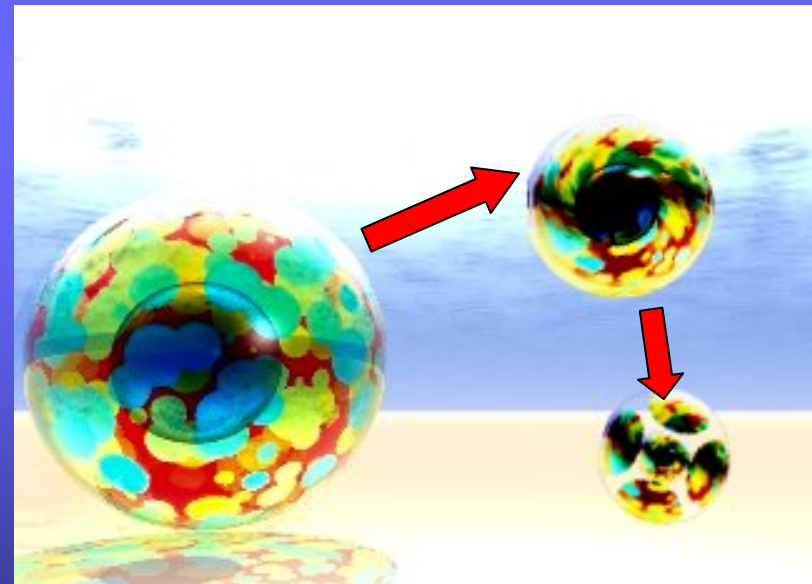
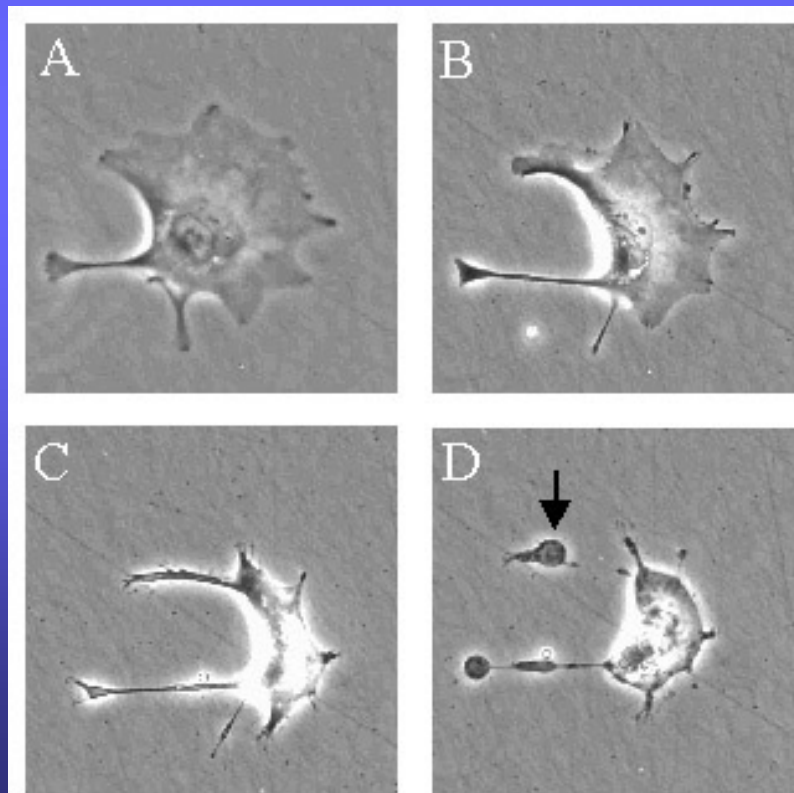


# APOPTOSI

## Programma di morte cellulare

**SCOPO: ELIMINARE CELLULE NON DESIDERATE ATTRAVERSO L'ATTIVAZIONE DI UNA SERIE DI EVENTI COORDINATI E INTERNAMENTE PROGRAMMATI PORTATI AVANTI DA UN INSIEME SPECIFICO DI PRODOTTI GENICI.**



## Classificazione delle modalità di morte cellulare

### Necrosi *versus* apoptosi

#### **1. Basata sulle Cause:**

- A. Morte cellulare accidentale
- B. Morte cellulare fisiologica

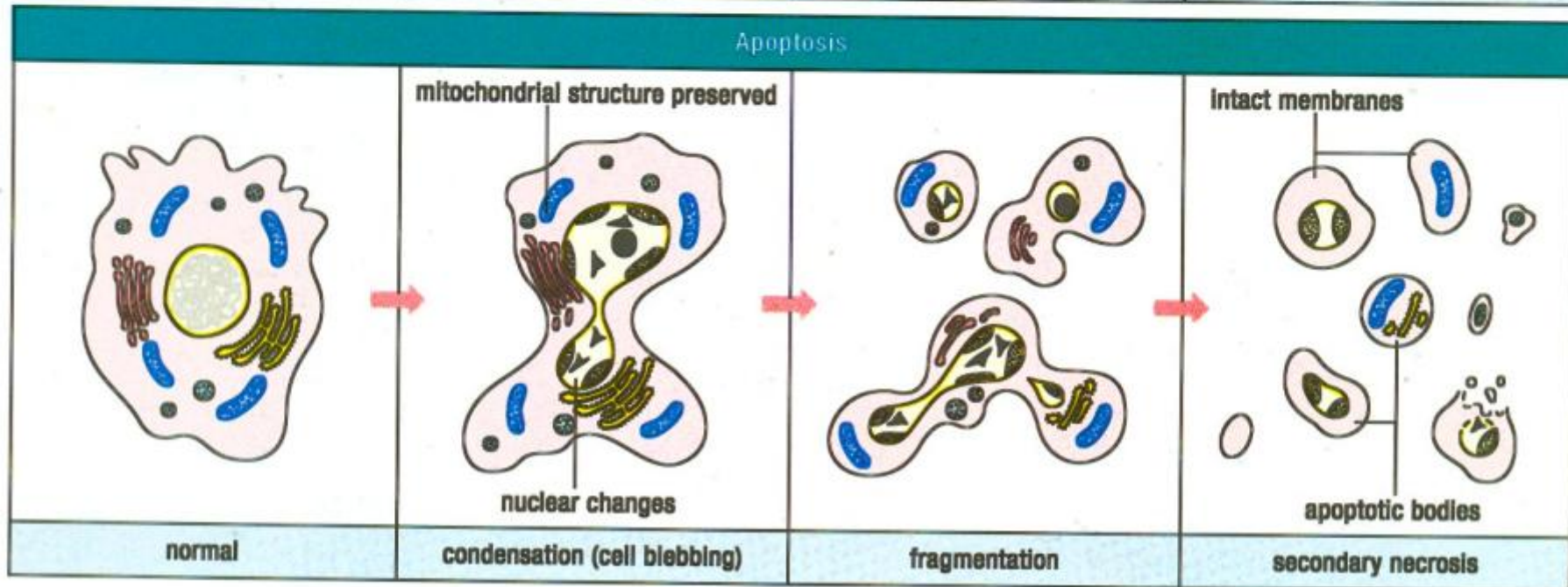
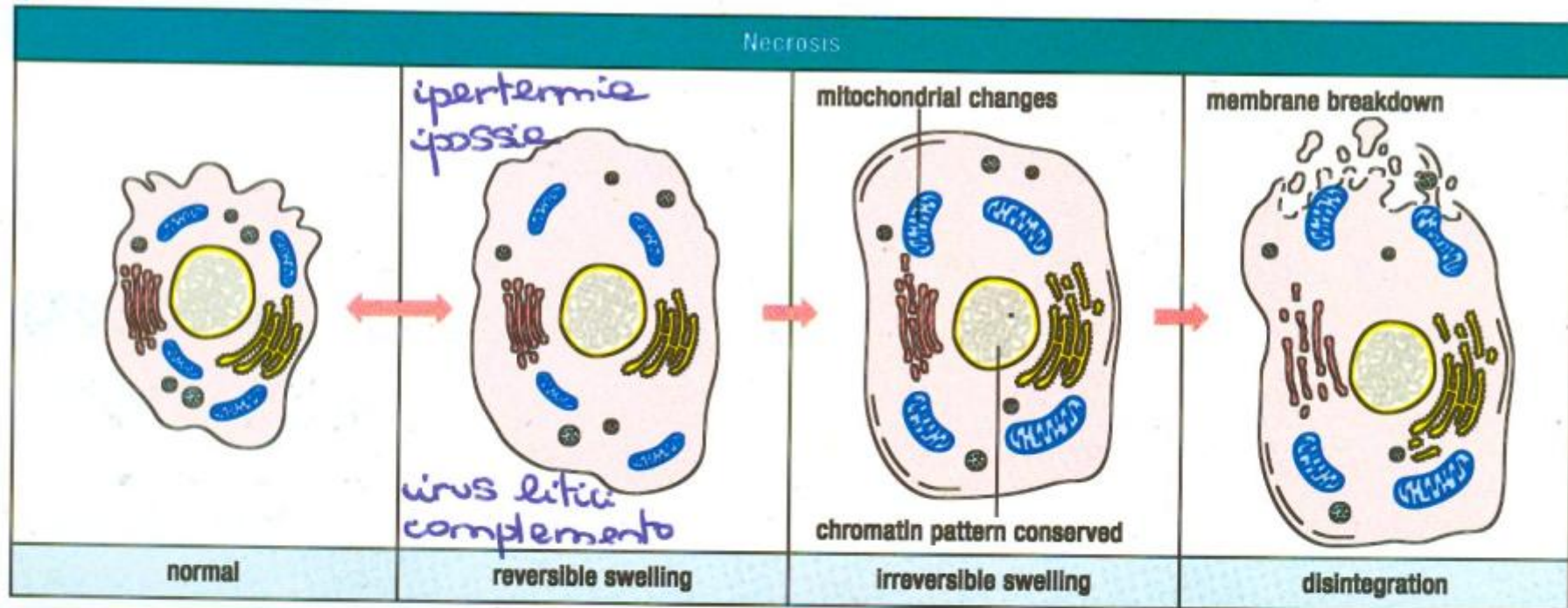
#### **2. Basata sul meccanismo di morte:**

- A. Morte cellulare passiva
- B. Morte cellulare attiva = morte cellulare programmata

#### **3. Basata sulla Morfologia:**

- A. oncosi (= necrosi)
- B. apoptosi

[www.fisiokinesiterapia.biz](http://www.fisiokinesiterapia.biz)





## Incremento esponenziale del numero di articoli sull'apoptosi



2002: Premio Nobel per la Medicina a Brenner, Horvitz e Sulston per le loro ricerche sull'apoptosi

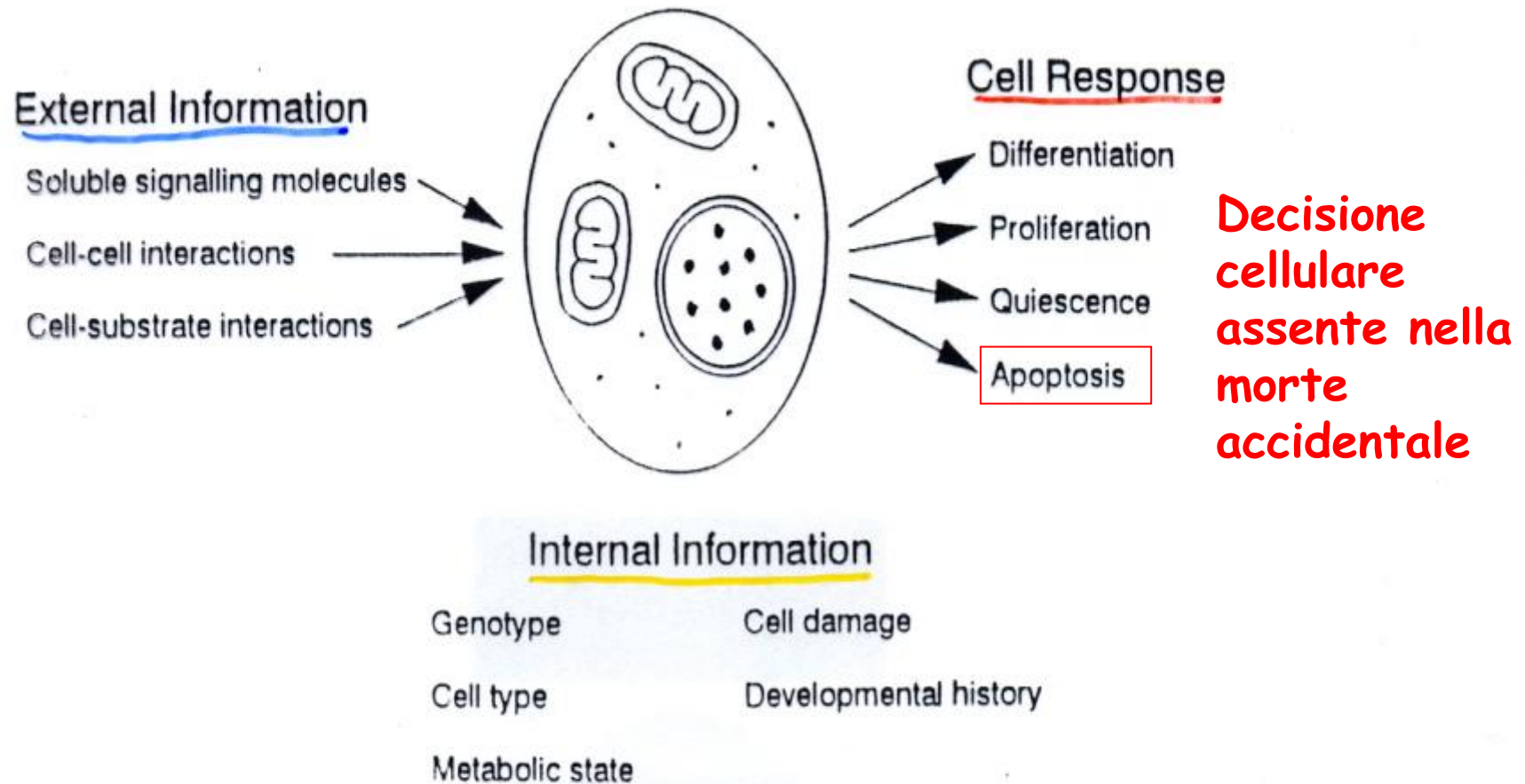
# Cosa è l'apoptosi?

**E' un processo di “morte cellulare programmata”:  
un programma di suicidio cellulare implementato  
nella cellula e altamente conservato nell'evoluzione**



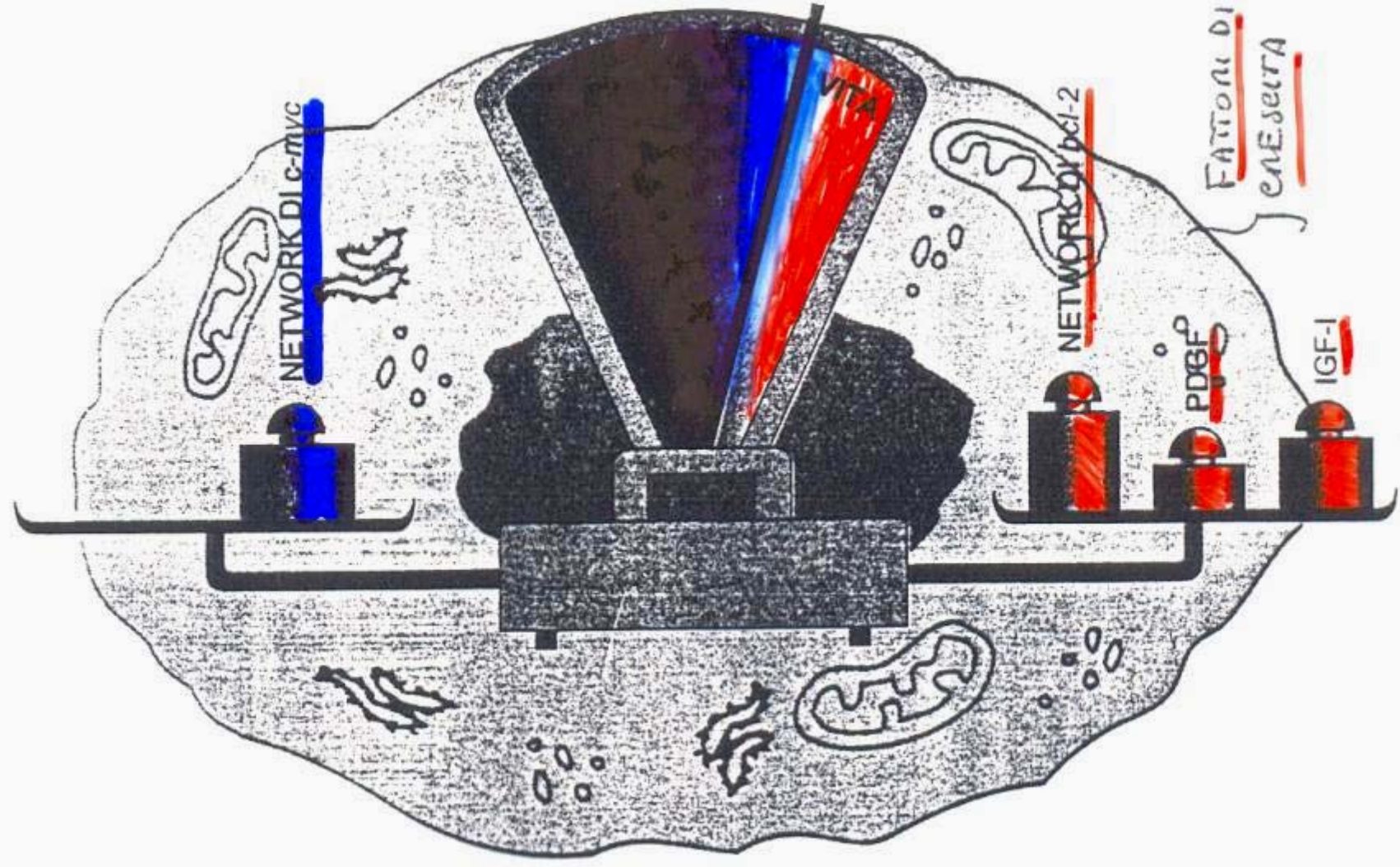
## **PERCHÉ SI PARLA DI *PROGRAMMA* APOPTOTICO**

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



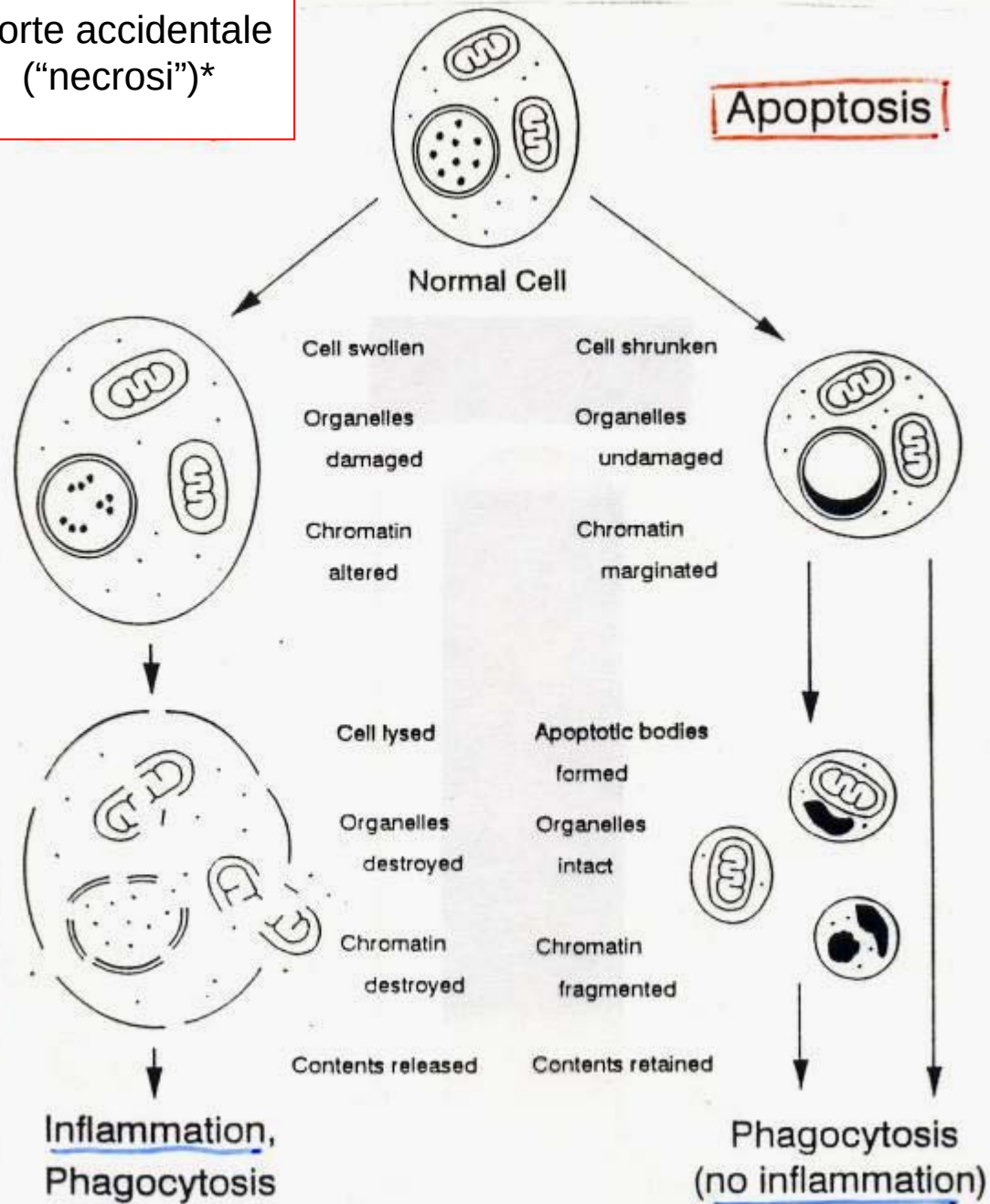
**Fattori esterni (per es. ormoni e fattori di crescita) e fattori interni governano il destino della cellula**



