

Sbobinatore: Sofia Rossetto
 Controllore: Federica Perino

A inizio lezione il Docente ha mostrato i libri di testo che consiglia per il corso. Lui personalmente usa, sia per patologia generale che per anatomia patologica, il Robbins in inglese perché a suo parere è più aggiornato ed interattivo.

Inoltre, sottolinea che l'esame sarà incentrato sulla patologia generale con esclusione della fisiopatologia.

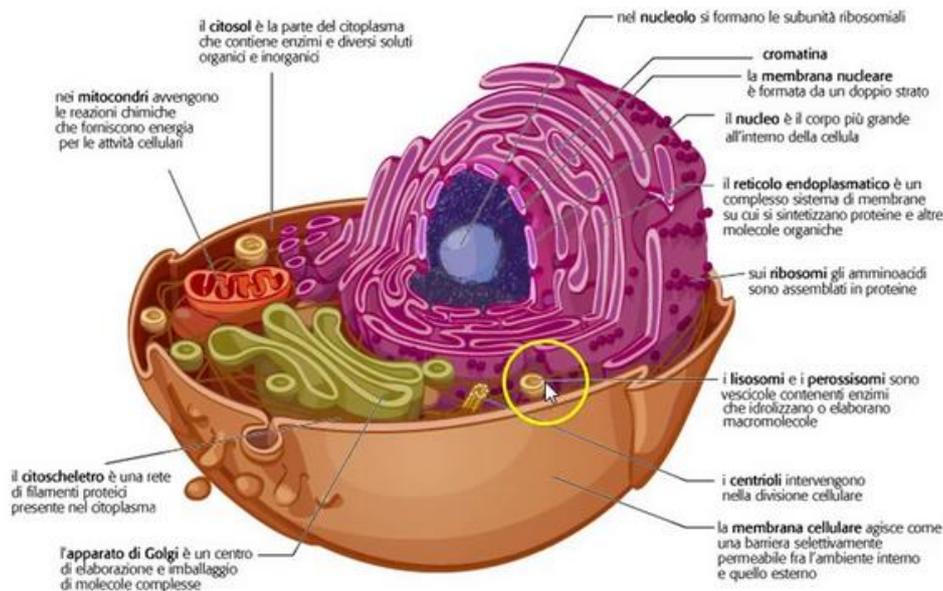
Riprendendo la lezione precedente:

Il mantenimento dell'omeostasi cellulare è di fondamentale importanza per la vita cellulare, per l'integrità dei tessuti e per la loro architettura. Le cellule eucariotiche spendono molta energia per difendersi dai cambiamenti in quanto esse sono conservative al punto da essere compartimentalizzate in organelli per dividere le funzioni: i mitocondri, ad esempio, producono energia e sono coinvolti nella produzione di radicali liberi dell'ossigeno per distruggere patogeni (vedremo il coinvolgimento dell'ossido nitrico quando parleremo dell'infiammazione) e nella regolazione dell'apoptosi.

Ad esempio, se necessario di un pH basso posso compartimentalizzare una struttura circoscritta di pH basso per permettere agli enzimi litici, i lisosomi, di funzionare in maniera corretta. Così facendo guadagno funzioni compartimentalizzate, ma devo spendere un po' più di energia per formare questi sistemi vescicolari per organizzare la compartimentalizzazione.

Quindi: la cellula eucariote risponde perfettamente alle esigenze dal momento in quanto è in grado di ottimizzare le funzioni necessarie e il modo migliore per svolgerle.

CELLULA EUCARIOTA



Della cellula eucariotica ricordiamo il **citosol**, coinvolto in metabolismo, trasporto, formazione di proteine, è la porzione preponderante del volume cellulare.¹

¹ La dimensione del nucleo dipende dalla tipologia di cellula, ad esempio un megacariocito ha un nucleo grande.

CITOSCHELETRO

Una componente importante del citoplasma è il **citoscheletro** che serve a:

- mantenere la struttura cellulare;
- orchestrare i movimenti che effettuano gli organelli ad esempio al momento della divisione con i riarrangiamenti del materiale genetico durante mitosi e meiosi;
- mantenimento della polarità cellulare. Nell'ambito dei tumori e delle cellule neoplasiche vedremo che sono cellule né differenziate né con polarità: in un epitelio, la porzione basale è differente sia morfologicamente che funzionalmente rispetto alla porzione apicale. Più aumenta la complessità dei tessuti, come in un epitelio pseudostratificato, più la polarità diventa importante.

Il citoscheletro è importante sia come “scaffold” sia per la polarità e questo aiuta a garantire il corretto funzionamento dei tessuti.

BIOGENESI ORGANELLI

Ricordiamo che la replicazione degli organelli è un evento indipendente da quella degli acidi nucleici.

Esistono patologie, dette mitocondriopatie, legate ai difetti del DNA mitocondriale; quando se ne fa diagnosi genetica² o quando serve il fenotipo clinico, si nota grande eterogeneità, per cui la diagnosi non è solo **qualitativa**³ ma anche **quantitativa**. Questo perché in una divisione cellulare iniziale a livello zigotico e dei vari foglietti embrionali non vengono ereditati tutti i mitocondri e non tutti saranno mutati.

L'**eteroplasmia** è il fenomeno per cui ogni individuo può essere considerato come un mosaico mitocondriale, ovvero i precursori dei tre foglietti embrionali potrebbero accumulare in ogni cellula un numero diverso di mitocondri mutati, da cui l'espressione fenotipica potenzialmente diversa di individuo in individuo. In termini clinici a parità di mutazioni qualitative in due pazienti, c'è un paziente che sta peggio perché ha una maggiore quantità di mitocondri mutati.

Negli **elettroferogrammi**, quando vediamo una mutazione compare una base azotata al posto di un'altra. Nel caso ideale di un *eterozigote* abbiamo un grafico che mostra la mutazione con due picchi bassi della stessa altezza. Nel caso di una patologia *eterozigotica* posso individuare fino al 10% di cellule mutate e posso identificare sia un picco di *Wild Type* sia uno di mutazione. Questo picco di mutazione devo poterlo riconoscere e quantizzare perché la quantità sarà (direttamente) proporzionale alla gravità del fenotipo clinico; più è estesa la mutazione e più il paziente sta male.

