Lezione 18

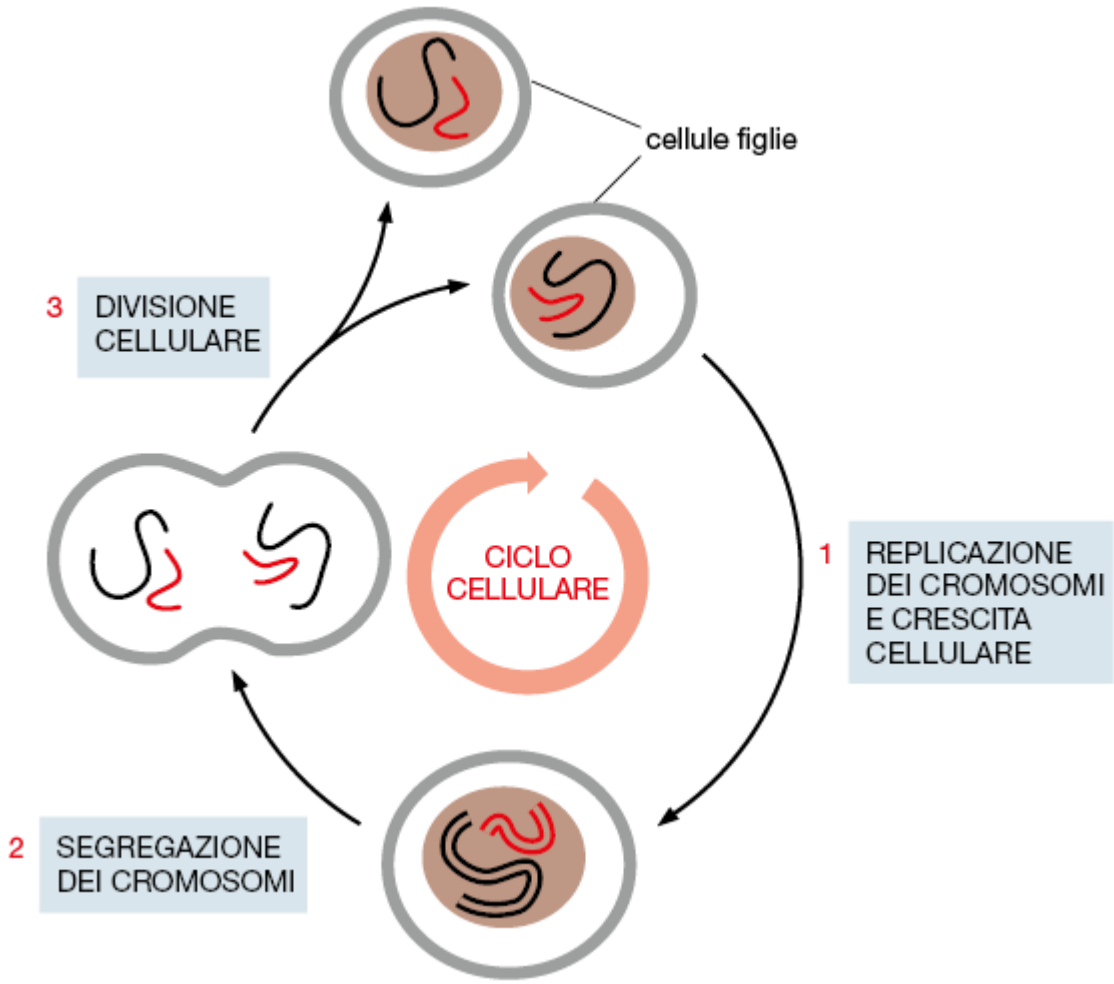
Il Ciclo Cellulare
- Le fasi e i punti di controllo.
- Le cicline e le chinasi dipendenti da ciclina e la loro modulazione.
- Le fasi della mitosi.
- L'ingresso in mitosi.
- La condensazione dei cromosomi.

L'Entrata in Fase S
- il ruolo dei fattori di crescita.
- La ciclina D-Cdk4/6.
- Fosforilazione di Rb e attivazione di E2F.
- Rb nel retinoblastoma.
- Gli inibitori del complesso ciclina-CDK.
- Il danno al DNA e l'attivazione di p53 per l'induzione del riparo o dell'apoptosi.

La Formazione del Fuso Mitotico
- i microtubuli astrali, del cinetocore e interpolari.
- I meccanoenzimi della mitosi, il disassemblaggio della lamina nucleare e la dinamica degli organelli intracellulari.
- Il complesso NDC80.
- Il movimento dei cromosomi e del fuso mitotico.

Il Completamento della Mitosi
- Il complesso APC/C o ciclosoma.
- La degradazione delle cicline e della securina.
- La separazione dei cromatidi fratelli.
- La citodieresi.
- La mitosi asimmetrica.

Ciclo Cellulare



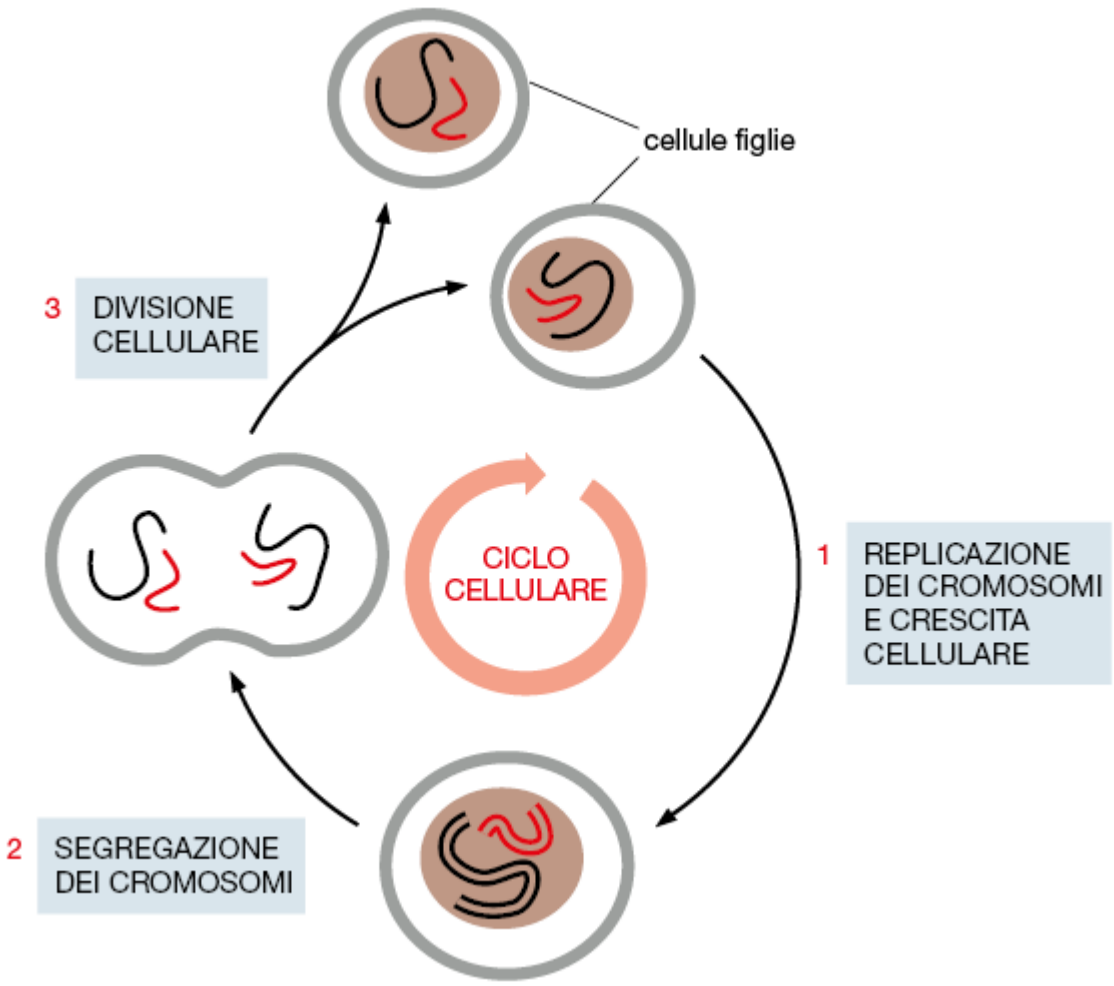
Introduzione: la continuità della vita

- L'unico modo per produrre una nuova cellula è **duplicare una cellula preesistente**.
- Questo principio, stabilito nel XIX secolo, rappresenta la base della **continuità della vita**.

Il concetto di ciclo cellulare

- Una cellula si riproduce seguendo una **sequenza ordinata di eventi**:
  - **Duplicazione** dei **contenuti cellulari**
  - **Divisione** in **due cellule figlie**
- Questo processo è detto **ciclo cellulare**.
- È il **meccanismo essenziale** attraverso cui tutti gli esseri viventi si riproducono.

Ciclo Cellulare



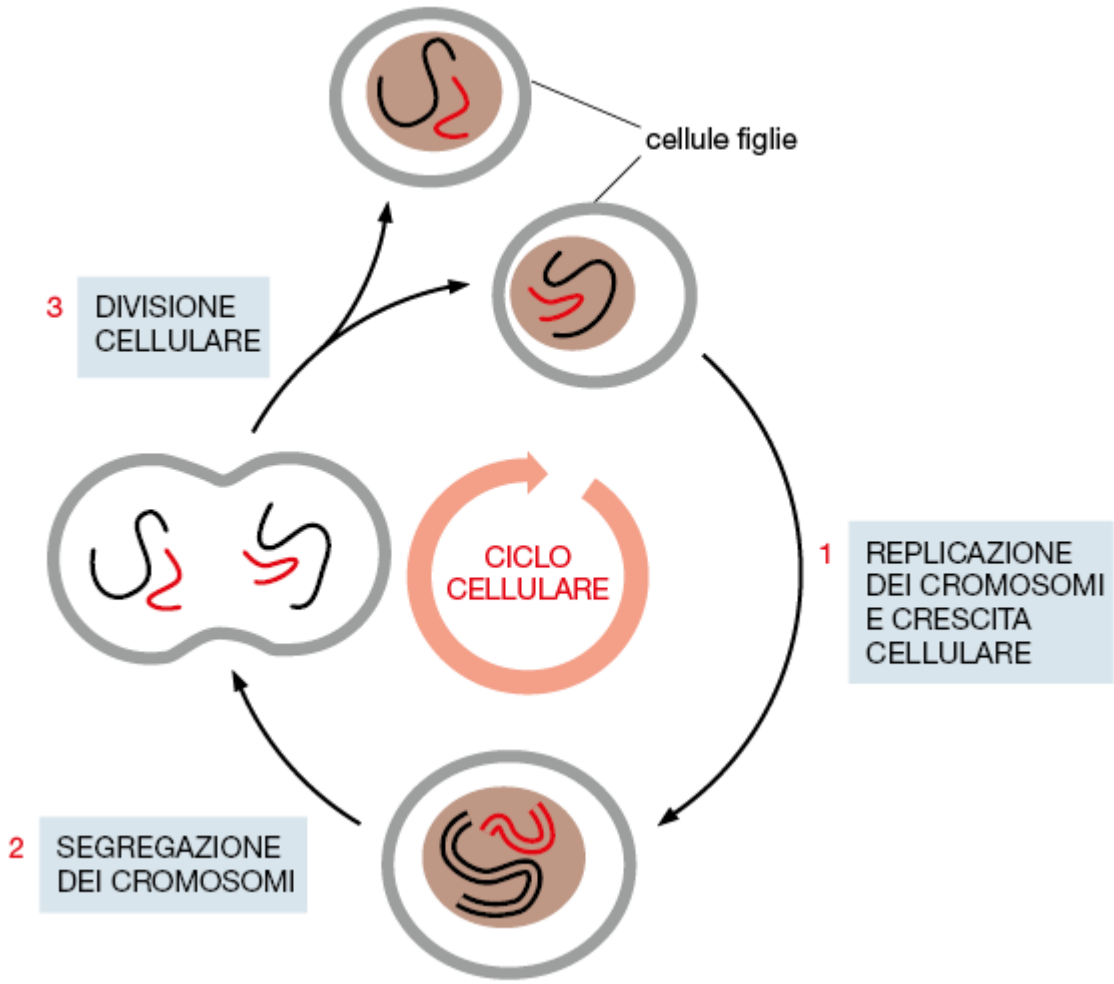
Significato biologico del ciclo cellulare

- **Organismi unicellulari**: ogni divisione produce un **nuovo organismo completo**.
- **Organismi pluricellulari**: sono necessarie **molte divisioni** per formare un organismo intero.
- Negli **adulti**, la divisione cellulare serve a **sostituire cellule morte o danneggiate**.

Universalità del processo

- Il ciclo cellulare varia **tra specie** e **nelle diverse fasi della vita** di un organismo.
- Tuttavia, presenta **caratteristiche universali**.
- Funzione essenziale: **Trasmettere fedelmente l'informazione genetica** alla generazione successiva di cellule.

Ciclo Cellulare



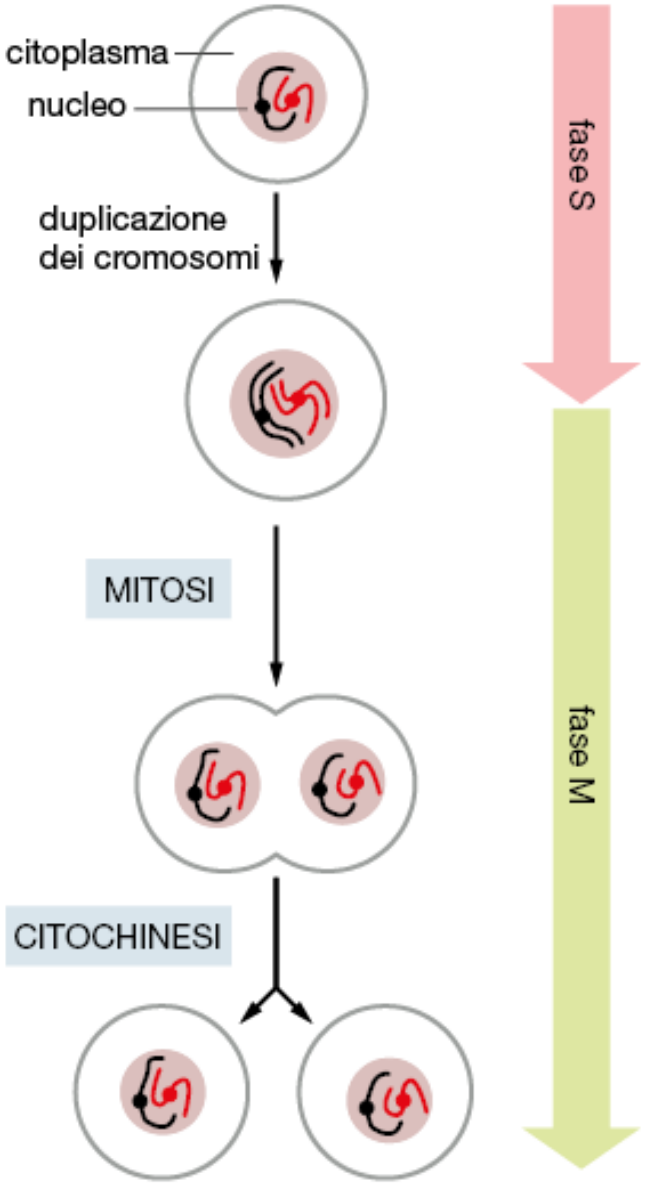
Replicazione e distribuzione del materiale genetico

- Per produrre due cellule figlie **geneticamente identiche**:
  - Il **DNA di ciascun cromosoma** deve essere **replicato fedelmente**.
  - I **cromosomi duplicati** vengono poi **segregati** in modo che ogni cellula figlia riceva **una copia completa del genoma**.

Coordinamento tra crescita e divisione

- Oltre al DNA**, la cellula deve duplicare anche organuli** e **macromolecole**.
- Senza questo processo → le cellule figlie diventerebbero progressivamente **più piccole**.
- Le cellule che si dividono **coordinano la crescita (aumento della massa) con** la **divisione** per **mantenere dimensioni costanti**.

Ciclo Cellulare: le due Fasi Principali



Funzione principale

- Duplicare **accuratamente** il DNA e
- **Distribuire esattamente** le copie in due cellule figlie **geneticamente identiche**.

Le due fasi principali

1.Fase S (Sintesi del DNA)

1. Avviene la **duplicazione dei cromosomi**.
2. Dura circa **10–12 ore** (≈ metà del ciclo in cellule di mammifero).

2.Fase M (Mitosi)

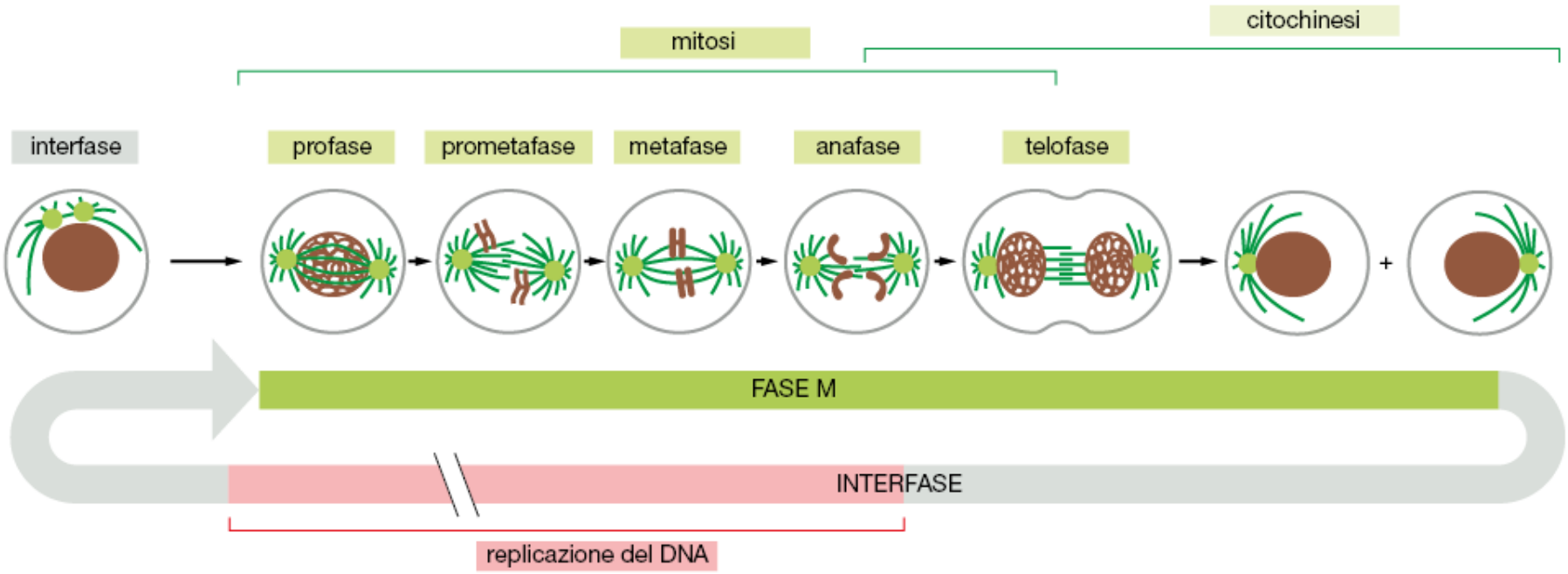
1. Avviene la **segregazione dei cromosomi** e la **divisione cellulare**.
2. Dura **< 1 ora** nelle cellule di mammifero.
3. **Citochinesi** = divisione del citoplasma

Dettagli della fase M

Mitosi = divisione del nucleo
Citochinesi = divisione del citoplasma

Fasi principali della mitosi:

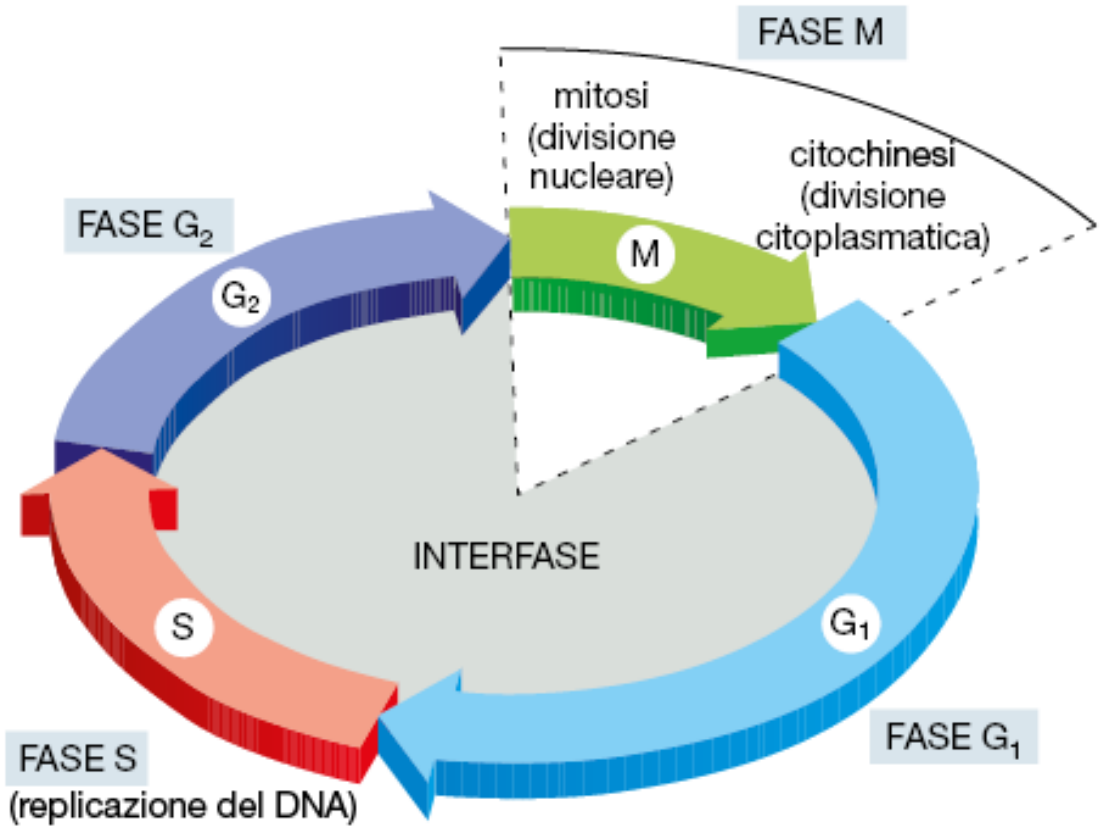
- **Profase** – i cromosomi si **condensano** in **cromatidi fratelli uniti**.
- **Prometafase** – **disassemblaggio** dell'**involucro nucleare** e attacco dei cromatidi al **fuso mitotico**.
- **Metafase** – i **cromatidi** si allineano all'**equatore del fuso**.
- **Anafase** – **separazione** dei cromatidi **verso poli opposti**.
- **Telofase** – **ricomparsa** degli **involucri nucleari** e **disassemblaggio del fuso**.
- **Citochinesi** – **divisione del citoplasma** → 2 cellule figlie identiche.