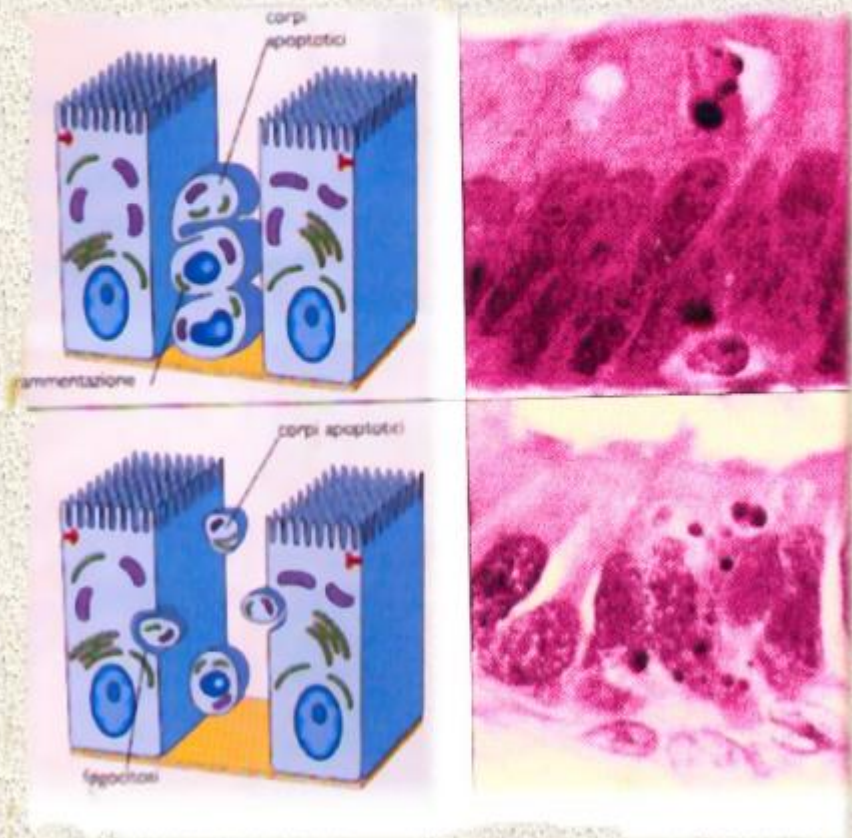
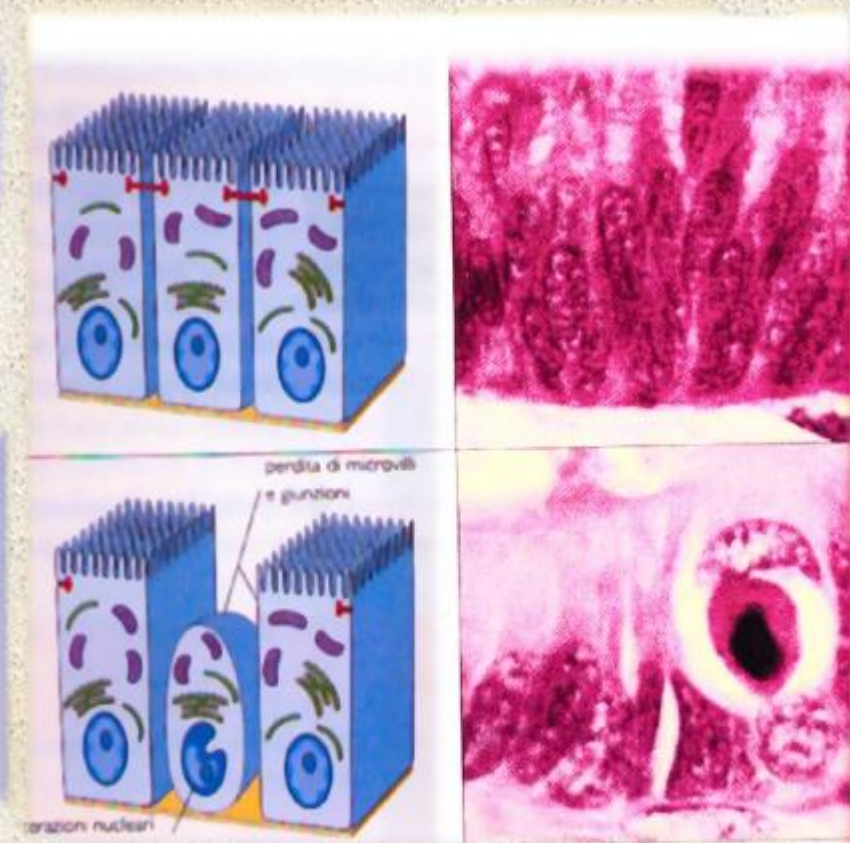


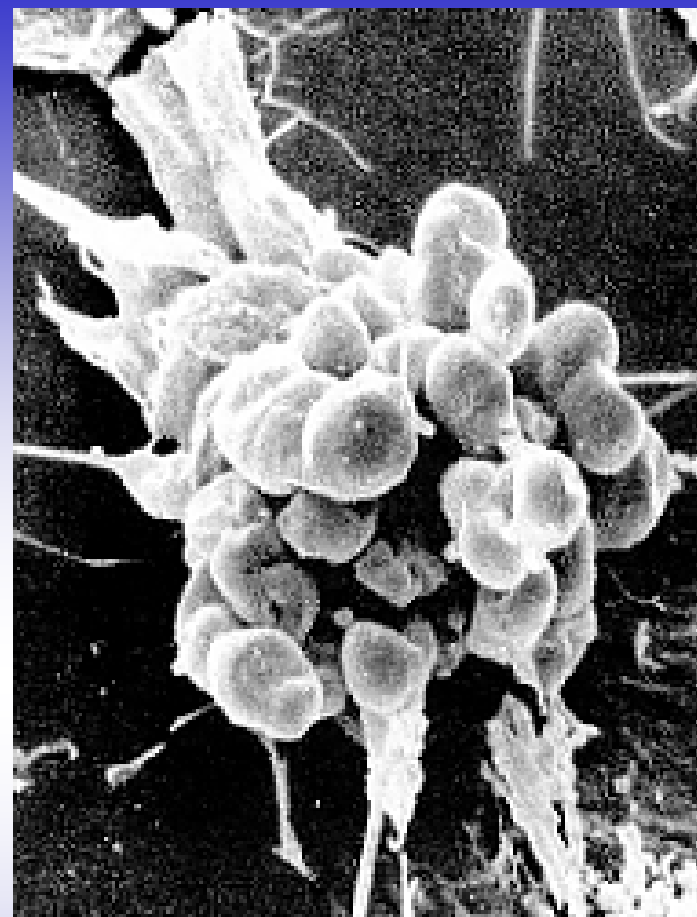
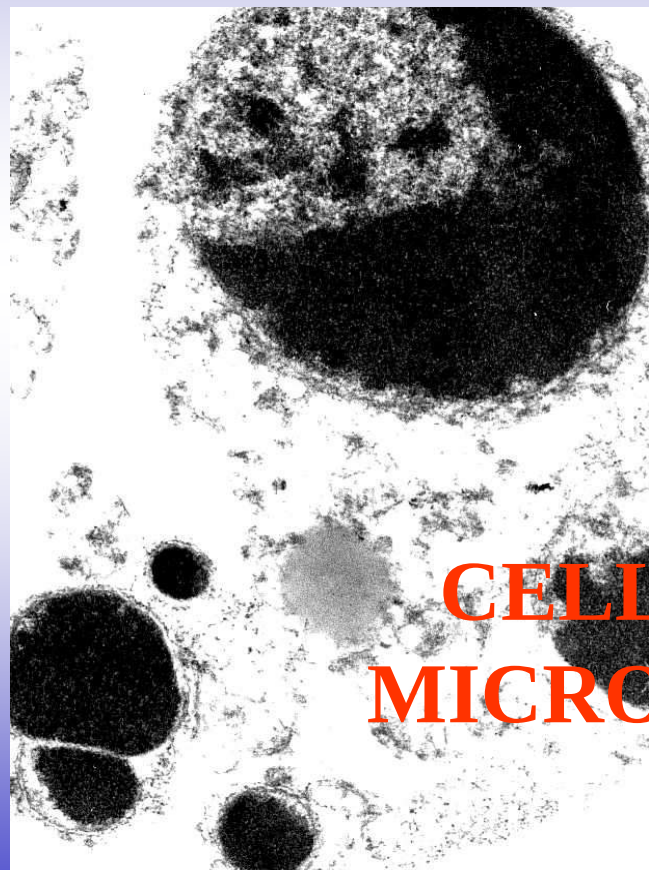
Morte accidentale  
("necrosi")\*

Apoptosis









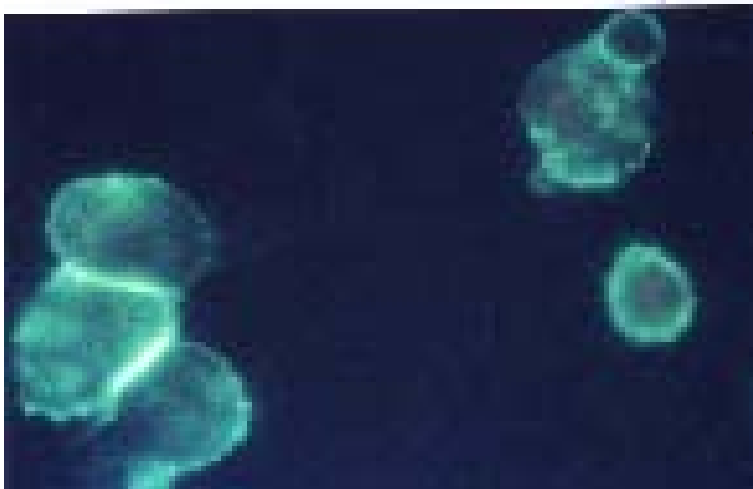
**CELLULA APOPTOTICA AL  
MICROSCOPIO ELETTRONICO**

# H33342 – FITC EC

3 linfociti normali a sinistra e 2 apoptotici a destra.



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



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



## Significato dell'apoptosi

- La morte cellulare programmata è indispensabile (come lo è la mitosi) per un corretto sviluppo

Esempi:

- Coda del girino
- Dita delle mani e dei piedi nel feto
- Eliminazione surplus di neuroni

- La morte cellulare programmata serve ad eliminare cellule che rappresentano una minaccia per l'integrità dell'organismo

Esempi:

- cellule infettate con virus (apoptosi indotta da linfociti T citotossici )
- cellule del sistema immunitario (eliminazione cloni autoreattivi)
- cellule con DNA danneggiato (aumento del p53)
- cellule tumorali (radiazioni e chemioterapici inducono apoptosi )
- **mantenimento omeostasi numerica nei tessuti adulti**

**Differentiation  
from Precursors**  
(numbers increase)

**BIOLOGICAL  
ACTIVITY**

**Differentiation  
to Products**  
(numbers decrease)

**Proliferation**  
(numbers increase)



**CELL  
POPULATION**

Inhibited, e.g. by  
external signals or  
increased *bcl-2*  
expression.

Stimulated, e.g. by  
hormones or other  
external signals

**Cell Death**  
(numbers decrease)

**Bilancio dei processi che determinano il numero cellulare.  
La dimensione di una particolare popolazione cellulare può essere  
controllata variando la velocità di morte cellulare, così come la  
velocità di differenziamento e proliferazione**

L'APOPTOSI E' IMPORTANTE IN MOLTI PROCESSI  
FISIOLOGICI E IN MALATTIE

- Rimodellamento embrionale
- Metamorfosi
- Selezione clonale
- Turn-over tissutale
- Ristabilimento dopo iperplasia
- Cicatrizzazione
- Cellule infettate da virus
- Cellule con danni al DNA
- Cellule neoplastiche
- Malattie neurodegenerative
- Molti altri...



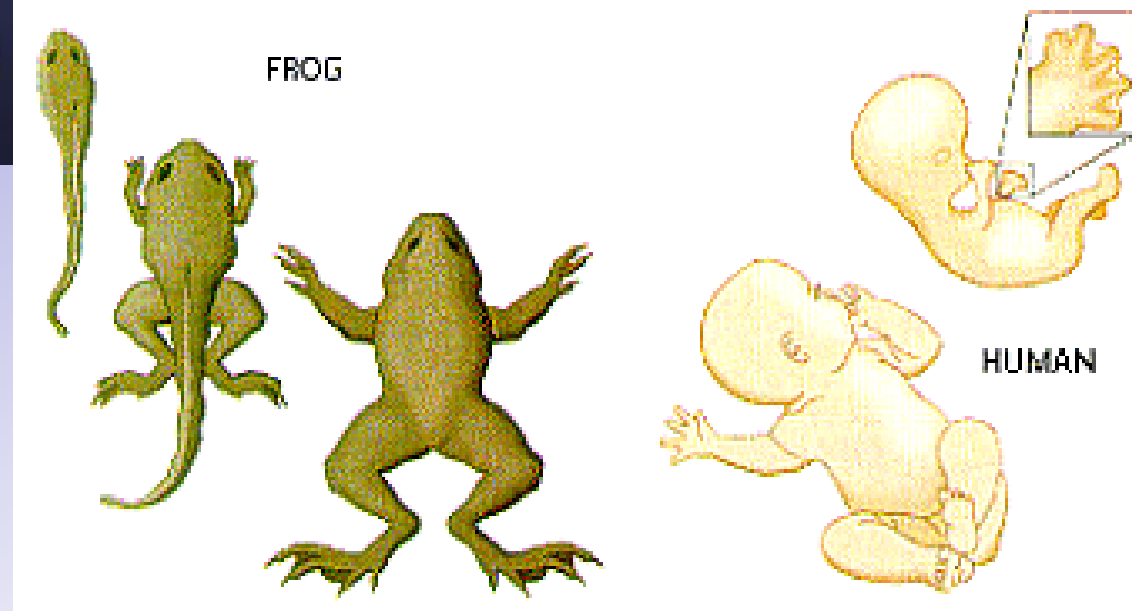


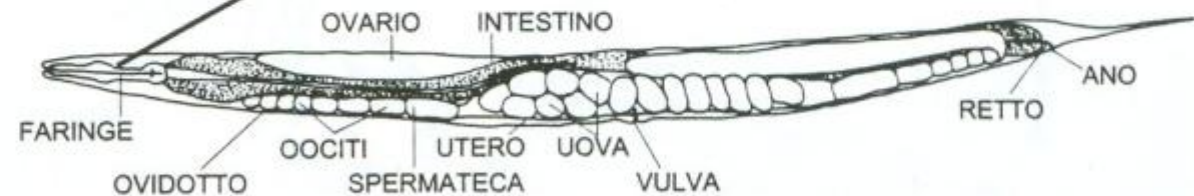
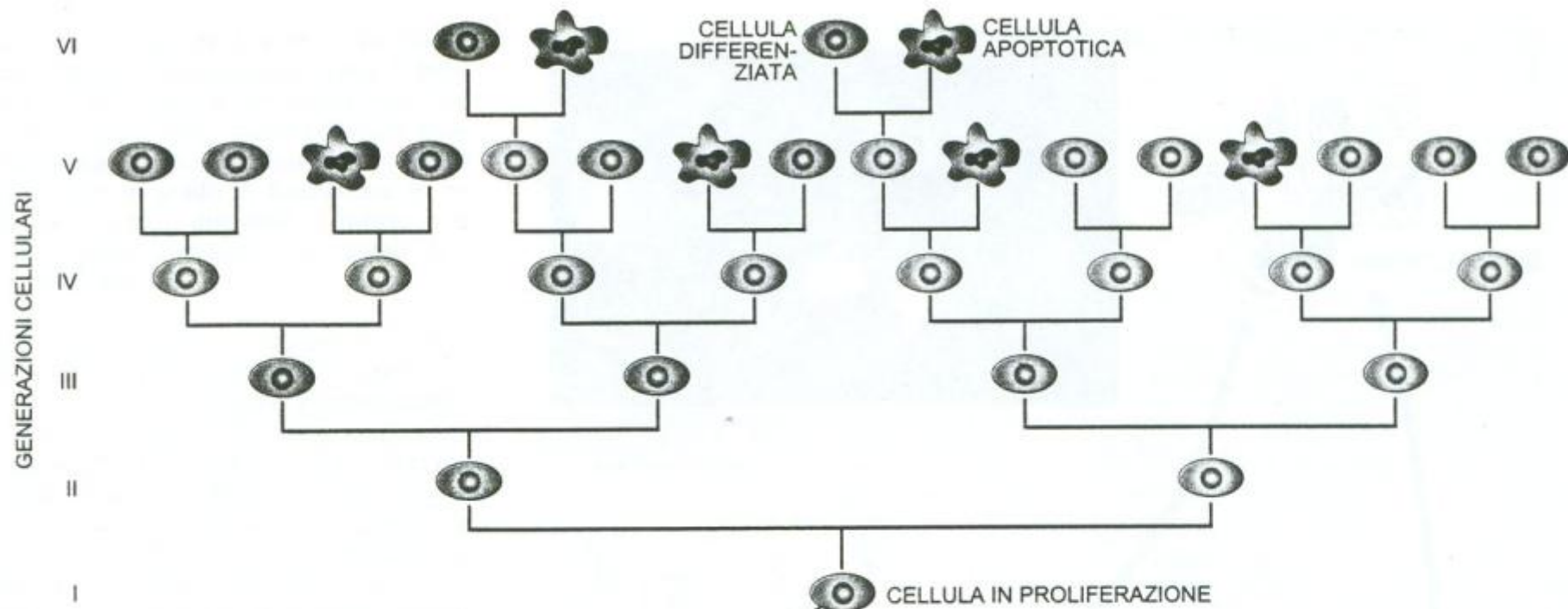
**L'apoptosi è responsabile di numerosi eventi fisiologici, adattativi e patologici, fra i quali:**

- La distruzione programmata di cellule durante l'embriogenesi.**
- L'involuzione ormono-dipendente nell'adulto (es. distruzione dell'endometrio nel ciclo mestruale / atrofia dei follicoli ovarici in menopausa / regressione della ghiandola mammaria dopo lo svezzamento / atrofia della prostata dopo castrazione).**
- La deplezione di cellule in popolazioni cellulari proliferanti (es. epitelio delle cripte intestinali).**
- La morte di cellule nei tumori.**
- La morte dei neutrofili in corso di infiammazione acuta.**
- La morte di cellule immunitarie (es. linfociti T e B dopo deplezione di linfocine / deplezione di cellule T autoreattive durante lo sviluppo del timo).**
- La morte cellulare indotta da cellule citotossiche (es. rigetto dei trapianti).**
- Atrofia da ostruzione duttale.**
- Danno cellulare in alcune malattie virali (es. epatite virale).**
- La morte cellulare indotta da diversi stimoli lesivi se somministrati a basse dosi (calore / radiazioni / farmaci antineoplastici / ipossia).**

## Esempi del ruolo dell'apoptosi nello sviluppo embrionale

- ***Nematode***: from zygote (1 cell) to adult worm (959 cells) deterministic loss of 131 cells
- ***Fruit fly***: metamorphosis from larva to perfect insect
- ***Amphibians***: loss of tail from tadpole to frog
- ***Humans***: nervous and immune system development, loss of interdigital membranes, overture of palpebral fissure ...





La genealogia cellulare di una parte di faringe di *C. elegans* durante l'ontogenesi (fotografia e schema qui sopra) illustra come la morte cellulare programmata contribuisca all'assetto finale dell'individuo eliminando deterministicamente un numero fisso di cellule. In questo caso, a partire da una cellula progenitrice tre divisioni successive producono otto cellule, mentre fra la quarta e la quinta divisione l'arresto-quiescenza e la morte cellulare riducono a 12 il numero di cellule terminali contro le teoriche 32. I sei eventi di morte si collocano sempre nello stesso punto della genealogia.

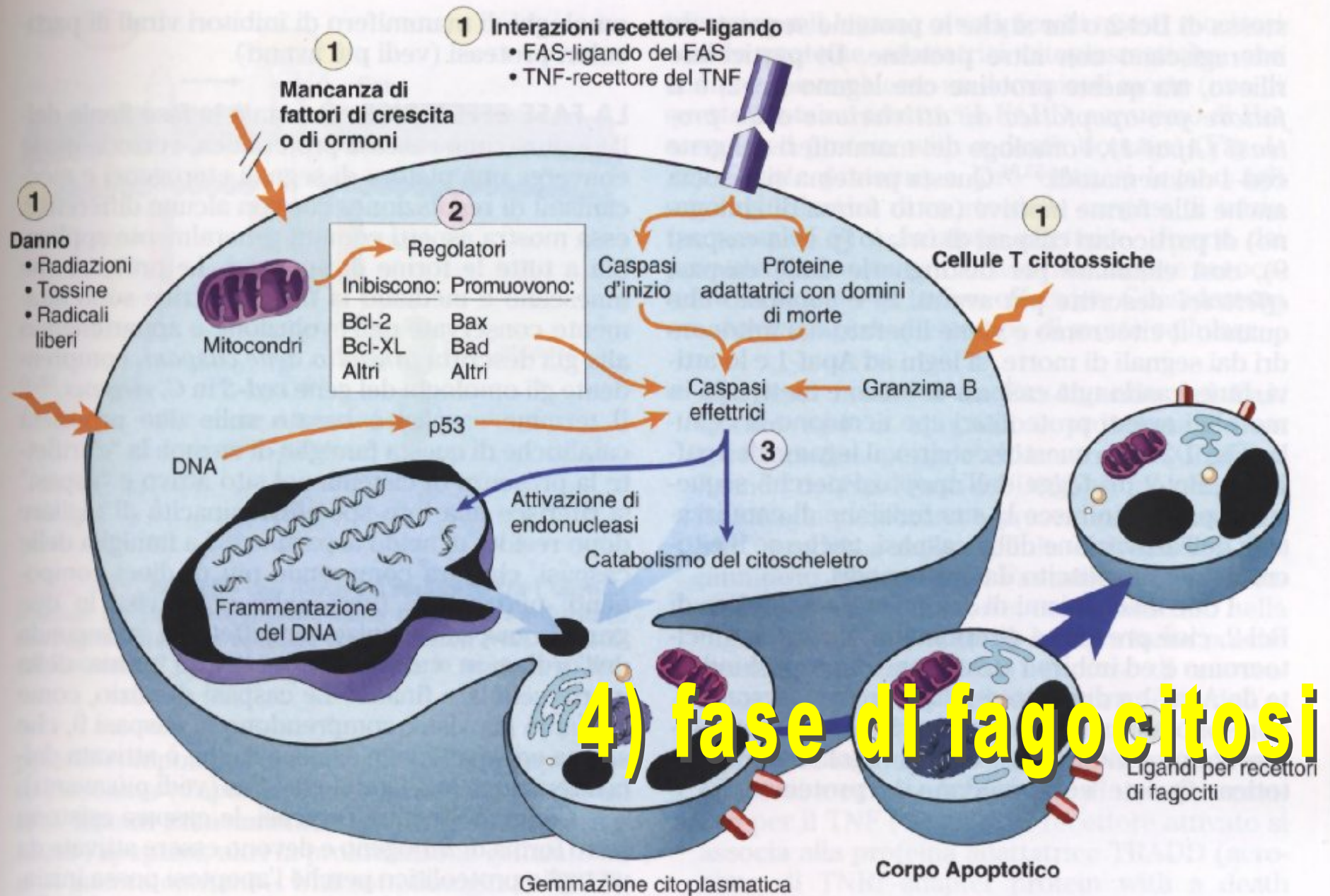


## CARATTERISTICHE GENERALI DELL'APOPTOSI

- Coinvolgimento di singole cellule
- Irreversibilità del processo
- Precoce distacco delle cellule
- Nuclei picnotici e frammentati
- Aumento contenuto di  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare
- Mantenimento dell'attività sintetica
- Nessuna risposta infiammatoria

