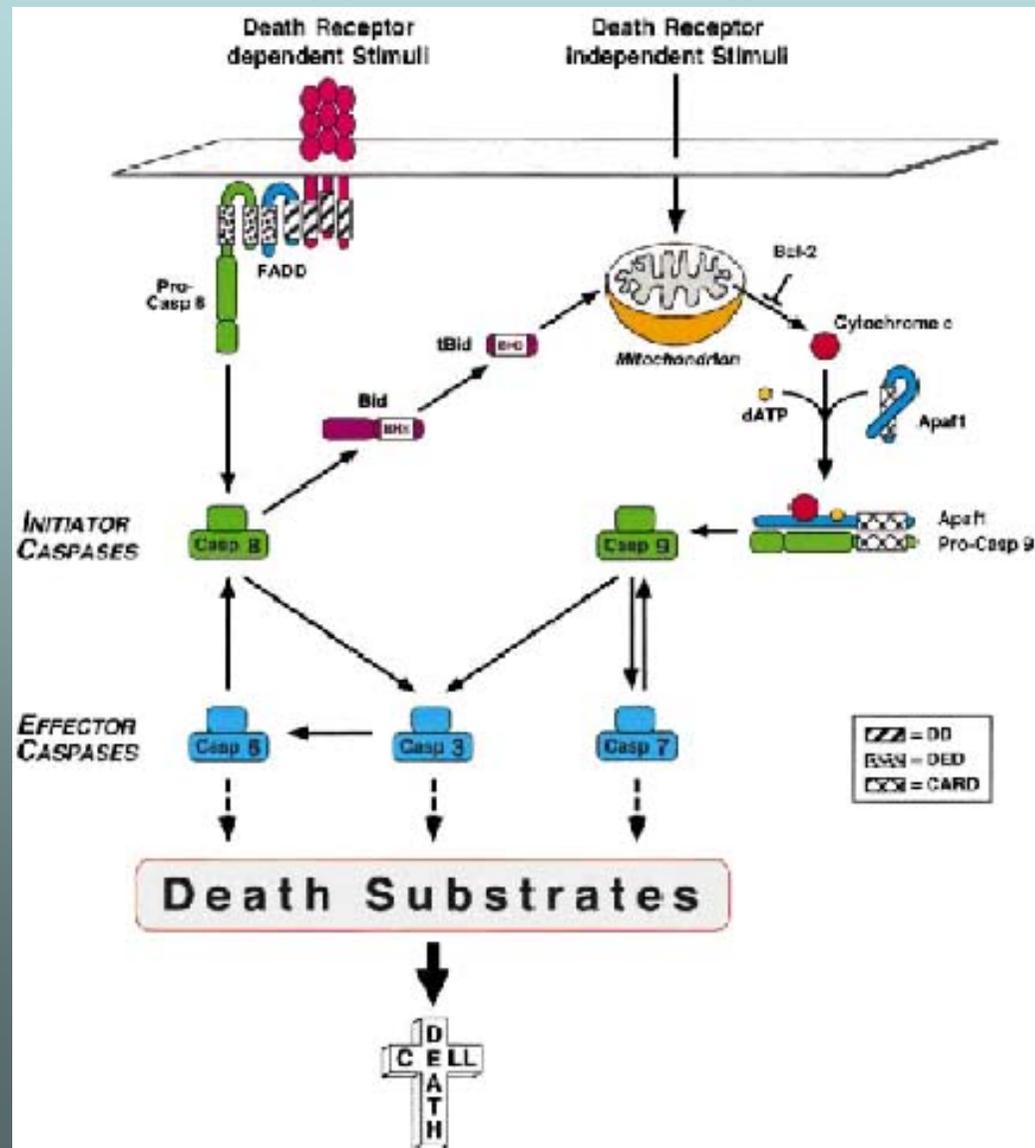
Apoptotic pathways – 1

schema che comprende le principali vie di induzione



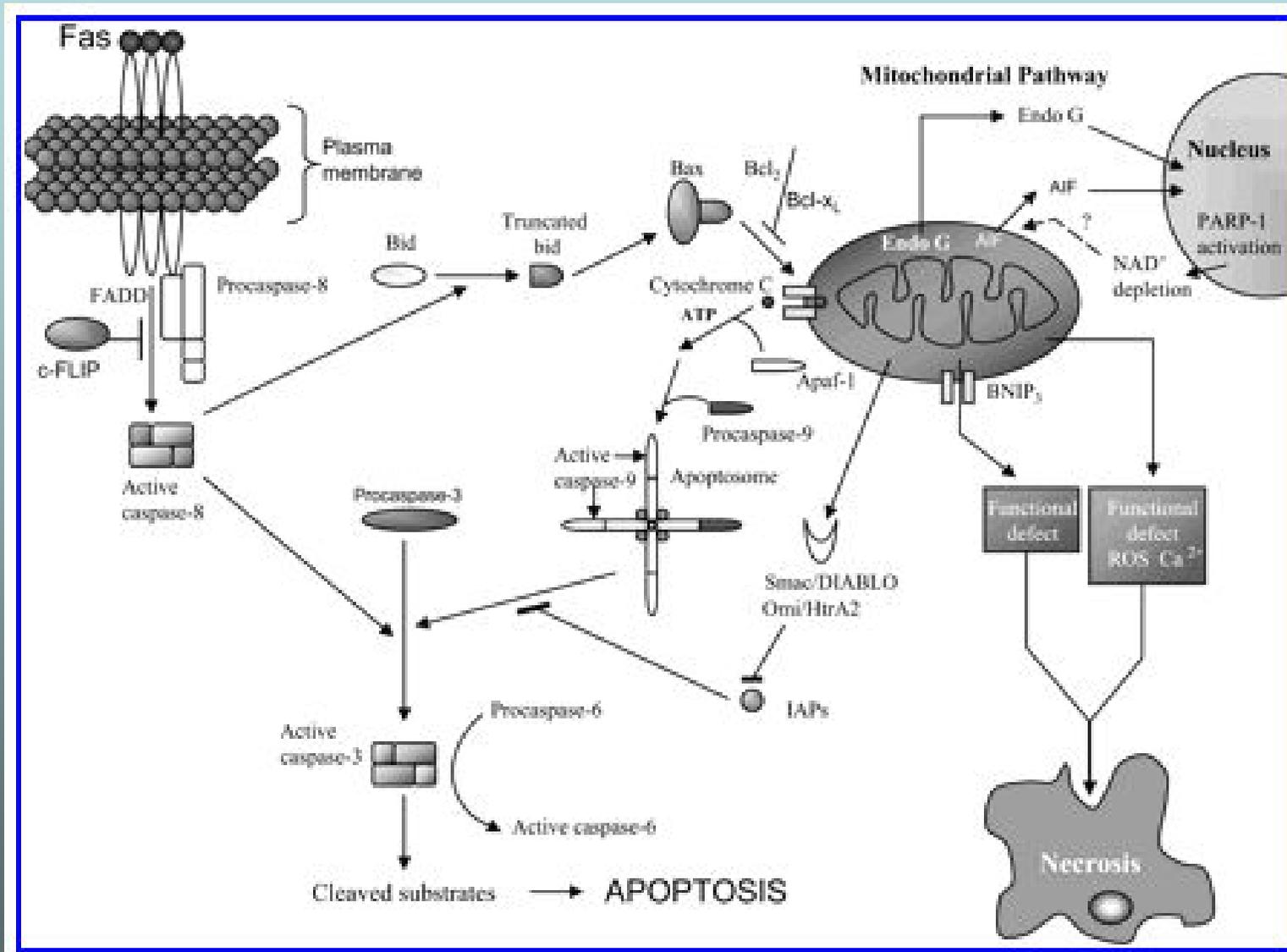