Il fuso mitotico

- Struttura **bipolare gigante di microtubuli**.
- **Coordina l'allineamento** e la **separazione dei cromatidi**.
- **I microtubuli del fuso** si **attaccano** ai **centromeri** dei cromosomi duplicati.

Le Fasi Gap



Le fasi gap

- **Non sono semplici "intervalli" ma periodi attivi**:
- **Crescita** e **sintesi di organuli** e proteine.
- **Controllo di qualità** per verificare che:
  - l'ambiente interno/esterno sia favorevole;
  - la cellula sia pronta per entrare in fase S o M.

La fase G1: un checkpoint fondamentale

- Fase altamente **variabile** in durata. **Sensibile** ai **segnali extracellulari** e alle **condizioni ambientali**.
- **Se l'ambiente è sfavorevole** → la cellula **ritarda o blocca** il passaggio alla **fase S.**

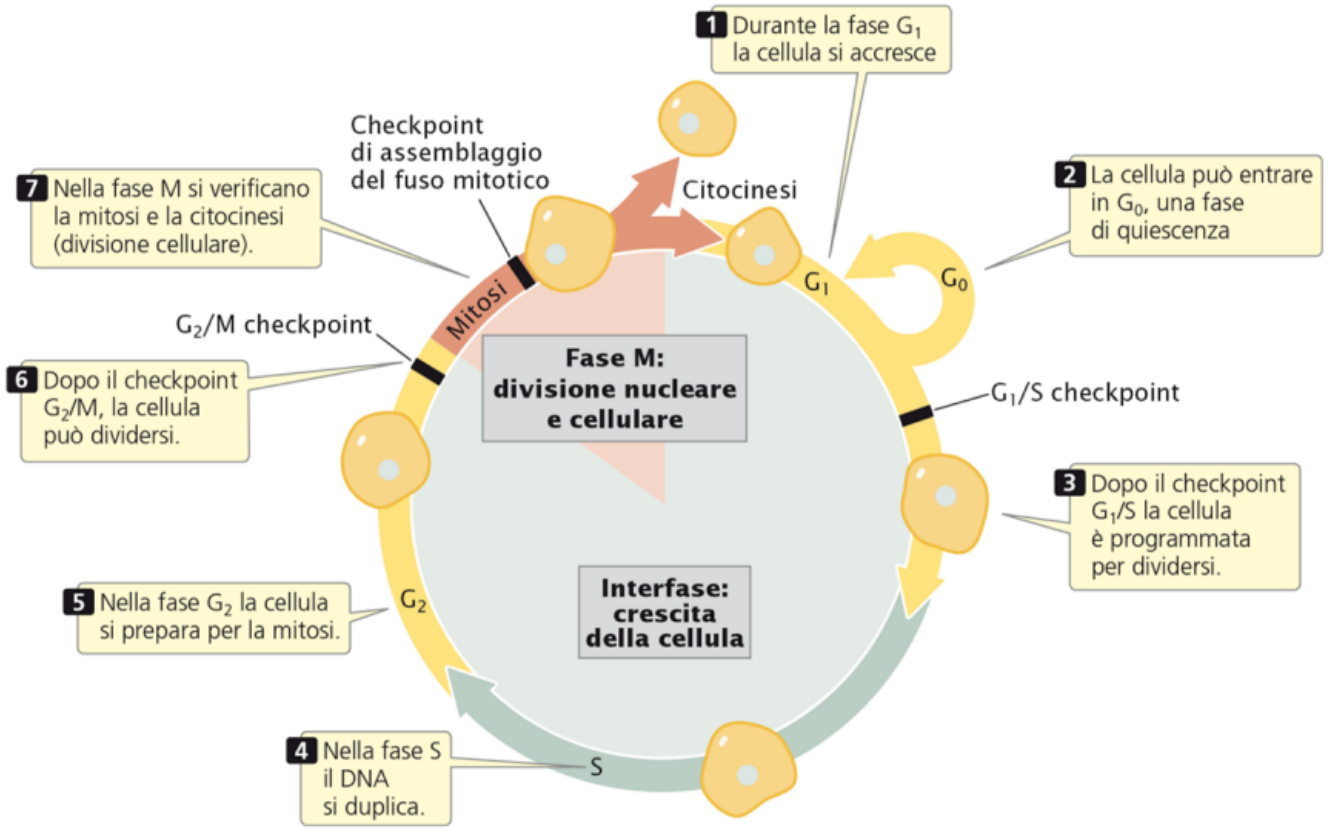
Può entrare in una fase di quiescenza (G_0):

- Le cellule possono rimanere in G_0 **giorni, settimane o anni**.
- Alcune vi restano **permanentemente** (neuroni, cellule muscolari, ecc.).

Il punto di impegno ("Start" o punto di restrizione)

- Dopo averlo superato, la cellula è **impegnata nella replicazione del DNA**, anche se i segnali extracellulari di crescita vengono meno.

Stato G0: l'uscita dal ciclo



Stato G0: l'uscita dal ciclo

- Stato **specializzato di non divisione**; le cellule **escono** dal ciclo **in assenza** di mitogeni.
- **Variabilità e reversibilità**

G0 terminale (sistema di controllo **smantellato**):

- Esempi: **neuroni**, **muscolo scheletrico** → **niente** Cdk/cicline espresse → divisione **rarissima**.

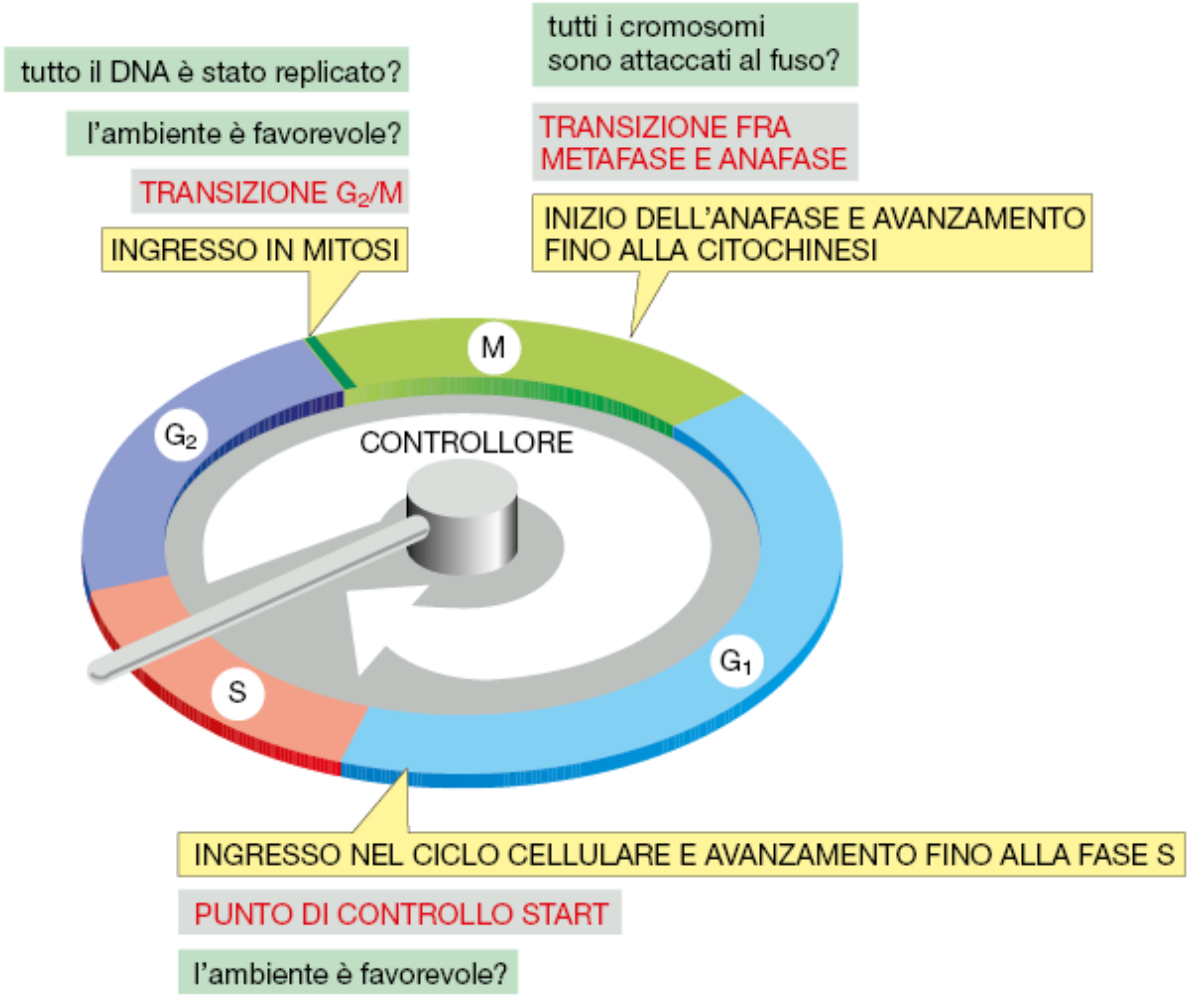
G0 temporaneo (controllo **riattivabile**):

- Esempi: **epatociti** (rientrano se fegato danneggiato); **fibroblasti**, **alcuni linfociti** (entrano/escono più volte).

Impatto sui tempi del ciclo

- La **variabilità** della durata del ciclo negli adulti è **quasi tutta** dovuta al **tempo in G1/G0**.
- Dalla **S** alla **M**: in genere **12–24 h** e relativamente **costanti** nei mammiferi, indipendenti dall'intervallo tra due divisioni.

Controllo del Ciclo Cellulare



L'organizzazione di base e il sistema di controllo sono essenzialmente gli stessi in tutte le cellule eucariote.

I tre "punti di controllo" (checkpoint) principali

1. Start / Punto di restrizione (G1 tardiva)

- **Impegno** a **entrare nel ciclo** e **duplicare i cromosomi**.
- **Se condizioni extracellulari sfavorevoli → blocco a Start**.

2. Checkpoint G2/M

- **Innesca eventi mitotici precoci condensazione, fuso, NEBD** (nuclear envelope breakdown, demolizione dell'involucro nucleare).
- **Se replicazione incompleta/danni DNA → ritardo dell'ingresso in M**.

3. Transizione metafase → anafase

- **Stimola separazione dei cromatidi fratelli →** completa **mitosi** e **citochinesi**.

Sequenza degli eventi di attivazione/inibizione

1. **G1-Cdk ↑** (Ciclina D-Cdk4/6) → **attivati da mitogeni inducono** trascrizione **G1/S** e **S-cicline** (Ciclina E-Cdk2).

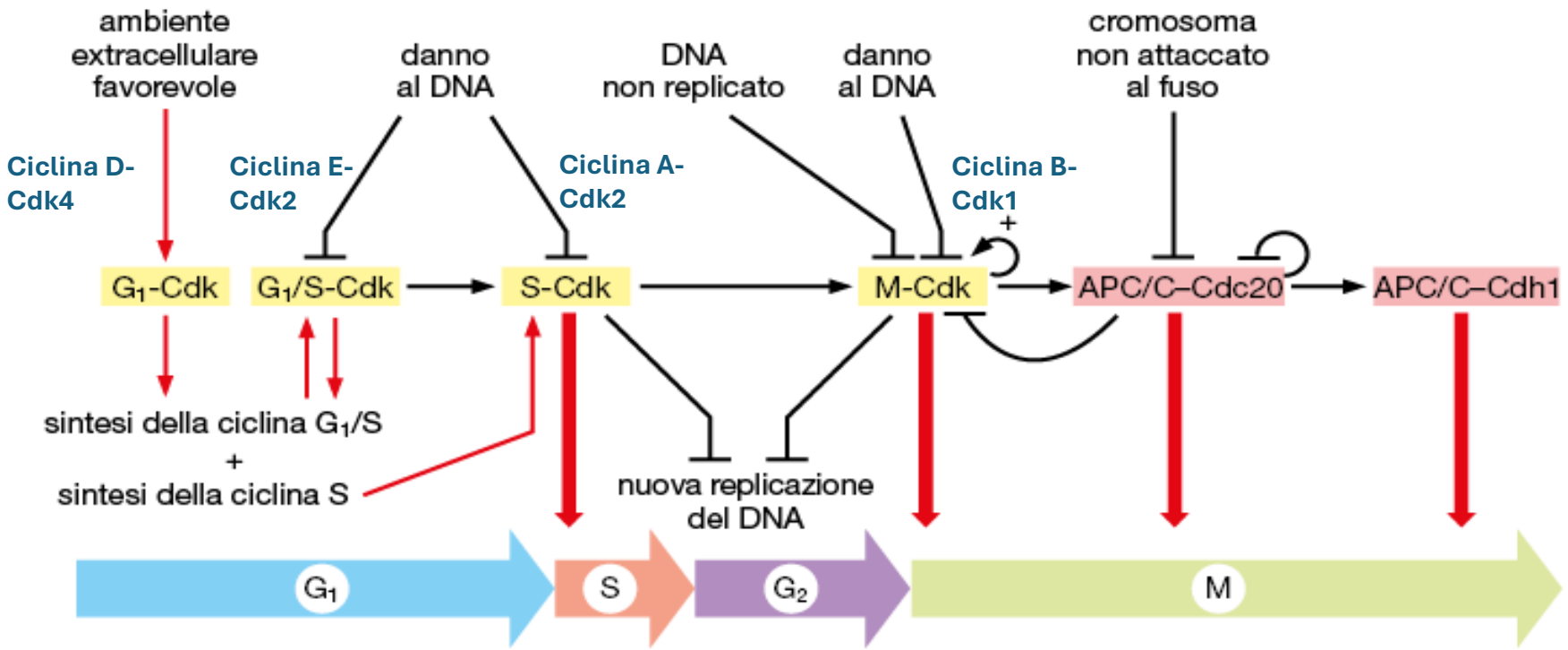
2. **G1/S-Cdk ↑** (Ciclina E-Cdk2) → **supera Start: rilascia i freni** che tenevano **Cdk** basse in G1.

3. **S-Cdk ↑** (Ciclina A-Cdk2/1) → **duplica i cromosomi** (fase S) + contribuisce a **attivare M-Cdk** (Ciclina B-Cdk1) e ad **eventi mitotici precoci**.

4. **M-Cdk ↑** (Ciclina B-Cdk1) → **attraversa G2/M** e avvia **mitosi precoce** (condensazione, fuso, NEBD).

5. **M-Cdk** (Ciclina B-Cdk2) → **attiva APC/C-Cdc20** → **distruzione** di **securina** e **cicline (B, A)** → **anafase**, eventi **mitotici tardivi**.

6. **Cdk inattive** → **APC/C-Cdh1** + altri meccanismi **sopprimono Cdk** → **G1 stabile**.



Sequenza degli eventi: Recap

1. **G1-Cdk ↑** (Ciclina D-Cdk4/6) → **attivati da mitogeni inducono** trascrizione **G1/S** e **S-cicline** (Ciclina E-Cdk2).

2. **G1/S-Cdk ↑** (Ciclina E-Cdk2) → **supera Start: rilascia i freni** che tenevano **Cdk** basse in G1.

3. **S-Cdk ↑** (Ciclina A-Cdk2/1) → **duplica i cromosomi** (fase S) + contribuisce a **attivare M-Cdk** (Ciclina B-Cdk1) e ad **eventi mitotici precoci**.

4. **M-Cdk ↑** (Ciclina B-Cdk1) → **attraversa G2/M** e avvia **mitosi precoce** (condensazione, fuso, NEBD).

5. **M-Cdk** (Ciclina B-Cdk2) → **attiva APC/C-Cdc20** → **distruzione** di **securina** e **cicline (B, A)** → **anafase**, eventi **mitotici tardivi**.

6. **Cdk inattive** → **APC/C-Cdh1** + altri meccanismi **sopprimono Cdk** → **G1 stabile**.

Nome generale	Funzioni e commenti
Proteina chinasi e proteina fosfatasi che modificano Cdk	
Chinasi che attiva Cdk (CAK)	Fosforila un sito attivatore in Cdk
Chinasi Wee1	Fosforila siti inibitori in Cdk; coinvolta soprattutto nella soppressione dell'attività di Cdk1 prima della mitosi; gli animali contengono anche una chinasi correlata, Myt1, con funzioni simili
Fosfatasi Cdc25	Rimuove fosfati inibitori da Cdk; tre membri della famiglia (Cdc25A, B, C) nei mammiferi; coinvolta soprattutto nel controllo dell'attività di Cdk1 all'inizio della mitosi
Proteina fosfatasi che defosforila i substrati delle Cdk e di altre chinasi del ciclo cellulare	
PP2A-B55	Una delle due forme principali di PP2A coinvolte nella regolazione dei substrati delle Cdk
PP2A-B56	La seconda delle due forme principali di PP2A coinvolte nella regolazione dei substrati delle Cdk
PP1	La seconda classe principale di fosfatasi coinvolta nella regolazione dei substrati delle Cdk
Proteine che inibiscono Cdk (CKI)	
Sic1 (lievito gemmante)	Sopprime l'attività di Cdk in G_1; la fosforilazione da parte di Cdk1 alla fine di G_1 ne scatena la distruzione
p27 (mammiferi)	Sopprime G_1/S-Cdk ed S-Cdk in G_1; aiuta le cellule a ritirarsi dal ciclo cellulare quando si differenziano terminalmente; la fosforilazione a opera di Cdk2 scatena la sua ubiquitinazione da parte di SCF
p21 (mammiferi)	Sopprime le attività G_1/S-Cdk e S-Cdk in seguito a un danno del DNA
p16 (mammiferi)	Sopprime l'attività G_1-Cdk in G_1; spesso inattivata nel cancro
Ubiquitina ligasi e loro attivatori	
APC/C	Catalizza l'ubiquitinazione di proteine regolatrici coinvolte soprattutto nell'uscita dalla mitosi, comprese securina e cicline S e M; regolata mediante associazione con subunità attivatrici Cdc20 o Cdh1
Cdc20	Subunità che attiva APC/C in tutte le cellule; scatena l'attivazione iniziale di APC/C alla transizione metafase-anafase; stimolata dall'attività di M-Cdk
Cdh1	Subunità che attiva APC/C; mantiene l'attività di APC/C dopo l'anafase e nell'intera fase G_1; inibita dall'attività di Cdk
SCF	Catalizza l'ubiquitinazione di proteine regolatrici coinvolte nel controllo in G_1, comprese alcune CKI (Sic1 nel lievito gemmante, p27 nei mammiferi); la fosforilazione della proteina bersaglio è in genere necessaria per quest'attività
CRL4–Cdt2	Collegata a SCF, catalizza l'ubiquitinazione del regolatore della replicazione Cdt1 durante la fase S, sopprimendo così il caricamento ulteriore dell'elicasi Mcm all'origine; il riconoscimento del bersaglio dipende dall'associazione con proteine alla forcella di replicazione

Cuore del controllo: Cdk attivate ciclicamente

Tabella 17.1 Le principali cicline e Cdk dei vertebrati e del lievito gemmante

Complesso ciclina-Cdk	Vertebrati		Lievito gemmante	
	Ciclina	Cdk partner	Ciclina	Cdk partner
G1-Cdk	Ciclina D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G1/S-Cdk	Ciclina E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	Ciclina A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	Ciclina B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