## FASI DEL PROCESSO APOPTOTICO

- fase di induzione  
(bilancio tra segnali on e off)
- fase effettrice  
(programma di esecuzione-  
punto di non ritorno)
- fase di degradazione  
(proteasi ed altri enzimi)
- fase di fagocitosi



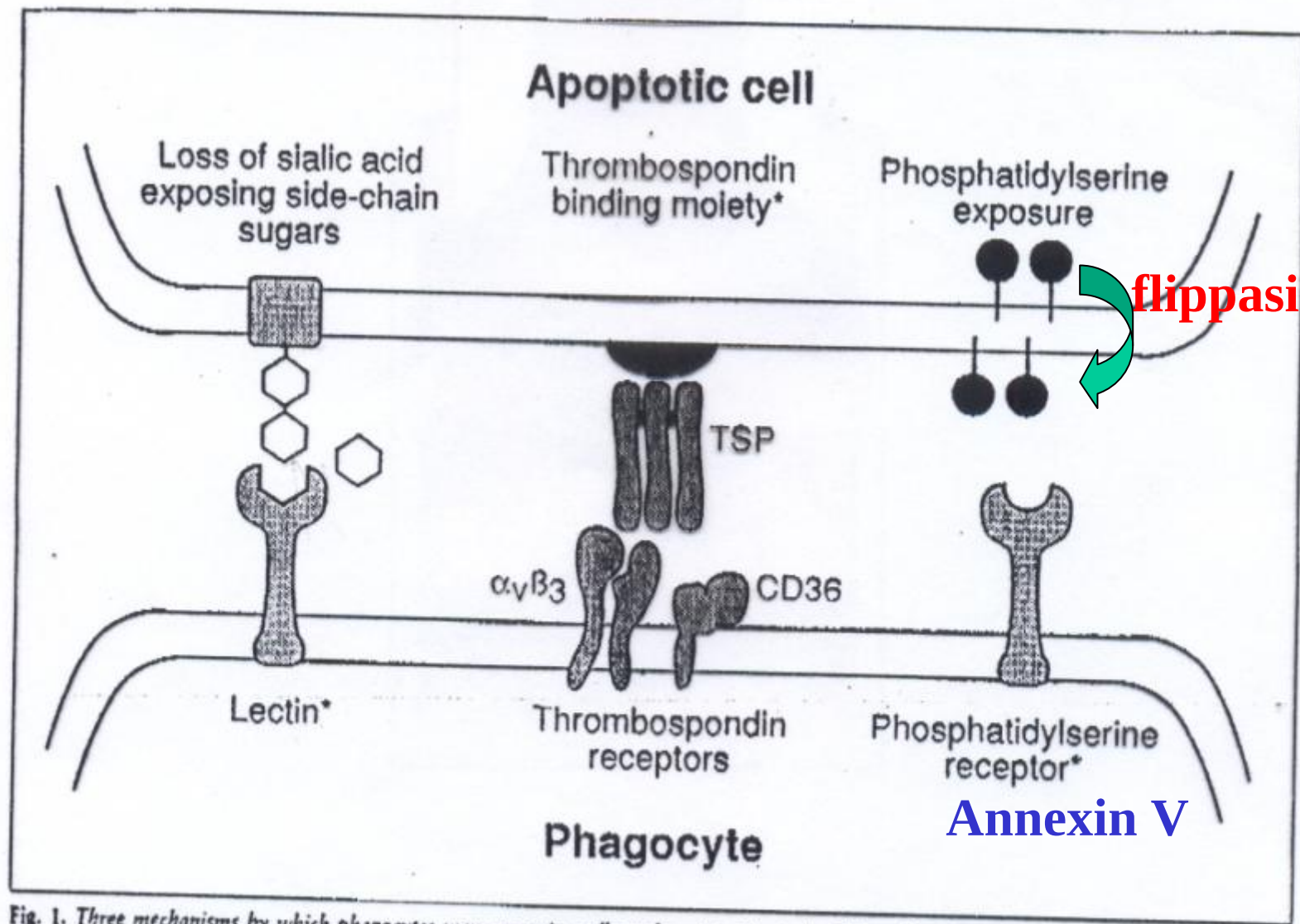
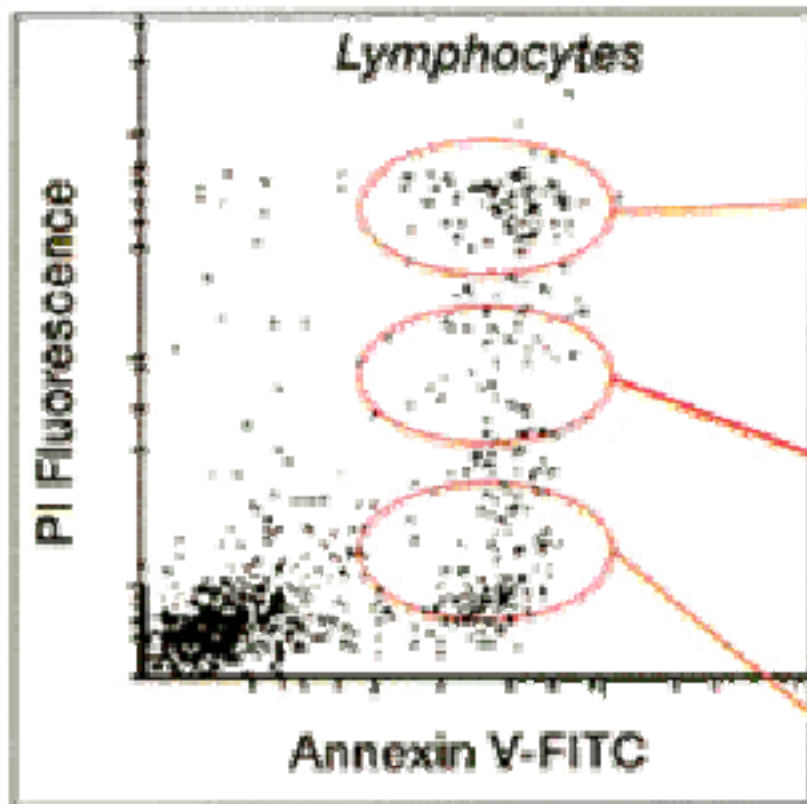


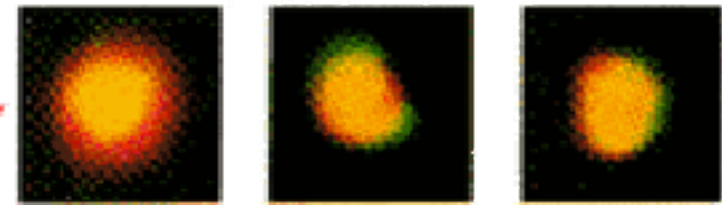
Fig. 1. Three mechanisms by which phagocytes may recognize cells undergoing apoptosis. TSP = thrombospondin. Elements marked with an asterisk have yet to be characterized.



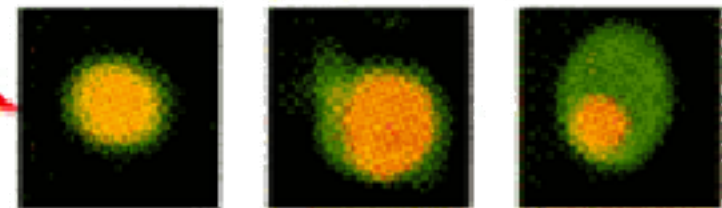
**PI = ioduro di propidio: si intercala nel DNA (fluorescenza rossa)**



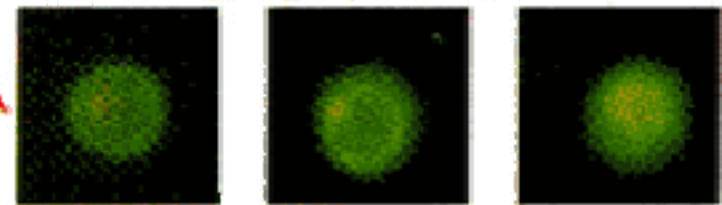
**Late Apoptotic Cells**



**Mid Apoptotic Cells**



**Early Apoptotic Cells**



**L'annexina V fluoresceinata (verde) si lega alla fosfatidilserina esposta esternamente sulla membrana delle cellule apoptotiche**

## Real time imaging dell'apoptosi nel cuore del topo in vivo

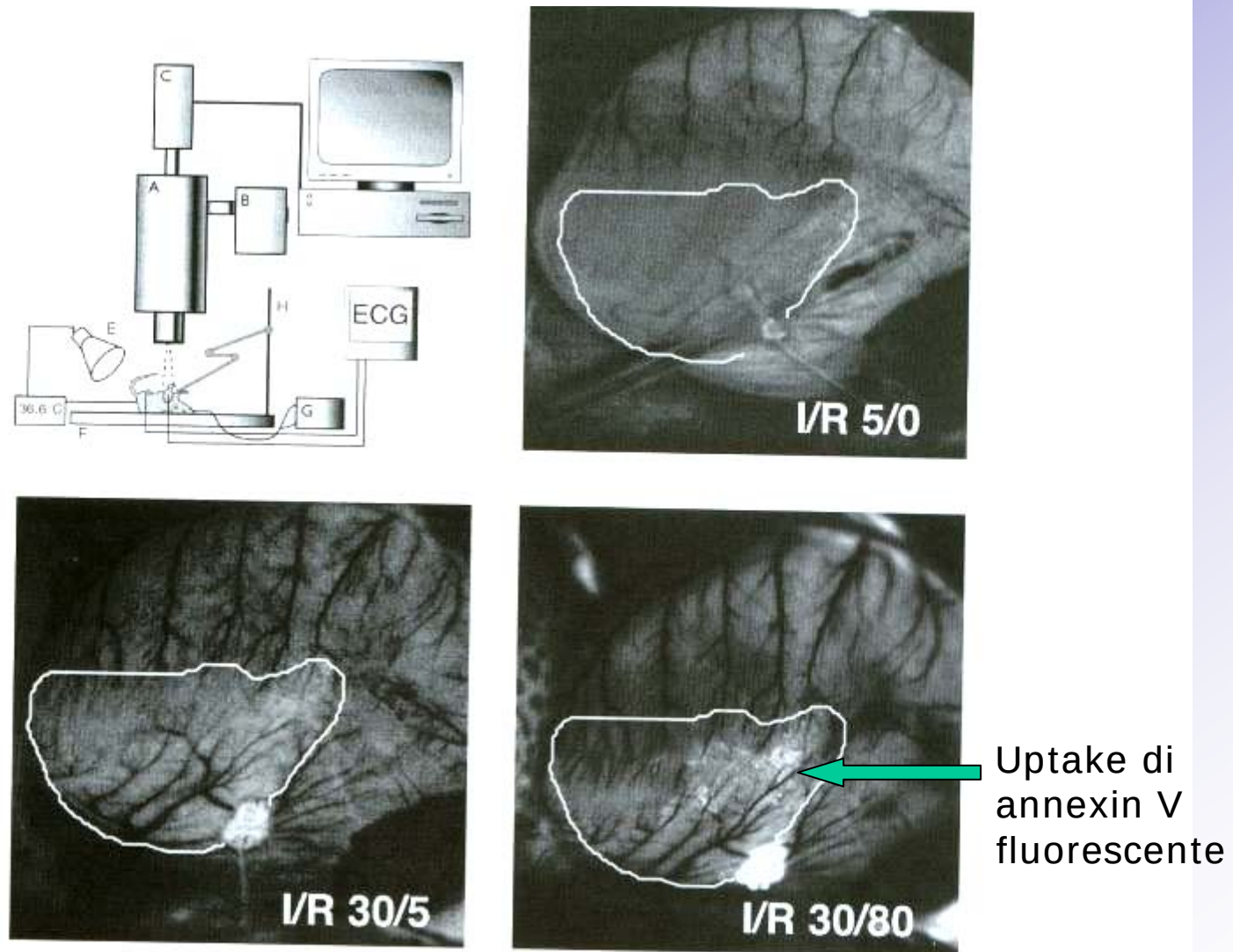


Fig. 3. Real time imaging of cell death in the heart of the living mouse. Panel (A) shows the experimental setup of the equipment. The mouse chest was opened and annexin A5-Oregon Green was administered to the bloodstream 15 min before ischemia. Reperfusion was established after 30 min of ischemia. At various time points, images were taken with a fluorescence camera, which was triggered by the ECG signal of the mouse to yield focused images. The area of the heart at risk is within the white circumference. Note the intense fluorescent spots in the area at risk at I/R 30/80 indicating the uptake of annexin A5-Oregon Green by the cardiomyocytes (Dumont et al., 2001). I/R: ischemia time in min/reperfusion time in min.

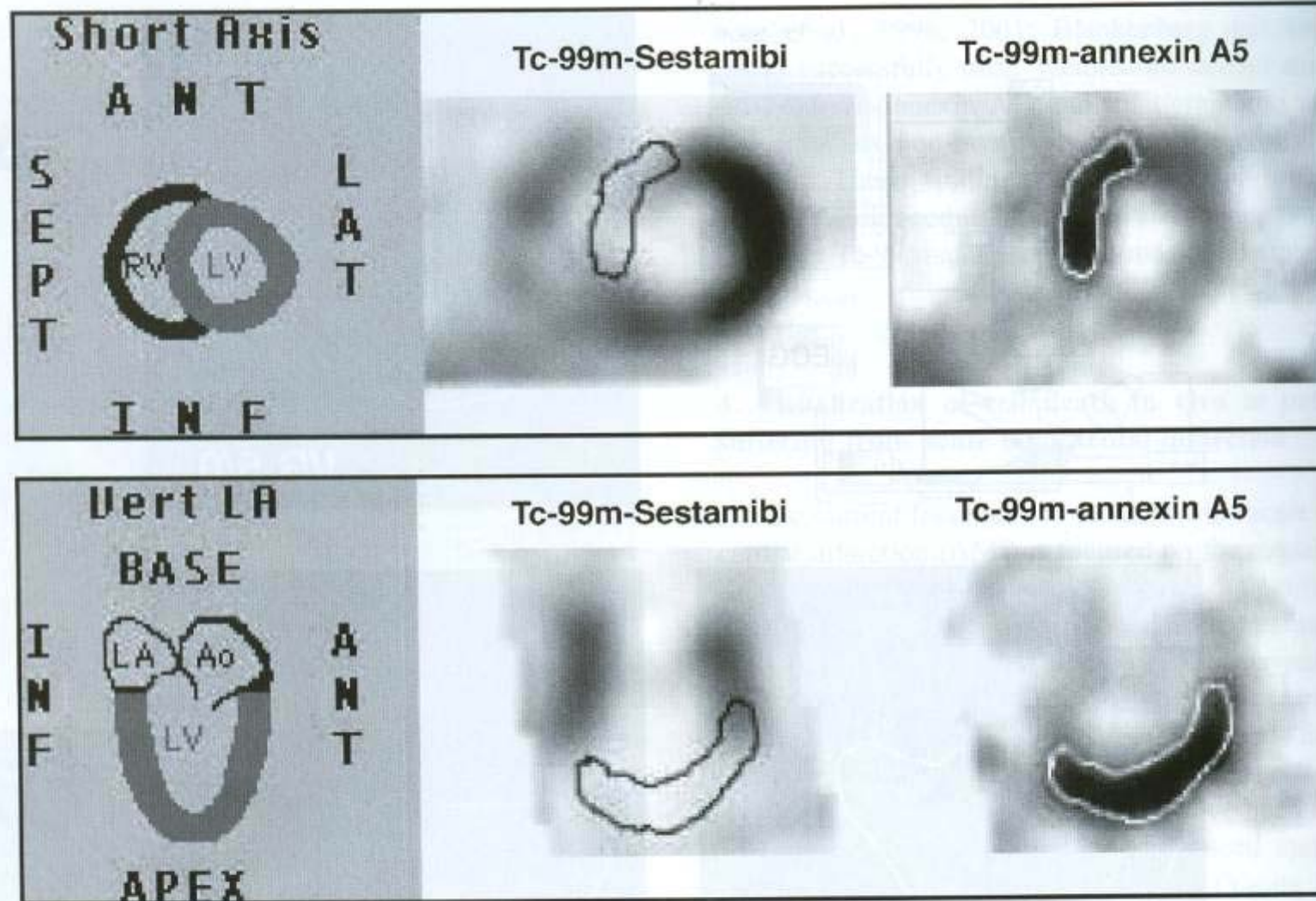
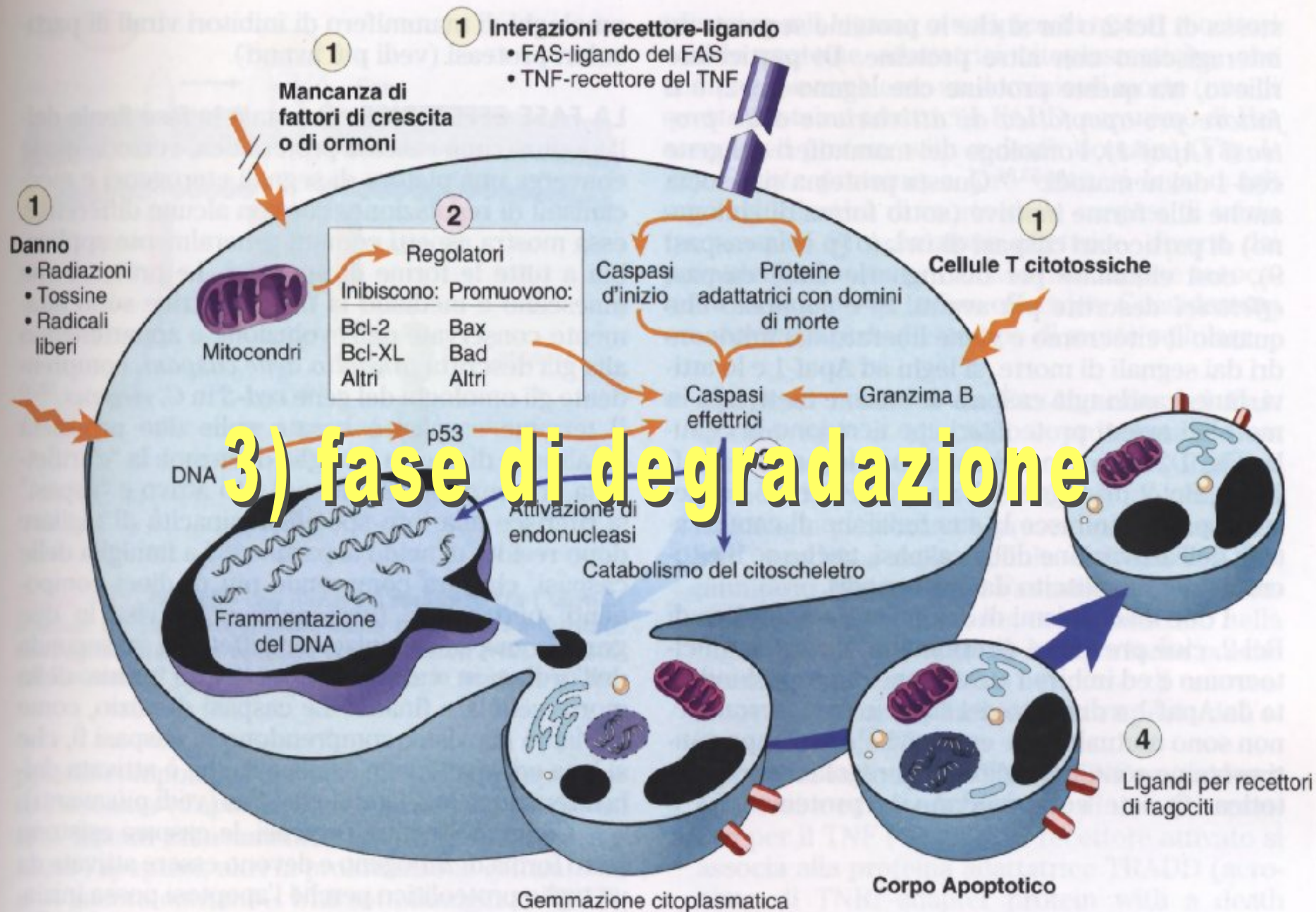