Apoptotic pathways – 2

schema che evidenzia i rapporti tra via recettoriale e via mitocondriale



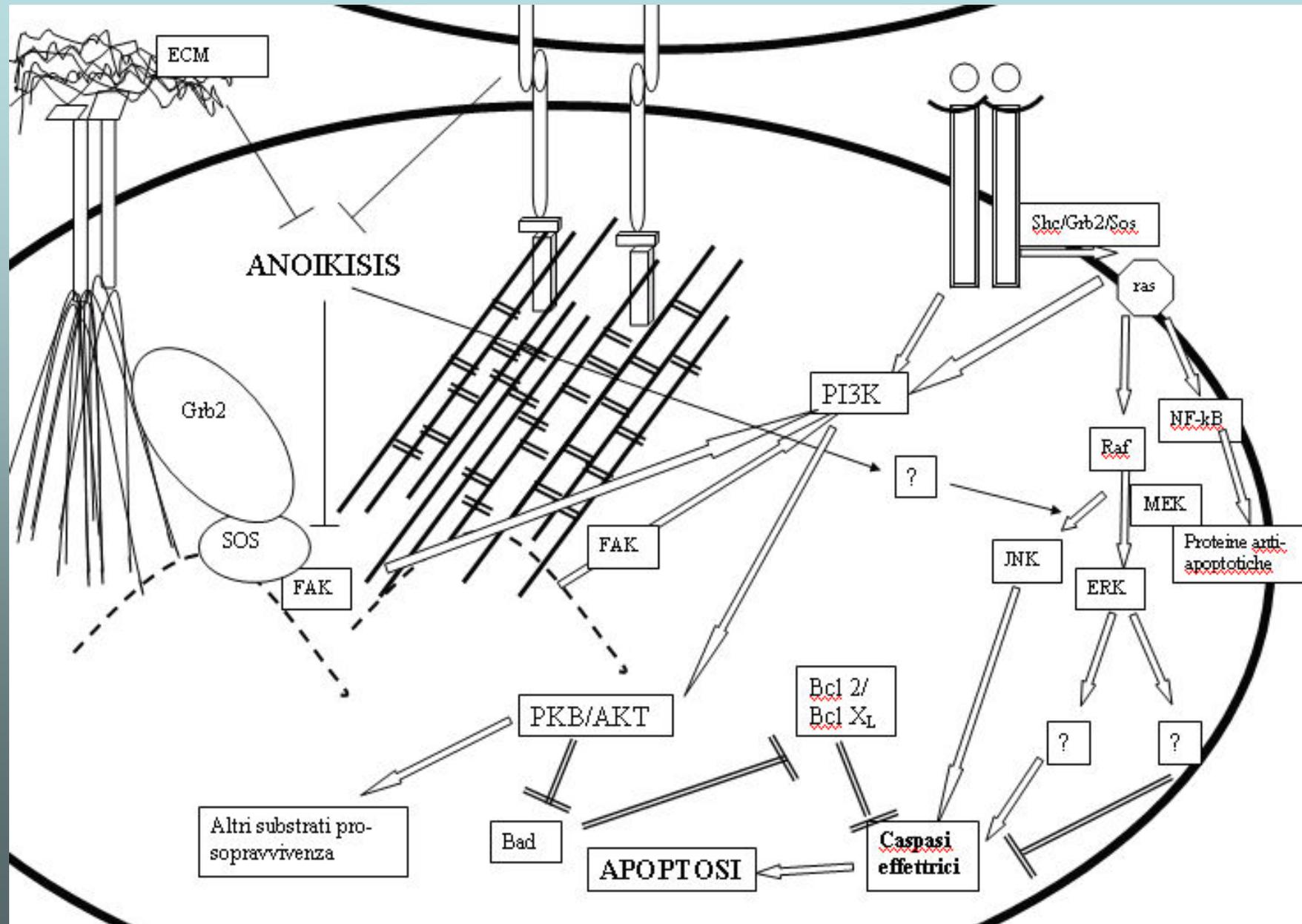
Apoptotic pathways – 3

schema che evidenzia i rapporti tra via recettoriale e mitocondriale e anche l'eventuale via alternativa alla necrosi