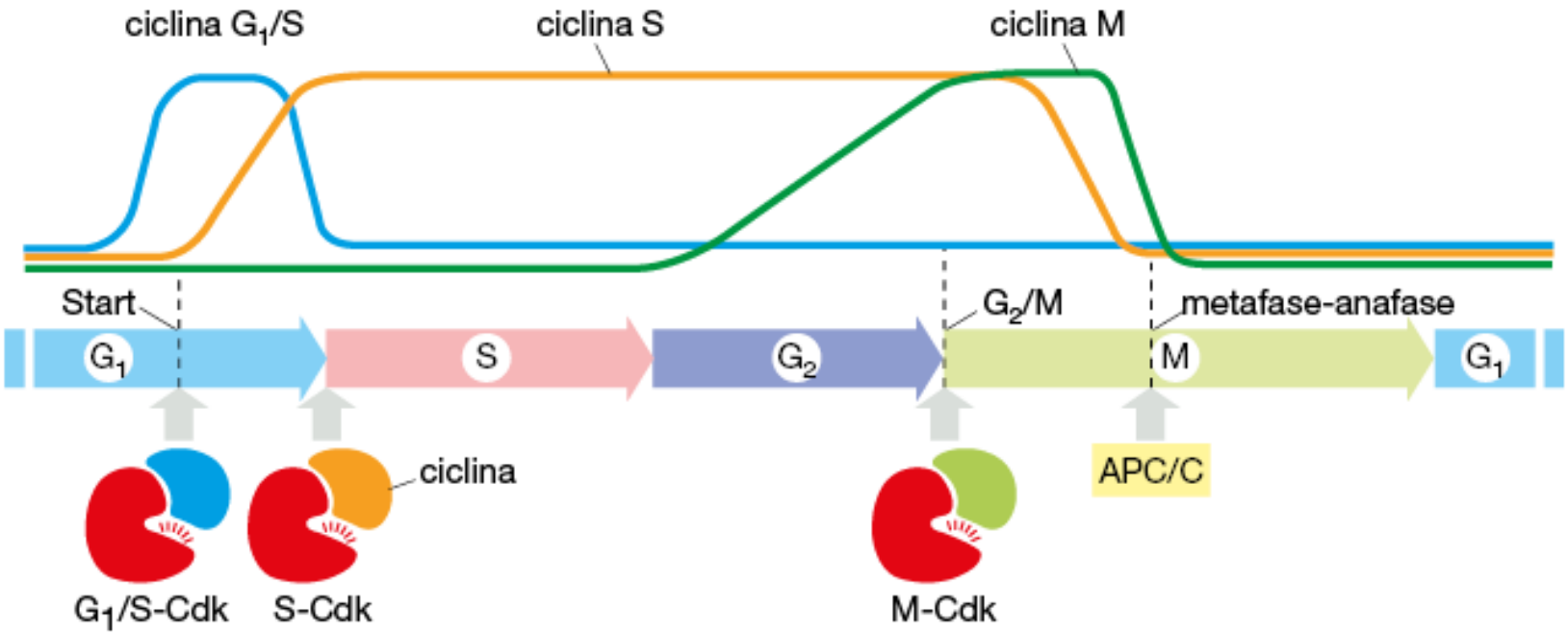
*Nei mammiferi ci sono tre cicline D (cicline D1, D2 e D3).
**Il nome originale di Cdk1 era Cdc2 nei vertebrati e nei lieviti a fissione, e Cdc28 nel lievito gemmante.

Famiglia di chinasi dipendenti da ciclina (Cdk)

- **La loro attività oscilla** durante il ciclo → **fosforilazioni** periodiche su proteine bersaglio che **innescano/regolano** gli **eventi principali**.
- Esempio: aumento **Cdk** a **G2/M** → fosforilazione proteine per **condensazione cromosomi**, **NEBD**, **assemblaggio del fuso**, ecc.

Ruolo delle cicline

- Le **Cdk** sono **inattive senza ciclina**; il **legame con la ciclina è necessario** ma **non sufficiente all'attivazione completa**.
- **Le cicline** oscillano (**sintesi/degradazione cicliche**); le **Cdk restano costanti**.
- Classi funzionali:
  - **G1-cicline** (**Ciclina D**): **governano** le attività G1/S, regolando il **passaggio attraverso Start**; segnali mitogenici **aumentano** la loro produzione.
  - **G1/S-cicline** (**Ciclina E**): si alzano in **G1 tardiva**, **promuovono il passaggio Start**; **diminuiscono in S**.
  - **S-cicline** (**Ciclina A**): compaiono **subito dopo Start**, **stimolano la duplicazione dei cromosomi**; restano alte fino a **M** e **contribuiscono** a eventi mitotici precoci.
  - **M-cicline** (**Ciclina B**): attivano Cdk per **ingresso in mitosi** (**G2/M**), poi **crollano** nella **mitosi intermedia**.



Architettura Cdk nei diversi eucarioti

Nei vertebrati ci sono quattro Cdk:

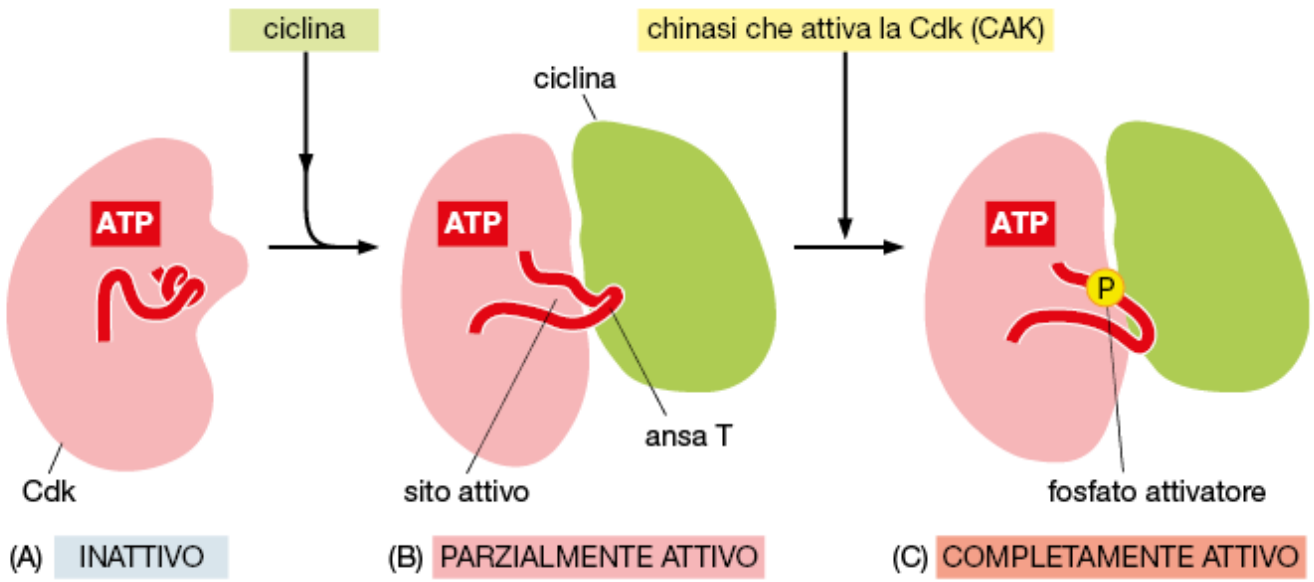
- **due** con **G1-cicline** (**CiclinaD**) (→ **G1-Cdk, Cdk4/6**),
- **una** con **G1/S-cicline** (**CiclinaE**) (→ **G1/S-Cdk, Cdk2**)
- **una** con **S-cicline** (**CiclinaA**) (→ **S-Cdk, Cdk2/1**),
- **una** con **M-cicline** (**CiclinaB**) (→ **S-Cdk**, **M-Cdk**).

Tabella 17.1 Le principali cicline e Cdk dei vertebrati e del lievito gemmante

Complesso ciclina-Cdk	Vertebrati		Lievito gemmante	
	Ciclina	Cdk partner	Ciclina	Cdk partner
G1-Cdk	Ciclina D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G1/S-Cdk	Ciclina E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	Ciclina A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	Ciclina B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

*Nei mammiferi ci sono tre cicline D (cicline D1, D2 e D3).
**Il nome originale di Cdk1 era Cdc2 nei vertebrati e nei lieviti a fissione, e Cdc28 nel lievito gemmante.

Meccanismi di attivazione/inibizione delle Cdk



Attivazione graduale

- **Stato inattivo** (senza ciclina): il **sito attivo** è bloccato dall'**ansa T**.
- **Legame della ciclina** → spostamento ansa T → **attivazione parziale**.
- **Fosforilazione CAK** (Cdk-Activating Kinase) su residuo di **treonina** dell'ansa T → **attivazione completa** (migliora il legame ai substrati).
- **Attività CAK**: **costante** durante il ciclo.

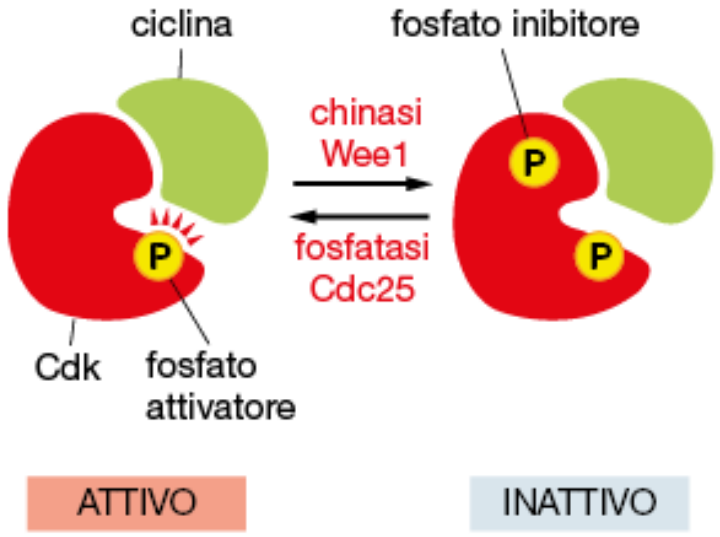
Meccanismi di attivazione/inibizione delle Cdk

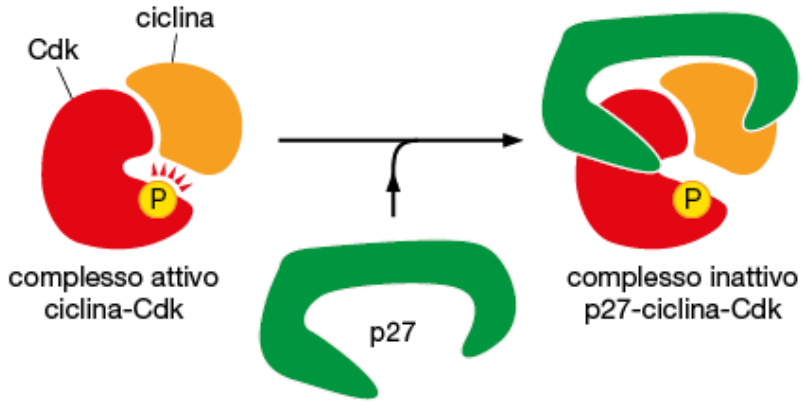
Fosforilazioni regolatorie inibitorie/attivanti

- **Wee1** (chinasi): aggiunge **fosfati inibitori** vicino al sito attivo → **spegne** il complesso **ciclina-Cdk attivo.**
- **Cdc25** (fosfatasi): **rimuove** questi **fosfati inibitori** → **ri-attiva** la **Cdk**.
- Particolarmente cruciale per **M-Cdk (Ciclina B/Cdk1)** all'**inizio della mitosi** (switch rapido/irreversibile).

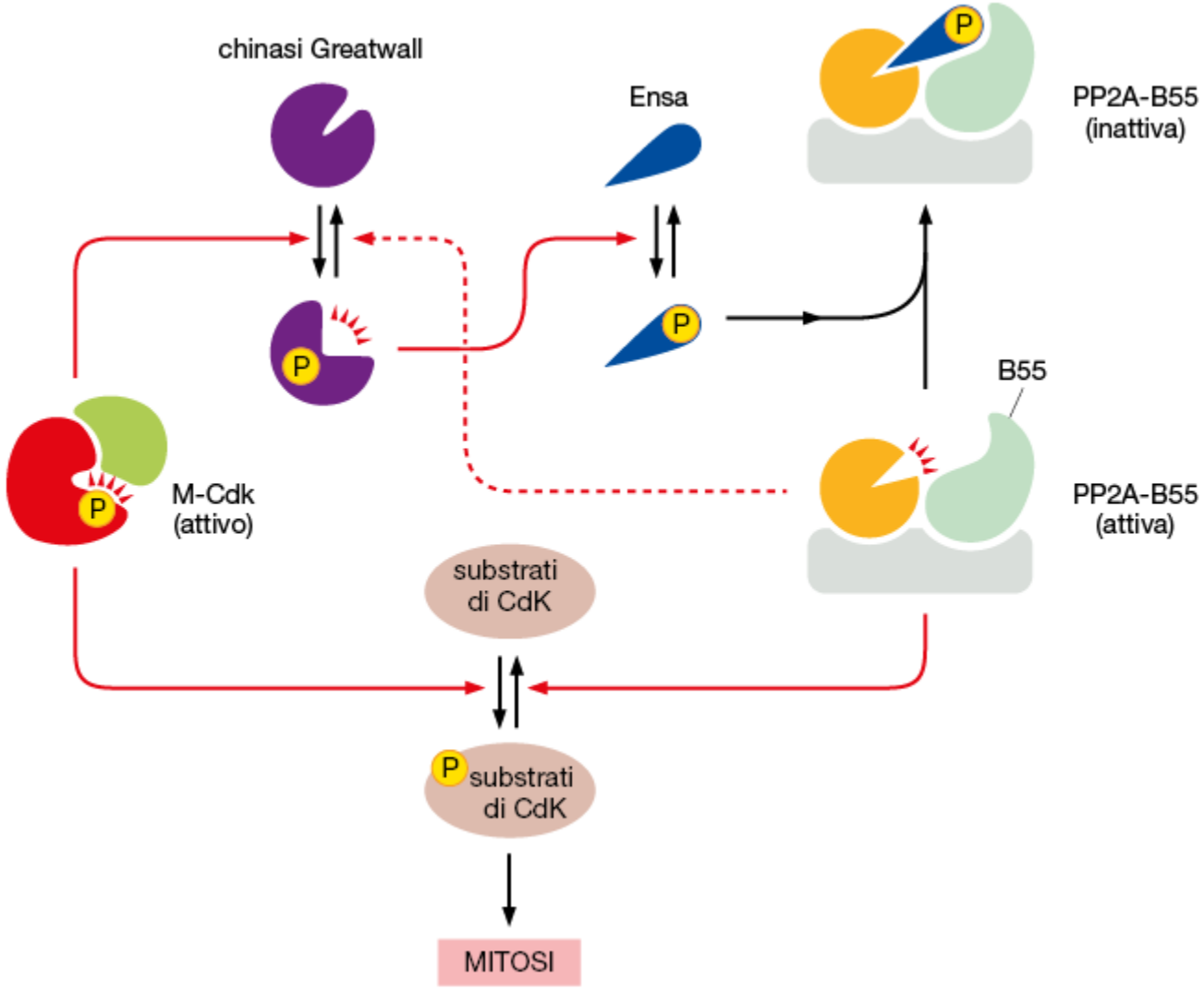
Inibizione tramite CKI (Cdk Inhibitor proteins)

- **CKI** (piccole proteine) si **avvolgono** attorno al **complesso ciclina-Cdk**, ne **ristrutturano** il sito attivo → **inattivo**.
- Importanti all'**inizio del ciclo** per regolare **G1/S-Cdk (Ciclina E/Cdk2)** e **S-Cdk (Ciclina A/Cdk2)**.





Fosfatasi e switch del ciclo



Le fosfatasi invertono gli effetti delle Cdk

- La fosforilazione proteica dipende da un **equilibrio dinamico**
- Durante l'**ingresso in mitosi**, **l'attività fosfatasica diminuisce** mentre aumenta quella di **Cdk** → **incremento netto** della fosforilazione.

PP2A come regolatore cardine

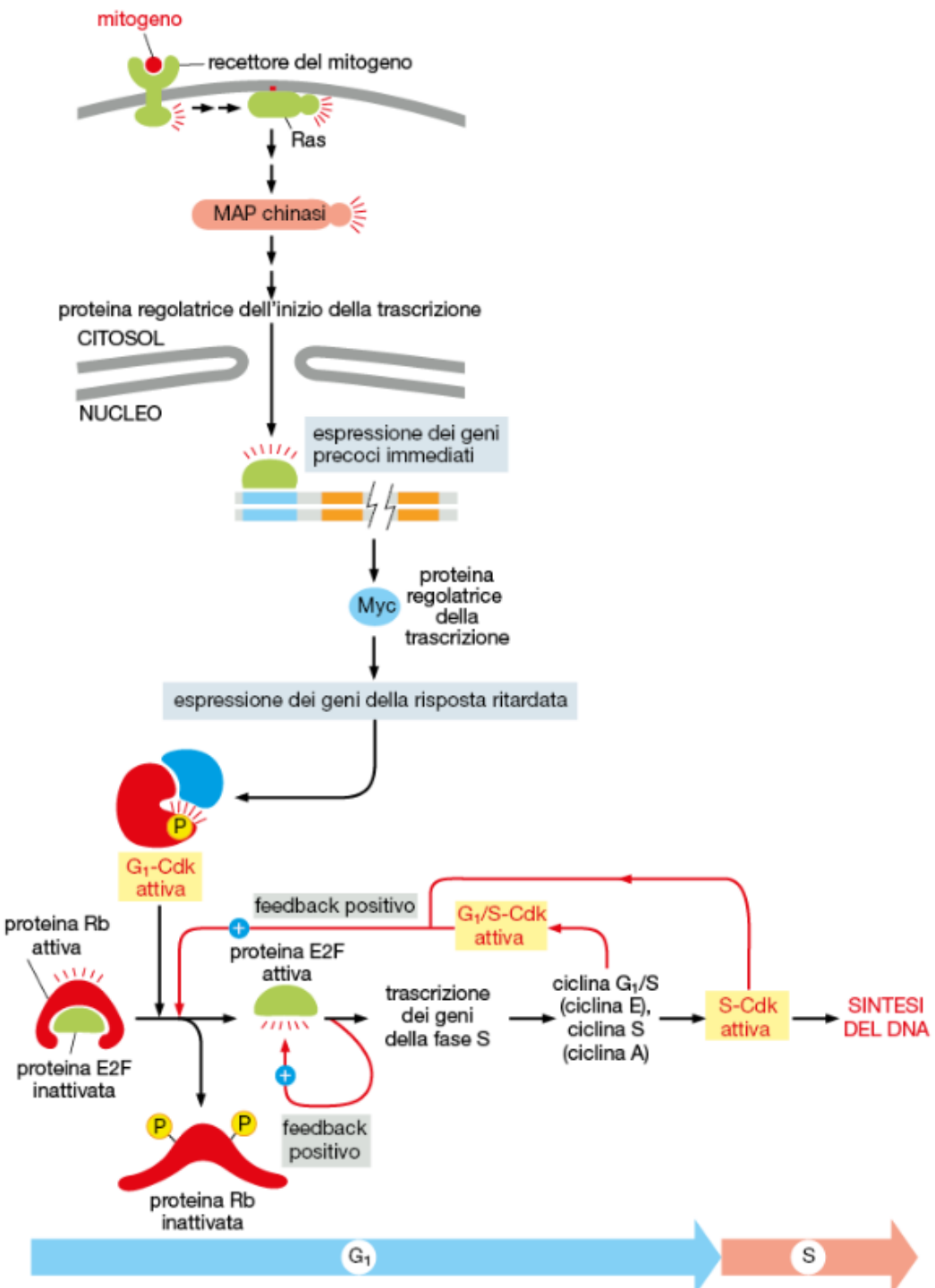
- **PP2A**: fosfatasi eterotrimerica, con subunità regolatoria **B** che determina **substrati, localizzazione, regolazione**.
- Subunità **PP2A-B55** e **PP2A-B56**: le più rilevanti.

I Mitogeni

Perché gli organismi hanno taglie diverse?

- La **dimensione finale** (organi/organismo) dipende da:
  - **Numero di cellule** (→ divisione vs morte),
  - **Dimensione delle cellule** (→ crescita di massa).

- Tre processi fondamentali, **tutti regolati** da programmi **intracellulari** e segnali **extracellulari**:
  - **Divisione**,
  - **Crescita** (massa),
  - **Sopravvivenza** (apoptosi soppressa).