Fig  
per  
int  
inf  
the  
Ho

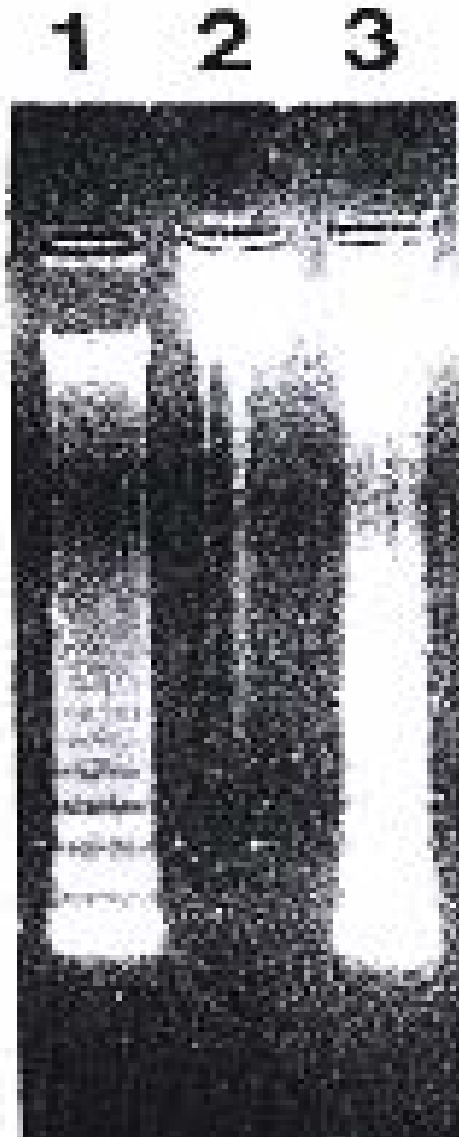
Single photon emission computed tomographic analysis (SPECT) del cuore di un paziente infartuato: la zona positiva alla captazione di annessina V (dopo 20h) è sovrapponibile alla zona sestamibi-negativa (dopo 3 g)

primary  
ected  
of the  
within  
s, see





# 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 (striscio continuo)

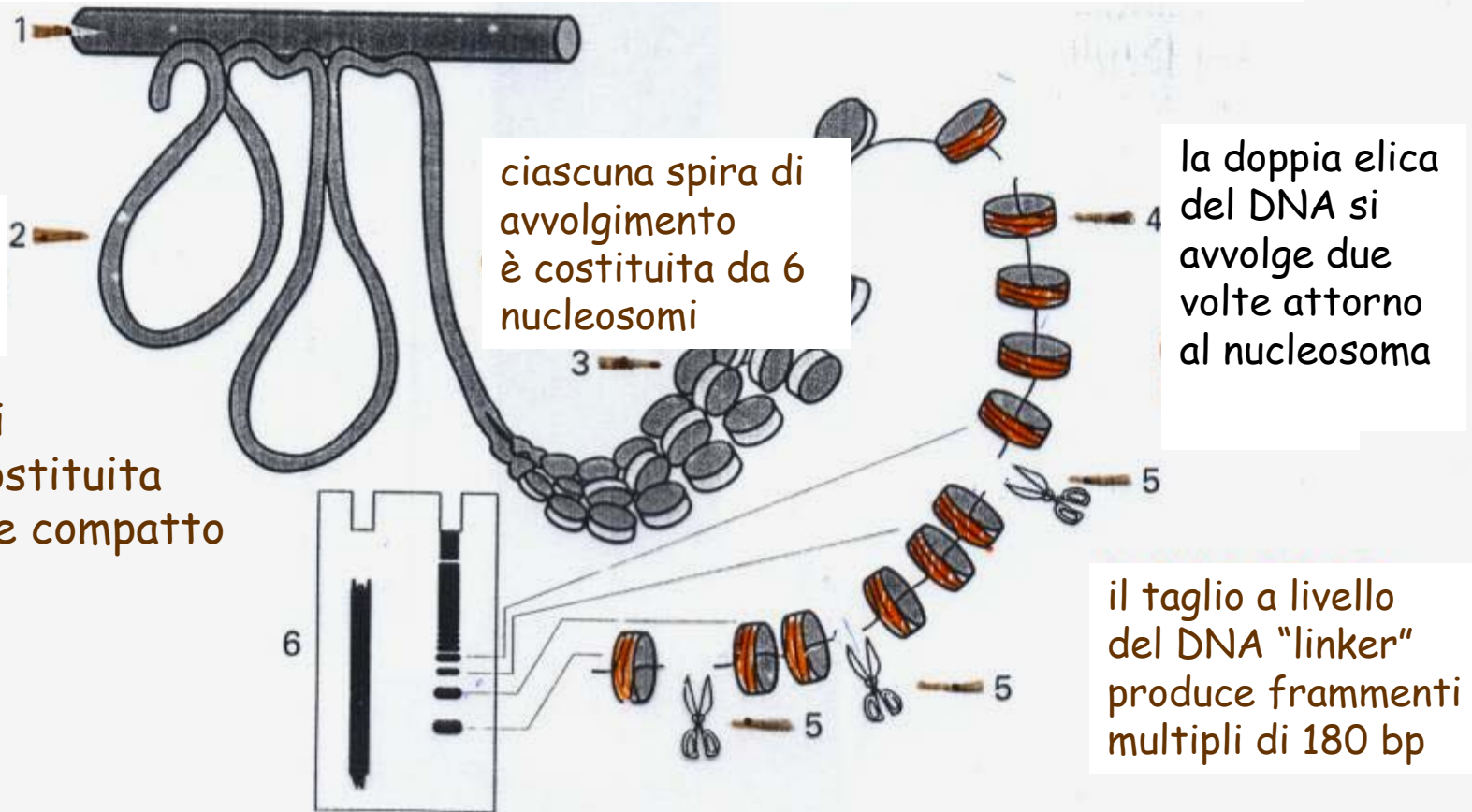
# "ladder": come si spiega?

## CROMATINA IN UN NUCLEO INTERFASICO

Matrice  
proteica

Fibrille di  
cromatina

Ogni fibrilla di  
cromatina è costituita  
da un solenoide compatto



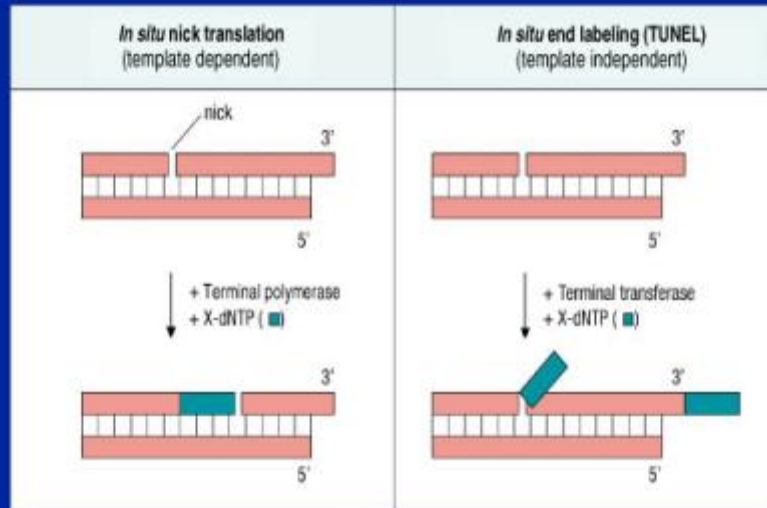


## DNA Fragmentation - TUNEL

### Labeling Principle

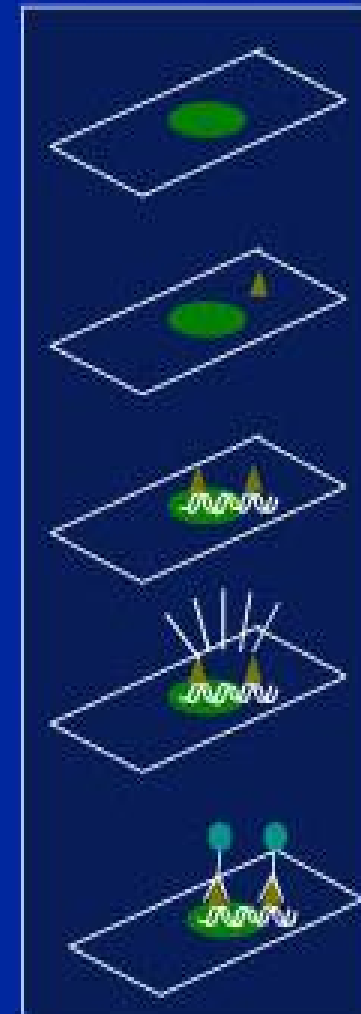


Diagnostics



During apoptosis, DNase activity not only generates double-stranded, low-molecular-weight DNA fragments (mono- and oligonucleosomes), but also introduces strand breaks ("nicks") into the high-molecular-weight DNA. These processes can be identified by labeling the free 3'-OH termini with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), which attaches labeled nucleotides to all 3' OH-ends (**TUNEL reaction; TdT-mediated dUTP nick end labeling**).

## Death Detection Kit - Test Principle



Cells on slide

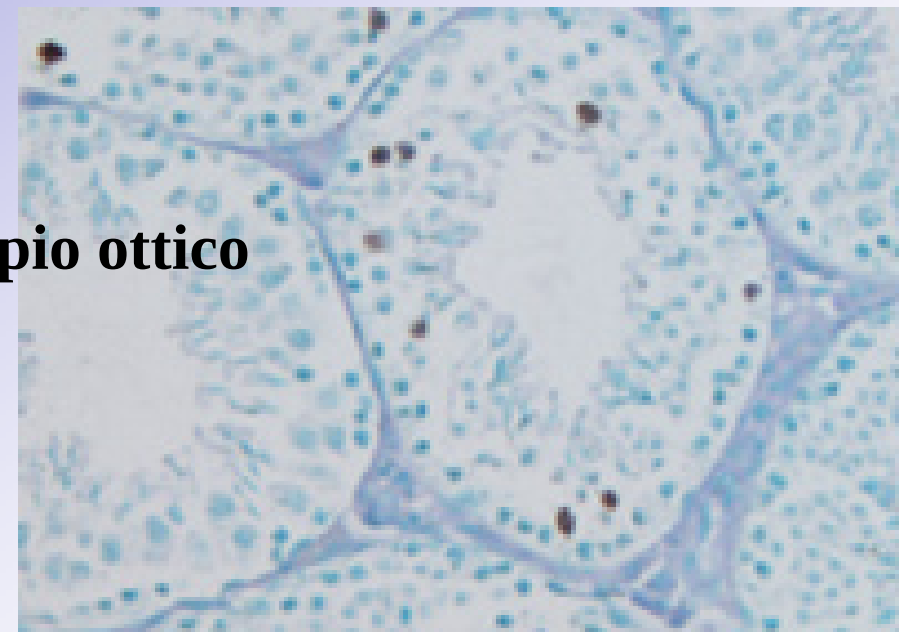
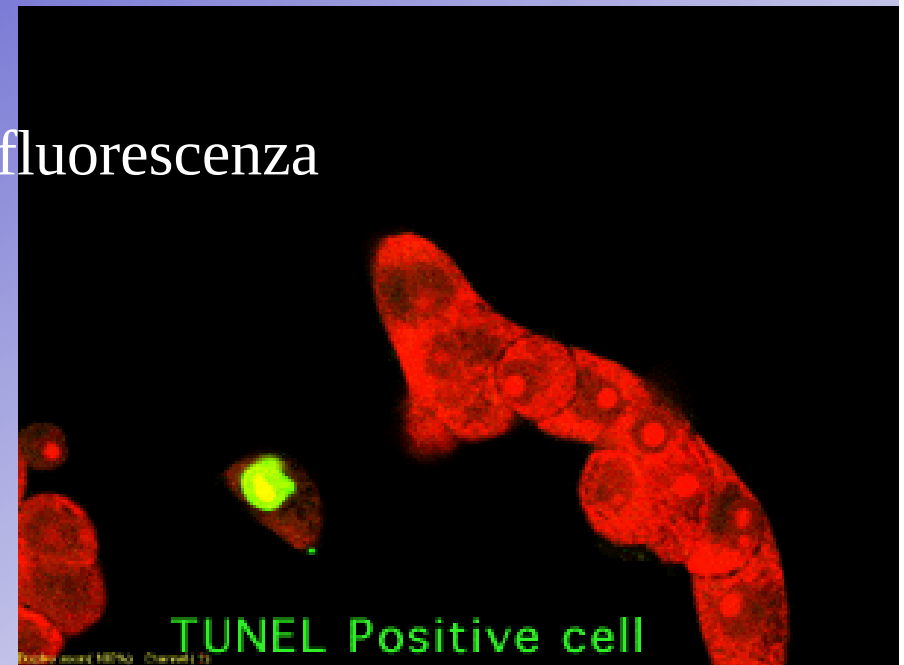
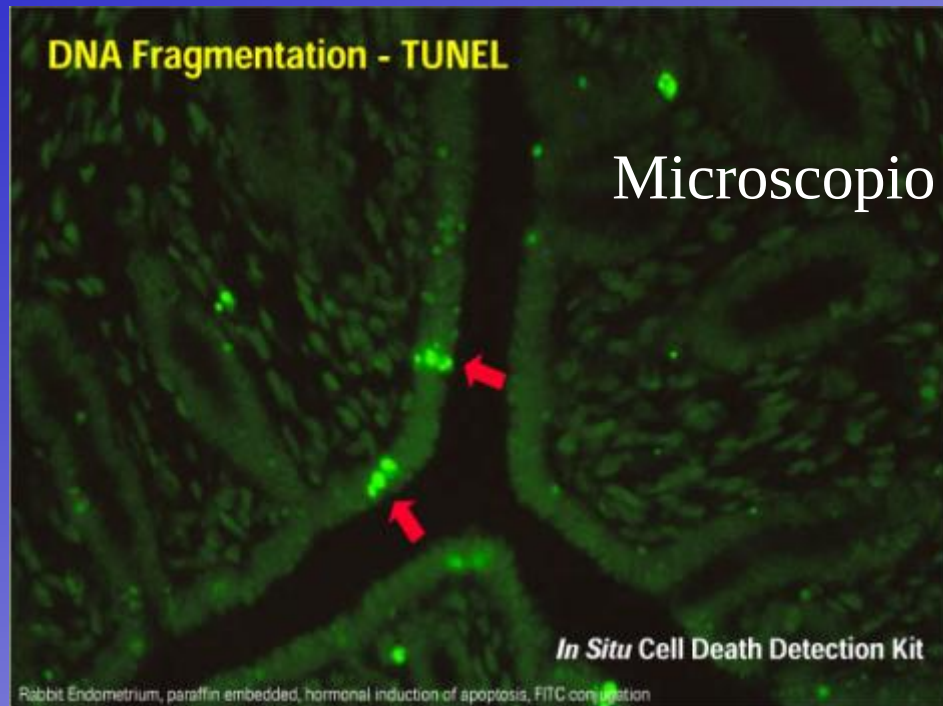
Add TdT and FITC-dUTP to cells

FITC-dUTP  
incorporated into  
DNA

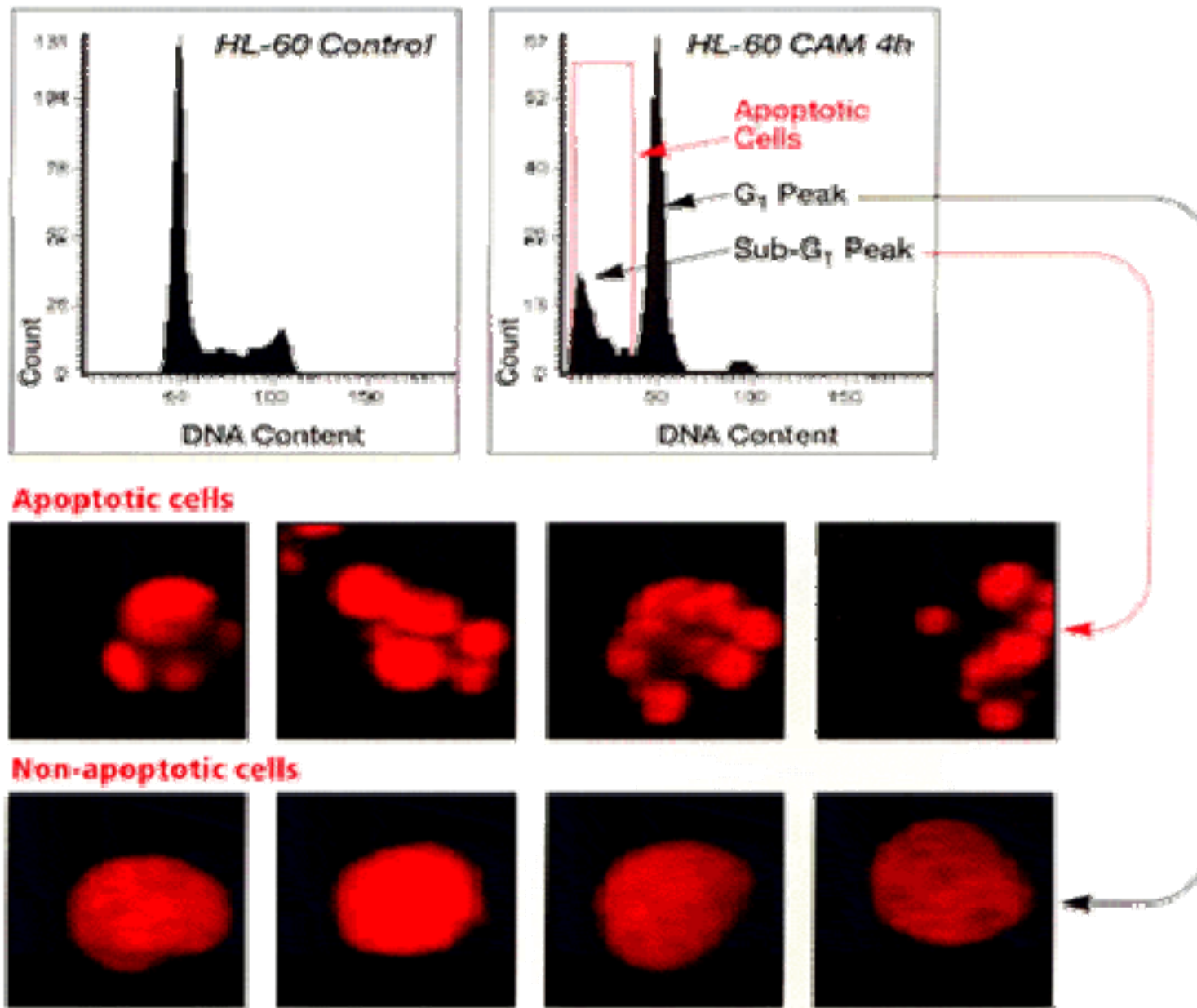
Fluorescence  
microscopy

<FITC> POD or <FITC> AP

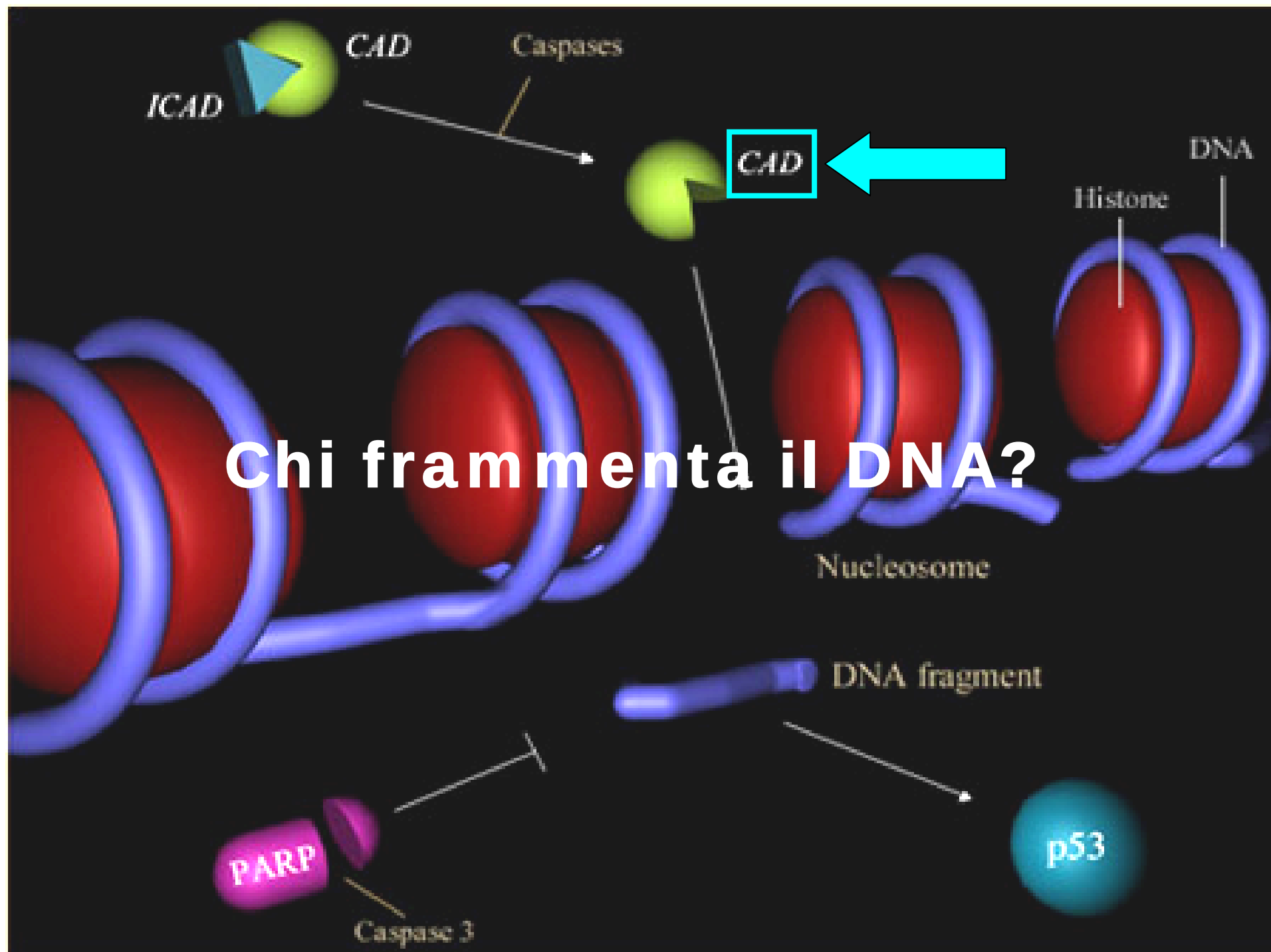
Light microscopy



# citometria di flusso







La via finale di tutti i tipi di apoptosi consiste nell'attivazione di una cascata proteolitica. Le relative proteasi sono proteine altamente conservate e appartengono alla famiglia delle **caspasi** (che comprende almeno 14 membri).

C → cisteino-proteasi

CASPASI

Asp → taglia dopo un residuo di  
ac. aspartico

## Conseguenze dell'attivazione delle caspasi: effetti nucleari

- Frammentazione del DNA

La caspasi 3 causa l'attivazione dell'endonucleasi CAD (Caspase Activated DNase).