MEMBRANA PLASMATICA

La membrana citoplasmatica è un doppio strato fosfolipidico descrivibile come un modello a mosaico fluido. La membrana oltre a rappresentare una barriera fisica, è un punto fondamentale di scambio di molecole con l'interno e con l'esterno. Infatti, è importante ricordare che in essa ci sono delle proteine transmembrana, tra cui i **carriers**, punti di scambio di molecole con l'esterno, ed altre come colesterolo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, sfingomielinina, zattere lipidiche, glicolipidi. La **fosfatidilserina**, in particolare, è un **marker** visibile con un colorante (annessina) che viene flippata, esposta nel lato extracellulare, nella cellula preapoptica. Se do un farmaco a cellule in vitro, misurando i livelli della fosfatidilserina ho già una prima informazione sul fatto che la cellula potrebbe morire.

² Per la diagnosi genetica si valutano mappature delle mutazioni legate alle mitocondriopatie che in questo caso saranno relative a problematiche riguardanti l'energia della cellula come ad esempio la catena respiratoria.

³ Qualitativa nel senso di ricerca della mutazione.

Quando mi serve sapere se in vitro una cellula muore per apoptosi o per necrosi? Per sapere se il farmaco fa male, causa la morte di cellule.

Il Docente e altri ricercatori stanno lavorando sugli effetti dei farmaci anti-retro-virali in modelli cellulari neuronali in vitro per dare una spiegazione a dei fenomeni comportamentali osservati su bambini nati da madre positiva. Si tratta di farmaci usati per la prevenzione della trasmissione verticale di questa malattia, farmaci salva vita, safe, che vengono dati alla madre in gravidanza per abbassare la carica virale durante il parto. Nonostante siano considerati farmaci sicuri hanno notato che alcuni bambini hanno dei piccoli danni neurologici non gravi, come ad esempio deficit dell'attenzione, iperattività, difetti comportamentali, cefalee, fenomeni manifestati in maniera sporadica. Resta da capire se si tratta di un effetto avverso al farmaco oppure no; hanno preso linee cellulari di neuroblastoma e le hanno coltivate in vitro dosando concentrazioni di farmaci terapeutiche usate normalmente in clinica e hanno valutato la presenza dell'anessina e propidio. Questo agente fluorescente aumenta l'apoptosi o la necrosi? Il propidio è un intercalante degli acidi nucleici per cui usando un citofluorimetro che evidenzia l'anessina di verde e il propidio di rosso, notando una prevalenza di rosso, concludono che prevale la necrosi ovvero la morte cellulare disordinata che provoca i danni nei bambini. Questo approccio è importante perché se abbiamo un'osservazione clinica e un modello cellulare su cui lavorare in vitro, posso avere una risposta in tempi brevi.

Caratteristiche della membrana cellulare:

- Contiene lipoproteine
- Trasporto di metaboliti
- Recettori carriers che aiutano l'uptake contro gradiente di macromolecole
- Segnali cellula – matrice extracellulare o fra cellule

Tra le molecole nella membrana:

- Proteine transmembrana: hanno domini importanti che mettono in comunicazione la cellula con proteine extracellulari.
- GPI linked protein: proteine legate al glicosilfosfatidilinositolo, sono proteine che possono comunicare con le proteine legate ai lipidi (l'importanza del colesterolo).
- Proteine citosoliche: riguardano i contatti con il citoplasma.
- Fosfati: coinvolti nella fosforilazione.

MECCANISMI DI INGRESSO E USCITA DALLA MEMBRANA

TRASPORTO PASSIVO

Diffondono passivamente: gas, molecole idrofobiche (benzene che non ha barriere, vedi carcinogenesi ambientale), piccole molecole polari, etanolo (debole fissativo). NON passano le grosse molecole polari e molecole cariche.

CARRIERS

Quando il canale non funziona, cioè quando una sostanza non entra secondo gradiente chimico o elettrochimico, abbiamo bisogno di un *carrier* che prende una macromolecola e la porta all'interno della cellula usando ATP. Quindi i carriers sono portatori di molecola contro gradiente.

Nell'integrazione di informazioni, mi basta una mutazione ovvero un'espansione differenziale della proteina, e posso già o fare accumulo o non integrare la proteina nella cellula.

ENDOCITOSI MEDIATA DA CAVEOLINA o CLATRINA

Le **caveoline** sono molecole che senza usare recettori aiutano a fare grandi caveole per guidare un meccanismo di endocitosi.

Tuttavia, grazie a dei recettori possiamo avere un'endocitosi che consiste in un sistema vescicolare che fa uso di **clatrina**, le *clathrin coated vesicle* sono vescicole rivestite di clatrina. Nel momento in cui le vescicole perdono la clatrina e mandano i recettori sulla membrana, si trasforma in **endosoma precoce** in cui il pH si abbassa e gli enzimi litici iniziano a funzionare.

I recettori sono importantissimi, è sufficiente che un recettore non funzioni per avere gravi conseguenze. Ad esempio, se perdiamo la capacità di regolare la trasduzione del segnale che blocca la crescita cellulare, la cellula prolifera in modo sconsiderato.⁴

Sbobina Patologia

12/04/2019

2^a ora

Sbobinatore: Veronica Baldi

Controllore: Federico Cellamare

Fagocitosi

È un processo attuato dai fagociti professionisti, macrofagi e cellule dendritiche, ed è coinvolta in molte patologie. Questi due tipi cellulari sono fondamentali per la presentazione dell'antigene ai CD4 e CD8, che poi scateneranno reazioni immuni. La presentazione avviene tramite:

- **HLA di classe II**, per la presentazione ai **CD4**, con conseguente produzione di citochine,
- **HLA di classe I**, per la presentazione ai **CD8**, con conseguente effetto citotossico.

L'HLA di classe II viene richiesto di routine negli esami di numerose patologie autoimmuni.

Se io dico fagocitosi a che classe di HLA pensate? Alle HLA di classe II, perché attiviamo i CD4.

Quali sono le molecole specifiche delle cellule professioniste CD4 e CD8 che riconoscono antigeni molto specifici? I TCR (recettori delle cellule T). C'è quindi questo doppio sistema, rappresentato da HLA e TCR, che beccano e riconoscono epitopi dei nostri patogeni.