Segnali Extracellulari

In presenza di Mitogeni le cellule possono uscire dalla G0 ed entrare in G1

1) Mitogeni — spingono la divisione

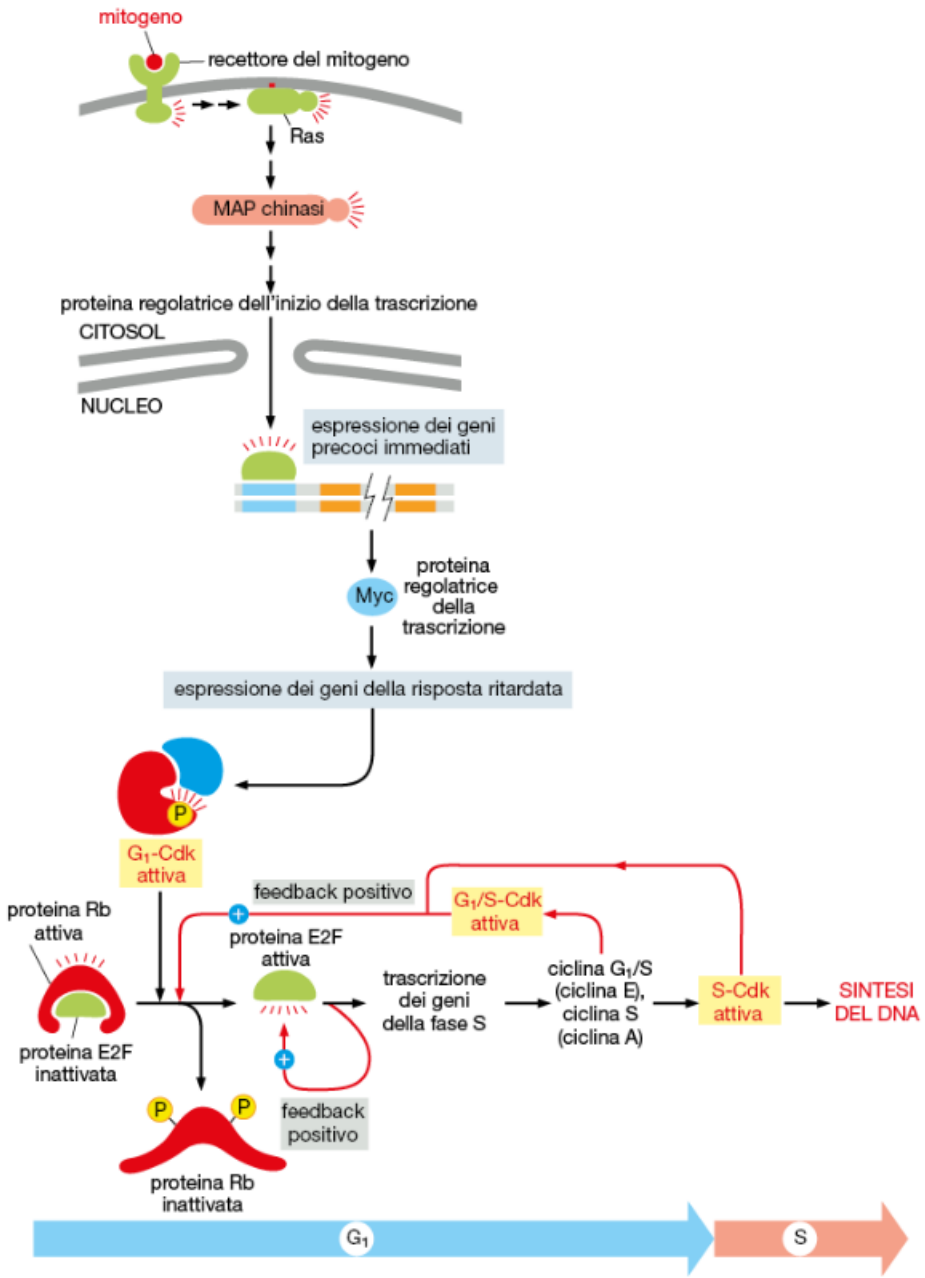
- **Innescano un'onda di G1/S-Cdk**, che **rimuove i freni** intracellulari e consente il passaggio oltre **Start/punto di restrizione**.
- Molti mitogeni hanno **funzioni aggiuntive** (crescita, sopravvivenza, differenziamento, migrazione) a seconda del contesto.

2) Fattori di crescita — spingono la massa

- Aumentano **sintesi proteica/macromolecolare** e **inibiscono la degradazione** → **aumento dimensioni** cellulari.

3) Fattori di sopravvivenza — inibiscono l'apoptosi

- Mantengono la **vitalità** cellulare sopprimendo i programmi di **morte**.
- "**fattore di crescita**" viene spesso usato impropriamente per indicare **qualunque** attività pro-proliferativa; anche "**crescita cellulare**" viene talvolta confusa con **proliferazione** (↑ numero).



Dalla stimolazione mitogenica all'ingresso in ciclo

Dove agiscono i mitogeni?

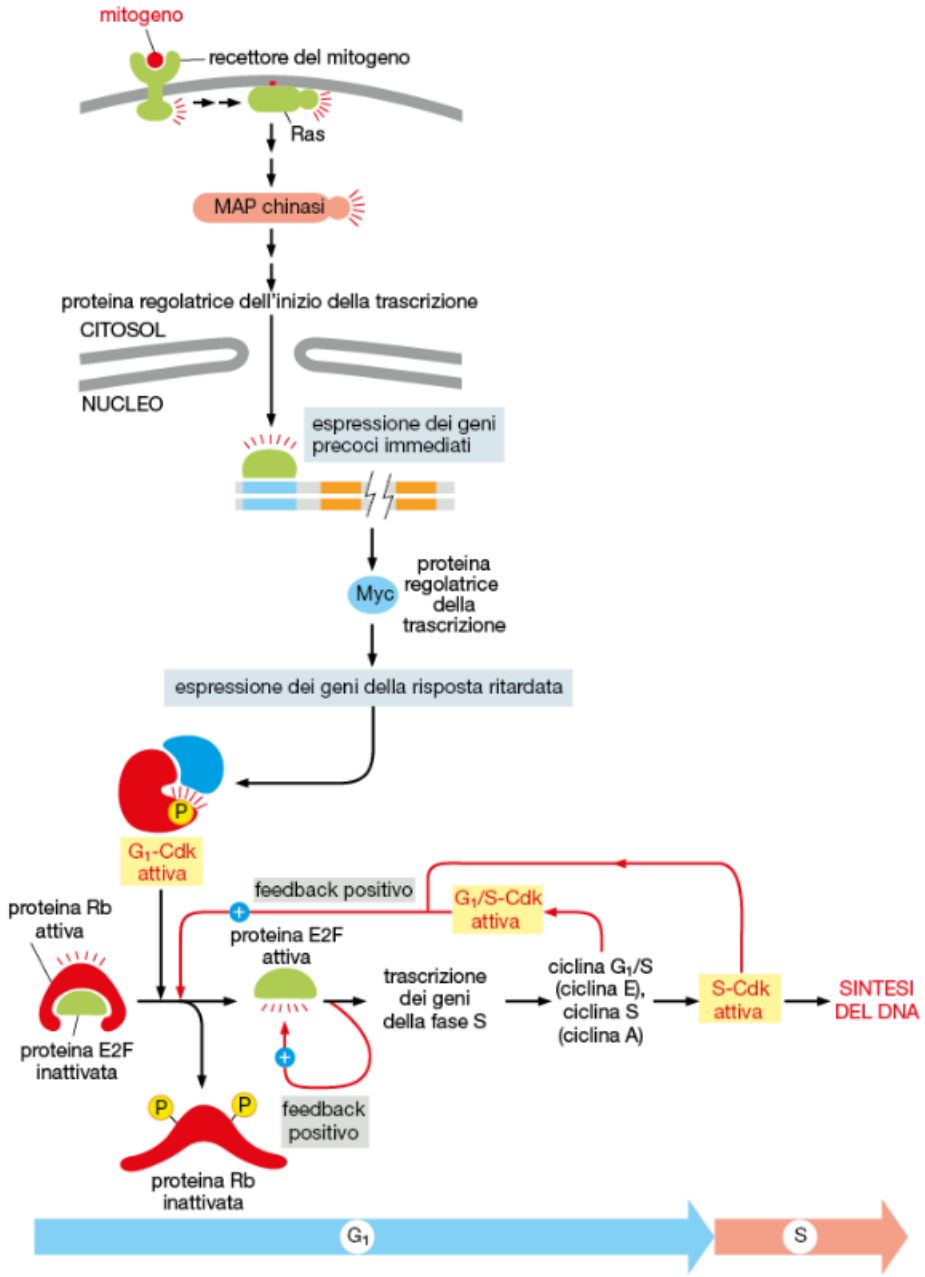
- Target principale: **fase G1**.
- Funzione: **rimuovere i freni** che sopprimono l'attività **Cdk** in G1 → avvio **nuovo ciclo**.

Via di segnalazione cardine

- **Recettori** di superficie → attivazione **Ras** → **MAPK cascade**.
- Output trascrizionale: ↑ fattori regolatori di geni, tra cui **Myc**.

Myc come hub pro-proliferativo

- **Myc** promuove l'ingresso in ciclo tramite più meccanismi:
  - **↑ trascrizione cicline G1 (cicline D)** → ↑ **G1-Cdk** (Ciclina D–Cdk4).
  - **Myc** sostiene **crescita** (**massa**) aumentando **programmi biosintetici**.



Rilascio di E2F: l'asse Rb–E2F

Stato basale (no mitogeni)

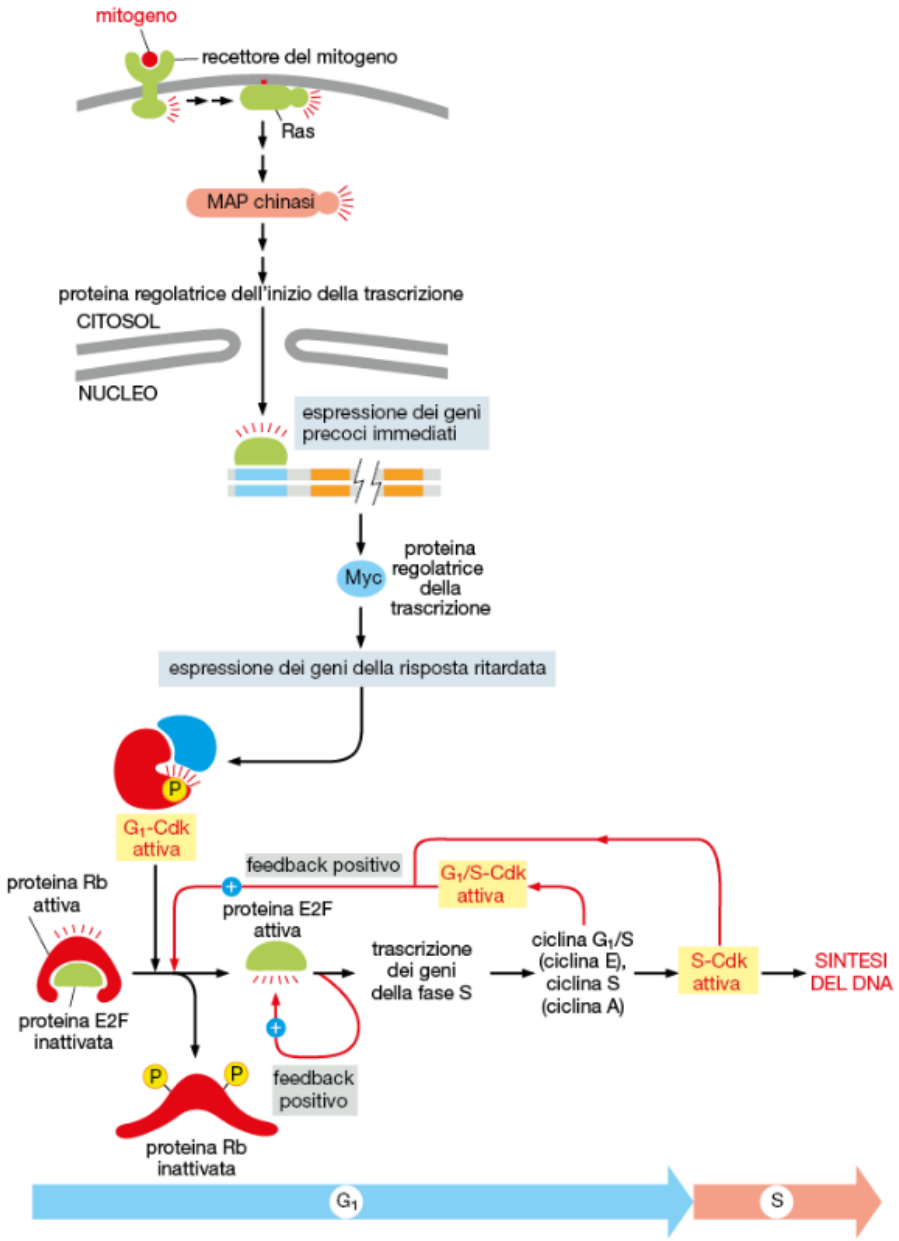
- **Fattori E2F** legati ai **promotori di geni S-phase** (cicline **G1/S/S**, proteine per **replicazione DNA**).
- **E2F** è **inibito** dall'interazione con **proteine Rb** (famiglia Rb) → **trascrizione OFF**.

Con mitogeni

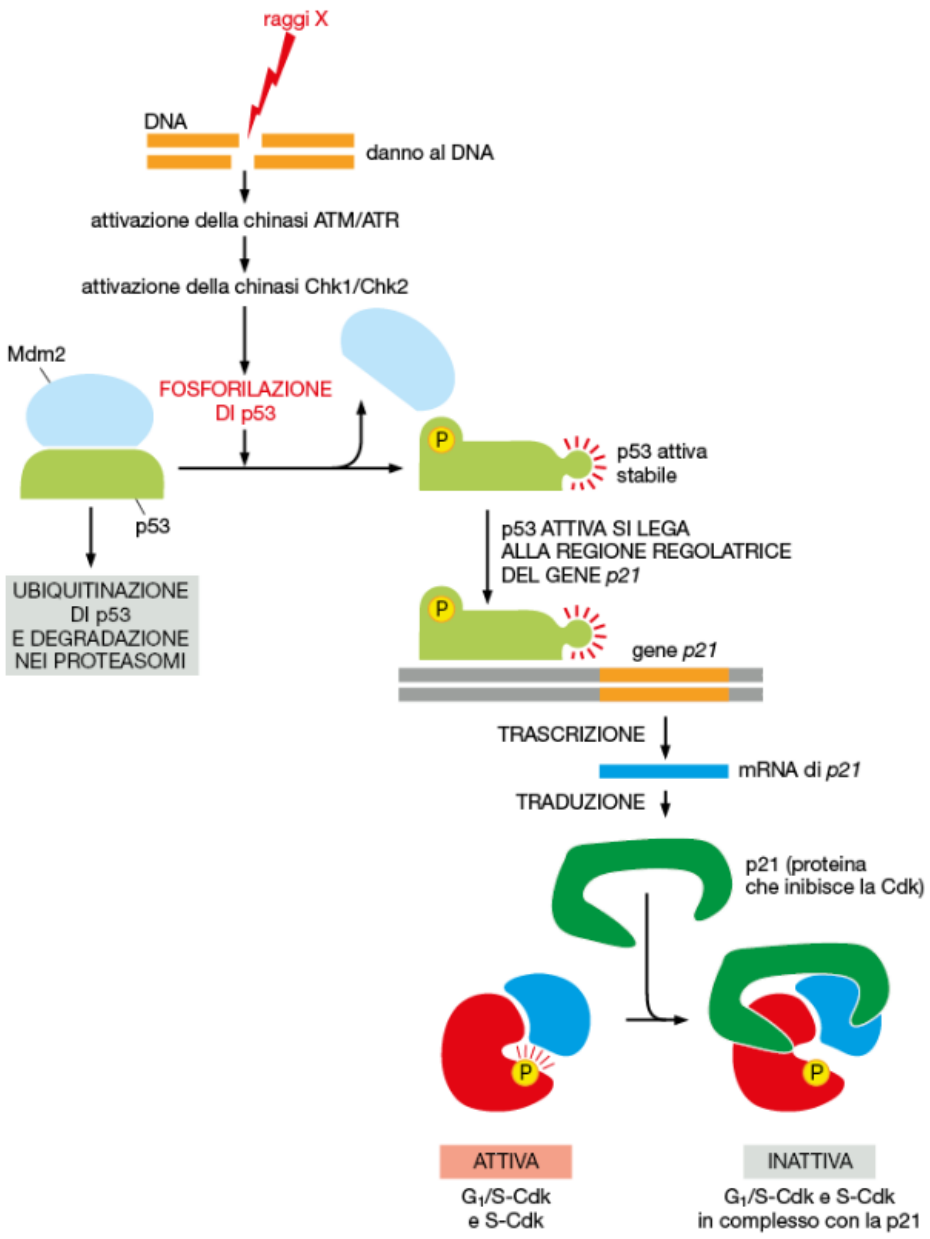
- ↑ **G1-Cdk** → **fosforila Rb** → **Rb perde affinità** per **E2F** → **E2F libero** → **trascrizione ON** dei **geni S-phase**.

Feedback:

- **E2F** auto-**amplifica** la **propria espressione**.
- **E2F** ↑ **ciclina E (G1/S)** e **ciclina A (S)** → ↑ **G1/S-Cdk** (**Cdk2**) e **S-Cdk** (**Cdk2**) → più **fosforilazione di Rb** → ulteriore rilascio di **E2F** → **switch irreversibile** oltre Start.



Sensori e trasduttori del danno al DNA: ATM/ATR e Chk1/Chk2

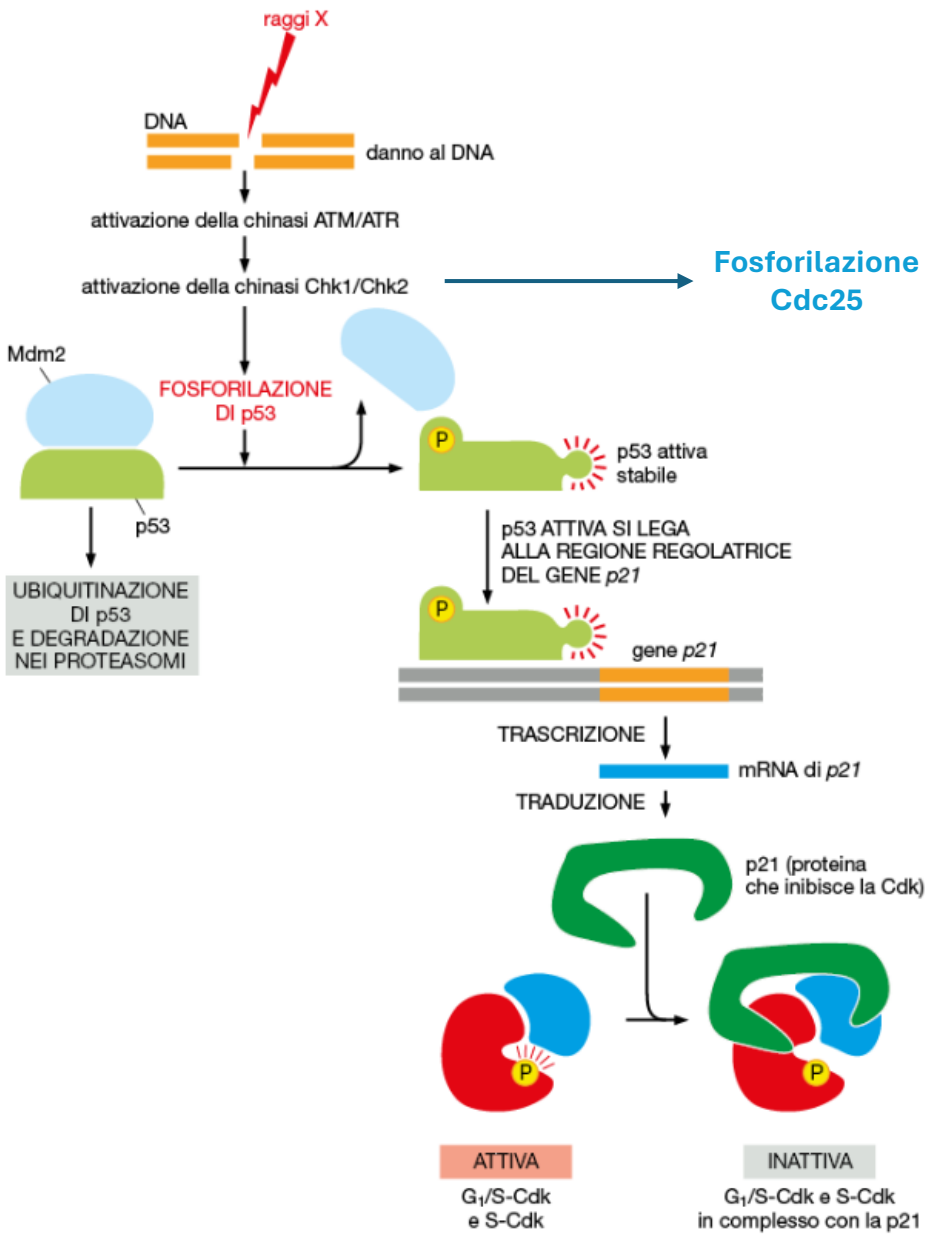


- Fonti di **danno**: reazioni chimiche spontanee, **errori di replicazione**, radiazioni, chimici.
- Obiettivo: **riparare prima di duplicare** (S) **o segregare** (M) i cromosomi.
- Due **punti di controllo** principali:
  - **Start/G1** → impedisce **ingresso in S**
  - **G2/M** → impedisce **ingresso in mitosi**

Sensori e trasduttori: ATM/ATR → Chk1/Chk2

- **ATM/ATR** si **reclutano al danno** e **fosforilano** bersagli-chiave, tra cui **Chk1/Chk2**.
- **Output** combinato: **fosforilazioni** che **bloccano** la **progressione del ciclo**.