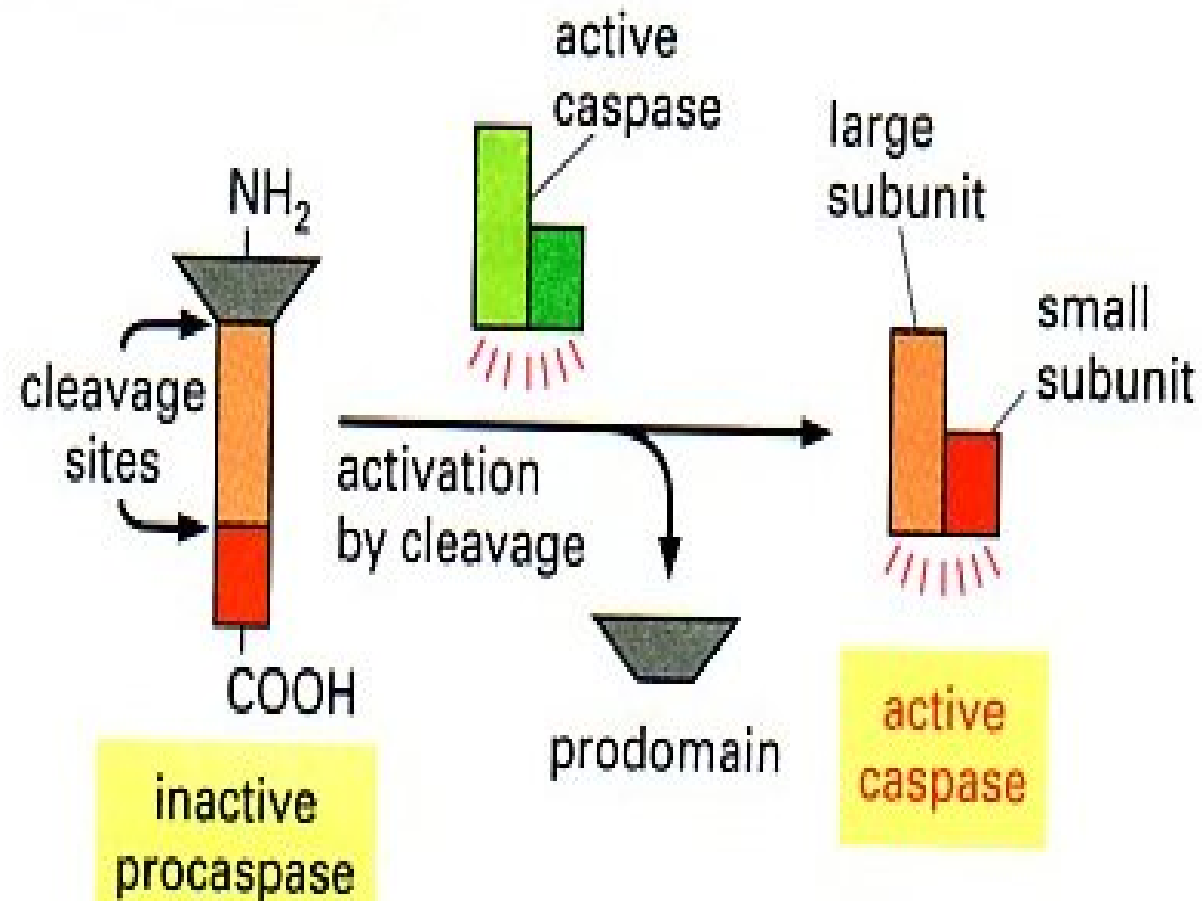
Normalmente la CAD si trova nel citosol, legata ad un inibitore. La caspasi 3 distacca l'inibitore, dopodichè CAD trasloca nel nucleo, dove causa una rapida frammentazione del DNA nucleare.



# Conseguenze dell'attivazione delle caspasi: effetti nucleari

- Inattivazione degli enzimi di riparazione del DNA.
  - Es.: la capacità della PARP (poly ADP-ribose polymerase) di riparare danni al DNA viene impedita in seguito alla proteolisi operata dalla caspasi 3
- Inattivazione di enzimi coinvolti nella replicazione cellulare.
  - ES.: le caspasi inattivano la DNA topoisomerasi II, essenziale per la replicazione e riparazione del DNA.
- Distruzione di proteine strutturali del nucleo.
  - Es.: le laminine sono proteine che mantengono la forma del nucleo e mediano l'interazione tra cromatina e membrana nucleare. La degradazione della laminina da parte della caspasi 6 è responsabile della condensazione della cromatina e della frammentazione nucleare.

(A) procaspase activation



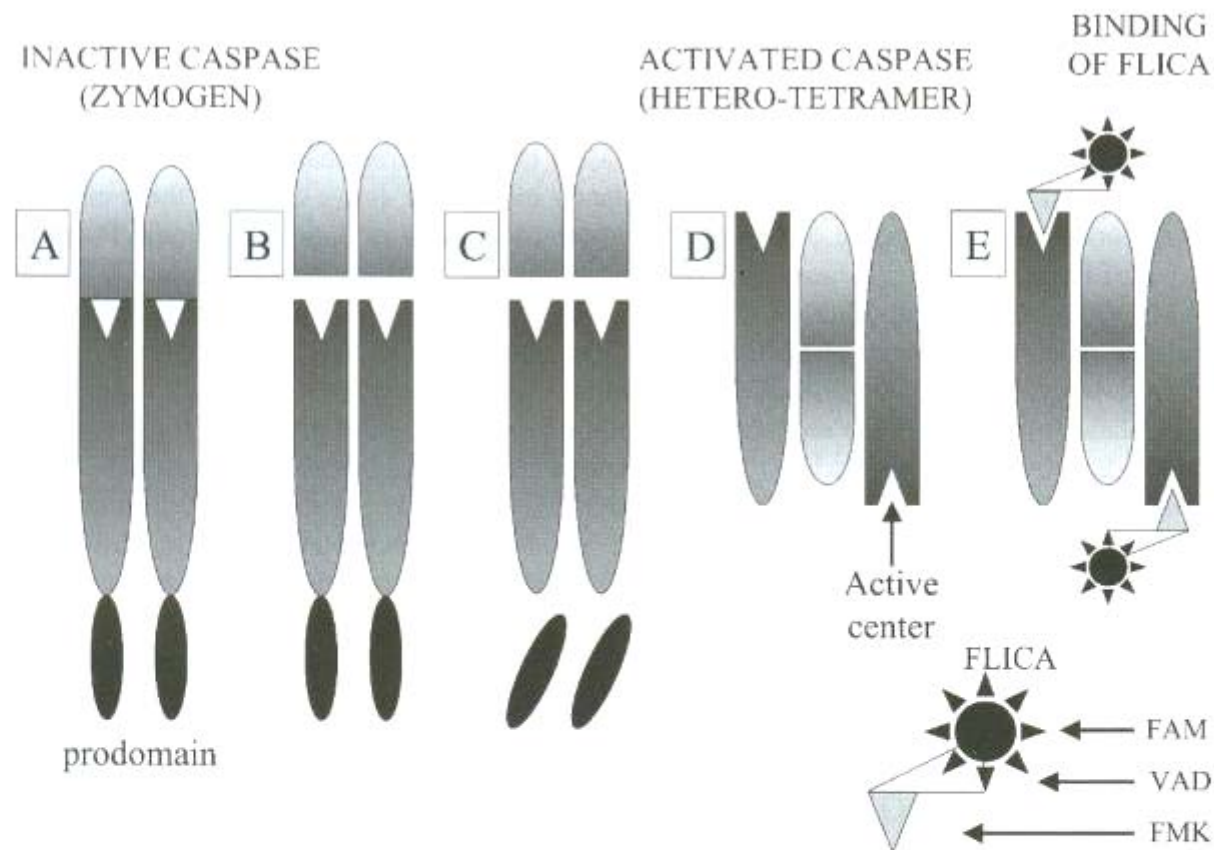
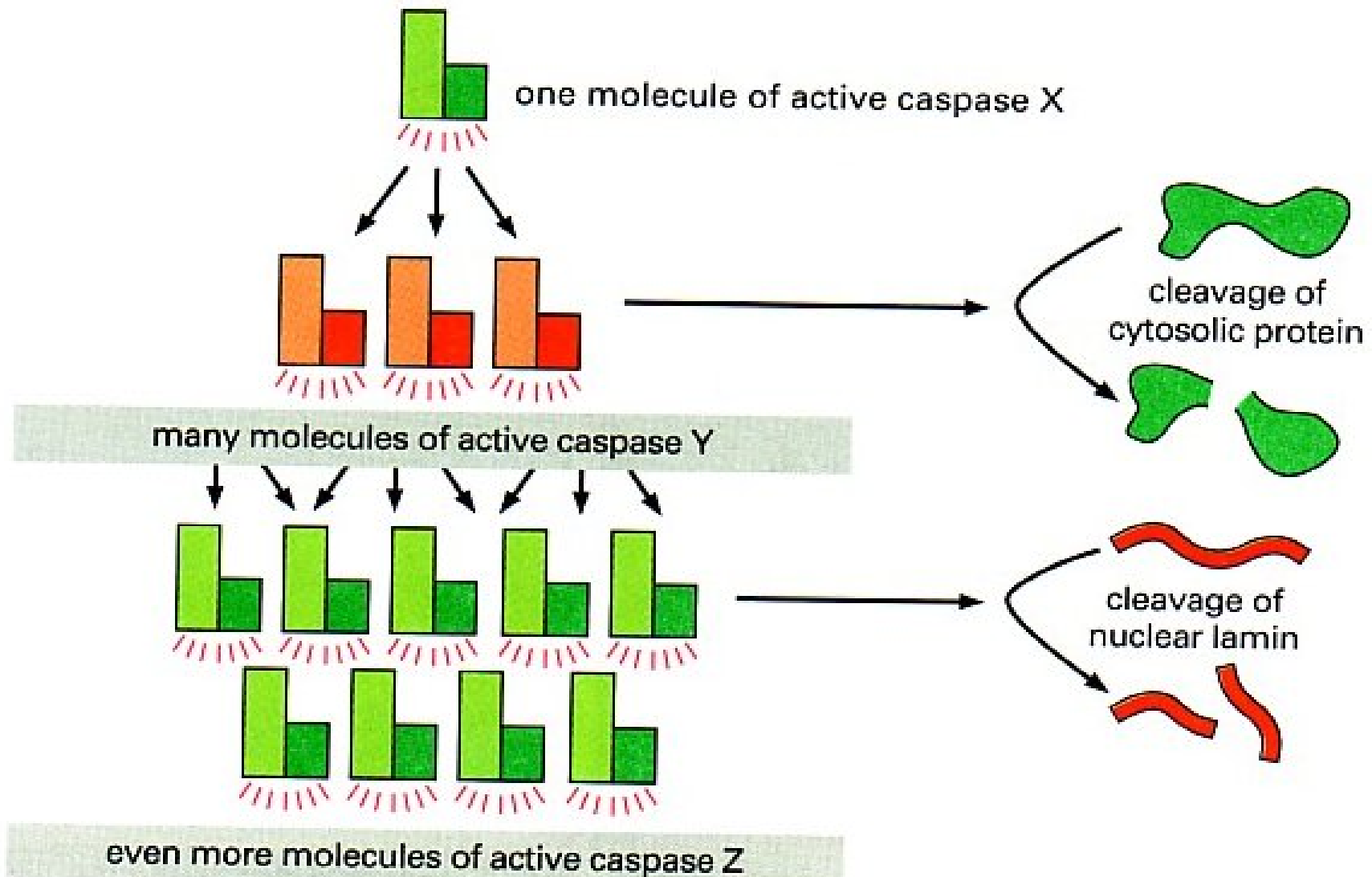


Fig. 1. Schematic illustration of caspase activation and FLICA binding to its enzymatic center. Caspases are present in the live cell as pro-caspases (zymogens) consisting of an N-terminal prodomain adjacent to a large ( $\sim 20$  kDa) subunit, which in turn is adjacent to a small ( $\sim 10$  kDa) subunit (A). The size of the prodomain differs between caspases: initiator caspases have a large size prodomain while effector caspases are

## Metodo per quantificare l'apoptosi in cellule intatte, viventi

subunits which results in separation of the subunits (B). The second cleavage takes place also at an Asp site and results in separation of prodomain (C). The subunits from two pro-caspases then assemble to form a hetero-tetramer which is the enzymatically active protease having two active centers on opposite ends of the molecule (D). The active centers are accessible to the substrates and can also bind FLICA (E). The binding of FLICA is mediated by the fluoromethyl ketone (FMK) moiety which covalently interacts with cysteine of the active center forming a thiomethyl ketone and irreversibly inactivates the enzyme (Thornberry et al., 1994, 1997). The specificity of binding is provided by the sequence of a four-amino acid peptide moiety (e.g. DEVD for caspase-3). The three-amino acid peptide VAD shown in the scheme binds to all caspases and thus FAM-VAD-FMK is a pan-caspase inhibitor/marker. The fluorescent tag (FAM) is located at the other end of the FLICA molecule.

(B) caspase cascade





# Subfamily members of caspase family

## Subfamily Role Members

I Apoptosis activator Caspase-2

Caspase-8

Caspase-9

Caspase-10

II Apoptosis executioner Caspase-3

Caspase-6

Caspase-7

III Inflammatory mediator Caspase-1

Caspase-4

Caspase-5

Caspase-11

Caspase-12

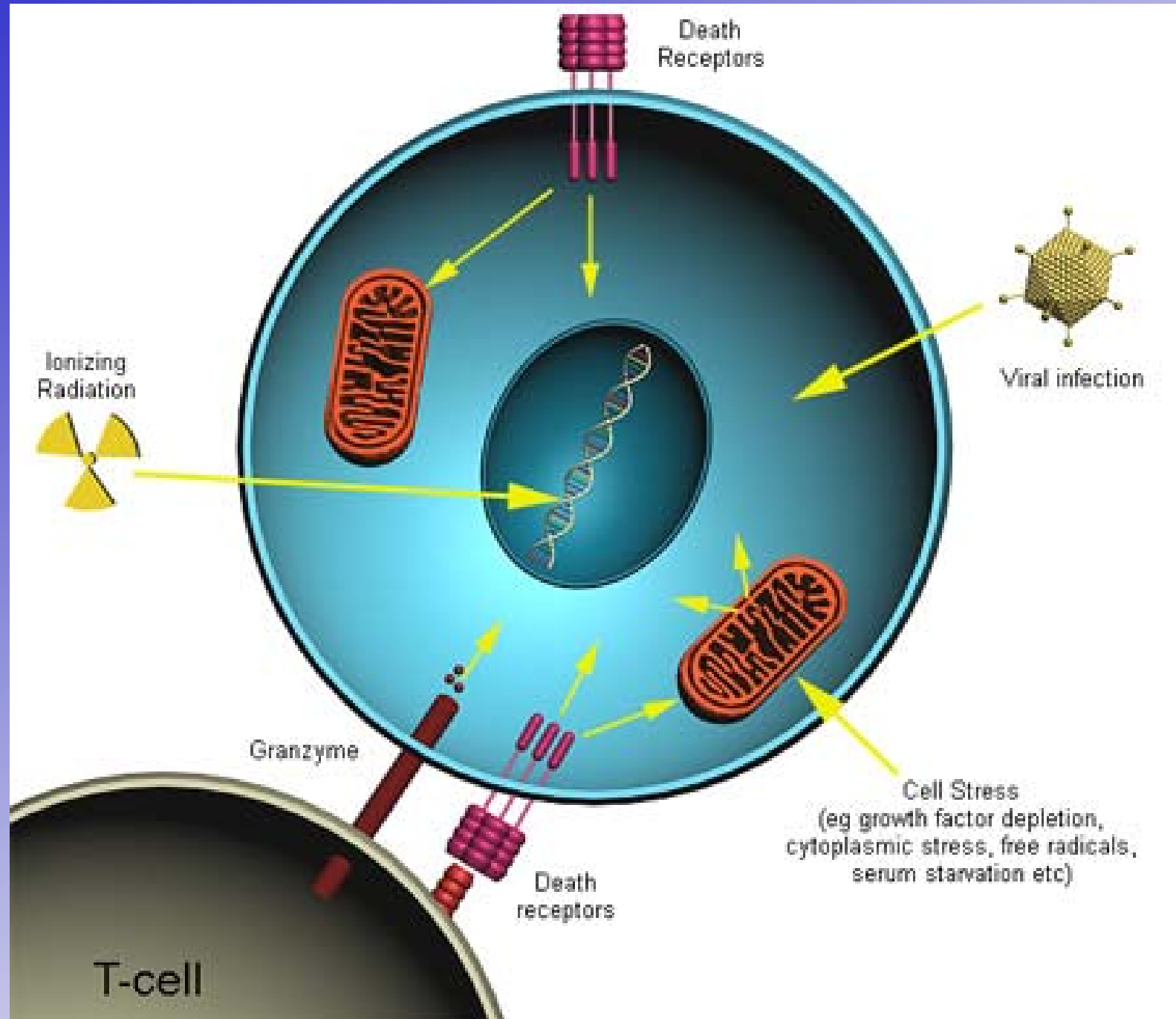
Caspase-13

Caspase-14

## MEDIATORI DELL'APOPTOSI (CAUSE)

I MEDIATORI DELL'APOPTOSI POSSONO ESSERE SUDDIVISI IN TRE GRANDI CLASSI:

- ① MOLECOLE CHE INDUCONO APOPTOSI LEGANDOSI AI LORO RECETTORI DI MEMBRANA O INTRACELLULARI E PRODUCENDO CAMBIAMENTI DEL CONTENUTO INTRACELLULARE (ORMONI E FATTORI DI CRESCITA)
- ② INTERAZIONI CON IL SISTEMA IMMUNITARIO: LE CELLULE VANNO INCONTRO AD APOPTOSI IN SEGUITO A CAMBIAMENTI NEL CONTENUTO INTRACELLULARE INDOTTI DALL'INTERAZIONE CON CELLULE CITOTOSSICHE
- ③ CONDIZIONI AVVERSE (IPERTERMIA, IPOTERMIA, ISCHEMIA, RADIAZIONI), FARMACI ANTITUMORALI, TOSSINE, AGENTI CHIMICI, RIMOZIONE DI UNO STIMOLO (ANDROGENI NELLA PROSTATA)



## COME VIENE ATTIVATO IL PROCESSO APOPTOTICO?

Ci sono quattro sistemi principali:

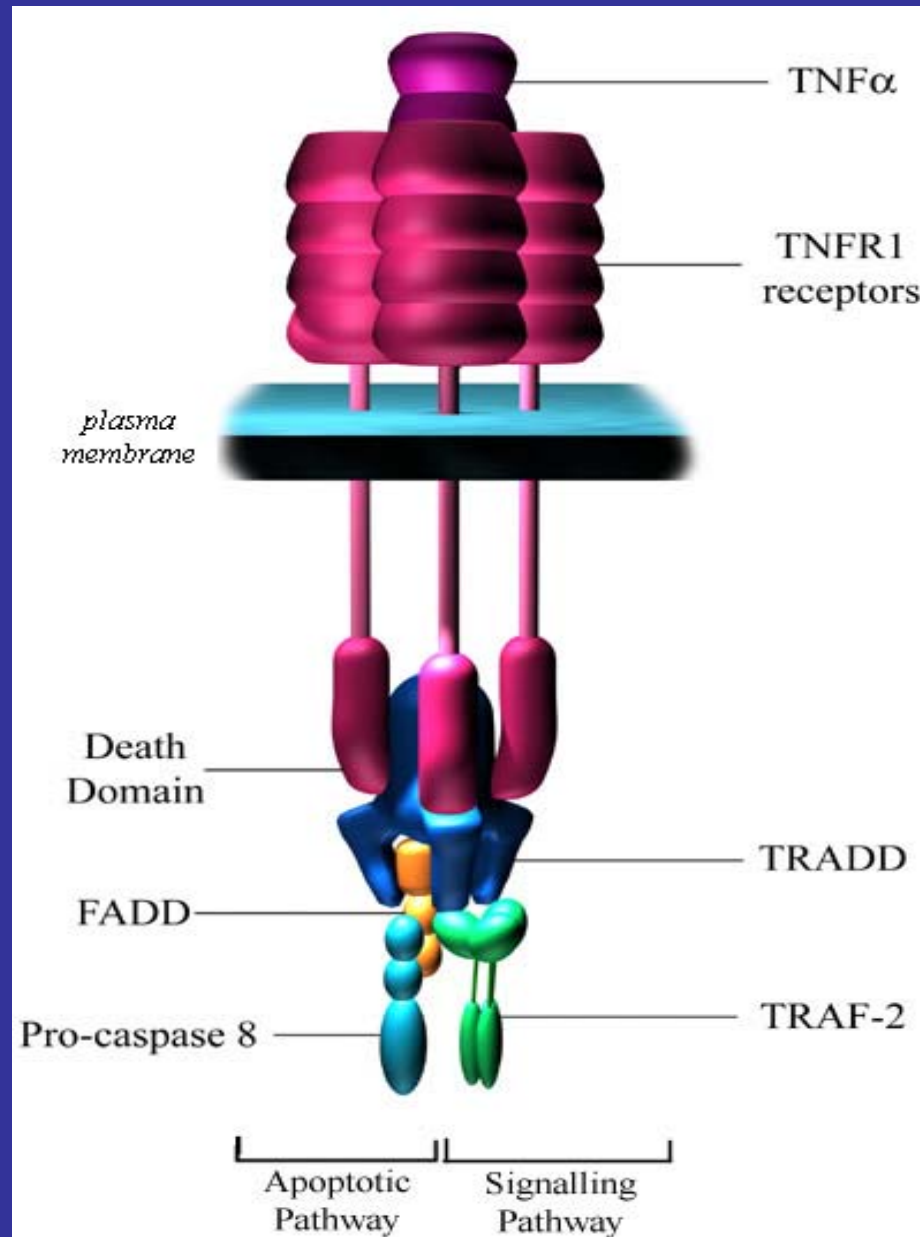
- • Via di trasduzione del segnale  
(es : apo mediata da segnali  
Fas-Fasligando, da TNFR)
- • Via di danno cellulare  
(es: radicali, anossia,  $\text{Ca}^{++}$ , perforine)
- • Danno al DNA (p53)  
(es: radiazioni, chemioterapici)
- • Danno della membrana (ceramide)  
(es: radiazioni, radicali liberi)



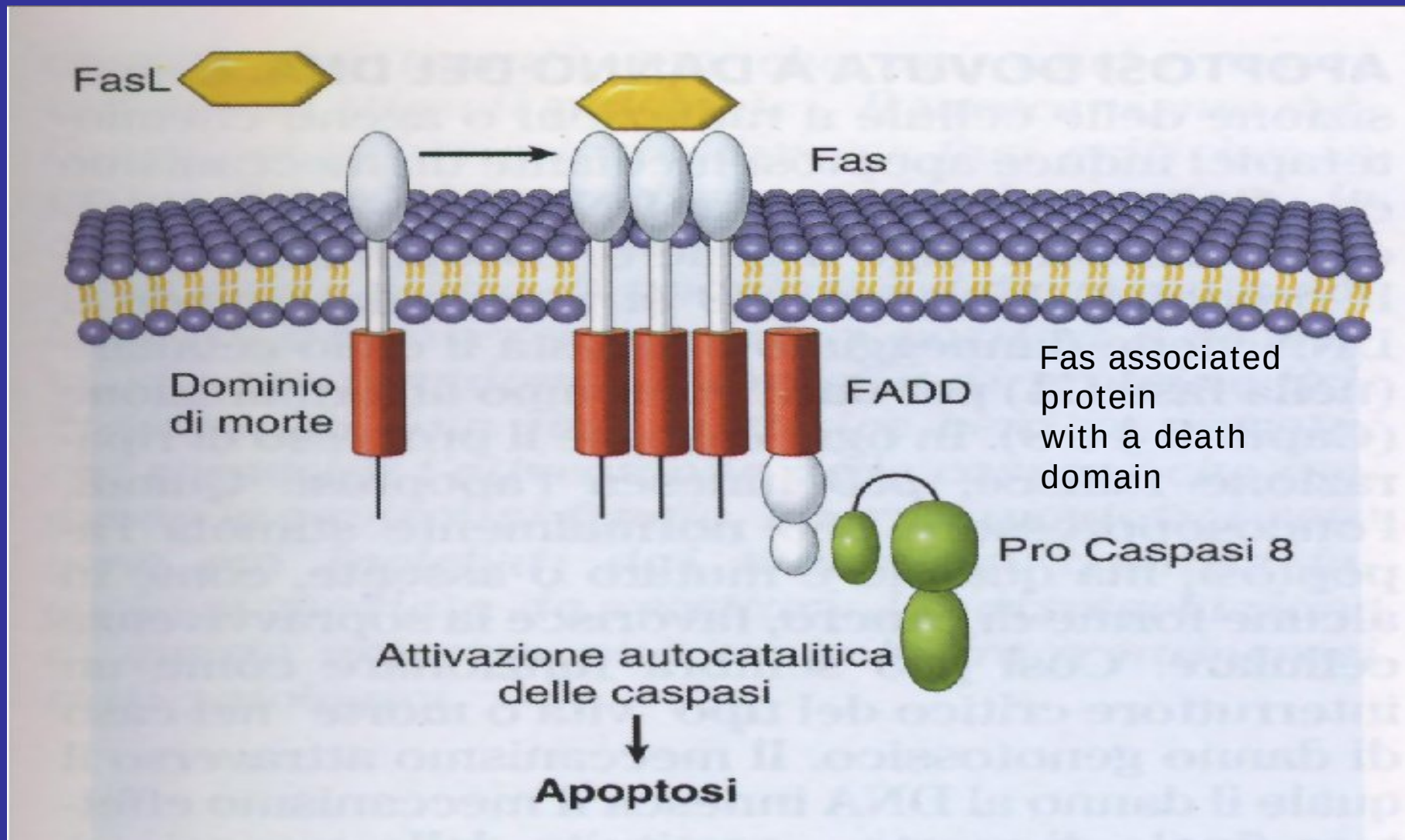
## INDUZIONE DELL'APOPTOSI

- Gli stimoli apoptotici possono essere **segnali extracellulari** che, attraverso l'interazione con recettori, possono innescare vie di trasduzione del segnale che comportano soppressione o induzione dei programmi di morte. I più importanti esempi sono rappresentati dalle **“vie di morte”** attivate dal legame di appropriati ligandi con recettori appartenenti alla superfamiglia dei TNFR (recettori del fattore di necrosi tumorale).
- In altri casi l'apoptosi è iniziata da **segnali intracellulari** che sono prodotti in situazioni di stress cellulare, quali l'esposizione a radiazioni, a tossici o a infezioni virali. Può essere anche la conseguenza della privazione di fattori di crescita o di stress ossidativo. In generale i segnali intrinseci iniziano l'apoptosi attraverso il coinvolgimento dei **mitocondri**.