Transitosi

È un meccanismo che fa passare molecole attraverso la cellula per raggiungere altri bersagli.

⁴ Ritorniamo su questo parlando di proteine RAS nei tumori.

Citoscheletro

È costituito da diverse componenti:

- **Filamenti di actina:** sono piccoli. La proteina G-actina, assemblandosi come una collana, forma la F-actina, cioè i filamenti, che hanno conformazione ad elica. A livello muscolare, i filamenti di actina vengono usati per la contrazione, in patologie come le distrofie muscolari vediamo infatti un danno a loro carico.

- **Filamenti intermedi:** di dimensioni maggiori dei primi. Ce li ricordiamo per la **lamina nucleare**, una struttura non solo di barriera, ma anche luogo di segnali, un luogo dove arrivano delle molecole (*2 anni fa è stato pubblicato uno studio, dal gruppo del professor Giacca, in cui si spiega dove HIV, un virus a RNA, va a finire e con che attori della lamina nucleare si lega prima di essere integrato nel genoma*).

I filamenti intermedi hanno dei **pattern tessuto-specifici**, quindi possono essere utilizzati per riconoscere tessuti. Questo ha rilevanza in ambito oncologico, per riconoscere l'origine di un tumore o la derivazione, nel caso di un tumore secondario, del tessuto primario. Se si effettua un esame istochimico, ritracciando i seguenti filamenti intermedi nel tessuto analizzato, si possono trarre queste conclusioni:

- *Vimentina:* indica che il tessuto è di origine mesenchimale;
- *Desmina:* è tipica delle cellule muscolari;
- *Neurofilamenti:* fanno parte degli assoni dei neuroni, fanno da scaffold e conferiscono forza e rigidità;
- *Fibrille per la glia ependimale:* La glia ependimale supporta i neuroni. In generale, le cellule della glia supportano i neuroni, hanno funzione di nutrizione e barriera immunologica. La cellula gliale è paragonabile ad un monocita che poi si trasforma in macrofago, ovvero in una cellula in grado di fagocitare. Questa cellula è importante per lo studio delle reazioni neuro-infiammatorie, che sono alla base di patologie croniche come l'Alzheimer e il Parkinson.
- *Citocheratine:* indicano che il tessuto è di origine epiteliale. Ce ne sono *tantissime* e ogni tessuto avrà una tipologia specifica di citocheratine; queste ci servono come marker immunoistochimici/istologici dei vari epiteli.

Esempio: se in una massa tumorale presente all'interno di un osso rilevo la presenza di citocheratina, significa che si tratta di un tumore secondario di origine epiteliale; ad esempio un tumore al seno che ha metastatizzato a livello osseo⁵.

I filamenti intermedi sono talmente importanti che mutazioni a livello della lamina⁶ sono legate ad alcune forme di distrofia muscolare e alla progeria, un invecchiamento precoce legato appunto a difetti della lamina. La lamina ha anche a che fare con i capelli, etc...

- **Microtubuli:** sono coinvolti sia nel movimento dei cromosomi che degli organelli. Da ricordare la polarità dei microtubuli:

- **L'estremità -** è quella che si localizza sul **centrosoma**;
- **L'estremità +** è quella che **si allunga o si accorcia**.

Le chinesine si muovono in direzione da - a +, le dineine si muovono da + a -. Difetti a livello di chinesine e dineine, semplificando e pensando solo alle eventuali ricadute a livello genetico, potrebbero comportare a tutta una serie di problematiche legate al trasporto dei cromosomi, come una aneuploidia, o una triploidia, o una endomitosi e così via...

Note dello sbobinatore:

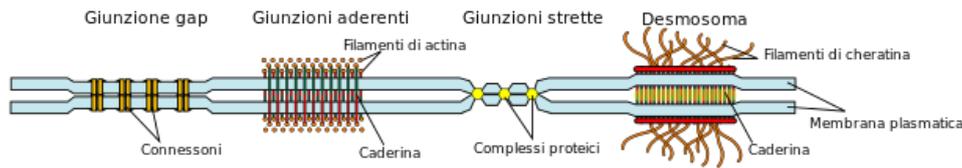
⁵ Perciò tutte queste strutture sono utilizzabili come marker tumorali per individuare la provenienza della massa neoplastica.

⁵ che si legano ai filamenti intermedi della cellula

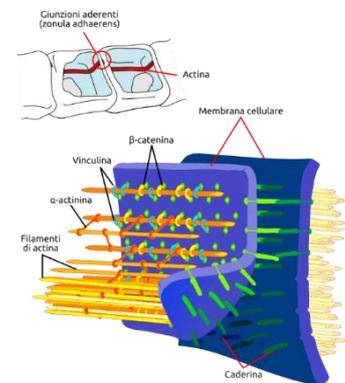
Note del controllore:

⁶ Si legge lamina, essendo una proteina.

Giunzioni tra cellule



- **Tight junctions** o **occluding junctions**: sigillano completamente gli spazi fra cellule adiacenti impedendo il passaggio di molecole attraverso lo spazio intercellulare⁷. Se abbiamo, ad esempio, una tight junction che si apre a livello intestinale, si avrà mal assorbimento. Malattie da malassorbimento potrebbero essere legate ad un motivo del genere, attenzione però che non tutte le malattie da malassorbimento hanno questa causa, ad esempio, la celiachia è una malattia più infiammatoria che altro.
- **Desmosomi a cintura**⁸: ancorano le cellule tra loro, lasciando però uno spazio intercellulare in cui troviamo matrice extracellulare; permettono inoltre la comunicazione tra cellule. Sono chiamati “a cintura” perché formano appunto una sorta di cintura. La cellula sfrutta sia i desmosomi a cintura, che quelli “semplici”. Se si hanno difetti a livello dei desmosomi si avrà anche in questo caso l’allontanamento delle cellule e l’aumento della permeabilità cellulare. I desmosomi sono costituiti da varie proteine (desmoplachina, plachina, etc...) tenute insieme da linker⁹. Di nuovo, malfunzionamenti delle giunzioni provocano patologie. Ad esempio, infatti, difetti a carico di componenti di queste giunzioni sono alla base di alcune patologie della pelle.