Guardiano del Genoma p53



Braccio trascrizionale: p53 → p21 → inibizione Cdk

Stato basale (nessun danno)

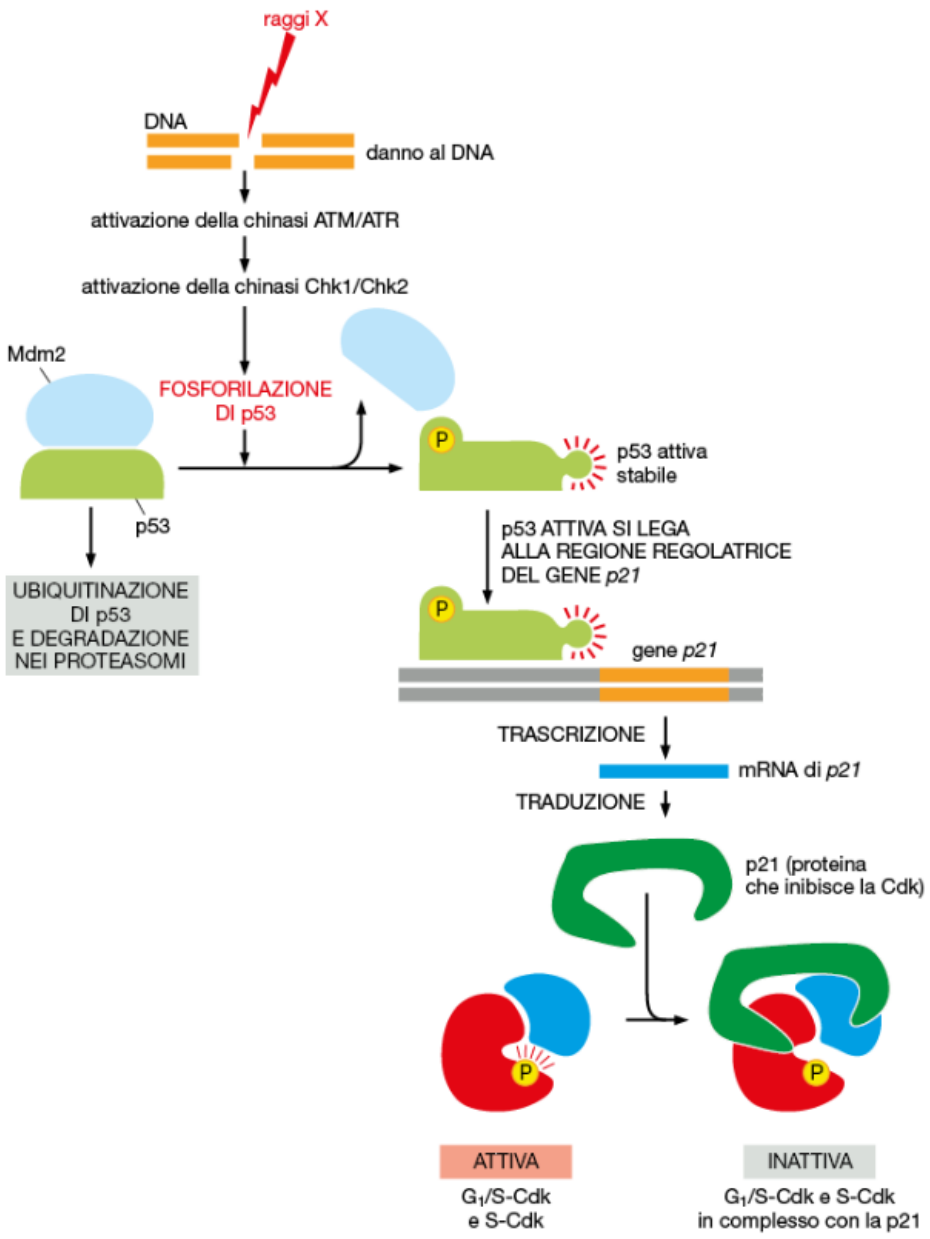
- **p53** è **instabile** (bassa concentrazione) perché **Mdm2** (**ubiquitina ligasi**) la **ubiquitina** → **proteasoma**.

Con danno al DNA

- Chinasi **ATM/ATR/Chk** attivate **fosforilano p53** → la fosforilazione **riduce l'affinità di legame** a **Mdm2**.
- Risultato: **p53 si stabilizza** e **attiva la trascrizione** dei suoi geni target per bloccare la replicazione.
- Gene cardine: **p21 (CKI)** → **lega e inibisce G1/S-Cdk** (Cilcina E/Cdk2) e **S-Cdk** (Ciclina A-Cdk2) → **blocco ingresso in S**.

p53 è sia **stabilizzato** sia **attivato** funzionalmente dalla fosforilazione.

Braccio post-traduzionale: Cdc25 sotto controllo di Chk1/Chk2



Chk1/Chk2 fosforilano Cdc25 su **siti inibitori → Cdc25 inattiva.**

- Poiché **Cdc25** serve ad **attivare M-Cdk** togliendo i fosfati inibitori, la sua inibizione → **blocco G2/M**.
- Stesso circuito risponde a **replication stress** (forcelle **in stallo** per carenza nucleotidi, ecc.) → **niente mitosi** finché la forchetta non è risolta.

Esiti della risposta al danno

1) Arresto del ciclo (G1 o G2)
Tempo per la **riparazione**; se riuscita → il ciclo **riprende**.

2) Apoptosi (soprattutto negli animali)
Se il danno è **grave/irrecuperabile**, prevale l'interesse dell'**organismo; p53** spesso **funge** da **interruttore pro-apoptotico**.

- **Unicellulari** (es. lievito gemmante): dopo tentata riparazione, possono **ripartire anche con danno** (meglio mutare che morire).

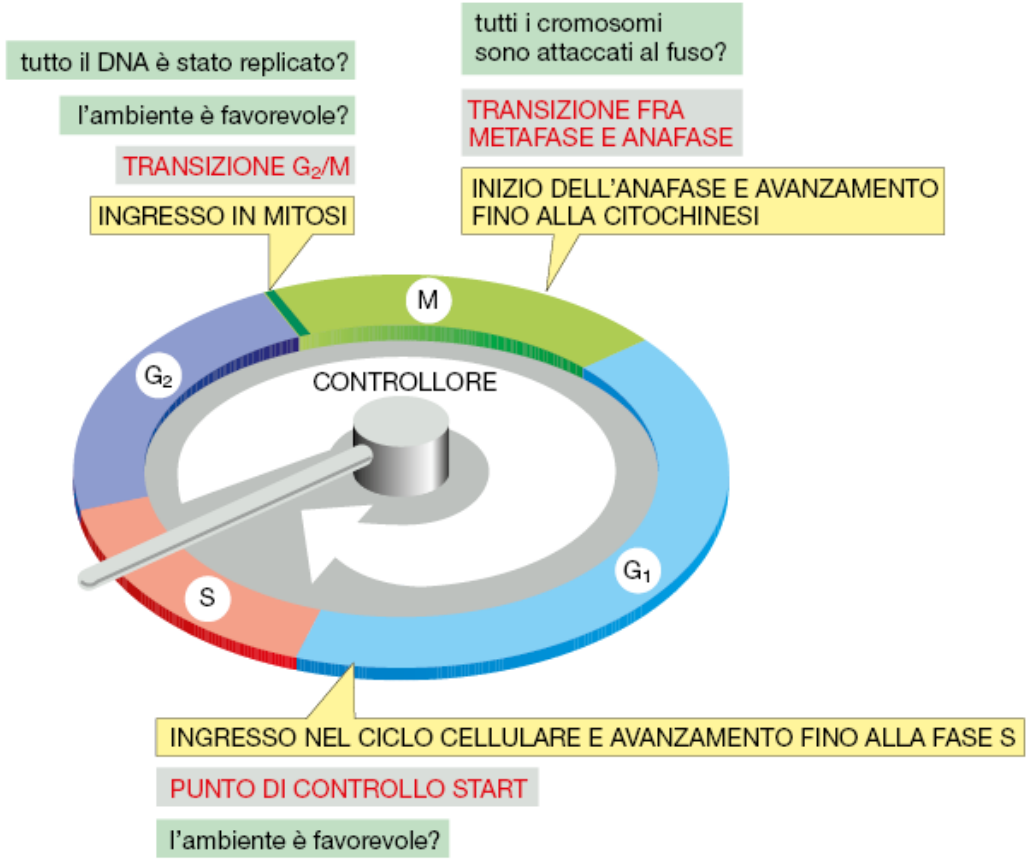
G1: Stato stabile a bassa attività Cdk

Perché G1 è stabile?

- **Alla fine della mitosi** è cruciale **"resettare"** il **sistema**: **Cdk inattive** per **crescita** e **monitoraggio** ambientale.
- **Tre meccanismi cooperanti**:
  - **APC/C-Cdh1 attivo** (**mitosi tardiva** → **G1**): **mantiene basse** le **cicline**.
  - **CKI ↑**: nelle **cellule di lievito gemmante**, **p27** si lega a **M-Cdk** (**Ciclina B/Cdk1**) e la **inattiva a fine M** e in **G1**.
  - **Diminuisce la trascrizione** delle **cicline M (Ciclina B)**: l'uscita da M **spegne** il **feedback positivo** che ne sosteneva l'espressione.
- **Esito combinato**: in **G1** si riscontra una **bassa attività Cdk costante**.

Come si "rompe" la stabilità di G1?

- **Fine G1**: **G1/S-Cdk** (aumentate da segnali proliferativi) **superano i freni**:
  - **spengono APC/C-Cdh1**,
  - **abbassano CKI** (via **SCF**),
  - **attivano S-Cdk** → **replicazione del DNA**.

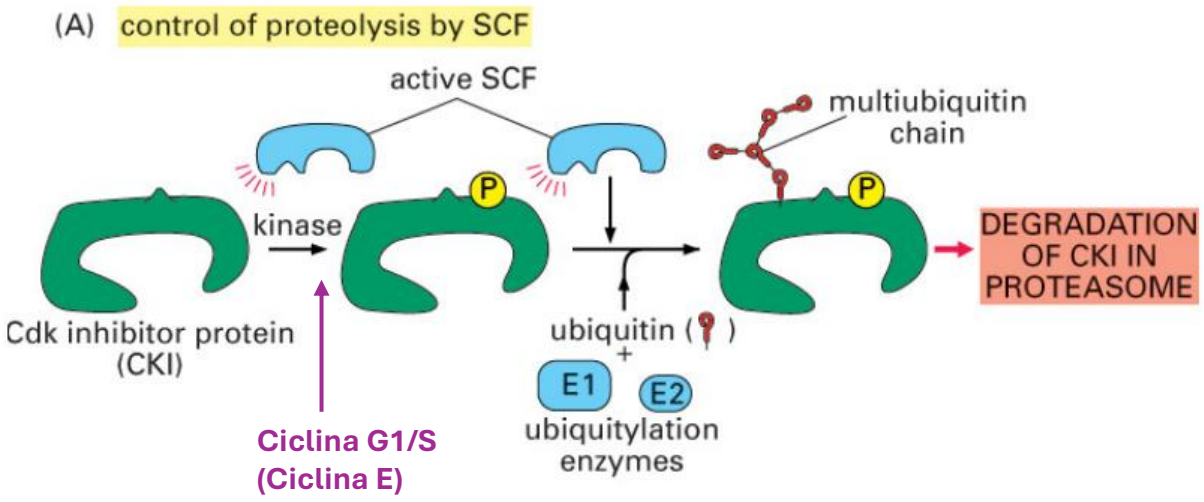


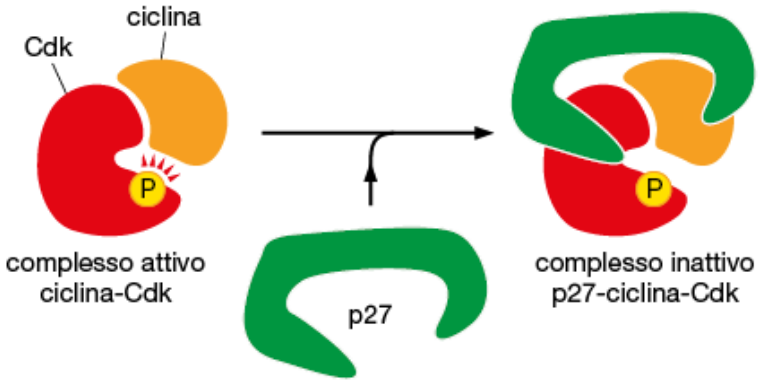
Modulo	Stato	Target principali	Effetto
APC/C-Cdc20	Metafase → Anafase	**Securina**, **cicline M/S**	Separazione cromatidi; **Cdk↓**
APC/C-Cdh1	Anafase tardiva → **G1**	**Cicline** e altri regolatori	Mantiene **Cdk LOW**
SCF	**Costante**, azione in **G1 tardiva/S**	**CKI** (es. Sic1), **G1/S-cicline**	Attiva **S-Cdk**, pulizia di G1/S

L’altra ubiquitina-ligasi del ciclo: SCF regola l’ingresso in fase S

L’altra ubiquitina-ligasi del ciclo: SCF

- **Ruolo principale in G1 tardiva**. È **cruciale** per la regolazione di processi cellulari come la **trascrizione genica** e la **replicazione del DNA**.
- **Ubiquitina CKI** selezionate → facilita **attivazione S-Cdk (Ciclina A-Cdk2)** e **ingresso in S**.
- **Distrugge** anche le **G1/S-cicline** in **(Ciclina E-Cdk2/1) S precoce**.
- Marcano proteine come **p27, p21**, **ciclina E, ciclina A** e **Cdc25a** per la degradazione, svolgendo un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare.
- **Specificità** data dalle **subunità F-box** (riconoscono **substrati fosforilati** in modo specifico).
- **Attività SCF**: **costante** nel ciclo; è il **substrato** che “dice quando” (via **fosforilazione**).





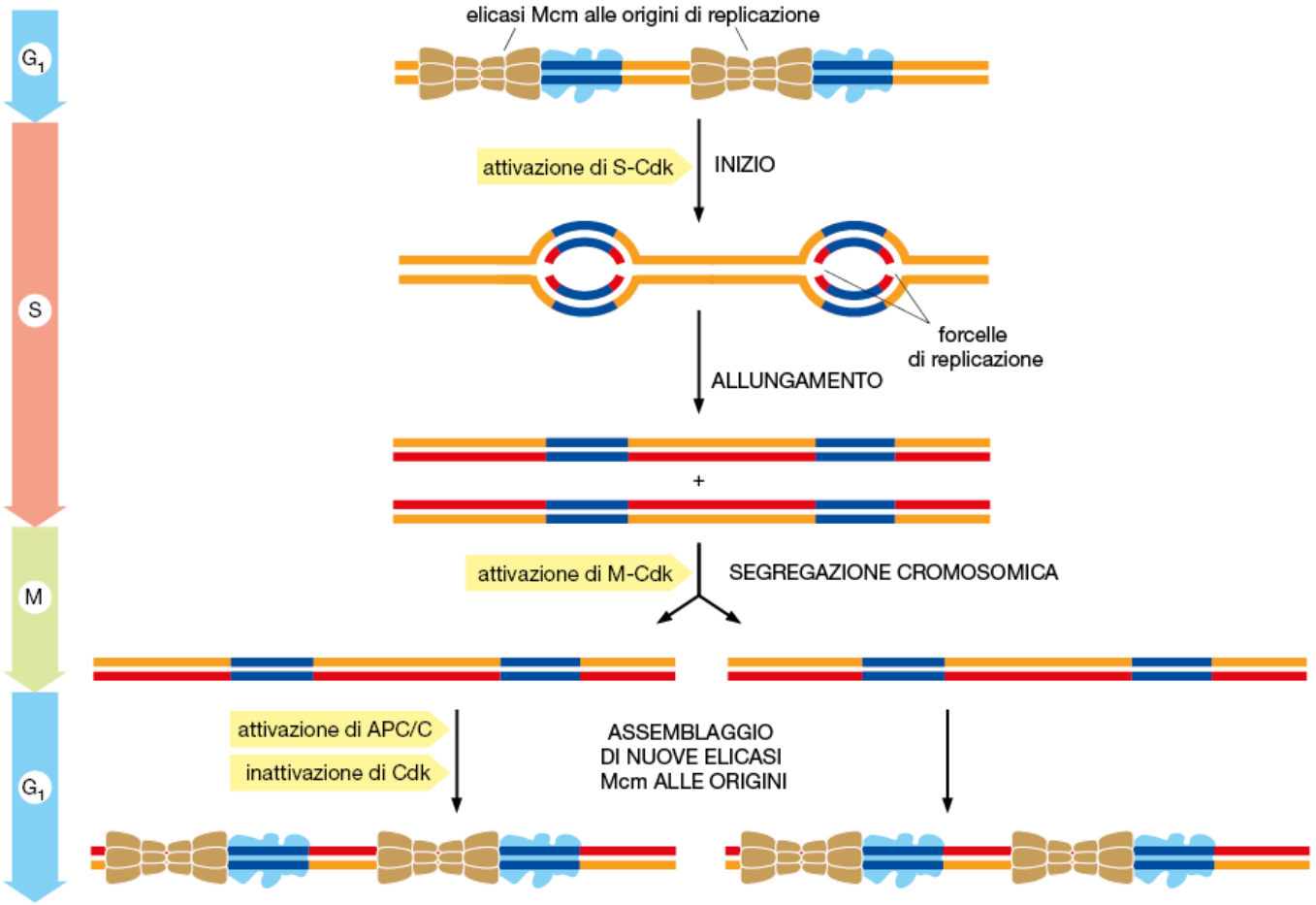
Fase S: Duplicazione fedele del genoma

Fase S: Duplicazione fedele del genoma

- I **cromosomi eucariotici** sono complessi dinamici **DNA + proteine (cromatina)**.
- La duplicazione richiede:
  - **Replicazione accurata del DNA** (minimizzare mutazioni),
  - **Copia una-sola-volta** di ogni nucleotide (evitare amplificazioni),
  - **Ripristino della struttura di cromatina** (eredità delle caratteristiche epigenetiche/architetturali).

Problemi da risolvere

- **Accuratezza** (errori → mutazioni): demandata al **replisoma**.
- **Una sola volta per ciclo**: richiesta al **sistema di controllo del ciclo** (regola **licensing vs firing**).



S-Cdk (Ciclina A-Cdk2) avvia la replicazione UNA sola volta per ciclo

Origini di replicazione e forcelle

- La **replicazione** parte alle **origini multiple** per cromosoma.
- **Inizio (initiation)**: **elicasi DNA (Mcm)** separa i filamenti, si caricano gli enzimi di replicazione.
- **Allungamento (elongation)**: **avanzano due forcelle** opposte.