L'APOPTOSI PUO' ESSERE INnescata DA SEGNALI PARTICOLARI CHE AGISCONO LEGANDOSI A SPECIFICI RECETTORI DI MEMBRANA.



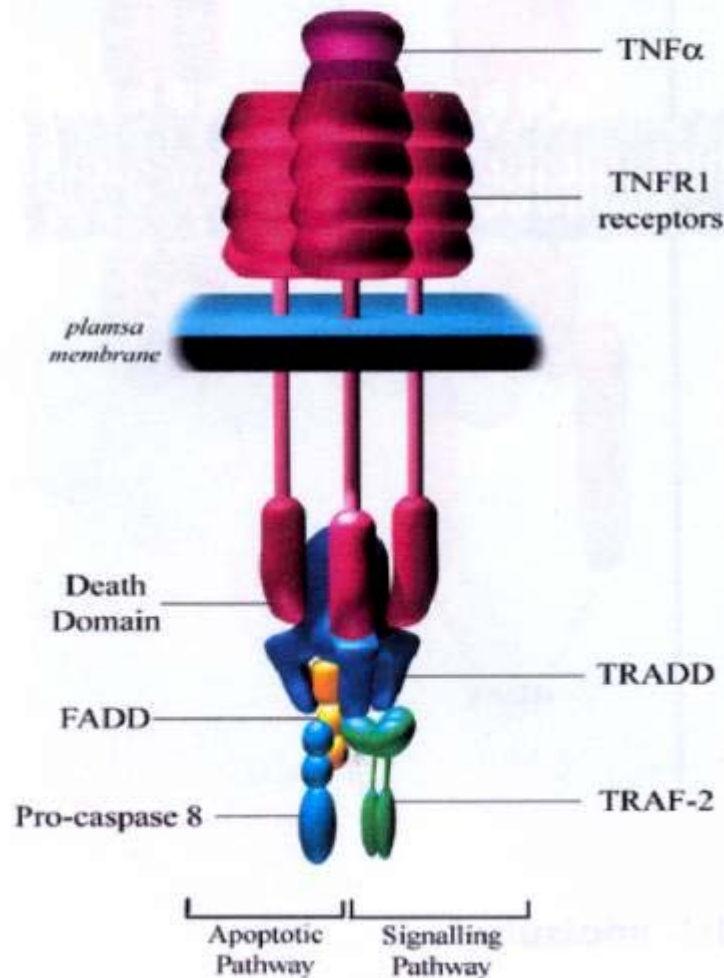
L'APOPTOSI, OLTRE CHE DA STIMOLI LESIVI O DALLA DEPRIVAZIONE DI FATTORI DI CRESCITA, PUO' ESSERE INnescata DA SEGNALI PARTICOLARI CHE AGISCONO LEGANDOSI A SPECIFICI RECETTORI DI MEMBRANA.



## 1. Tumour Necrosis Factor Recettore-1 (TNFR1)

2.

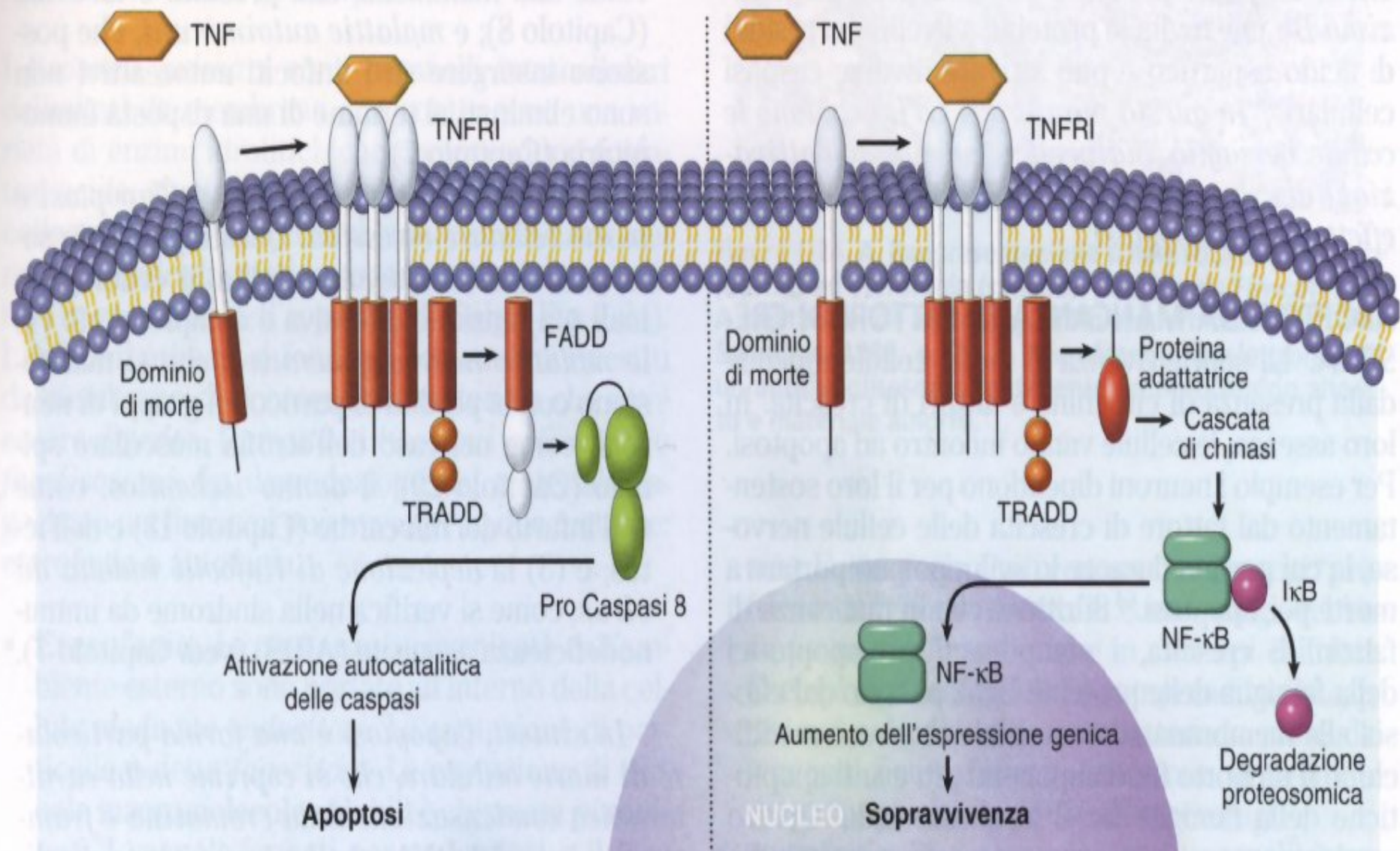
Il TNF è prodotto dai linfociti T e attiva i macrofagi, in risposta ad un processo infettivo. Legando il recettore TNFR1 (Figura 2), il TNF può avere diversi effetti: in alcune cellule comporta l'attivazione di geni proinfiammatori ed immunomodulatori, in altre cellule, invece, induce apoptosi.



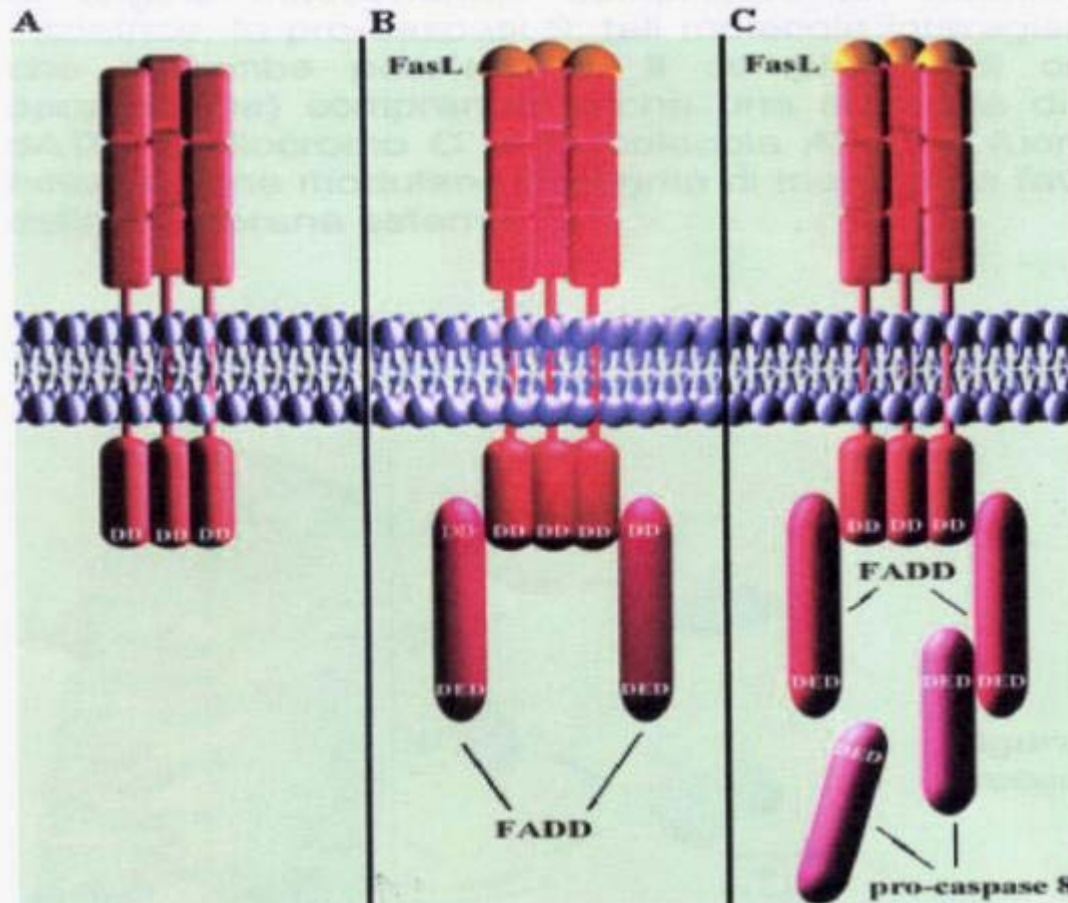
**Figura 2.** Il legame del TNF $\alpha$  al recettore TNFR1 provoca una trimerizzazione del recettore ed un raggruppamento dei domini "death" intracellulari. Questo consente il legame di una molecola intracellulare denominata TRADD (*TNFR-associated death domain*) attraverso interazioni con i domini death. La molecola TRADD è in grado di reclutare un numero di diverse proteine intorno al recettore attivato. L'associazione della molecola TRADD con il fattore FADD, induce il processo apoptotico mediante il reclutamento e l'attivazione della caspasi 8.



L'APOPTOSI PUO' ESSERE INnescata DA SEGNALI PARTICOLARI CHE AGISCONO LEGANDOSI A SPECIFICI RECETTORI DI MEMBRANA.



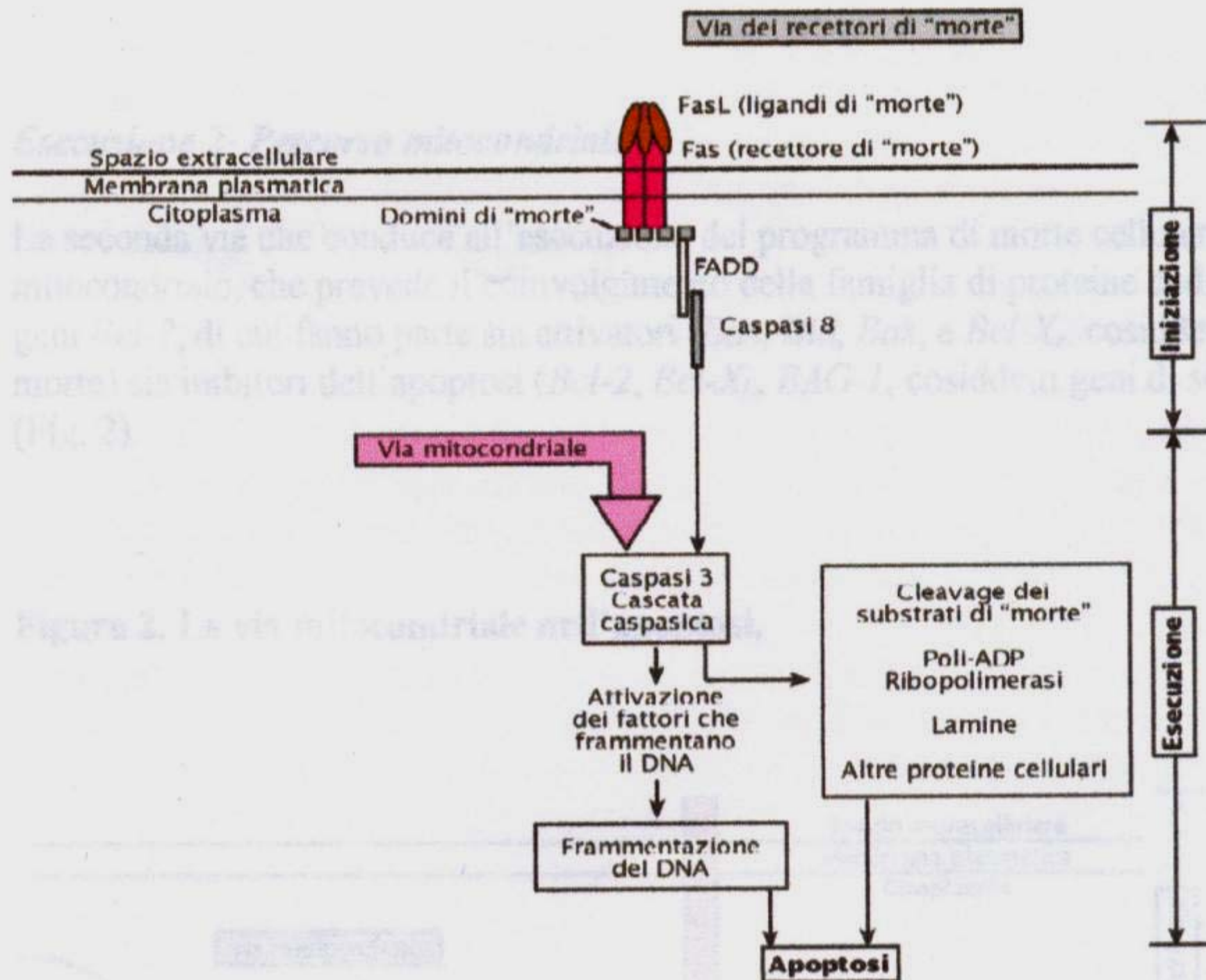
I ruoli principali svolti dal recettore CD95 includono il *killing* cellulare mediato da linfociti T-citotossici e la delezione di cellule-T attivate al termine di una risposta immunitaria. L'attivazione dell'apoptosi mediata da CD95/Fas è mostrata in Figura 3. Il ligando per il recettore CD95 (CD95L or FasL) è una molecola trimerica che, in associazione col recettore, promuove la trimerizzazione del recettore stesso, il quale, a sua volta, provoca il reggruppamento dei *death domains* (DD). Questo consente alla proteina FADD (*Fas-associated death domain*) di associarsi al recettore attraverso una interazione con domini *death* omologhi. La proteina FADD contiene anche un dominio *death* effetttore che lega una pro-caspasi iniziatrice, pro-caspasi 8, al complesso CD95-FADD. La pro-caspasi 8 viene immediatamente scissa e trasformata in caspasi 8, che a cascata, attiva altre caspasi.

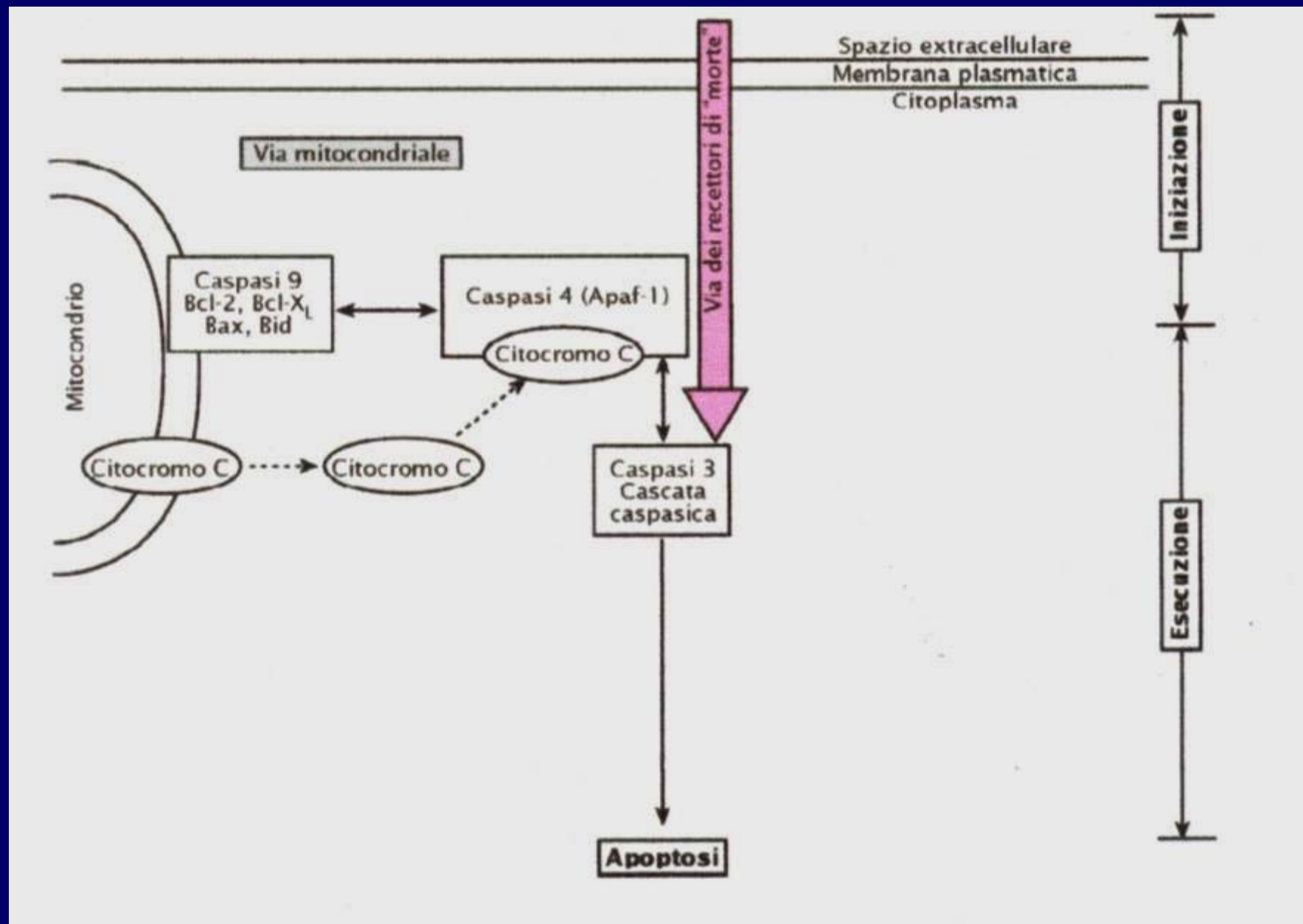


**Figura 3.** Attivazione dell'apoptosi mediata da CD95/Fas

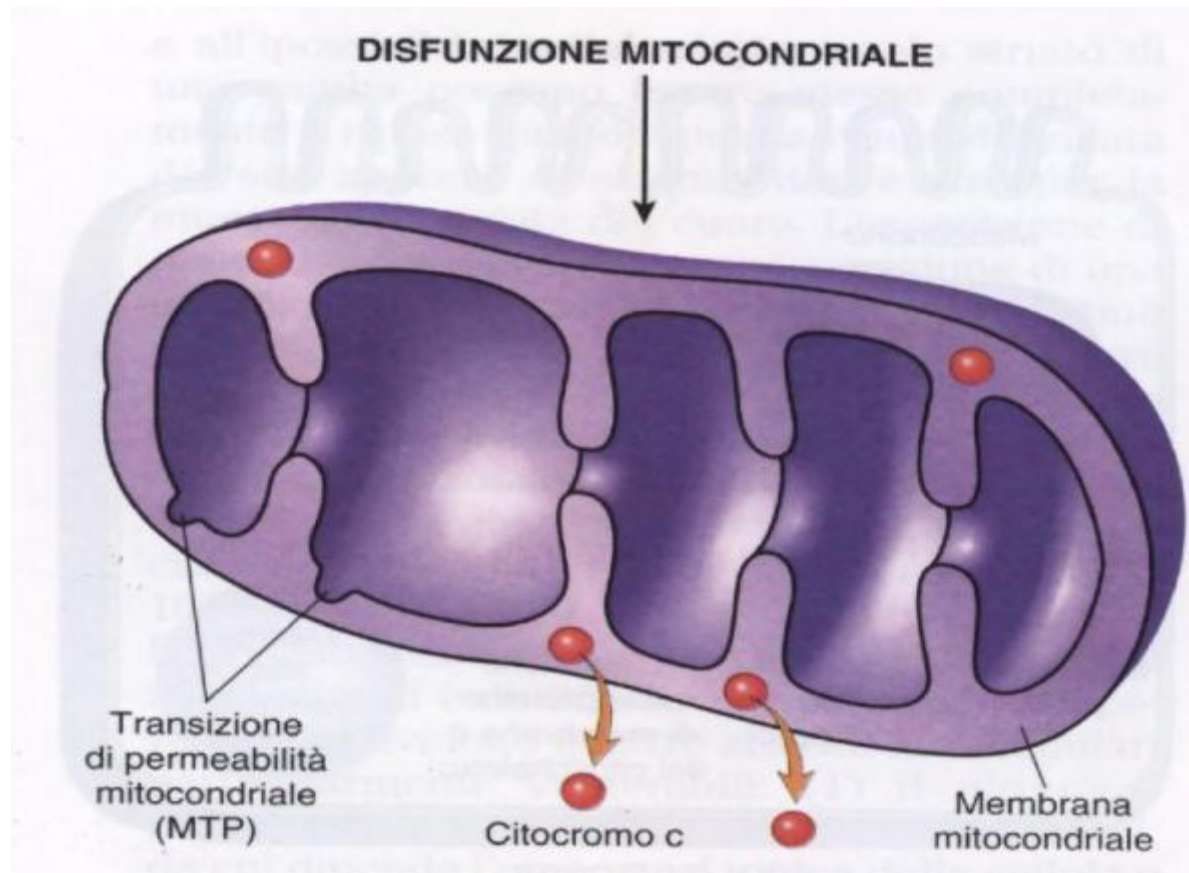
Questa via può essere bloccata da FLIP che lega la procaspasi 8, ma non la attiva. La FLIP viene prodotta anche da alcuni virus