Difetti a carico di:

- Linker provocano una epidermolisi bollosa gravissima, che è letale;
- Filamenti intermedi causano una epidermolisi bollosa semplice;
- Placofilina determinano una displasia ectodermica, ovvero una fragilità della pelle.
- Caderine (presenti nello spazio extracellulare) causano il pemfigo.
- **Emidesmosomi**: ancorano la cellula alla lamina basale.
- **Giunzioni comunicanti**: pori tra cellule attraverso cui passano molecole da una cellula all’altra.

Come vediamo, piccoli difetti a livello di proteine di giunzione, molecole collanti, etc, possono causare delle patologie di interesse dermatologico molto importanti. Le junction quindi ci servono tanto, ma ci servono in maniera differenziale: poco sopra si è discusso a riguardo dell’epidermide, ma un discorso analogo lo si poteva fare sull’intestino, vedendo come la permeabilità intestinale varia a seconda della funzionalità delle junction.

Lisosomi, autofagia e fagocitosi

Lisosomi

Si occupano di degradare sostanze. Sono elementi circoscritti da una membrana resistente e che contengono almeno 40 diverse idrolasi acide, che funzionano a $\text{pH} < 5$ ¹⁰. La membrana lisosomiale deriva dal reticolo

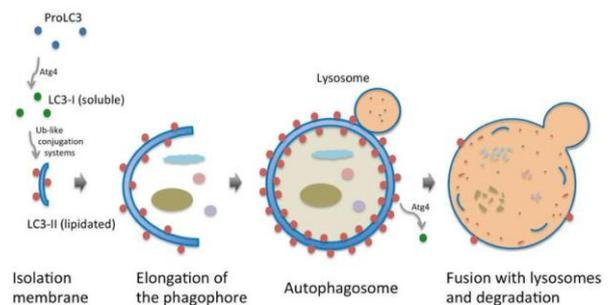
⁷ Definizione presa e rielaborata dal Monesi, VII edizione, p.178,179

⁸ Le giunzioni ancoranti o aderenti (desmosomi) uniscono meccanicamente le cellule (e i loro citoscheletri intracellulari) ad altre cellule o alla matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM). Quando il punto centrale dell’adesione è tra cellule ed è simile a un chiodo di piccole dimensioni, viene definito come desmosoma a borchia o macula adherens. Quando il punto centrale dell’adesione congiunge la cellula alla ECM, è chiamato emidesmosoma. Domini di adesione simili possono presentarsi anche come ampie fasce tra cellule e sono denominati desmosomi a cintura. *Robbins, IX edizione p.11*

endoplasmatico. Le idrolasi sono proteine che, nell'apparato di Golgi, vengono marcate con mannosio-6-fosfato (M6P) (tutte le modificazioni post-traduzionali delle proteine avvengono sempre nell'apparato di Golgi). Queste proteine marcate vengono poi inviate al lisosoma tramite delle vescicole di trasporto. Se questo sistema di marcatura non dovesse funzionare, le idrolasi non marcate verranno ubiquitinate e inviate quindi al proteasoma.

Autofagia

L'autofagia è un meccanismo che serve per eliminare organelli senescenti e proteine denaturate, di conseguenza un suo deficit può essere un danno. Certe malattie pediatriche autoinfiammatorie, ad esempio, sono legate a incapacità di eliminare organelli danneggiati tramite autofagia, con conseguente stress mitocondriale e quindi induzione delle cellule in apoptosi. Nell'infiammazione, un fenotipo iperinfiammatorio può essere legato ad un deficit dell'autofagia. Esistono delle molecole che permettono di valutare l'autofagia. L'autofagia inoltre è utile anche in momenti di stress cellulare, dove la cellula si autofagocita per cercare di sopravvivere in attesa che le condizioni cellulari migliorino. (Nel 2016 un ricercatore giapponese ha vinto il premio Nobel per i suoi studi sull'autofagia). L'autofagia serve anche per eliminare proteine denaturate, perciò, se non ci fosse l'autofagia, si rischierebbe di avere patologie d'accumulo.



Meccanismo dell'autofagia:

Il materiale che deve essere eliminato (organelli senescenti o proteine denaturate) viene circoscritto da una membrana, si forma così il preautofagosoma e poi quindi l'autofagosoma. Una serie di proteine interviene nella formazione del preautofagosoma e altre ancora nella formazione dell'autofagosoma. Tutte queste proteine devono essere prenilate (la prenilazione è un modo per attivare molte proteine che ci permettono poi di dare origine a fenomeni biologici). **LC3**¹¹ (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) è una delle molecole chiave dell'autofagia, si tratta della catena leggera di una proteina associata ai microtubuli. Una volta che l'autofagosoma si è formato, quindi, esso si fonderà con il lisosoma formando così l'autofagolisosoma. Qui abbiamo un'altra proteina che viene in aiuto, **p62** (ubiquitin binding scaffold protein) che lega un aggregato proteico e aiuta l'ubiquitina a formare un complesso che viene poi riconosciuto dal lisosoma e farà fondere il lisosoma formando l'autofagolisosoma¹².

LC3 e p62 possono essere usate come marcatori per valutare la funzionalità del meccanismo dell'autofagia:

- Un livello alto di LC3 non significa che l'autofagia funziona, significa che funziona la formazione dell'autofagosoma. Esistono patologie in cui inizia l'autofagia ma non arriva a compimento, ovvero non formo l'autofagolisosoma, che è là dove vengono distrutte le componenti da degradare; se queste componenti rimangono, sono fonte di stress cellulare ed eventualmente di morte cellulare;
- con LC3 e p62 noi vediamo che si è formato l'autofagolisosoma, quindi che c'è autofagia.