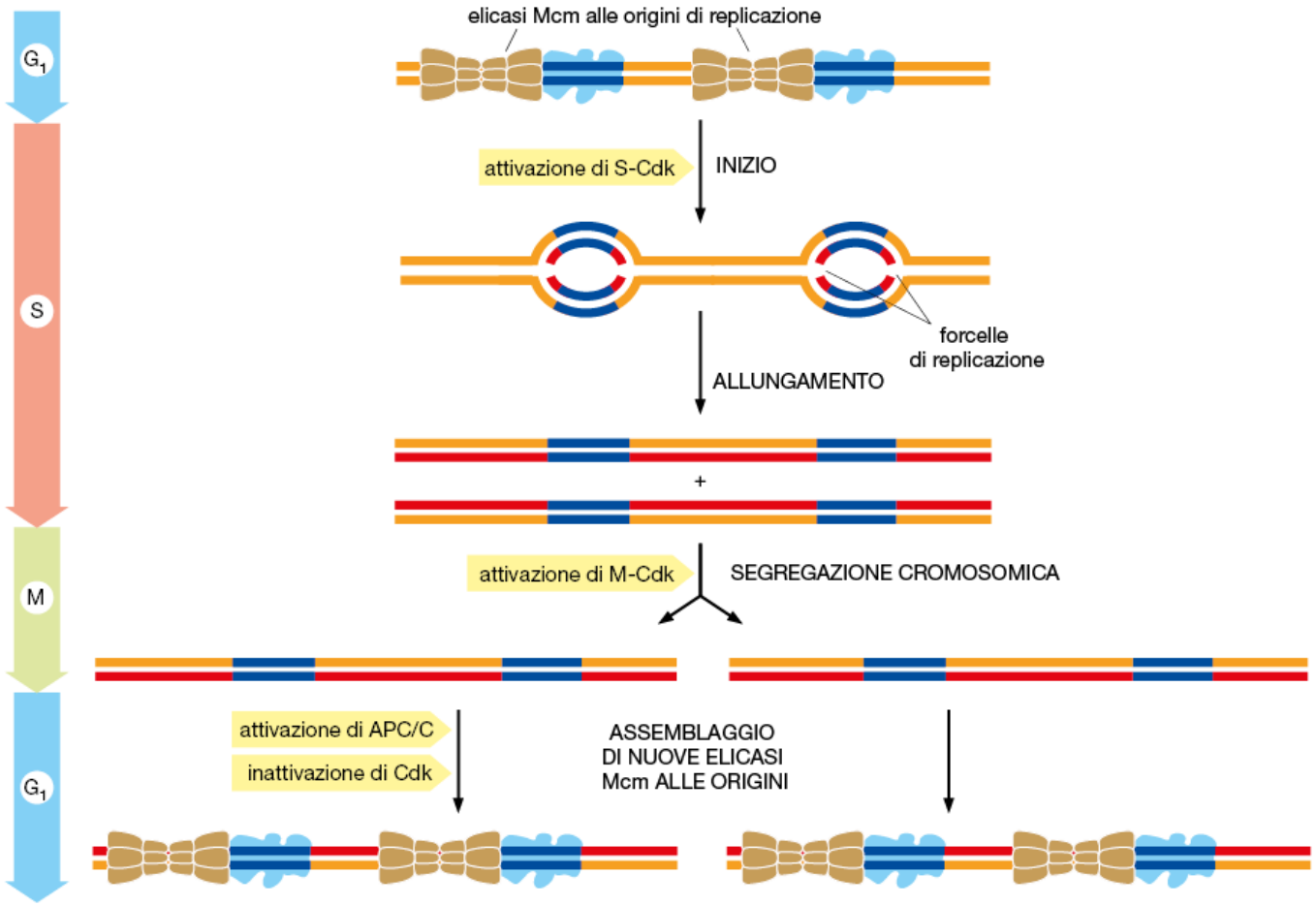
Strategia "in due passaggi"

Passaggio A — Licensing (abilitazione):

- **Quando: mitosi tardiva / G1 precoce**.
- **Cosa:** si **caricano due elicasi Mcm inattive** sull'origine → **origine abilitata**.
- **Esito: l'origine è pronta ma non parte** finché non viene attivata.

Passaggio B — Firing (attivazione):

- **Quando: inizio Fase S**.
- **Chi: S-Cdk (Ciclina A-Cdk2) attivano Mcm** → apertura della doppia elica → **reclutamento replisoma** → **avvio sintesi DNA**.
- **Vincolo chiave:** un'origine **attivata non è più riutilizzabile** fino a nuovo licensing (solo **fine M/G1**).



Prevenire il re-licensing

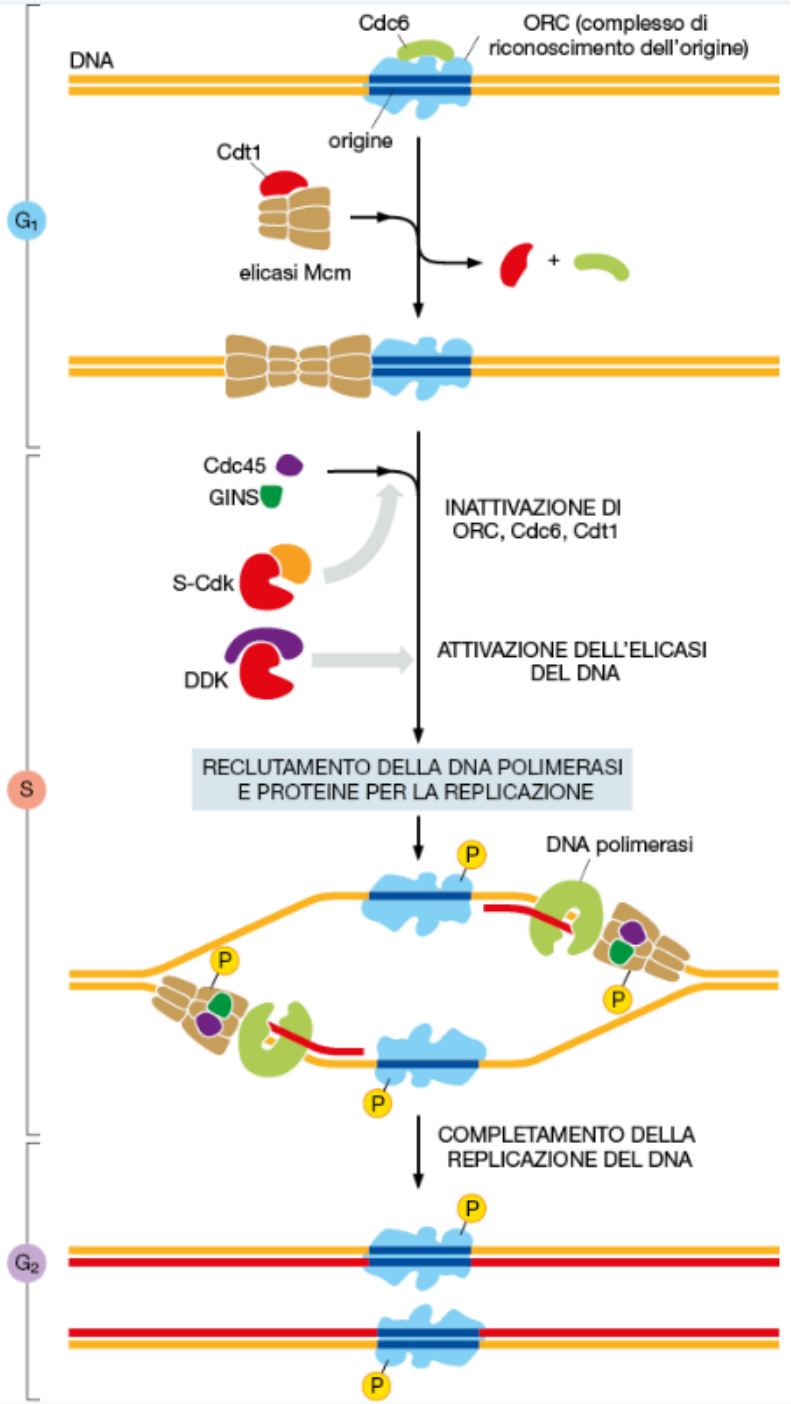
Evitare che si replichi regioni del DNA già duplicate

Licensing (M tardiva/G1 precoce)

- **ORC** (Origin Recognition Complex): si lega alle origini.
- **Cdc6** e **Cdt1**: assistono ORC nel **caricamento** dell'elicasi **Mcm** (Mcm2-7) **attorno al DNA**.
- **Esito: pre-RC** (pre-Replication Complex) formato; origine **abilitata**.

Attivazione (inizio S)

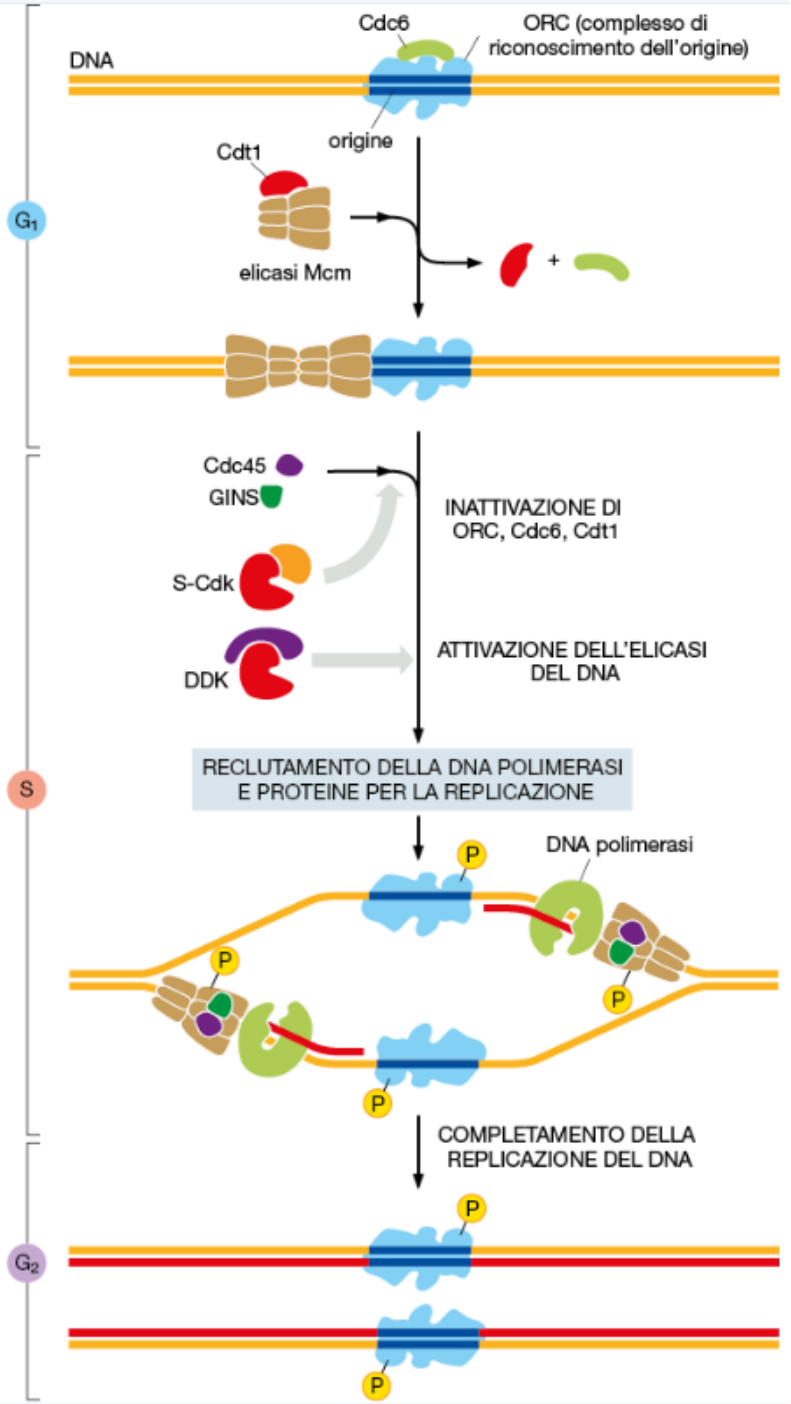
- **S-Cdk (Ciclina A-Cdk2)**: fosforila **proteine accessorie** che **attivano Mcm** all'origine.
- **DDK** (Dbf4-dependent kinase): **fosforila subunità Mcm** → **cooperazione con S-Cd**k.
- **Conseguenze:**
  - **Separazione** dei due filamenti,
  - **Caricamento elicasi attive** su **entrambi** i filamenti,
  - **Reclutamento** del **macchinario di sintesi** e **inizio** della replicazione.



Prevenire il re-licensing

Blocchi multipli da S a metà M

- **S-Cdk (ciclina A-Cdk2) inibisce** il **ricaricamento di Mcm**:
- **Fosforila ORC** e **Cdc6** → **inattivazione**.
- **APC/C-Cdh1 OFF in G1 tardiva** → **geminina si accumula** → **inibisce Cdt1 non** legata al DNA.
- **CRL4–Cdt2** (ubiquitina-ligasi) all'**origine/forcella**:
- **Cdt1** associata alle forcelle attive → **ubiquitinazione** → **degradazione** (dipende dal contesto di caricamento/PCNA).
- **Sintesi:** da **S** a **metà mitosi**, il **caricamento Mcm** è **bloccato** su più fronti.



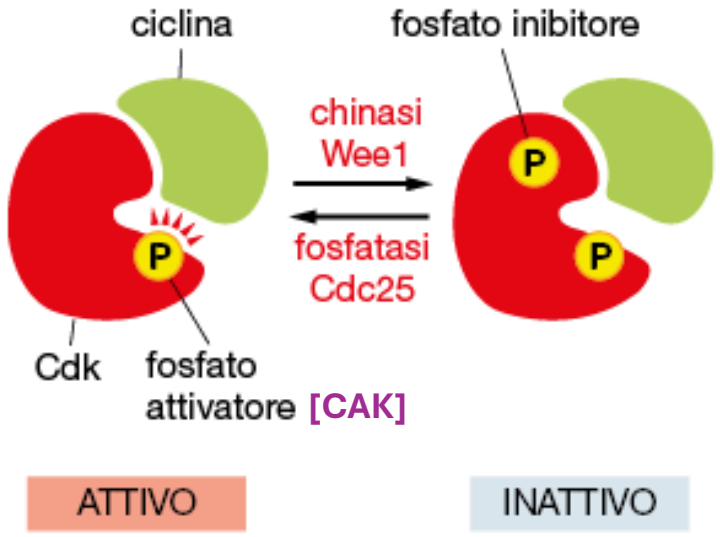
Meccanismi di attivazione M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)

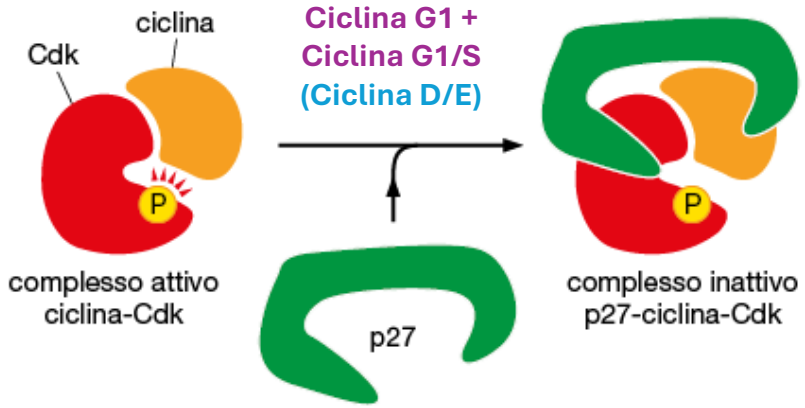
Fosforilazioni regolatorie inibitorie/attivanti

- **Fosforilazione CAK** (Cdk-Activating Kinase) su residuo di **treonina** dell'ansa T → **attivazione completa** (migliora il legame ai substrati). Sempre **attiva durante il ciclo**.
- **Wee1** (chinasi): aggiunge **fosfati inibitori** vicino al sito attivo → **spegne** il complesso **ciclina-Cdk attivo.**
- **Cdc25** (fosfatasi): **rimuove** questi **fosfati inibitori** → **ri-attiva** la **Cdk**.
- Particolarmente cruciale per **M-Cdk (Ciclina B/Cdk1)** all'**inizio della mitosi** (switch rapido/irreversibile).

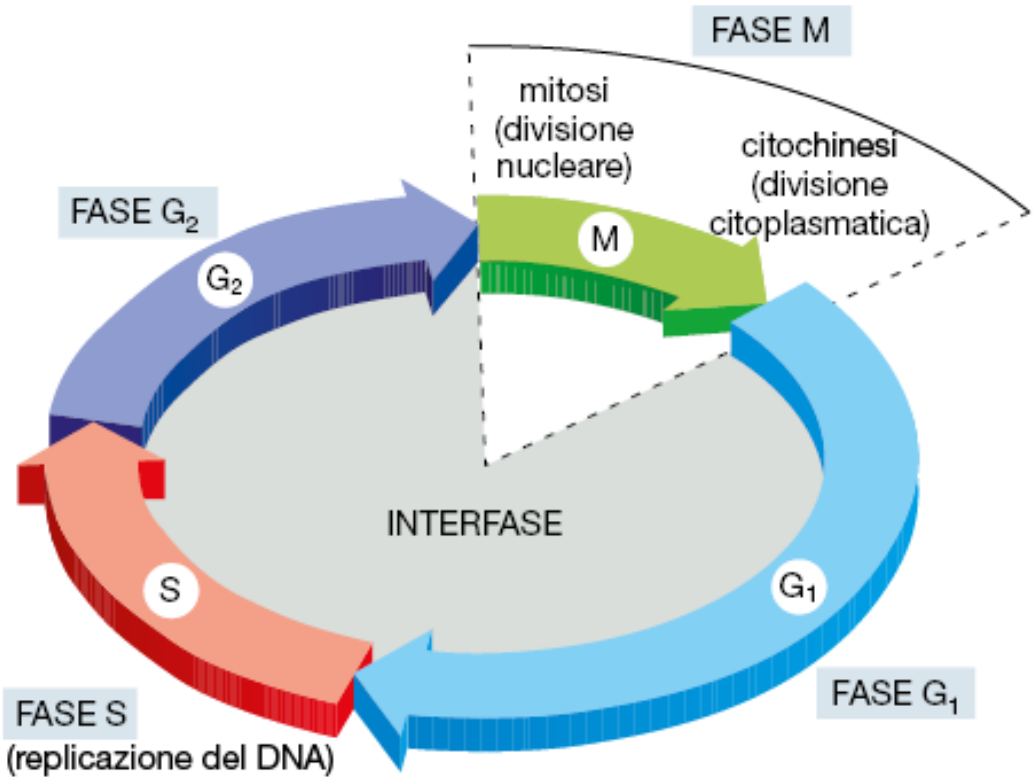
Inibizione tramite CKI (Cdk Inhibitor proteins)

- **CKI** (piccole proteine) si **avvolgono** attorno al **complesso ciclina-Cdk**, ne **ristrutturano** il sito attivo → **inattivo**.
- Importanti all'**inizio del ciclo** per regolare **G1/S-Cdk (Ciclina E/Cdk2)** e **S-Cdk (Ciclina A/Cdk2)**.





La Mitosi



La Mitosi — divisione del nucleo

- Dopo **fase S** e **G2**, la cellula entra nella **fase M**.
- La **mitosi** separa i **cromatidi fratelli** in due **nuclei figli** geneticamente identici.
- Segue la **citochinesi**, che divide la cellula in due metà equivalenti.
- → Entrambi gli eventi completano la **riproduzione cellulare**.

Le due grandi fasi regolative della mitosi

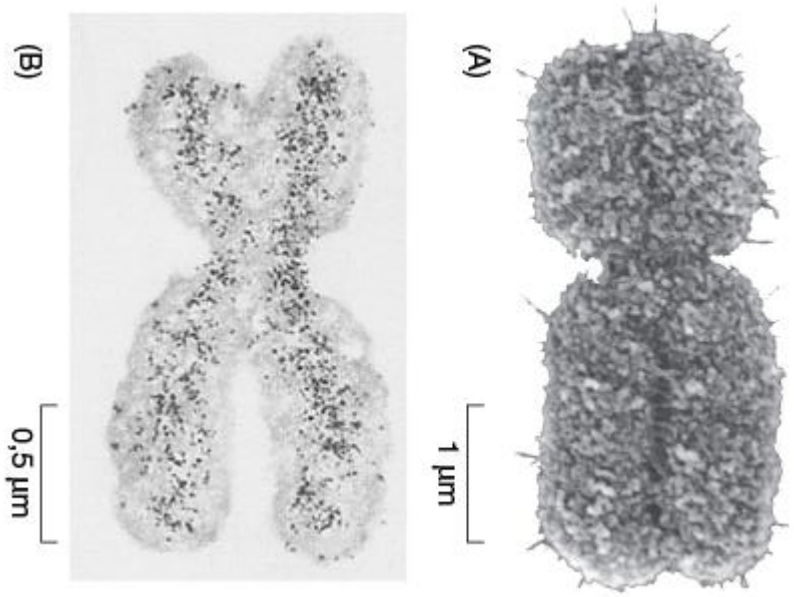
1. Mitosi precoce (profase → metafase)

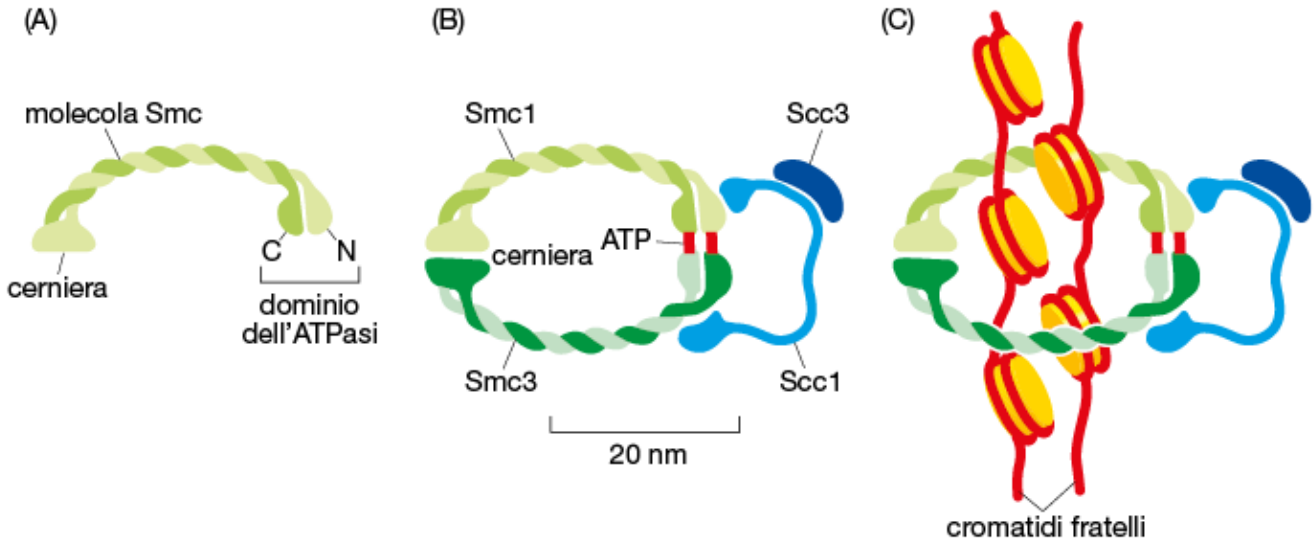
- **Guidata** da **M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)**.
- Fosforilazione diffusa di proteine → **condensazione cromosomi, assemblaggio fuso, attacco ai cinetocori**.