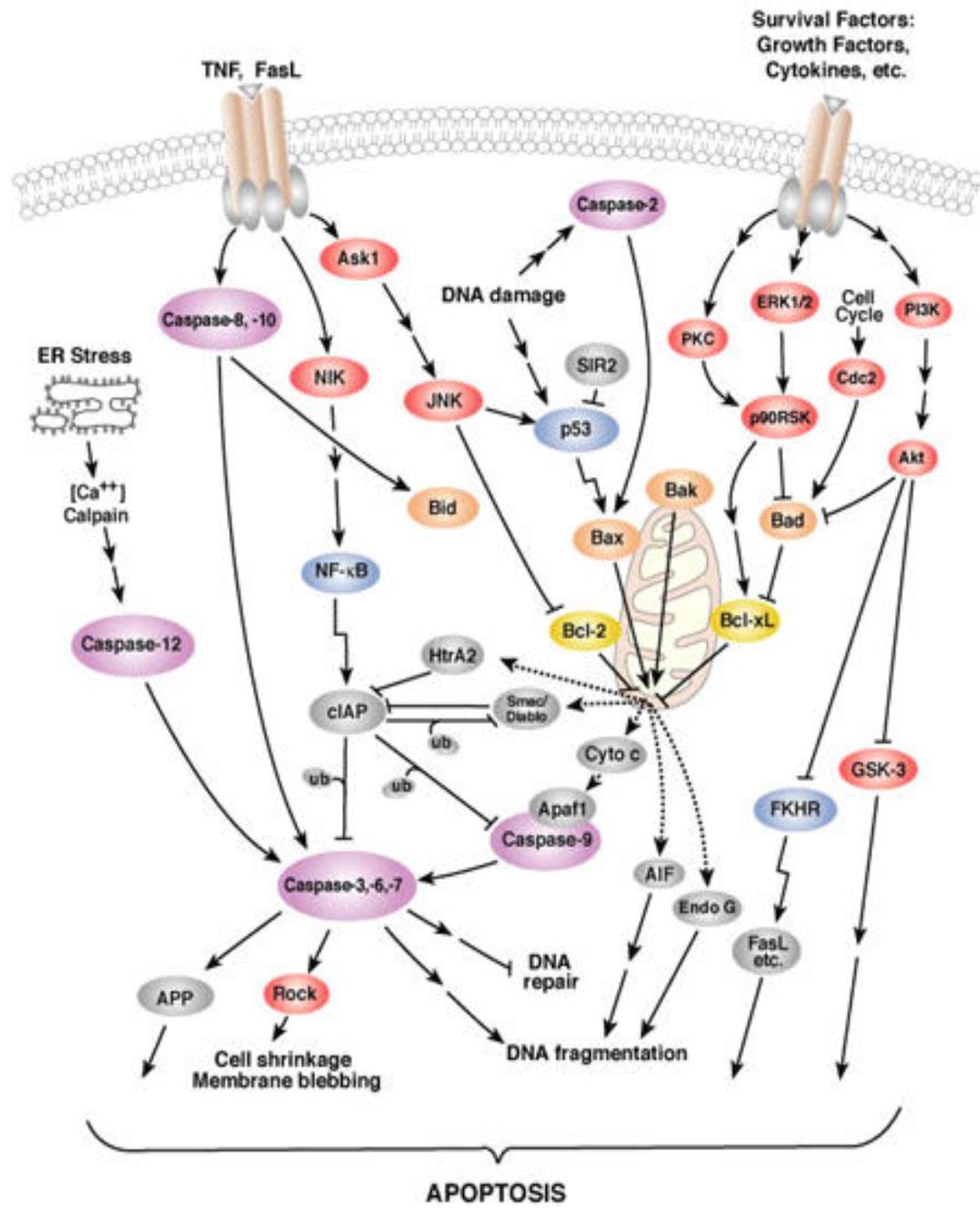


ANOIKISIS