¹⁰ Questo pH, infatti, è estremamente dannoso per la cellula, perciò bisogna fare in modo che l'ambiente acido sia circoscritto al solo lisosoma

Nota del controllore:

¹¹ Nell'autofagia, gli organuli senescenti o le proteine denaturate sono indirizzati alla degradazione lisosomiale dopo essere stati avvolti da una membrana doppia che deriva dal reticolo endoplasmatico e caratterizzata da proteine LC3 (1A/1B catena leggera 3 della proteina associata ai microtubuli). Robbins, IX edizione p.13, Fig. 1.9

Note del controllore:

¹² p62 media l'aggregazione dei substrati ubiquitinizzati e la loro consegna nell'autofagosoma. Fonte: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/sequestosome-1>, Articolo: Selective Autophagy

Perciò, valutando LC3 e p62, è possibile vedere se l'autofagia inizia e poi se arriva alla fine. Se non arriva alla fine, si hanno dei rifiuti nelle cellule (es. proteine non foldate) e quindi potremmo avere uno stress cellulare con conseguente morte cellulare.

L'autofagia è implicata in alcune patologie, come nei Crohn ad insorgenza precoce, ed è stata valutata nella via del mevalonato (colesterolo) e in modelli cellulari infettati da HIV¹³.

Domanda studente: Cosa significa prenilazione?

È l'aggiunta di un gruppo prenilico alle proteine ed è un segnale di attivazione di una determinata molecola, il gruppo prenilico dovrebbe derivare da degli isoprenoidi, e quindi avrà sicuramente dei gruppi -OH. In laboratorio, ad esempio, usavamo il geraniol geraniolo, un isoprenoide prenilato, quindi con gruppi -OH (alcolato), per rescue di queste patologie.

Fagocitosi

È definita come eterofagia. Prendendo come esempio un macrofago che fagocita un patogeno:

il macrofago cattura e manda al fagolisosoma il patogeno, questo poi in parte viene buttato fuori e in parte viene presentato¹⁴.

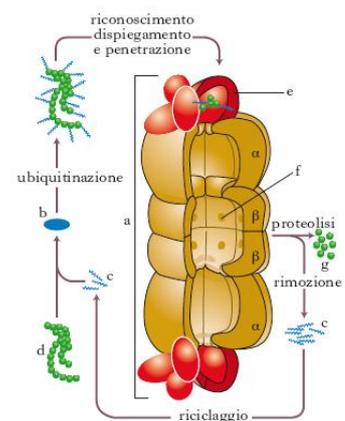
Proteasoma

È un complesso proteico di forma pressoché cilindrica che contiene tante proteasi che distruggono le proteine marcate con l'ubiquitina. L'ubiquitina viene montata sulle proteine che non funzionano¹⁵ tramite enzimi specifici.

Il proteasoma ha a che fare con le HLA di classe I e la risposta cellulare. Il proteasoma è il sistema tramite il quale la cellula presenta gli antigeni di un patogeno via MHC di classe I, quindi ha a che fare con la risposta cellulo-mediata. Gli endosomi tardivi e i lisosomi hanno invece a che fare con la risposta umorale CD4-mediata.

Nella cellula, le chaperonine si occupano di garantire il corretto ripiegamento proteico, ma, se non si folda correttamente, o perché senescente o perché denaturata (da fattori mutageni, o da eccessivo calore, o dalle specie reattive all'ossigeno, etc...) verrà ubiquitinata, mandata al proteasoma e ridotta quindi in frammenti.

Se la proteina non si ripiega correttamente e non viene ubiquitinata, questa creerà stress del reticolo endoplasmatico. Lo stress del reticolo endoplasmatico legato alla presenza di un eccesso di proteina mal foldata manda la cellula in apoptosi, morte cellulare programmata (non necrosi!).



¹³ Il docente qua si riferisce a studi fatti dal suo gruppo di ricerca.

¹⁴ - La fagocitosi di microrganismi o di grossi frammenti di matrice extracellulare o di detriti avviene principalmente nei fagociti "professionisti" (macrofagi o neutrofili). Il materiale viene fagocitato a formare un fagosoma che si fonde successivamente con i lisosomi. *Robbins, IX edizione, p.14*

- Nell'eterofagia, i lisosomi si fondono con gli endosomi o con i fagosomi per favorire la degradazione del loro contenuto internalizzato. I prodotti finali, possono essere liberati nel citosol per nutrire la cellula o essere riversati nello spazio extracellulare (esocitosi). *Robbins, IX edizione p.13, Fig. 1.9*

Note del controllore:

¹⁵ Le proteine citosoliche destinate al ricambio (come i fattori di trascrizione o le proteine regolatrici), le proteine senescenti o le proteine denaturate da stimoli meccanici o chimici esterni possono essere legate da più di una molecola di ubiquitina (mediante l'attività dell'ubiquitina ligasi E1, E2 ed E3). Questo evento marca le proteine per la degradazione a opera dei proteasomi, complessi costituiti da multi-subunità citosoliche che degradano le proteine in piccoli frammenti peptidici. *Robbins, IX edizione p.13, Fig. 1.9*

Da ricordare che l'autofagia, la formazione dell'autofagolisosoma, è un'alternativa per eliminare queste proteine.

Mitocondri

Possono essere considerate le “pile” del nostro organismo, perché si occupano di **produrre ATP** tramite la formazione di gradiente protonico, in un processo noto come fosforilazione ossidativa¹⁶.

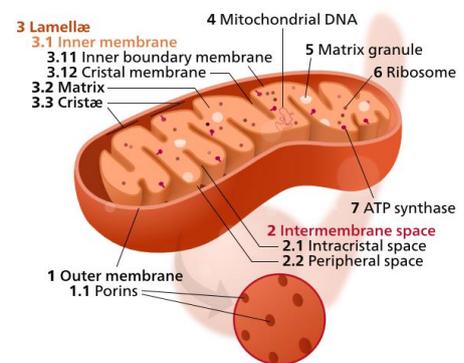
Il 20% delle proteine che intervengono nella fosforilazione ossidativa sono prodotte nel mitocondrio. Il mitocondrio, infatti, possiede un proprio piccolo DNA circolare, simile a quello batterico, tramite cui produce circa l'1% delle proteine cellulari totali.

La propria machinery di trascrizione e traduzione non è sufficiente ai mitocondri, poiché essi si sono evoluti da procarioti ancestrali che furono fagocitati da eucarioti primitivi¹⁷, perciò, per la trascrizione e la traduzione, necessitano di fattori di trascrizione e proteine nucleari, hanno bisogno quindi del nucleo eucariotico. La traduzione nei mitocondri, come nei batteri, non inizia con la MET, ma con la n-formil-MET, perciò si può dire che questi organelli hanno conservato l'ancestralità del loro codice genetico, che è degenerato. Nei procarioti i codoni di inizio e di stop sono diversi e i mitocondri non fanno eccezione.