2. Mitosi tardiva (anafase → telofase + citochinesi)

- **Guidata** da **APC/C**.
- **Degradazione securina** → separazione cromatidi.
- **Distruzione cicline M → inattivazione Cdk → defosforilazione bersagli → riformazione nuclei, divisione cellulare**.

Coesione dei cromatidi fratelli: Il complesso coesina





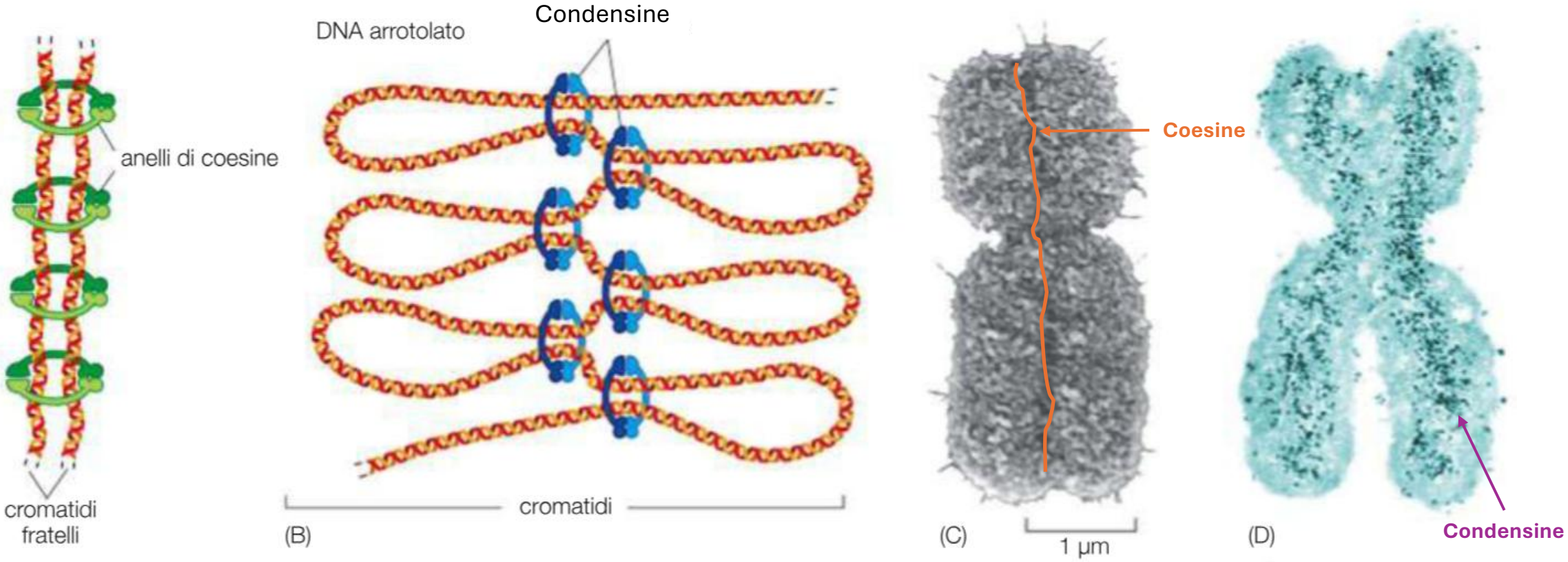
Perché la coesione è essenziale

- A fine **Fase S**, ogni **cromosoma replicato** è una **coppia di cromatidi fratelli uniti lungo l'asse**.
- La **coesione** facilita l'**attacco bipolare** al fuso mitotico e la **segregazione fedele**.
- **Difetti di coesione** (mutanti di lievito) → **errori di segregazione** cromosomica.

Il complesso coesina

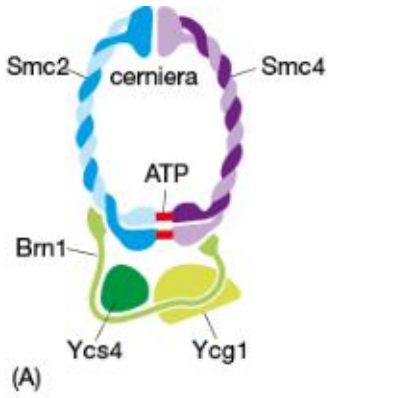
- Grande complesso ad **anello** che **circonda** i **due cromatidi fratelli**.
- **Caricamento**: prima della **Fase S**, con un **complesso di caricamento** dedicato.
- **Durante la replicazione**, l'anello **rimane in sede** mentre passa la forcella e **abbraccia** la coppia neo-sintetizzata.
- In **Fase S**, una **acetiltransferasi** modifica una sottopopolazione di coesine → **anello bloccato** per **coesione stabile** fino alla mitosi.

Relazione tra Coesina e Condensina

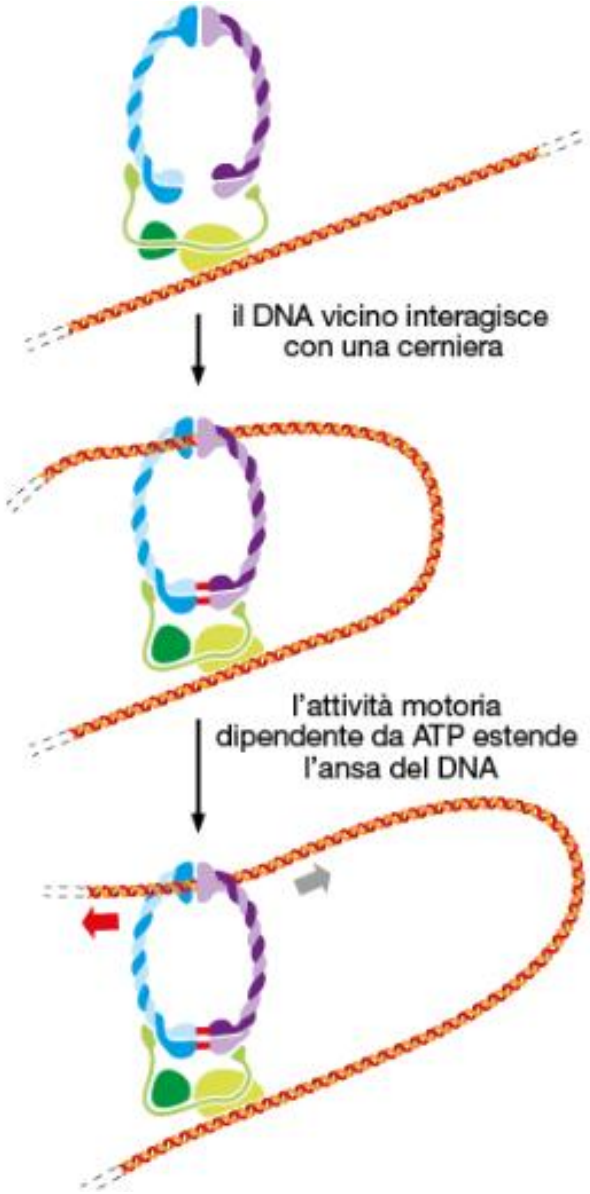


- **Le Coesine legano assieme due cromatidi fratelli in ogni cromosoma duplicato.**
- **Le Condensine promuovono il compattamento del dei filamenti di DNA di ogni cromatide.**

Meccanismo d'azione della Condensina

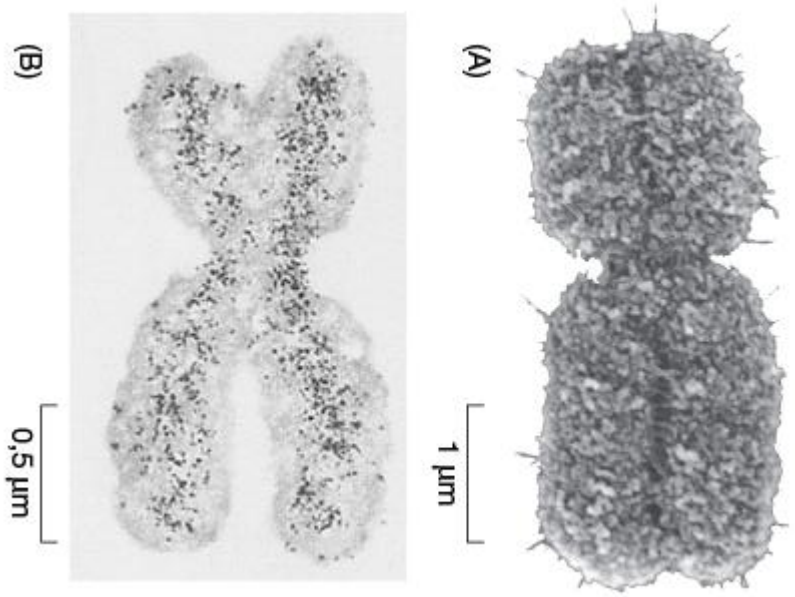


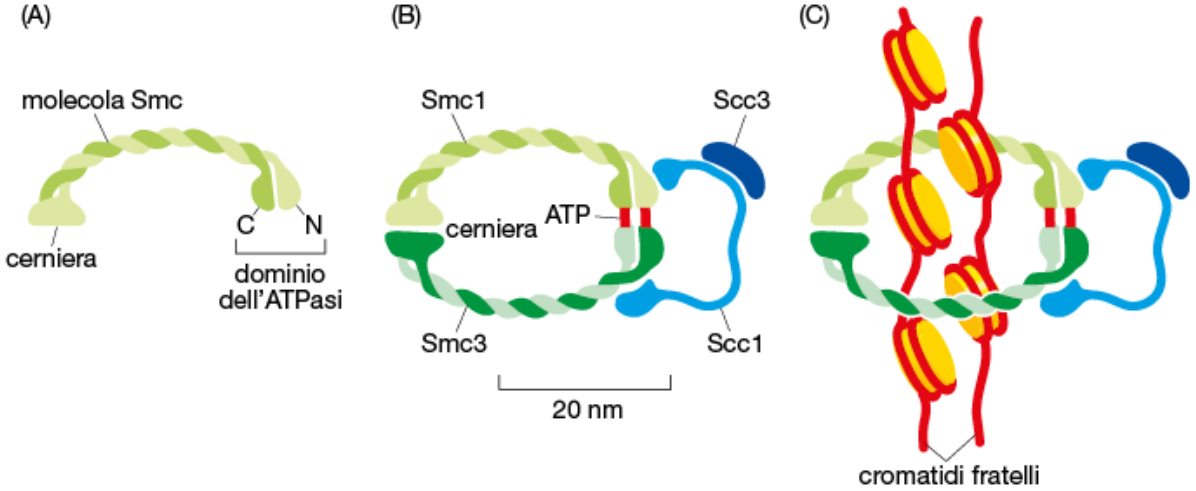
le subunità non SMC di condensina si legano saldamente al DNA



- La coesione deriva **anche** dall'**intreccio** (catenazione) delle **molecole sorelle** di DNA quando **le forcelle si incontrano**.
- La **condensina** ripiega ed **impacchetta il DNA** di un cromosoma in una **struttura altamente compatta**, sfruttando **l'idrolisi di ATP** e la creazione di **anse**
- **Topoisomerasi II districa** gradualmente i **DNA fratelli** tra **Fase S** e **mitosi precoce**:

Meccanismo d'azione della Coesina e Separazione Cromatidi Fratelli





- **ATP**: legame promuove l'interazione degli ATPasi; **idrolisi** favorisce la **dissociazione**.
- **Carico/scarico** della coesina richiede **idrolisi di ATP** e **apertura** di un varco intersubunità (ancora poco compreso).
- In **Fase S**, **acetilazione di Smc3** impedisce l'**apertura** dell'anello → **coesione bloccata**.
- In **metafase**, **taglio proteolitico** di **Scc1** nella regione disordinata → **separazione dei cromatidi**

Decatenazione del DNA: ruolo di topoisomerasi II

- La coesione deriva **anche** dall'**intreccio** (catenazione) delle **molecole sorelle** di DNA quando **le forcelle si incontrano**.
- **Topoisomerasi II districa** gradualmente i **DNA fratelli** tra **Fase S** e **mitosi precoce**:

M-Cdk e chinasi mitotiche: ingresso nella mitosi

Logica funzionale dell'ingresso in mitosi

1. **M-Cdk ON (Ciclina B-Cdk1)**→ attiva Plk/Aurora → fosforila substrati mitotici.
2. **Fuso mitotico** assemblato, **involucro nucleare** disassemblato.
3. **Condensina attiva** → compattamento cromosomi.
4. **Coesina parzialmente rimossa** → cromatidi risolti ma uniti ai centromeri.
5. **Cromosomi** pronti per l'**allineamento metafasico** e la **segregazione**.

1 M-Cdk (Ciclina B-Cdk1): il direttore d'orchestra della mitosi

- Una **sola proteina chinasi (Ciclina B-Cdk1)** coordina molteplici trasformazioni cellulari.
- **Eventi chiave scatenati da M-Cdk:**
  - **Assemblaggio del fuso mitotico** e separazione dei poli.
  - **Condensazione dei cromosomi**.
  - **Demolizione dell'involucro nucleare**.
  - **Riorganizzazione del citoscheletro di actina** e **frammentazione del Golgi**.
- Ogni processo è attivato tramite **fosforilazione di substrati specifici**.

M-Cdk e chinasi mitotiche: ingresso nella mitosi

2 M-Cdk (Ciclina B-Cdk1) : effetto diretto e indiretto

- **Diretto: fosforila proteine** strutturali e regolatrici **coinvolte nei processi mitotici**.
- **Indiretto: attiva altre chinasi secondarie** che amplificano e specificano la risposta.

Due famiglie di chinasi mitotiche principali:

- **Plk (Polo-like kinase)**
- **Aurora kinases**

3 Famiglie di chinasi mitotiche

Famiglia	Isoforme principali	Funzione mitotica	Effetto regolativo
Plk	Plk1 (mammiferi)	Assemblaggio del fuso bipolare; separazione dei poli mitotici	Fosforila proteine dei centrosomi e del fuso
Aurora A	-	Controllo dell'assemblaggio e stabilità del fuso	Regola proteine microtubulari ai poli
Aurora B	-	Correzione dell'attacco dei cromatidi al fuso; checkpoint del fuso	Regola coesina e cinetocore

M-Cdk e chinasi mitotiche: ingresso nella mitosi

4 Sintesi regolativa

- **M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)** attiva e coordina:
  - **Organizzazione microtubulare** (fuso + poli),
  - **Rimodellamento nucleare e citoplasmatico**,
  - **Condensazione e risoluzione cromosomica**.

Con M-Cdk in stato attivo, la cellula entra irreversibilmente nella mitosi precoce.

5 Necessità della riorganizzazione

- Alla fine della **Fase S**, i cromatidi fratelli sono **aggrovigliati** in una massa di DNA e proteine.
- La cellula investe notevole energia per:
  - **Condensare i cromatidi,**
  - **Risolverli** in strutture distinte.
- Entrambi i processi avvengono nella **mitosi precoce**, prima della metafase.
- **Dipendono da M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)** e da complessi **condensina** e **coesina**.

M-Cdk e chinasi mitotiche: ingresso nella mitosi

6 Condensazione dei cromosomi

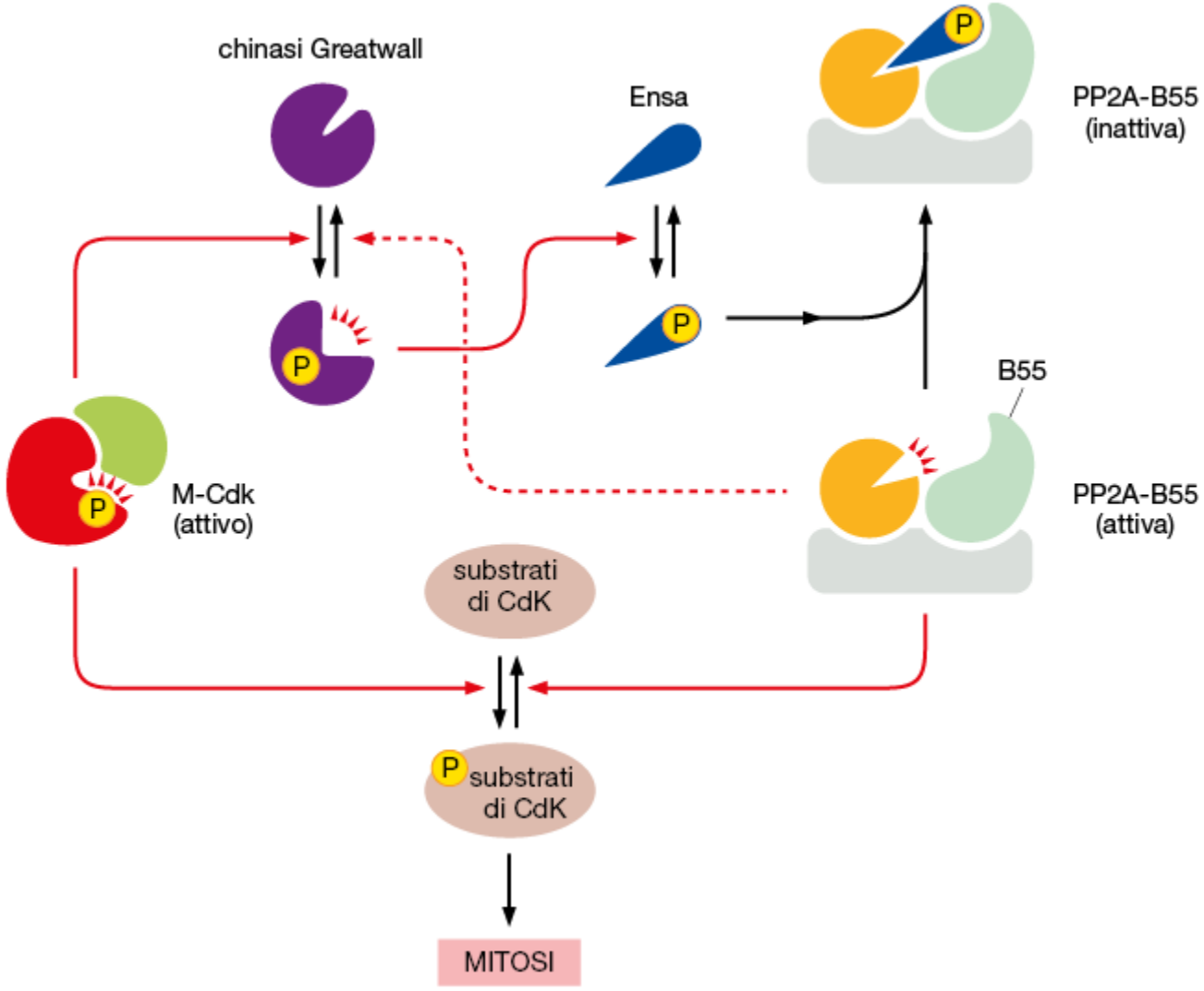
- **Compattamento** dei **cromatidi** in bastoncelli corti e densi.
- **Favorisce** la **manipolazione meccanica** da parte del fuso mitotico.
- Richiede **fosforilazione di istoni H1 e H3** e **attivazione della condensina**.
- **È un processo dinamico e reversibile**, che culmina in metafase

7 Risoluzione dei cromatidi fratelli

- **Separazione graduale dei due cromatidi fratelli** in **unità distinte**, pur mantenendo coesione centromerica.
- Coinvolge **il districamento del DNA** (**Topoisomerasi II**) e la **rimozione parziale della coesina** dai bracci.
- A **metafase**: cromatidi compatti, uniti solo nel **centromero**.