La funzione mitocondriale può essere influenzata in due modi:

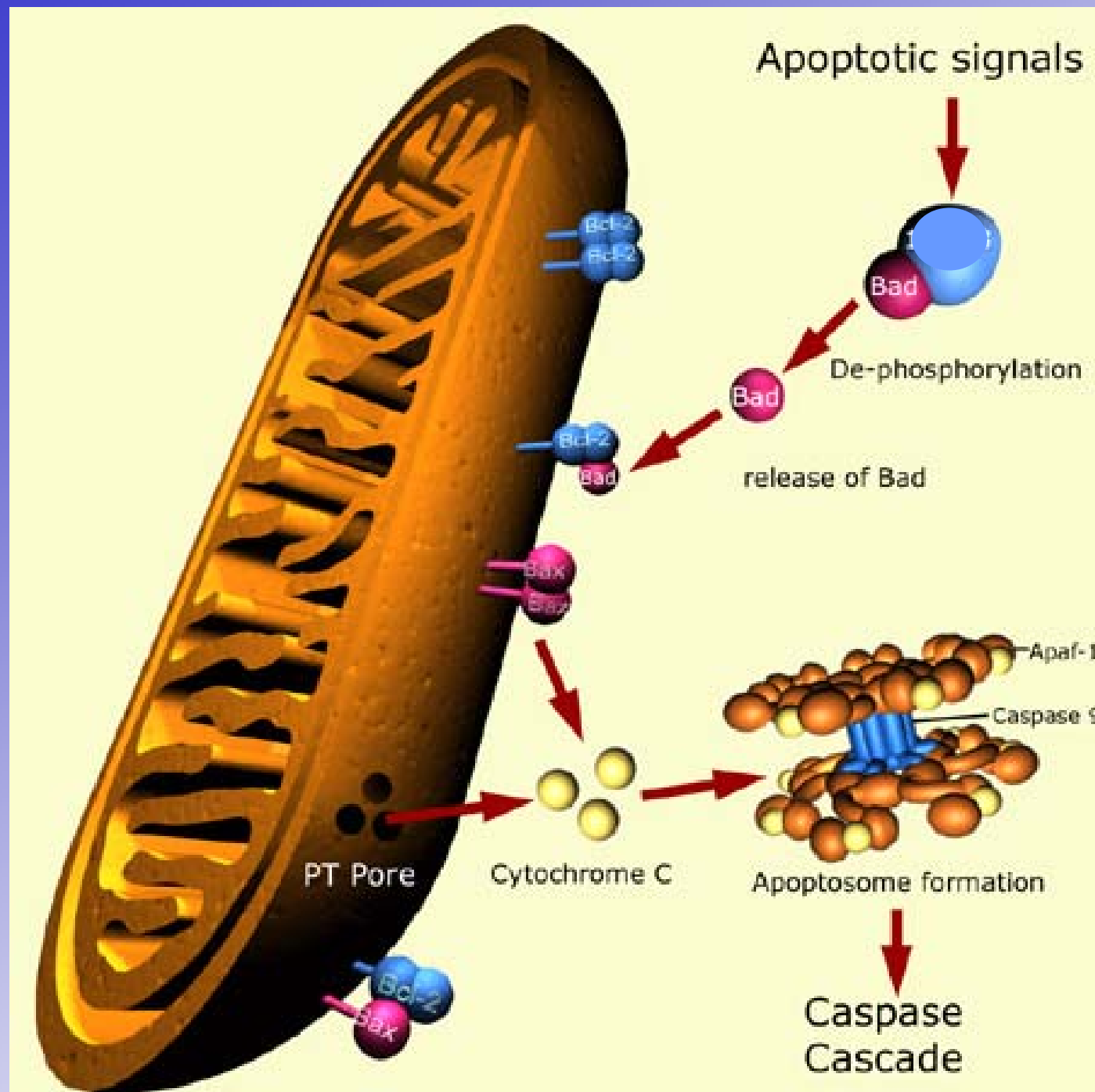
- Provocando una *transizione di permeabilità mitocondriale* (MPT): apertura di pori nella membrana interna → riduzione potenziale di membrana → arresto fosforilazioni ossidative → rigonfiamento.
- Provocando un aumento della permeabilità della membrana esterna e il *rilascio del citocromo C* nel citosol.

# RUOLO DEL MITOCONDRIO

- I mitocondri promuovono l'apoptosi attraverso il rilascio del citocromo c che, insieme con Apaf-1 (*fattore pro-apoptotico di attivazione delle proteasi*) e ATP, forma un complesso (apoptosoma) con la pro-caspasi 9 che porta all'attivazione della caspasi 9 e quindi della cascata delle caspasi.
- Le proteine della famiglia Bcl-2 modulano il processo apoptotico dipendente dai mitocondri.
- I membri anti-apoptotici, quali Bcl-2 e Bcl-XL, sono localizzati sulla faccia esterna della membrana mitocondriale e promuovono la sopravvivenza cellulare.
- I membri pro-apoptotico, quali Bad e Bax, mediano i loro effetti sia interagendo con Bcl-2 e Bcl-XL, sia attraverso interazioni dirette con la membrana mitocondriale.

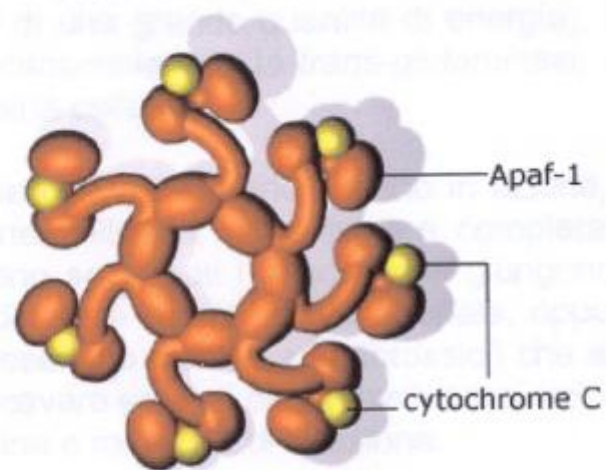
## **famiglia Bcl-2**

| <b>Pro-apoptotic proteins</b> | <b>Anti-apoptotic proteins</b> |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Bad                           |                                |
| Bax                           |                                |
| Bid                           |                                |
| Bak                           | Bcl-2                          |
| Bik                           | Bcl-XL                         |
| Bim                           | Mcl-1                          |
| Bmf                           | Bcl-w                          |
| Bok                           |                                |
| Puma                          |                                |

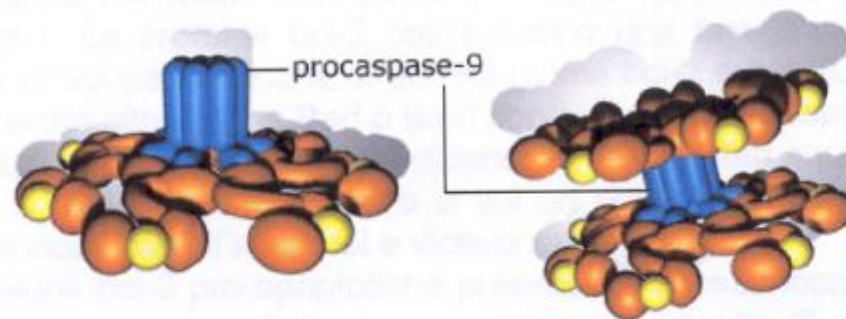




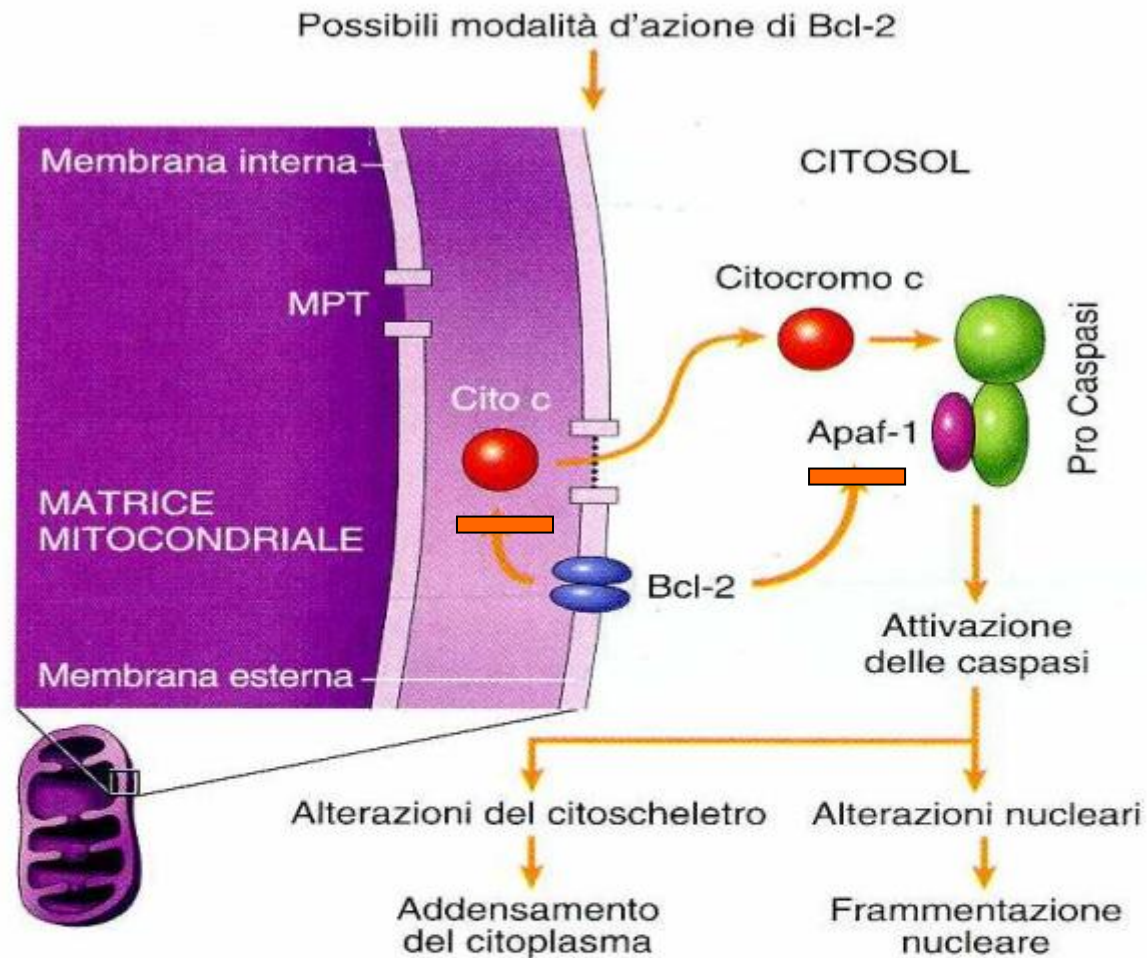
### First stage of apoptosome formation



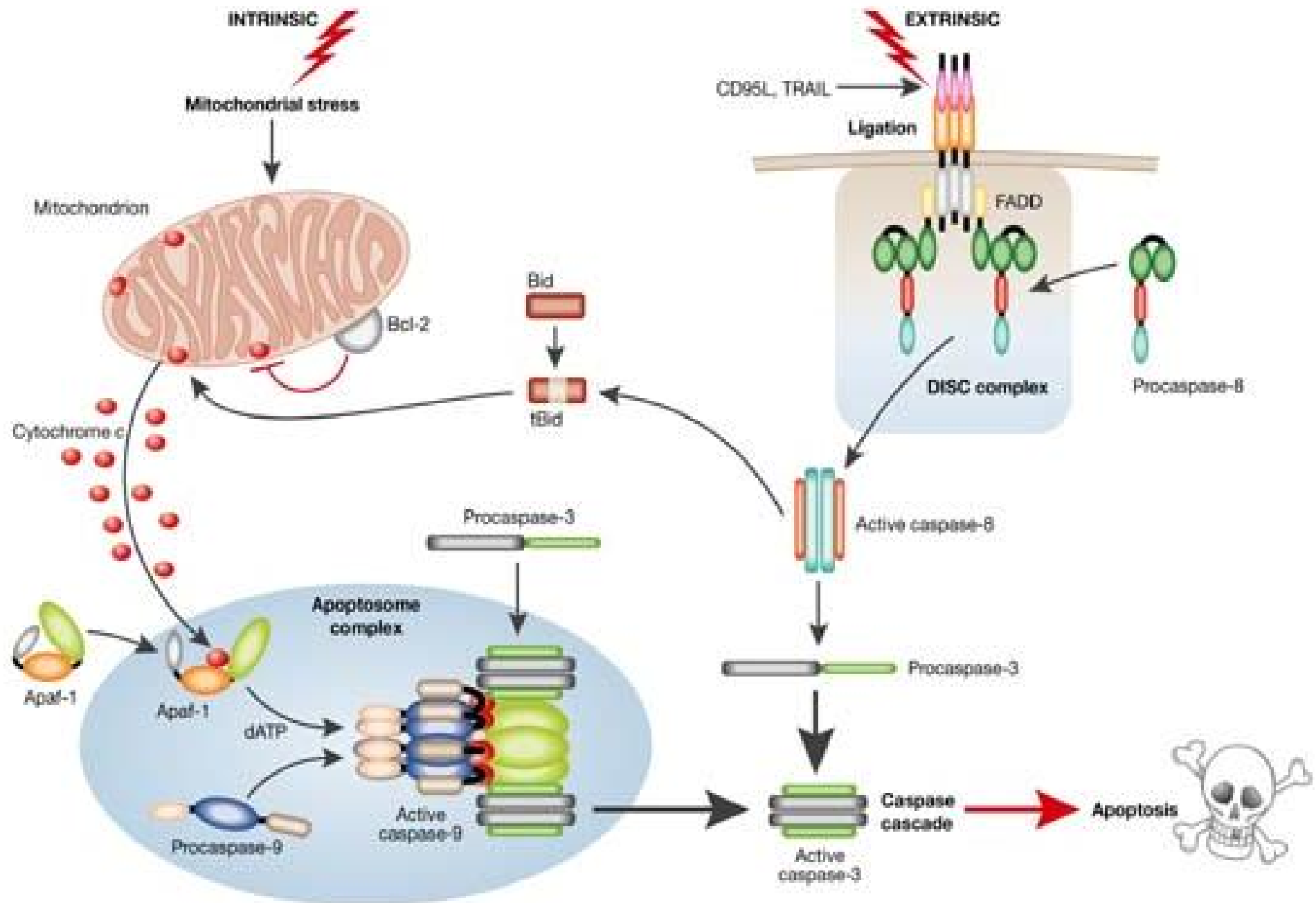
### Recruitment of procaspase-9

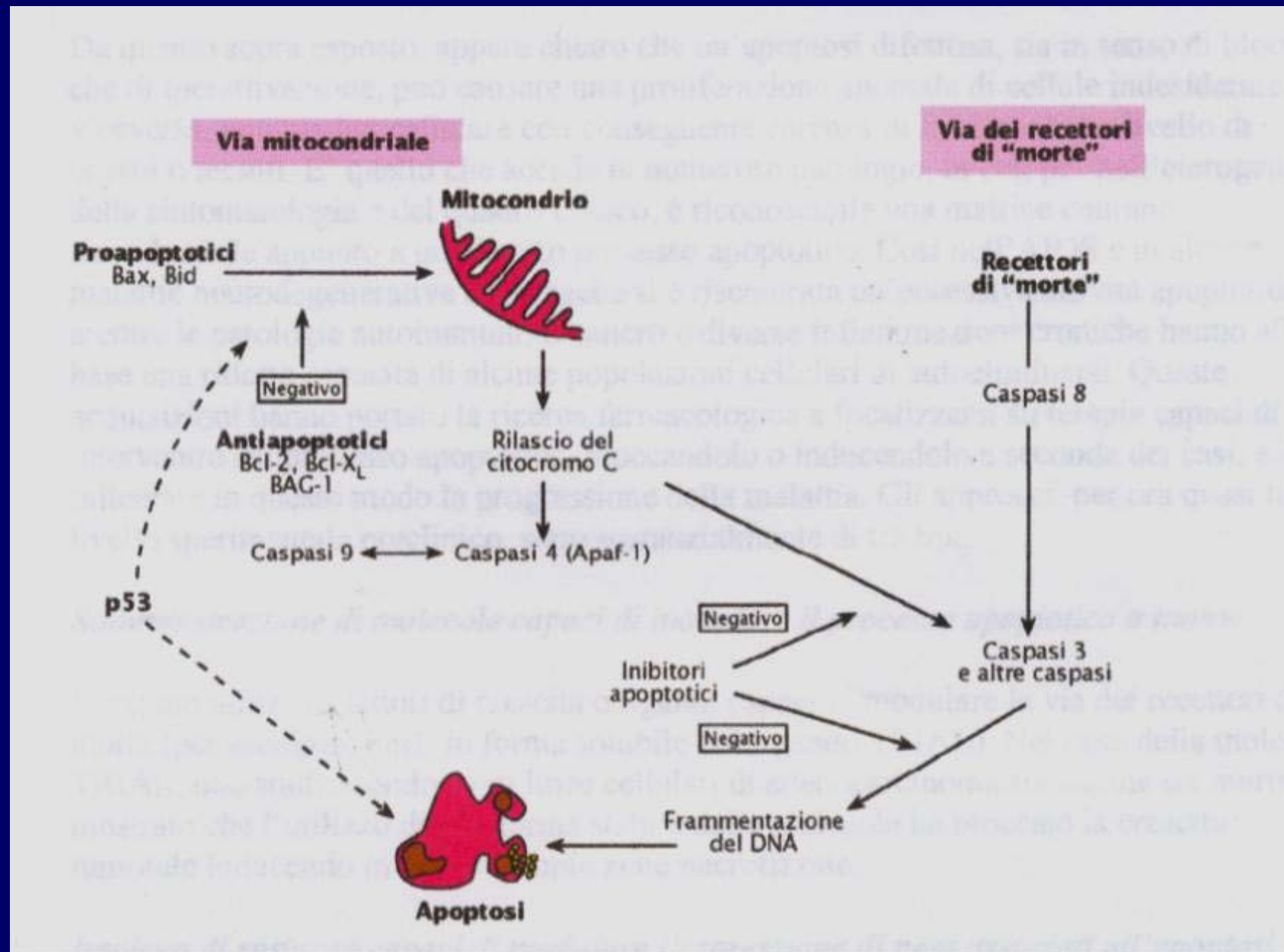


### Caspase Activation



**Figura 1-21.** Eventi mitocondriali e effetti di Bcl-2 nell'apoptosi. Gli agonisti dell'apoptosi possono indurre modificazioni della membrana mitocondriale interna, e provocare transizione di permeabilità mitocondriale (MPT) e rilascio di citocromo c nel citosol con un meccanismo tuttora non chiaro. Il citocromo c rilasciato rompe il legame tra Bcl-2 e il fattore attivante le proteasi pro-apoptotiche (Apaf). Questo attiva le caspasi di inizio, che innescano gli eventi proteolitici che infine uccidono la cellula. Bcl-2 sopprime l'apoptosi mediante inibizione del rilascio di citocromo c quindi inattivando Apaf-1.