La vita media dei mitocondri è breve, va da 1 a 10 giorni a seconda dal tessuto a cui appartengono; sono quindi superattivi ma durano poco. I mitocondri si dividono, si fondono, si staccano da altri mitocondri in maniera estremamente dinamica. Se osserviamo ad esempio le cellule dell'epitelio renale, notiamo che al fondo c'è il cosiddetto “orletto a spazzola”, che è legato all'accumulo di mitocondri, abbiamo quindi tanti più mitocondri quanto più abbiamo bisogno di energia.

Dal punto di vista strutturale, i mitocondri presentano una doppia membrana e le creste¹⁸.

I mitocondri però non producono solo energia, hanno **anche** a che fare con il **metabolismo lipidico**, con la produzione di **metaboliti** e con l'**ischemia**, in particolare con questa tramite perdita protonica canalare che porta a morte cellulare via necrosi^{19 20}.



¹⁶La principale fonte di energia per alimentare tutte le funzioni cellulari fondamentali deriva dal metabolismo ossidativo. I mitocondri ossidano substrati a CO₂, trasferendo gli elettroni a elevata energia dalla molecola originaria (per esempio, zucchero) all'ossigeno molecolare, producendo così elettroni d'acqua a bassa energia. L'ossidazione di diversi metaboliti attiva pompe di ioni idrogeno (o protoni) che trasferiscono H⁺ dalla matrice centrale allo spazio intermembrana. Quando gli ioni H⁺ tornano al loro gradiente elettrochimico, l'energia liberata è utilizzata nella sintesi di adenosina trifosfato (ATP). *Robbins, IX edizione, p.14*

Nota dello sbobinatore:

¹⁷ teoria dell'endosimbiosi di Margulis

Nota dello sbobinatore:

¹⁸ date dal ripiegamento della membrana più interna

Note del controllore:

¹⁹ Oltre a un'efficace produzione di ATP a partire da substrati quali i carboidrati e acidi grassi, i mitocondri hanno un ruolo importante nel metabolismo intermedio, producendo molecole che sono utilizzate per sintetizzare lipidi e proteine, ma svolgono anche una funzione primaria nei meccanismi decisionali che controllano la vita e la morte della cellula. *Robbins, IX edizione, p.14*

Fig. 1.10

²⁰ Due sono le vie principali che conducono alla morte cellulare:

- Necrosi: uno stimolo lesivo cellulare esterno (tossina, ischemia, trauma) può danneggiare i mitocondri, inducendo la formazione di pori di transizione della permeabilità mitocondriale nella membrana esterna. Questi canali consentono la dissipazione del potenziale protonico, così che la produzione di ATP nei mitocondri viene meno e la cellula muore.
- Apoptosi: la morte programmata della cellula è una caratteristica fondamentale del normale sviluppo e ricambio tissutale, e può essere innescata da segnali estrinseci (come le cellule T citotossiche e le citochine infiammatorie), oppure mediante vie intrinseche (come danni al DNA e lo stress intracellulare). I mitocondri svolgono una funzione fondamentale nella via intrinseca dell'apoptosi. Se i mitocondri sono danneggiati (come risultato di stimoli lesivi o stress cellulare irreversibili), oppure la cellula non riesce a sintetizzare un'adeguata quantità di proteine per sopravvivere (a causa di insufficienti segnali di crescita cellulare), i mitocondri vanno incontro a una serie di alterazioni. Il citocromo c, che generalmente è isolato

Il complesso BAX/BAK forma il MAC ed è coinvolto nell'apoptosi e nella piroptosi. Si tratta di un canale che permette la fuoriuscita di citocromo C che, captato dalla piattaforma dell'inflammasoma, dà origine a una via di segnalazione della caspasi, che porta a morte cellulare.

Perciò è da ricordare che il mitocondrio, oltre alle altre funzioni che svolge, è coinvolto pesantemente nella **morte cellulare**.

Sbobina Patologia
Sbobinatore: Zanchi Giorgia
Controllore: Paladin Jessica

12/04/2019

3[^] ora

Metabolismo mitocondriale

Ci sono moltissime patologie che sono legate ad alterazioni del metabolismo mitocondriale. Per esempio, vengono usati dei farmaci per fare la **mitochondrial rescue**, cioè per evitare la morte cellulare legata a danni mitocondriali: un esempio di farmaco è MITOQ, può essere usato in patologie anche multifattoriali.

I mitocondri quindi, fondamentali dal punto di vista della produzione di energia, rivestiranno un ruolo importante nell'ambito della morte cellulare.

Studiando le mitocondriopatie in laboratorio, sono state isolate su una piastra con 96 pozzetti tutte le principali mutazioni legate a difetti mitocondriali. Fenomeni di sordità, miopatie e sindromi mitocondriali a livello metabolico sono solo alcuni esempi di patologie legate a queste mutazioni mitocondriali. In base alla mutazione trovata posso risalire alla patologia attraverso dei websites.

Produzione di energia → il mitocondrio presenta due membrane specializzate, interna ed esterna. Quella interna presenta gli enzimi della catena respiratoria, a questo livello avvengono le reazioni per la produzione dell'energia; qualsiasi mutazione a carico di questi enzimi sfocia in **mitocondriopatie gravi**, nella maggior parte dei casi assistiamo a fenotipi muscolari e scheletrici.

Il mitocondrio produce energia a partire da zuccheri e fonti di carbonio che vengono trasformate in CO₂ e H₂O producendo ATP. Se la cellula usa tutte le fonti di carbonio solo per fare energia come fa a crescere? Come produce delle strutture? Ha bisogno di una via alternativa che permetta la produzione di energia e allo stesso tempo che tenga da parte delle fonti di carbonio (da usare per ragioni di tipo strutturale): questa via è denominata **effetto Warburg**.