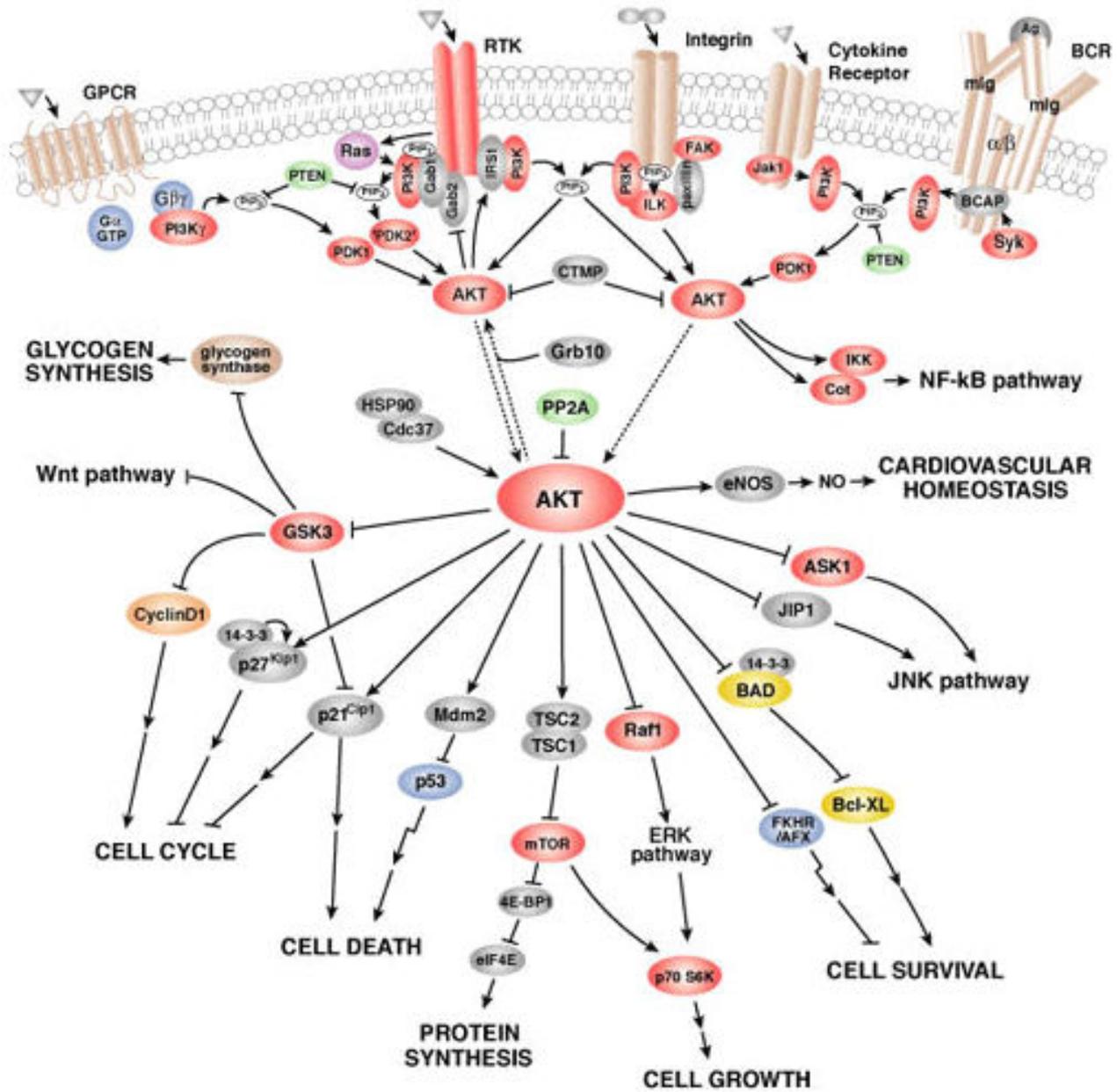
segnali di sopravvivenza e proteine di adesione