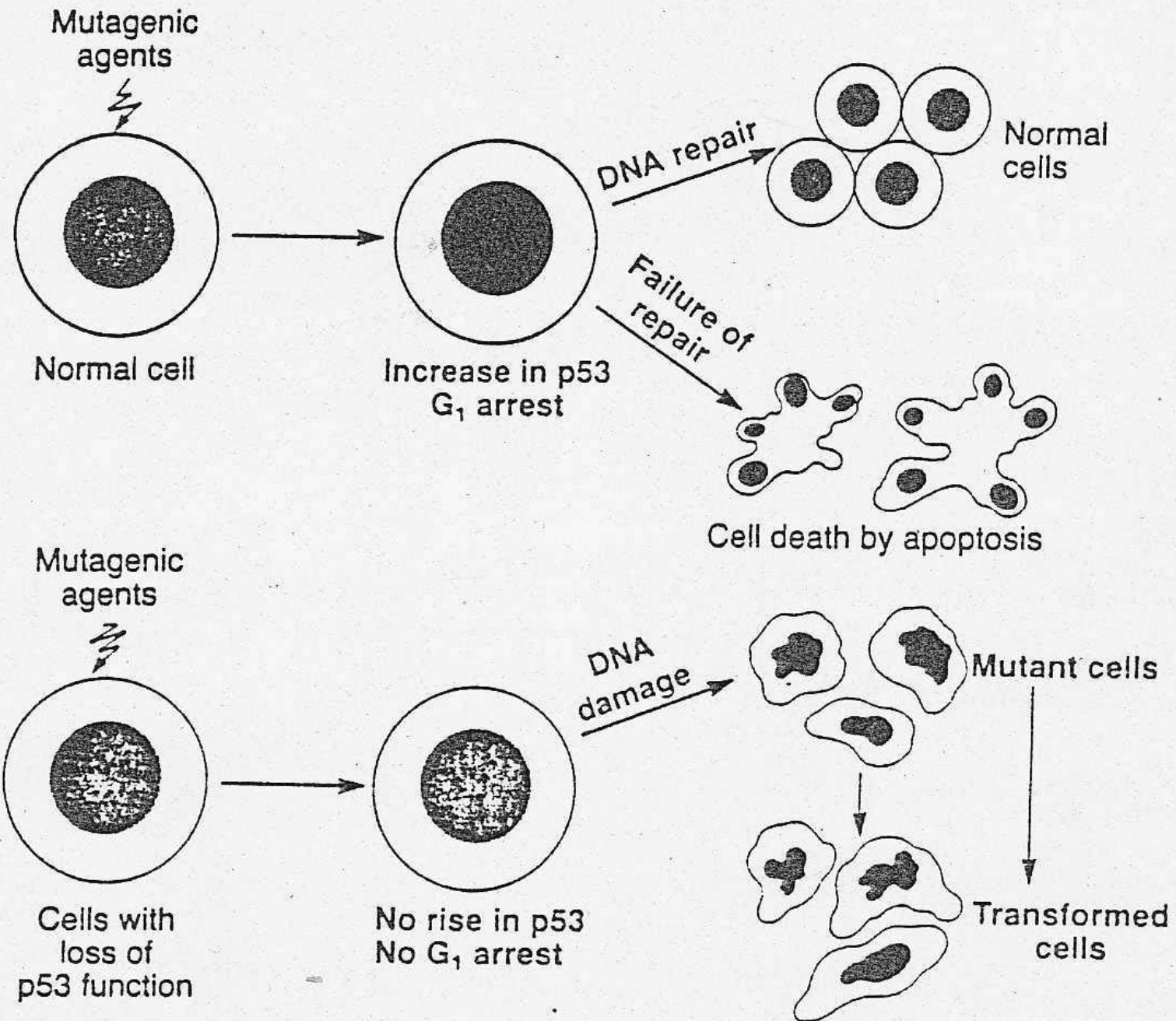
# Danni genetici non letali sono alla base del processo di cancerogenesi.

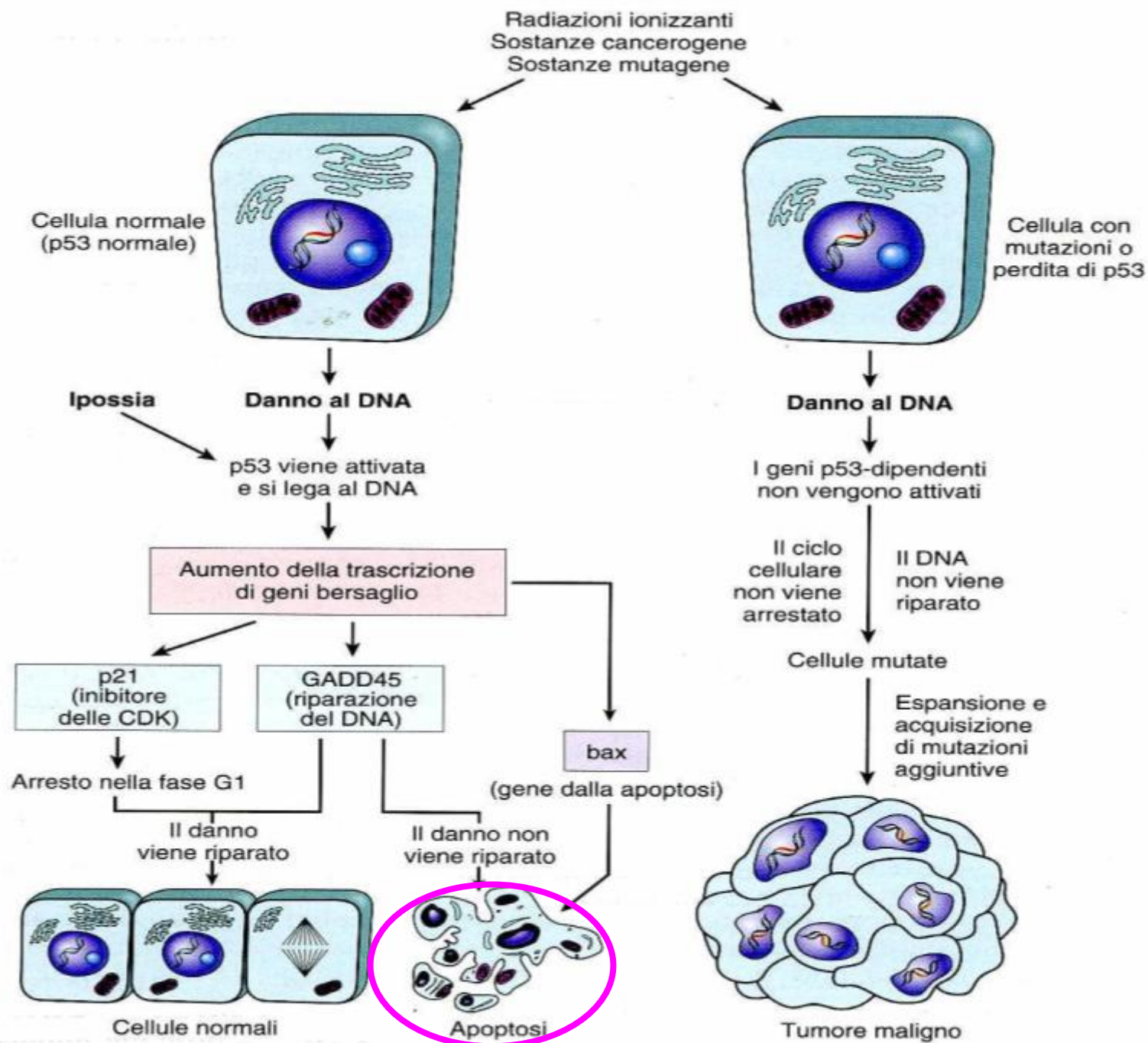
**I bersagli principali del danno genetico sono:**

- I proto-oncogeni che promuovono la crescita cellulare
- Gli anti-oncogeni o geni onco-soppressori che inibiscono la crescita (es. p53)
- I geni che regolano l'apoptosi (es. Bcl2)
- I geni che regolano il processo di riparazione del DNA

# p53

p53 è il gene più frequentemente alterato in tumori umani. La perdita omozigote del gene p53 si trova nel 70% dei tumori del colon, nel 30-50% dei tumori della mammella e nel 50% dei tumori del polmone.



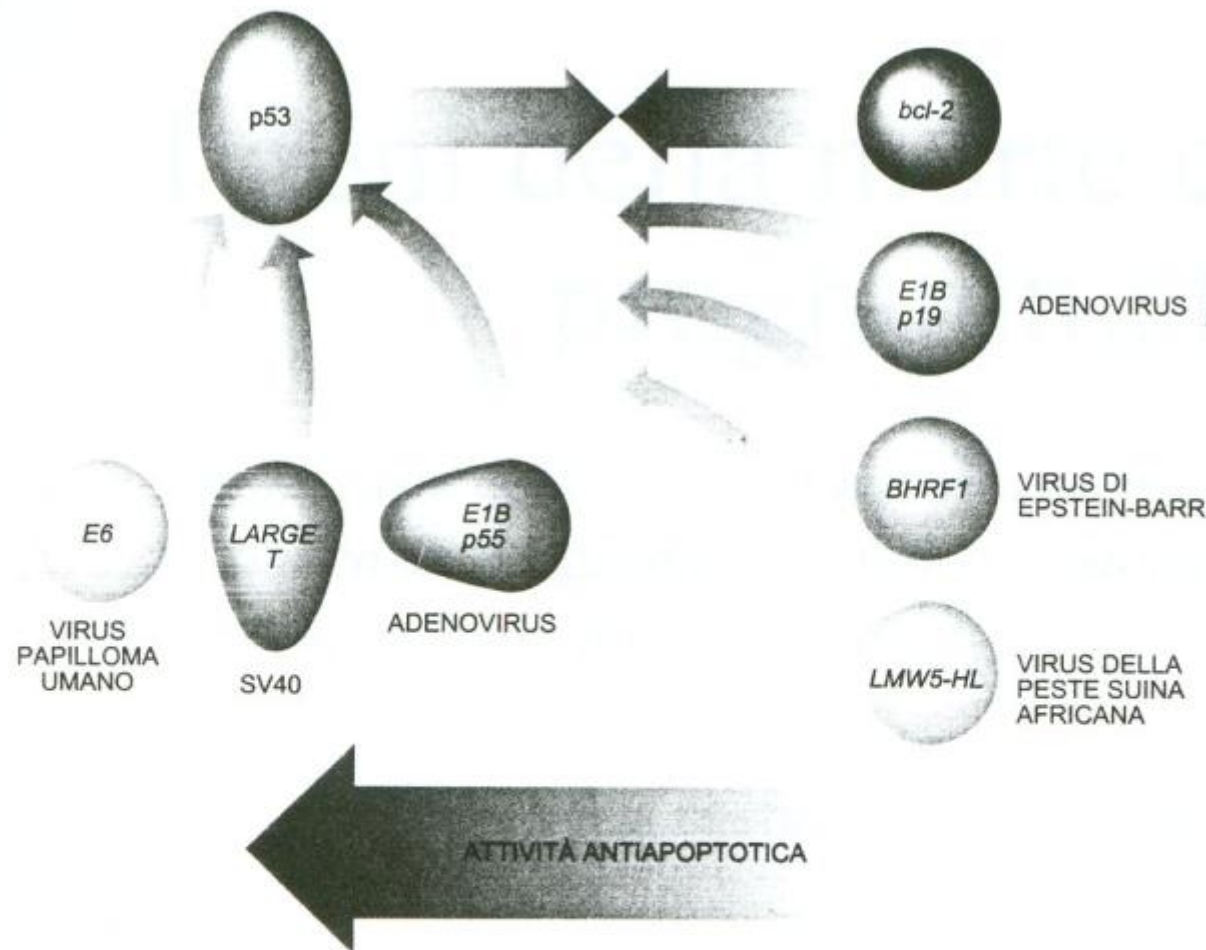




# GENI DELL'APOPTOSI

## **Bcl-2**

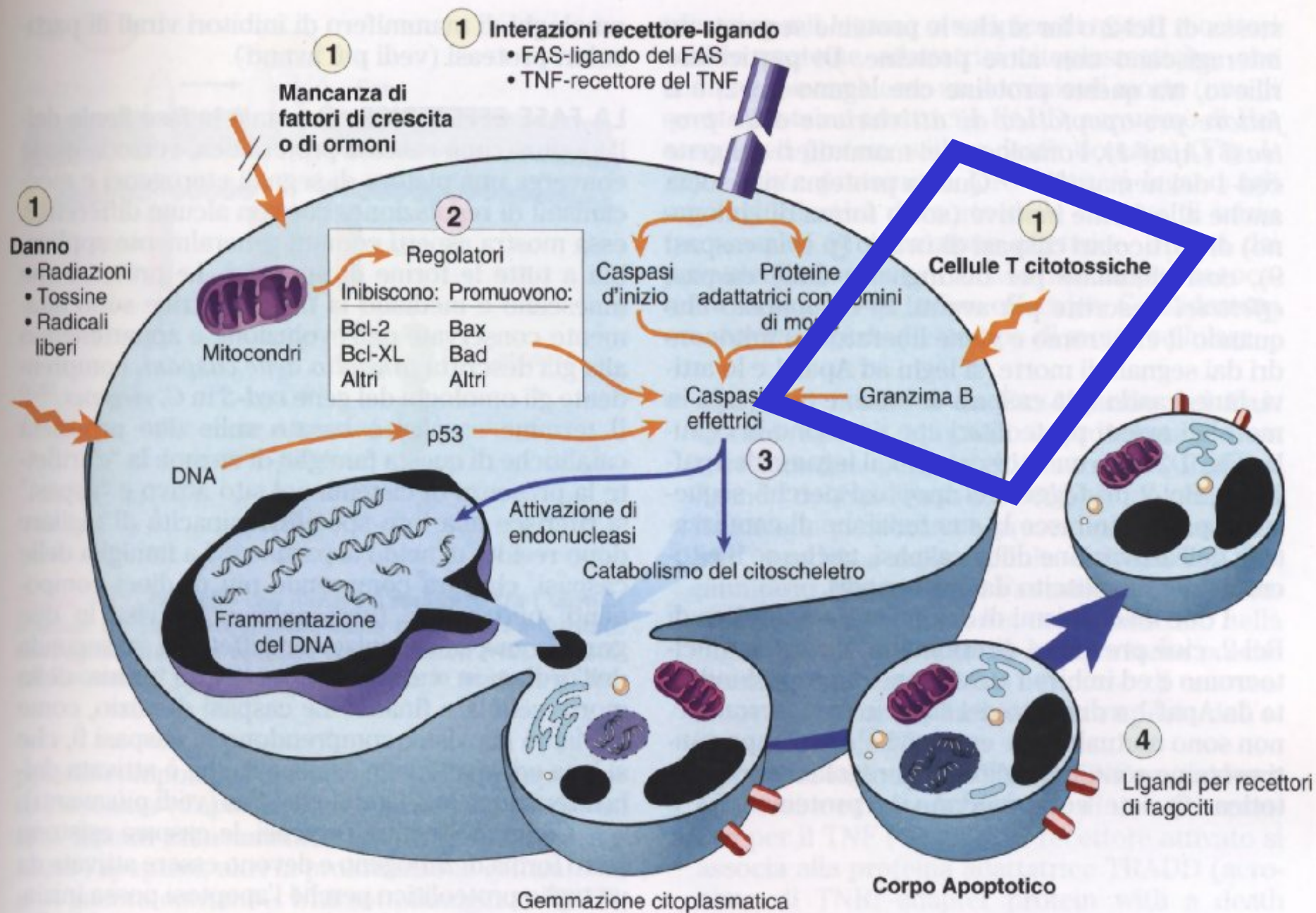
- Traslocazione 18;14 presente in 85% dei linfomi follicolari e nel 20% dei linfomi diffusi a cellule B → iperespressione di Bcl-2.
- Transfezione di Bcl-2 in linee IL-dipendenti: non è fattore di crescita, ma impedisce l'apoptosi.
- Topi transgenici per il gene Bcl-2 sviluppano iperplasia follicolare per linfoproliferazione policlonale. Dopo lunghi periodi di latenza, la proliferazione policlonale evolve in linfoma maligno monoclonale.



I geni p53 e *bcl-2*, che rivestono un ruolo fondamentale nella morte cellulare programmata, sono implicati anche nella «strategia» messa in atto da taluni virus a DNA per portare a compimento con successo il proprio ciclo nelle cellule che infettano. È probabile che la replicazione di gran parte di questi virus necessiti che il programma di morte, implementato nell'ospite e capace di essere eseguito anche in risposta all'infezione, venga soppresso. In effetti si conosce l'esistenza di almeno tre virus, quello di Epstein-Barr, quello della peste suina africana e l'adenovirus, che recano «imitazioni» di *bcl-2* e sono quindi capaci di esercitare a loro volta una attività antiapoptotica. Altri geni di adenovirus, SV40 e papillomavirus agiscono invece contrastando l'attività di p53, un determinante positivo dell'apoptosi, inattivandolo funzionalmente oppure favorendone la degradazione.

## APOPTOSI INDOTTA DA LINFOCITI T CITOTOSSICI

- I CTL, attivati dal riconoscimento di antigeni estranei, esprimono il FasL alla loro superficie e possono pertanto indurre apoptosi nelle cellule bersaglio dotate di Fas.
- Un altro meccanismo (forse più efficiente) consiste nel produrre pori nella membrana della cellula bersaglio tramite la secrezione di *perforina*. Attraverso tali pori viene immessa nelle cellule la proteasi *granzima B* che taglia le proteine a livello dei residui di ac. Aspartico e può attivare direttamente alcune caspasi cellulari.

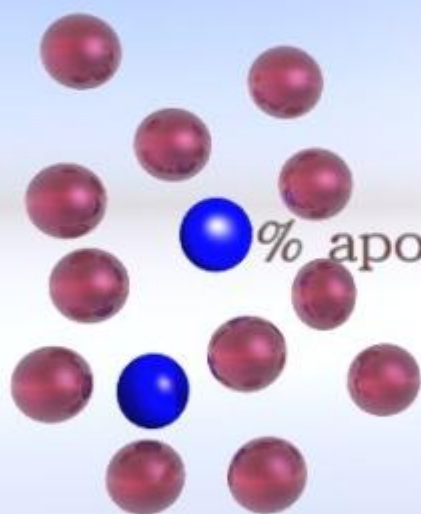




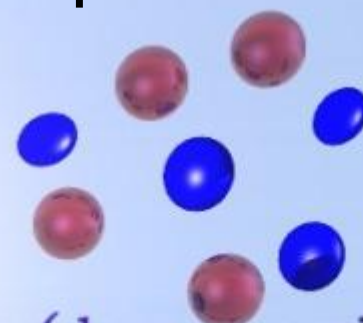
## APOPTOSI INDOTTA DA LINFOCITI T CITOTOSSICI

La frammentazione del DNA, che costituisce la caratteristica saliente del processo apoptotico, ha un notevole significato protettivo, in quanto causa la distruzione del DNA dei microrganismi (in genere virus) situati all'interno della cellula bersaglio

# Implicazioni in patologia e terapia



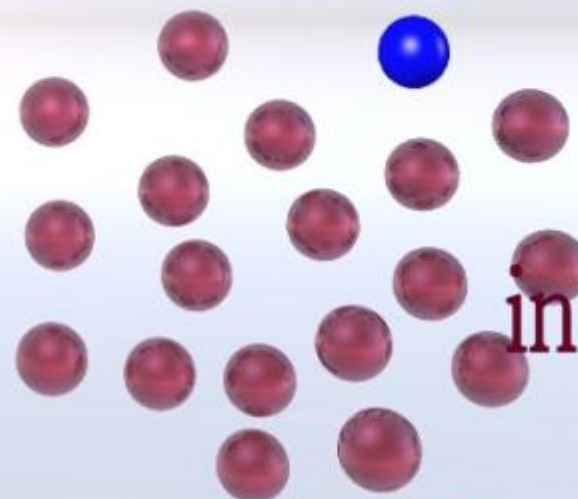
% apoptosi normale



inibire

troppa (degenerazioni?)

Parkinson, Alzheimer, AIDS



indurre

poca (tumori?)

tumori, infiammazioni croniche

## Approcci terapeutici (a livello sperimentale preclinico)

Molecole capaci di modulare la via dei recettori di morte, e.g. FasL in forma solubile o il ligando TRAIL( tumor necrosis factor related apoptosis induced ligand) o altre molecole come Smac-Diablo (second mitochondria-derived activator of caspasis)

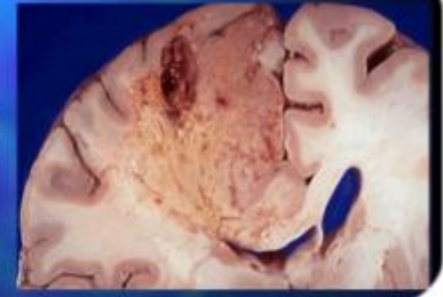
Impiego di sostanze capaci di modulare l'espressione di geni associati all'apoptosi, e.g. oligonucleotidi antisenso per geni target della famiglia BCL-2 o per le caspasi

Terapia genica di geni pro o antiapoptotici

# Ipotesi di approccio terapeutico per patologie legate all'apoptosi

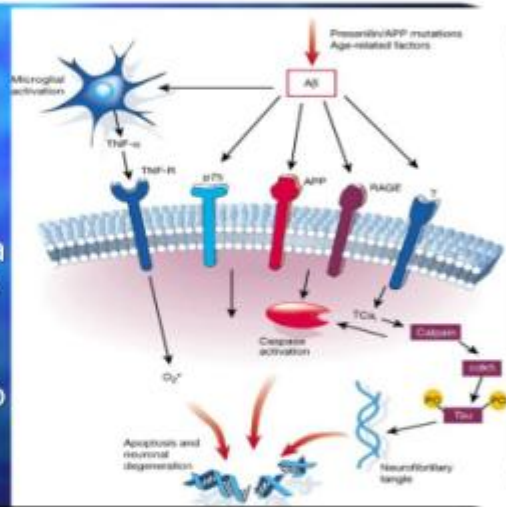
## ISCHEMIA:

- I neuroni vanno in apoptosi dove l'insulto è meno severo e durante la riperfusione
- Approccio terapeutico: trattamento con inibitore di caspasi 11



## MORBO DI ALZHEIMER:

- Causato da mutazioni che predispongono a una maggior deposizione di  $\beta$ -amiloide
- Il  $\beta$ -amiloide induce apoptosi interagendo con recettori neuronali



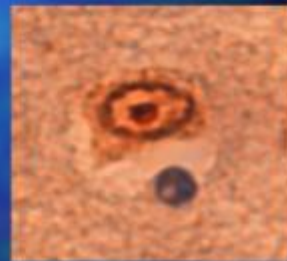
## MORBO DI ALZHEIMER:

- Il  $\beta$ -amiloide attiva la microglia cerebrale
- La microglia attiva secerne TNF- $\alpha$  e altri fattori tossici
- Approccio terapeutico: trattamento con inibitori di caspasi 2 e 12



## COREA DI HUNTINGTON:

- Causata da aggregati di proteine con ripetizioni di poliglutammine (huntingtina) sottoforma di grandi inclusioni nucleari
- Approccio terapeutico: trattamento con inibitori della caspasi 1



## SCLEROSI AMIOTROFICA LATERALE (ALS):

- Causata da mutazioni in SOD-1 che ha attività proapoptotica
- SOD-1 forma degli aggregati intraneuronali
- Approccio terapeutico: trattamento con inibitori delle caspasi 1 e 3