In alcuni momenti della vita cellulare, alcuni tipi di cellule scelgono di fare glicolisi anaerobia per utilizzare il carbonio come fonte strutturale; stiamo parlando di cellule che si dividono molto velocemente, per esempio cellule tumorali, embrionali e cellule staminali. La cellula tumorale respira con l'effetto Warburg tramite la glicolisi anaerobia, poi utilizza il resto del carbonio per produrre strutture per la crescita della stessa.

Riassumendo: il tessuto differenziato predilige la fosforilazione ossidativa, invece durante la crescita rapida prevale la glicolisi anaerobia e quindi l'effetto Warburg.

Morte cellulare → il mitocondrio è importante nell'ambito della morte cellulare.

Da una parte i mitocondri sono fondamentali perché producono energia e quindi sono strettamente collegati alla sopravvivenza della cellula, dall'altra, quando sono esposti a stimoli potenzialmente dannosi e non sono in grado di rispondere a questo danno, partecipano alla morte cellulare. In quest'ultimo caso possono promuovere la **necrosi, oppure l'apoptosi** (ossia la cellula "si suicida" per non fare ulteriori danni).

Il mitocondrio rappresenta una fonte di segnali importantissimi per guidare la cellula verso la morte cellulare, che può essere appunto per necrosi o per apoptosi, in quest'ultimo caso utilizzerà l'inflammasoma, una piattaforma specifica dell'infiammazione caspasi dipendente.

all'interno dei mitocondri, si porta nel citosol dove forma un complesso con altre proteine che attivano le caspasi, gli enzimi che inducono l'apoptosi. Questo processo è descritto in maniera più approfondita nel Capitolo 2. Un difetto di apoptosi può contribuire all'insorgere di tumori maligni (Cap. 7) mentre un eccesso di apoptosi può portare alla morte cellulare prematura, come accade in alcune malattie neurodegenerative (Cap. 28).

Esiste una forma di autofagia che si chiama **mitofagia**, legata solo alla rimozione dei mitocondri danneggiati affinché questi non scatenino i segnali di morte cellulare che mandano la cellula in necrosi.

Cell signaling

Lo studio del cell signaling è fondamentale per la comprensione delle malattie: la comparsa di difetti a livello delle vie di segnalazione e trasduzione può essere causa di patologia.

Un qualsiasi stimolo extracellulare – paracrino, sinaptico o endocrino – è catturato da una proteina recettore che funziona con il sistema chiave-serratura, ogni recettore ha il suo specifico ligando. Ovviamente sono presenti proteine adattatrici e co-recettori che coadiuvano questo legame.

I recettori attivano delle vie di trasduzione del segnale che hanno come obiettivo finale quello di comportarsi come regolatori della trascrizione o di stimolare dei fattori di trascrizione per produrre proteine di interesse in risposta al segnale.

(Ad esempio, se un fattore di crescita si lega al suo recettore, si attiva una via di segnale che va al nucleo e i fattori di trascrizione attivano uno o più geni che inducono la crescita della cellula).

Esistono vari tipi di recettori:

- recettori **non tirosin-chinasici**
- recettori **tirosin-chinasici**: hanno un dominio chinasico

In entrambi questi primi due casi vi è la fosforilazione per l'attivazione delle proteine

- recettori a **sette eliche** transmembrana associati a proteine G
- recettori **ormonali**: sono presenti a livello citoplasmatico, in quanto gli ormoni sono liberi di passare la membrana cellulare. Il recettore legato al suo ormone si comporta da **fattore di trascrizione**
- **Notch**: recettore formato da una porzione intra ed una extracitoplasmatica, il suo ligando è una proteina di membrana di un'altra cellula. Il segnale avviene tramite un **taglio di Notch** che libera la porzione intracitoplasmatica, la quale fungerà poi da fattore di trascrizione
- proteine della via **wnt-Frizzled**: queste proteine devono essere attivate per rilasciare, insieme ad altri complessi proteici, **beta-catenina** che funziona da fattore di trascrizione (dopo essere stata fosforilata)
- **recettori per LDL**: sono omologhi e funzionano come co-recettori di wnt e frizzled. Ci sono diverse proteine recettoriali e quello che avviene a livello citoplasmatico è mediato da proteine adattatrici.

Meccanismo della via di trasduzione:

Via di trasduzione del segnale = binding recettore-ligando → cambio conformazionale → intermedi biochimici → attivazione enzimi → fattori di trascrizione vanno nel nucleo → espressione genica

Non si può immaginare che in una malattia tutti gli elementi coinvolti nella trasduzione (recettori, corecettori ecc.) siano mutati, **basta** che **una sola mutazione** modifichi l'espressione di uno di questi per avere la patologia. Il fatto che siano coinvolti tutti questi elementi e che quindi uno qualsiasi possa essere mutato genera l'eterogeneità del fenotipo clinico nei pazienti.

Facciamo ora un esempio di via di segnalazione: consideriamo un fattore di crescita e il suo recettore, che in questo caso è il recettore tirosin chinasico.

Il fattore di crescita si lega al recettore che dimerizza, avviene quindi l'autofosforilazione dei residui di tirosina. È presente RAS inattivo legato alla membrana tramite un farnesilato che funge da ancora. Una proteina adattatrice che funge da ponte tra il recettore e RAS, ne permette l'attivazione tramite la trasformazione di GDP in GTP; GTP a questo punto attiva RAS.

RAS è collegato ad un'**ipercrecita cellulare** ed è un gene che si studia nel pannello di geni collegati ai tumori. Una volta attivato, RAS attiva RAF, che è una MAP chinasi chinasi chinasi, RAF a sua volta attiva MAPK (mitogen-activated protein kinase) che funzionerà da fattore di trascrizione. In questo modo il fattore di crescita arriva a stimolare la proliferazione cellulare.

È presente però **anche un piano B**, un'altra via di segnalazione: RAS può interagire con PI3K, AKT e **mTOR** (mammalian target of Rapamycin). Quindi RAS usa due vie per stimolare la crescita cellulare.

Dobbiamo ricordare che non basta il sistema chiave-serratura, abbiamo bisogno di un'ancora che lega RAS inattivo alla membrana e di una proteina adattatrice. Quindi non sempre una mutazione di RAS spiega il

tumore, posso avere mutazioni anche a livello di altri fattori. Tutto quanto descritto finora è una rete complessa di interazioni che va trattata come tale nello studio delle mutazioni che possono causare un tumore.