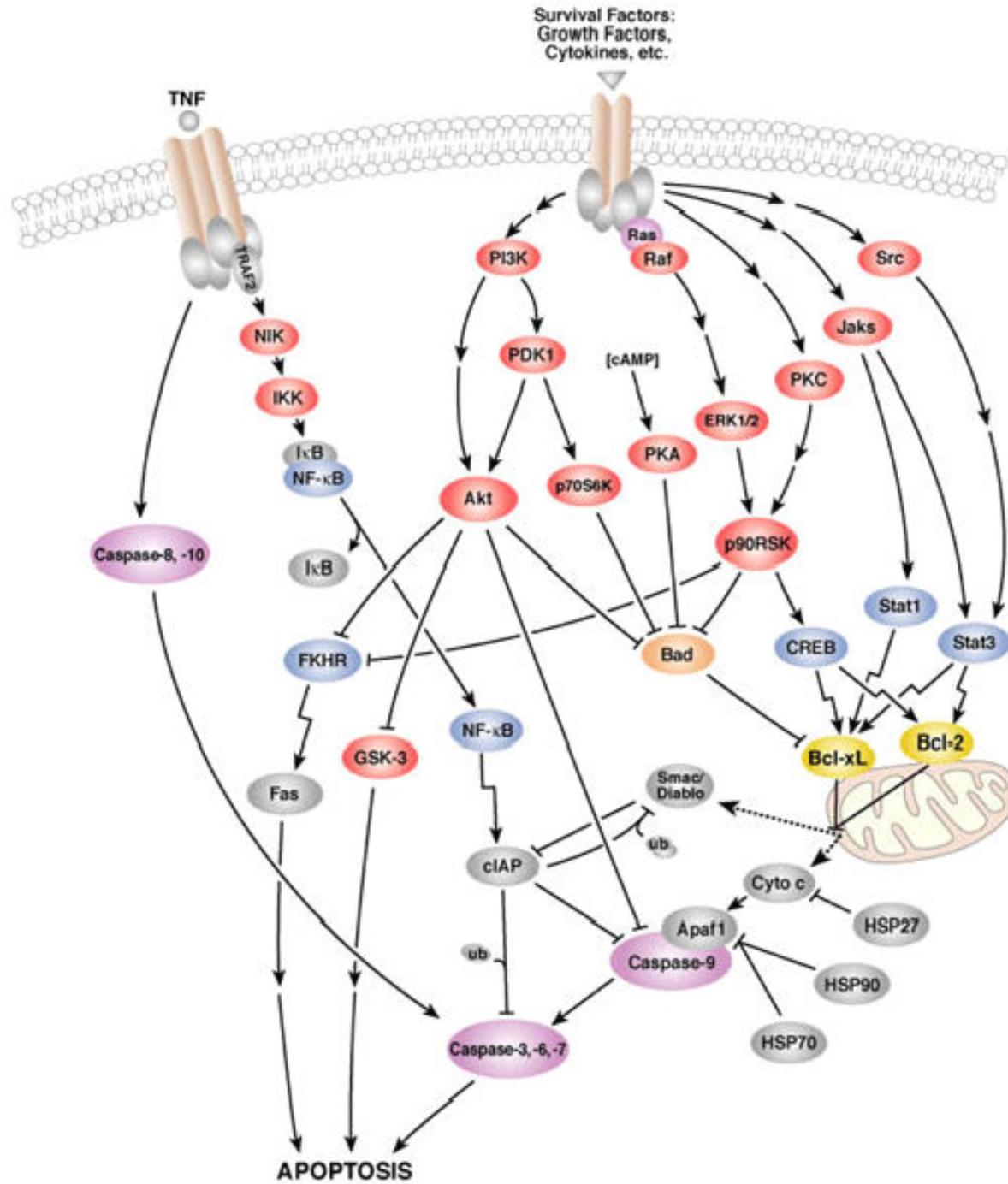
Overview: Regulation of Apoptosis



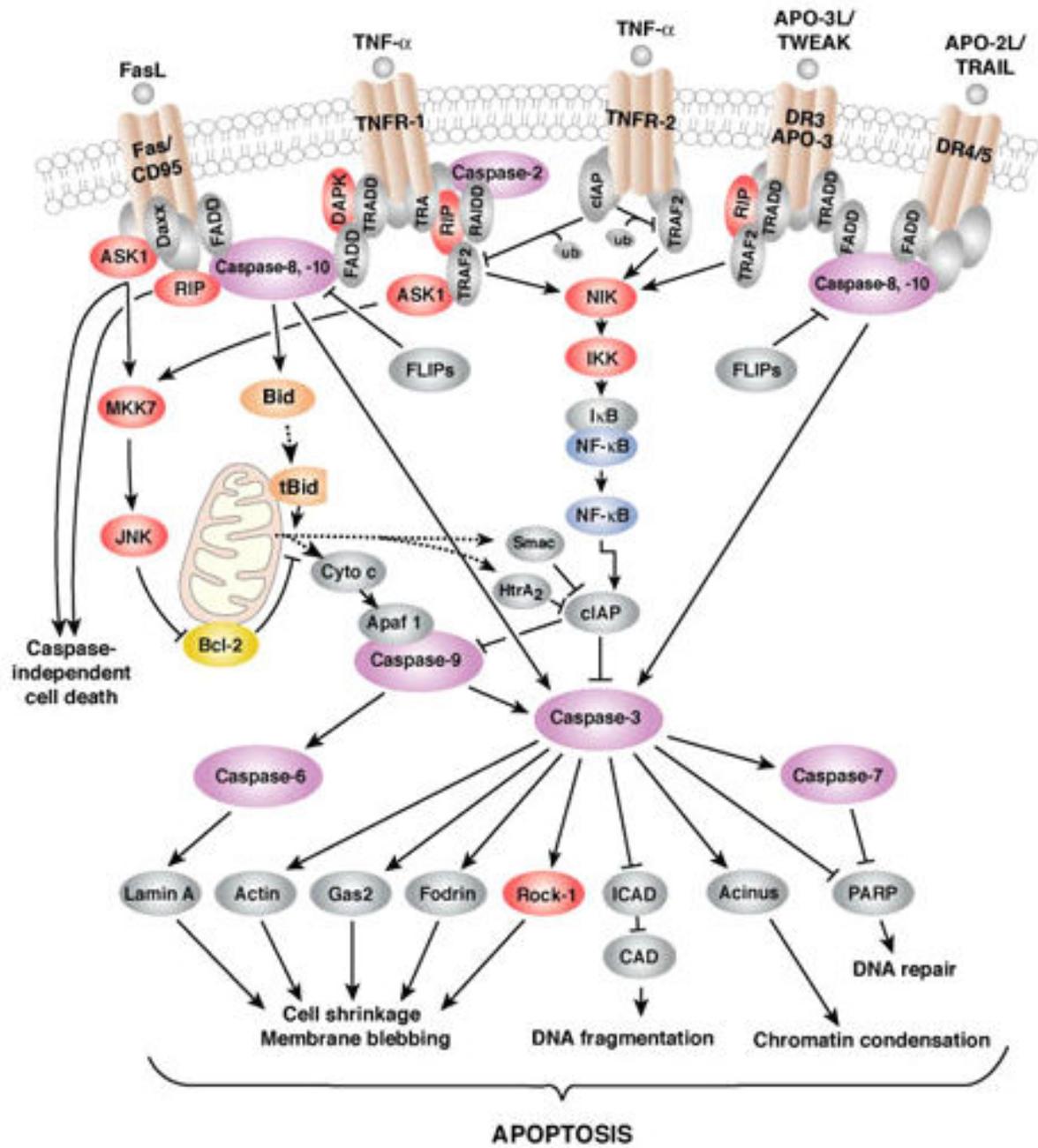
Akt/PKB Signaling Pathways



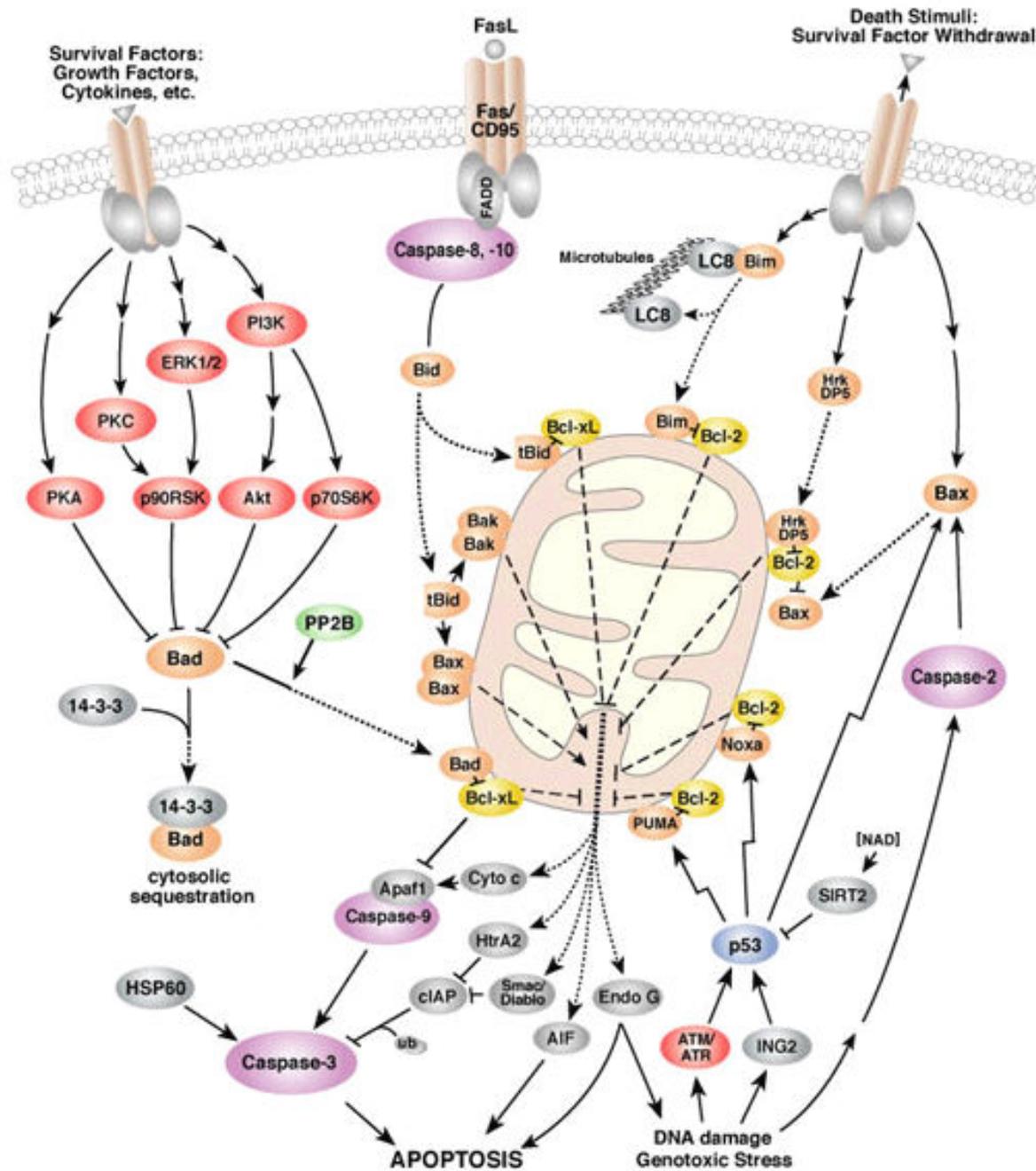
Inhibition of Apoptosis



Death Receptor Signaling



Mitochondrial Control of Apoptosis



Conclusioni

- La vita cellulare è soggetta a una *fine regolazione* sia della proliferazione sia della morte
- Una migliore conoscenza dei segnali e dei meccanismi cellulari e molecolari coinvolti può fornire informazioni sulla proliferazione e la regressione di popolazioni cellulari e, quindi, ipotesi terapeutiche utili nella cura dei tumori e delle malattie degenerative