La trasduzione del segnale è come una rete neurale, abbiamo degli hubs e dei nodi fondamentali.

Per quanto riguarda la fosforilazione: se fosforiliamo una proteina a caso questa si assocerà ad altre proteine e potrà avere vari effetti:

- attiva/disattiva un enzima
- attiva un fattore di trascrizione, che può essere a livello nucleare o citoplasmatico, e quindi attiva la sintesi
- attiva la polimerizzazione o depolimerizzazione dell'actina (movimento degli organelli o contrazione)
- può favorire la degradazione o stabilizzazione delle proteine
- a lungo andare può attivare meccanismi di feedback di produzione di enzimi

Proteine adattatrici

Sono connessioni importantissime per mantenere i contatti tra varie proteine, possono essere di membrana, citosoliche oppure possiamo trovarle nel nucleo. Ad esempio, nella trascrizione ho bisogno dei fattori di trascrizione per far sì che la RNA polimerasi svolga la sua funzione: quelli che noi chiamiamo fattori di trascrizione sono in realtà proteine adattatrici! I fattori di trascrizione possono legarsi direttamente al DNA in un binding site: nel promotore sono presenti molte sequenze che sono target per i fattori di trascrizione.

I fattori di trascrizione possono essere proteine adattatrici per la RNA polimerasi; possono essere dei silencer, sia che si legano direttamente al DNA sia che creano un ingombro sterico per impedire il legame della RNA polimerasi con il DNA.

Due sono i fattori di trascrizione importanti da ricordare che ritroveremo in seguito:

Myc: regola la trascrizione dei geni per la crescita cellulare, è collegato ai tumori;

p53: regola l'espressione di tutti i geni che bloccano la crescita cellulare.

Fattori di crescita

I fattori di crescita hanno fonti diverse, funzioni diverse, specificità su tessuti diversi. Alcuni esempi di fattori di crescita sono:

- **EGF** → prodotto da ghiandole salivari, cheratinociti e macrofagi. Mitogenico per cheratinociti e fibroblasti. Lo studieremo nei tumori della pelle, carcinomi, tumore della cervice, carcinoma mammario
- **TGF- α** → prodotto da macrofagi, cellule dell'immunità specifica, cheratinociti. Agisce su epatociti e altre cellule epiteliali
- **HGF** → Prodotto da fibroblasti, cellule stromali. Induce la proliferazione degli epatociti. Posso avere HGF tanto prodotto in una fibrosi epatica
- **VEGF** → prodotto da cellule mesenchimali. Induce la proliferazione dell'endotelio. I tumori hanno fame, stimolano l'angiogenesi.
- **PDGF** → prodotto da macrofagi, piastrine e altri

I fattori di crescita sono prodotti da varie cellule e hanno funzioni specialistiche, li ricordiamo perché possono avere a che fare con un'iperproliferazione tumorale in un fenotipo patologico.

TABELLA 3.1 Fattori di crescita e citochine implicati nella guarigione delle ferite e nella rigenerazione

Fattori di crescita	Simbolo	Origine	Funzioni
Fattore di crescita epidermico	EGF	Piastrine, macrofagi, saliva, urine, latte materno, plasma	Mitogenico per cheratinociti e fibroblasti; stimola la migrazione dei cheratinociti e la formazione del tessuto di granulazione
Fattore di crescita trasformante α	TGF α	Macrofagi, linfociti T, cheratinociti e molti tessuti	Simile all'EGF; stimola la replicazione degli epatociti e della maggior parte delle cellule epiteliali
EGF legante l'eparina	HB-EGF	Macrofagi, cellule mesenchimali	Mitogenico per i cheratinociti
Fattore di crescita epatocitario/ fattore di dispersione	HGF	Cellule mesenchimali	Mitogenico per gli epatociti e per le cellule epiteliali ed endoteliali; aumenta la motilità cellulare, mitogenico per i cheratinociti
Fattore di crescita endoteliale vascolare (isoforme A, B, C, D)	VEGF	Molti tipi cellulari	Aumenta la permeabilità vasale; mitogenico per le cellule endoteliali (si veda Tab. 3.3); angiogenesi
Fattore di crescita piastrine-derivato (isoforme A, B, C, D)	PDGF	Piastrine, macrofagi, cellule endoteliali, cheratinociti, cellule muscolari lisce	Chemotattico per PMN, macrofagi, fibroblasti e cellule muscolari lisce; attiva PMN, macrofagi e fibroblasti; mitogenico per fibroblasti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce; stimola la produzione di MMP, fibronectina e HA; stimola l'angiogenesi e la contrazione della ferita
Famiglia dei fattori di crescita fibroblastici 1 (acido) e 2 (basico)	FGF	Macrofagi, mastociti, linfociti T, cellule endoteliali, fibroblasti	Chemotattico per i fibroblasti; mitogenico per fibroblasti e cheratinociti; stimola la migrazione dei cheratinociti, l'angiogenesi, la contrazione delle ferite e la deposizione della matrice
Fattore di crescita trasformante β (isoforme 1, 2, 3); della famiglia fanno parte anche i BMP e l'attivina	TGF β	Piastrine, linfociti T, macrofagi, cellule endoteliali, cheratinociti, cellule muscolari lisce, fibroblasti	Chemotattico per PMN, macrofagi, linfociti, fibroblasti e cellule muscolari lisce; stimola la sintesi di TIMP, l'angiogenesi e la fibrogenesi; inibisce la produzione di MMP e la proliferazione dei cheratinociti
Fattore di crescita dei cheratinociti (detto anche FGF-7)	KGF	Fibroblasti	Stimola la migrazione, la proliferazione e il differenziamento dei cheratinociti
Fattore di necrosi tumorale	TNF	Macrofagi, mastociti, linfociti T	Attiva i macrofagi; regola l'attività delle altre citochine; molteplici funzioni

BMP; proteina morfogenetica dell'osso; HA, acido ialuronico; MMP; metalloproteasi della matrice; PMN, leucociti polimorfonucleati; TIMP, inibitore tissutale delle MMP.

Modificato da Schwartz SI: Principles of Surgery. New York, McGraw-Hill, 1999.