Caratteristica	Condensina	Coesina
Struttura	Anello SMC2/4 + 3 subunità non-SMC	Anello SMC1/3 + Scc1 + Scc3
Momento d'azione	Mitosi precoce (condensazione)	Fase S → Anafase (coesione)
Funzione	Compatta e risolve i cromatidi	Tiene uniti i cromatidi fratelli
Regolazione	Attivata da **M-Cdk** (fosforilazione)	Tagliata da **separasi** in anafase

Fosfatasi e switch del ciclo



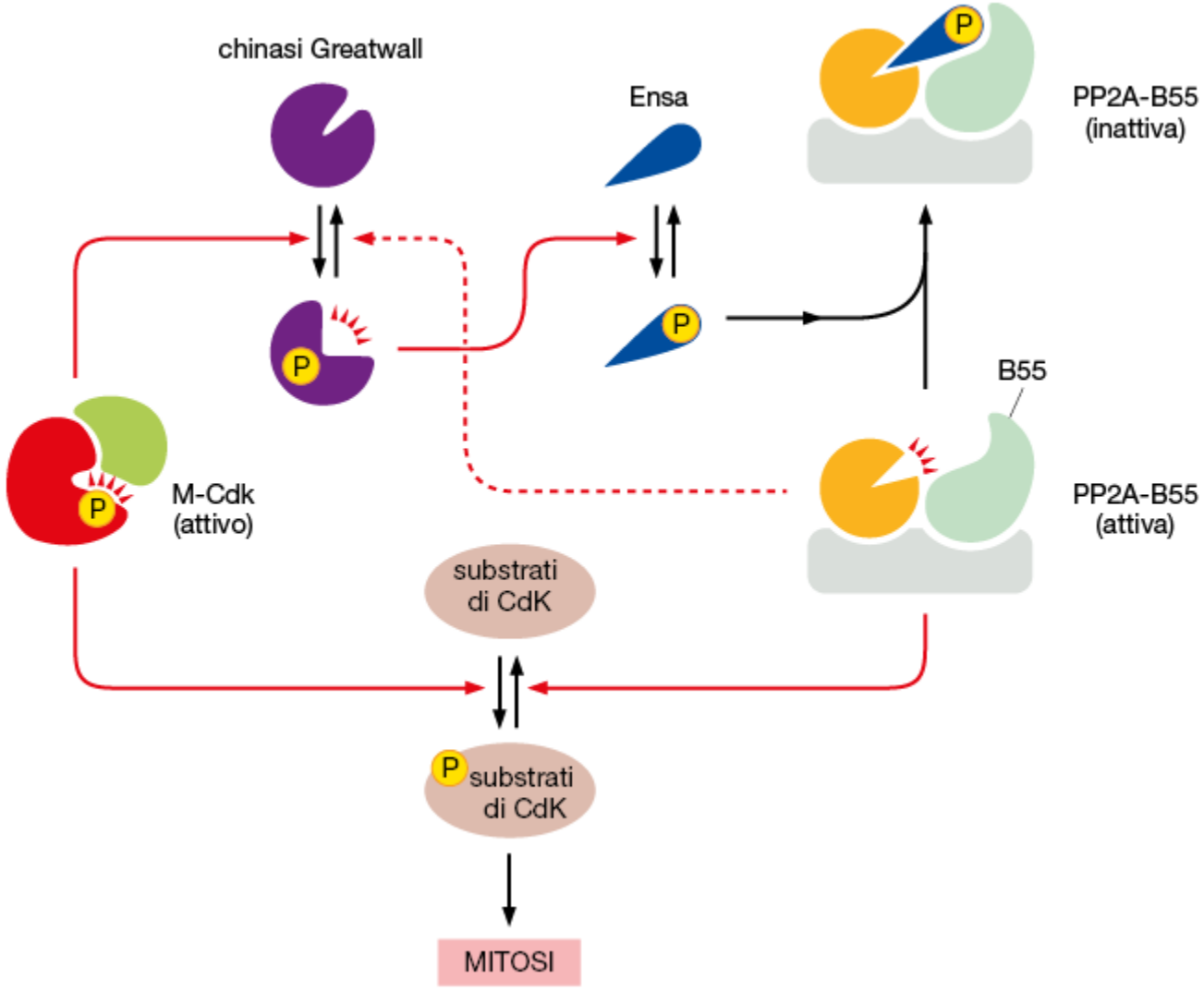
Le fosfatasi invertono gli effetti delle Cdk

- La fosforilazione proteica dipende da un **equilibrio dinamico**
- Durante l'**ingresso in mitosi**, **l'attività fosfatasica diminuisce** mentre aumenta quella di **Cdk** → **incremento netto** della fosforilazione.

PP2A come regolatore cardine

- **PP2A**: fosfatasi eterotrimerica, con subunità regolatoria **B** che determina **substrati, localizzazione, regolazione**.
- Subunità **PP2A-B55** e **PP2A-B56**: le più rilevanti.

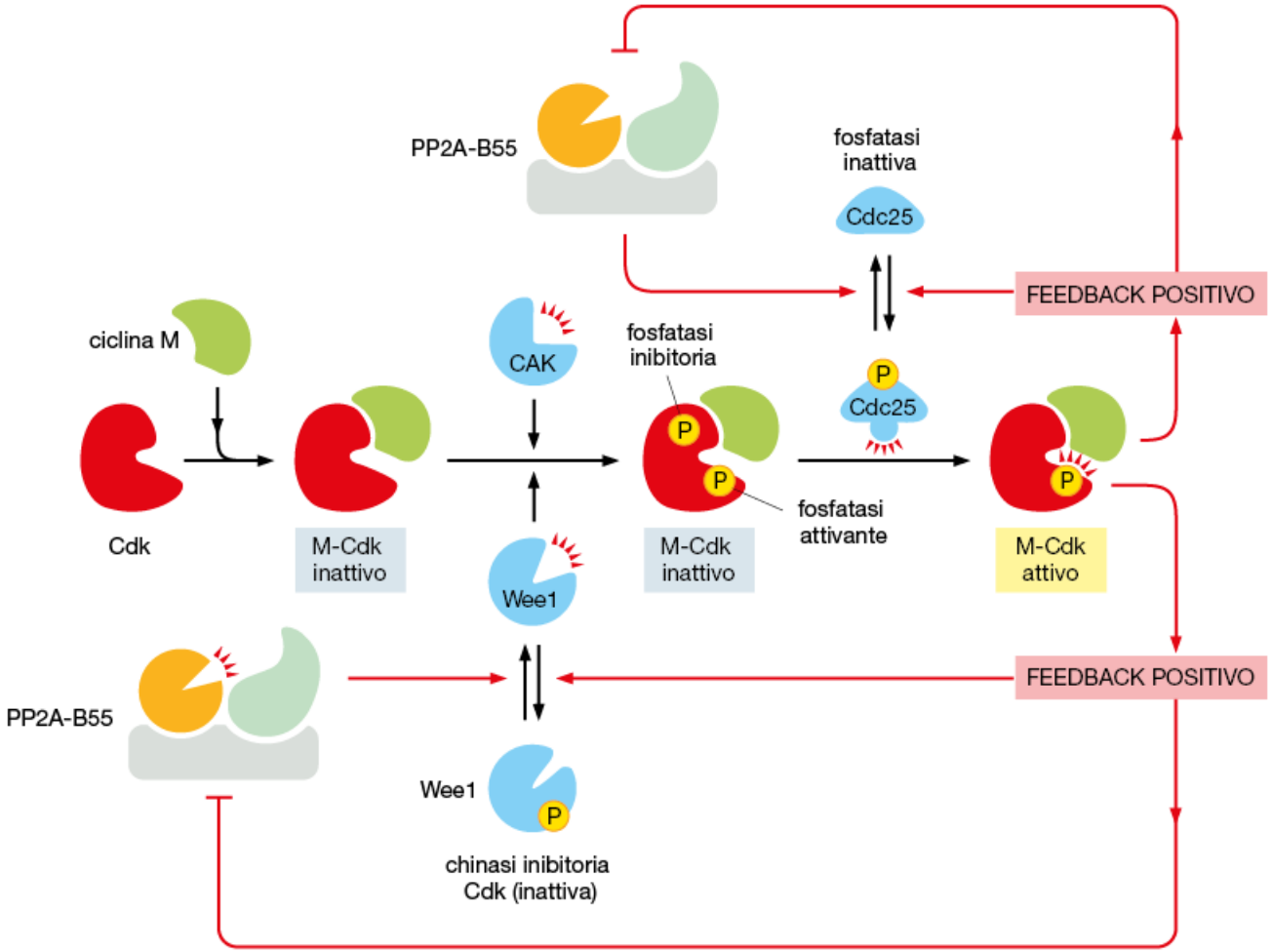
PP2A come regolatore cardine



La subunità PP2A-B55:

- **PP2A è alta in interfase**, poi **inibita** all'**inizio della mitosi** (quando sale **M-Cdk**).
- **Meccanismo**: **M-Cdk** (**Ciclina B-Cdk1**) → **fosforila Greatwall** → Greatwall **fosforila Ensa** → **Ensa-P** si lega a **PP2A-B55** e **la inibisce**.
- **Risultato**: **M-Cdk "spegne** il suo avversario" → rapida **fosforilazione** dei bersagli mitotici.
- **In anafase/telofase, quando calano le cicline M, PP2A-B55 si riattiva** → **defosforilazione** rapida dei **bersagli Cdk** e **uscita dalla mitosi**.
- **Feedback**: **PP2A-B55** può **defosforilare Greatwall** → **inibisce il proprio inibitore** (circuito di **feedback positivo**).

PP2A come regolatore cardine



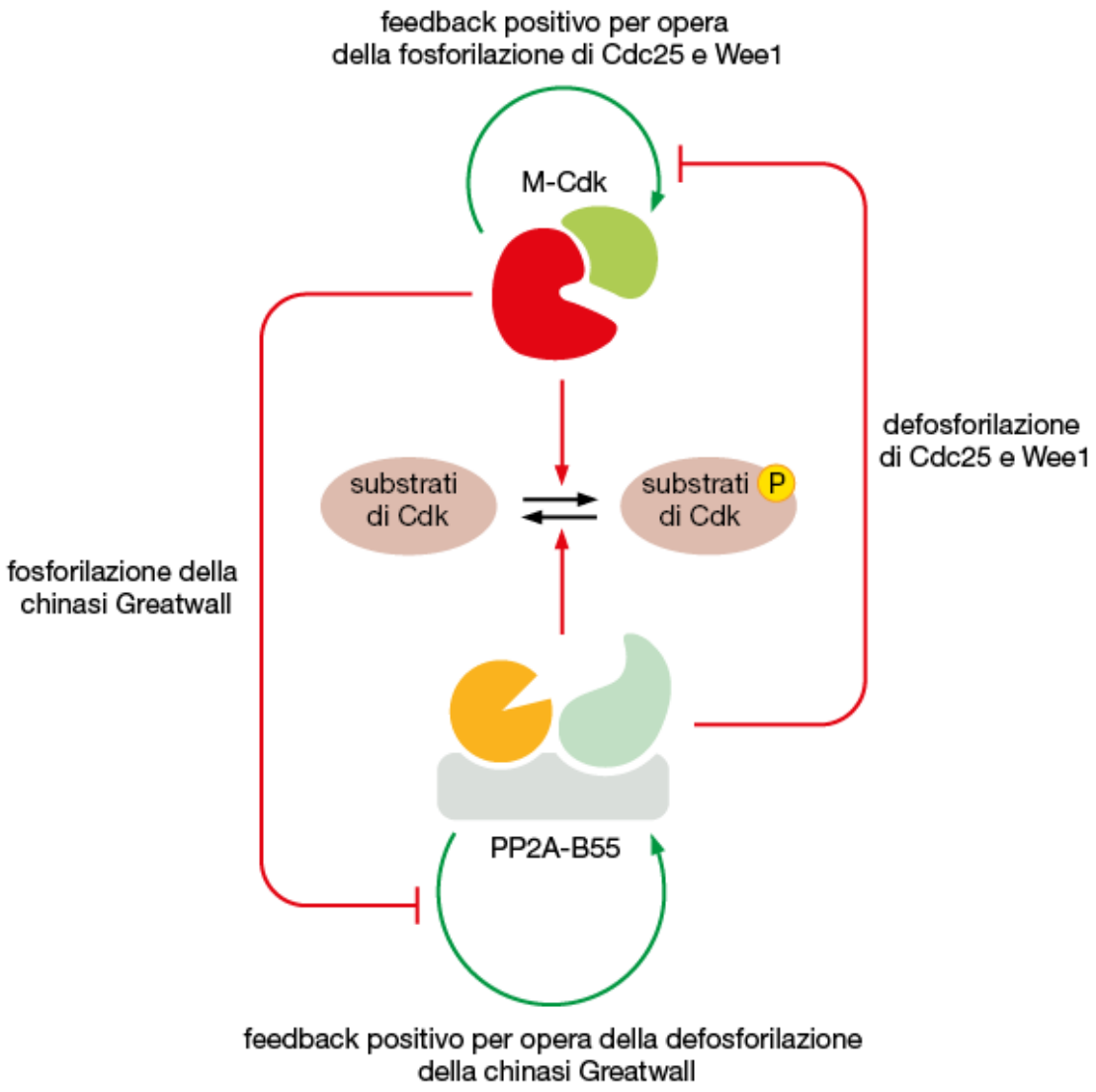
Feedback positivo = interruttori "tutto o niente"

- Le transizioni chiave del ciclo sono **binari** e **irreversibili**.
- **Feedback positivo** = strategia per generare **switch robusti**.

Ingresso in mitosi: attivazione di M-Cdk

- **In G2** si accumulano **complessi M-Cdk pronti ma inattivi** (CAK attiva il sito T-loop; **Wee1** aggiunge **P inibitori**).
- **Innesco**: **Cdc25** (fosfatasi) rimuove i P **inibitori** da M-Cdk → piccola quota di **M-Cdk attivo**.
- **Circuito ON**:
  - **M-Cdk attivo → attiva Cdc25** (**attiva il proprio attivatore**).
  - **M-Cdk attivo → inibisce Wee1** (**inibisce il proprio inibitore**).
  - **PP2A-B55** tende a spegnere Cdc25 e a **riattivare** Wee1 (de-P), **ma** viene **inibita** dalla via **Greatwall/Ensa-P**.

Doppio feedback integrato: M-Cdk (Ciclina B-Cdk1) e PP2A-B55



Doppio feedback integrato

- **Antagonismo reciproco**: **M-Cdk** ↔ **PP2A-B55**
  - **M-Cdk (Ciclina B-Cdk1) inibisce PP2A-B55** (via Greatwall/Ensa-P).
  - **PP2A-B55 inibisce** attivazione di **M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)** (de-P **Cdc25**; de-P → **attiva Wee1**).
- Due **loop positivi collegati** tra loro → **switch biochimico robusto**, resistente a **fallimenti parziali**.

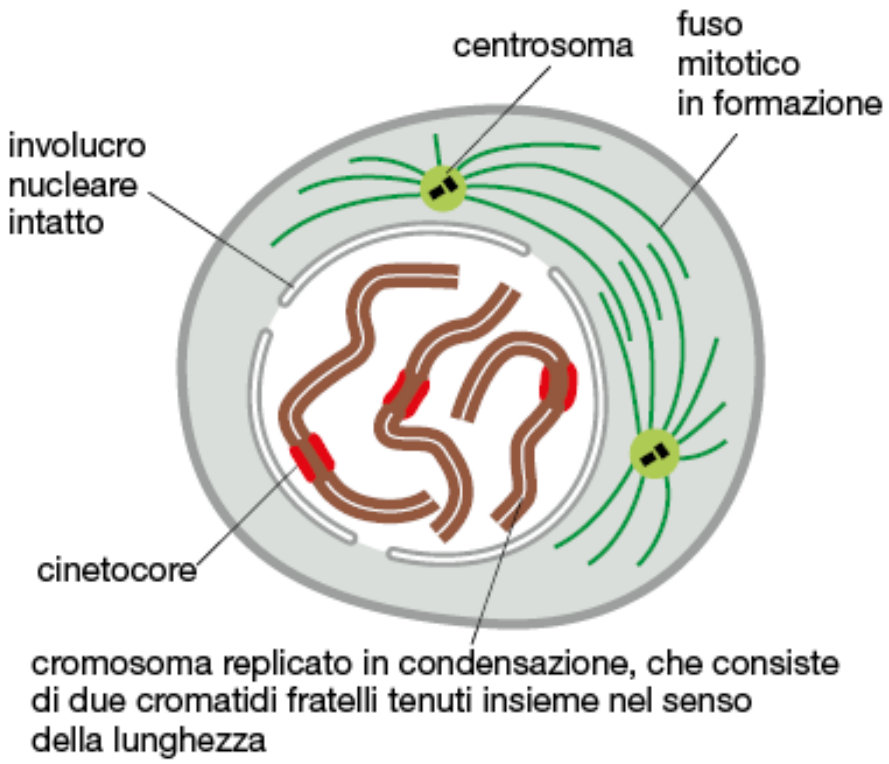
Uscita dalla mitosi: inversione dello switch

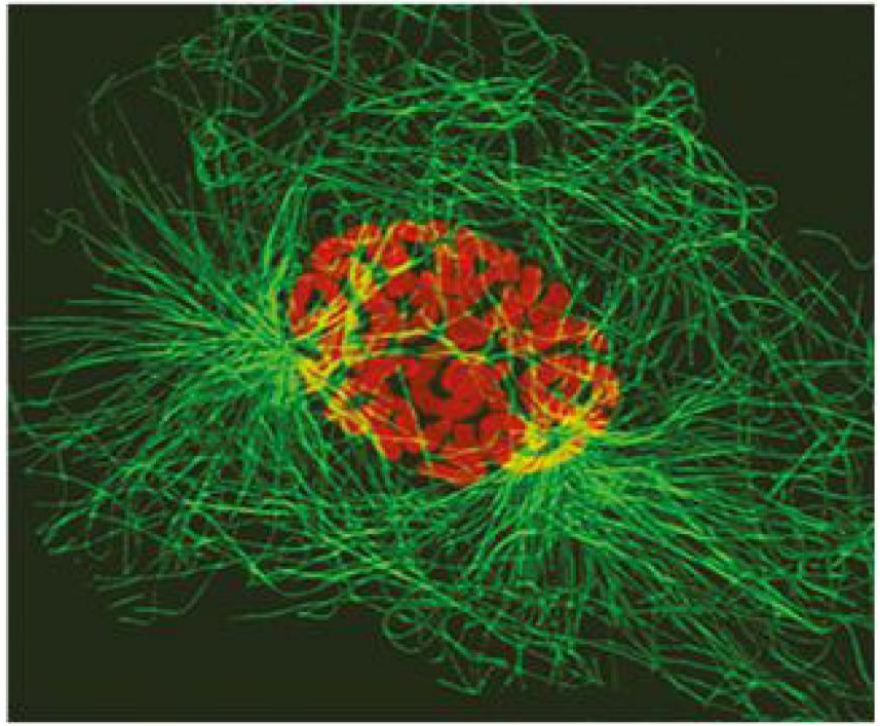
- **Anafase**: **distruzione delle cicline M (Ciclina B)**→ **M-Cdk↓**.
- I circuiti a **feedback** si **spengono**; **PP2A-B55 si riattiva** → **defosforilazione** dei substrati **di M-Cdk**.
- Conseguenze: **completamento della mitosi** e **citochinesi**.

Fasi della mitosi: PROFASE

- I **cromosomi replicati** si **condensano** → ciascuno con **2 cromatidi fratelli** uniti da **coesina.**
- I **centrosomi** (**già duplicati**) si **separano** → formano i **poli del fuso mitotico**.
- Il **fuso** inizia ad assemblarsi tra i due poli.

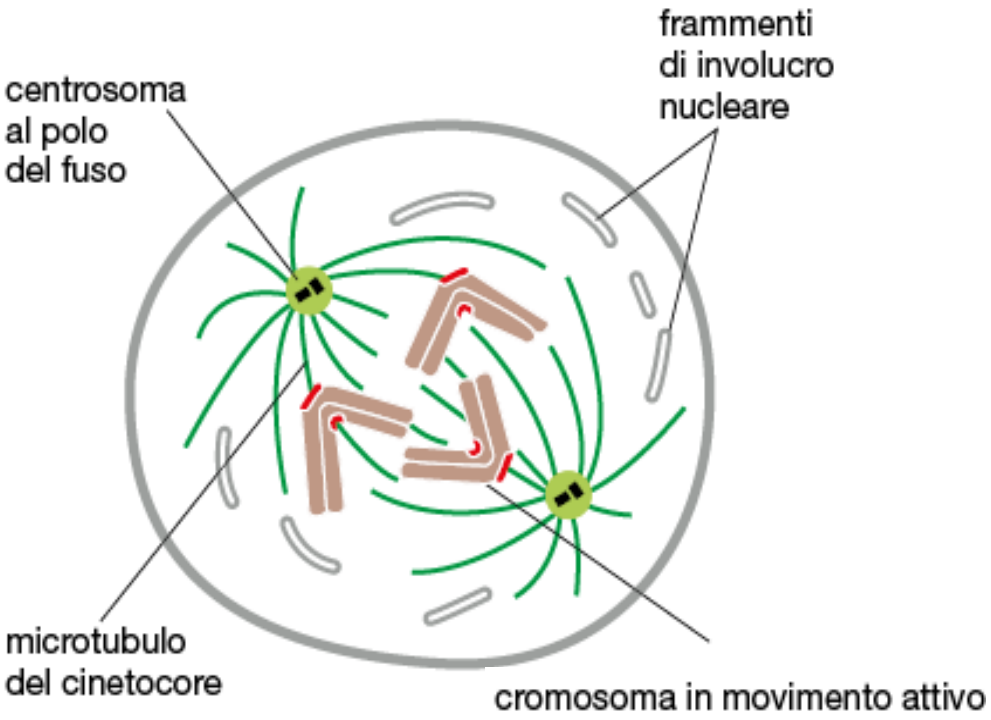
- *M-Cdk fosforila condensine e proteine del citoscheletro.*

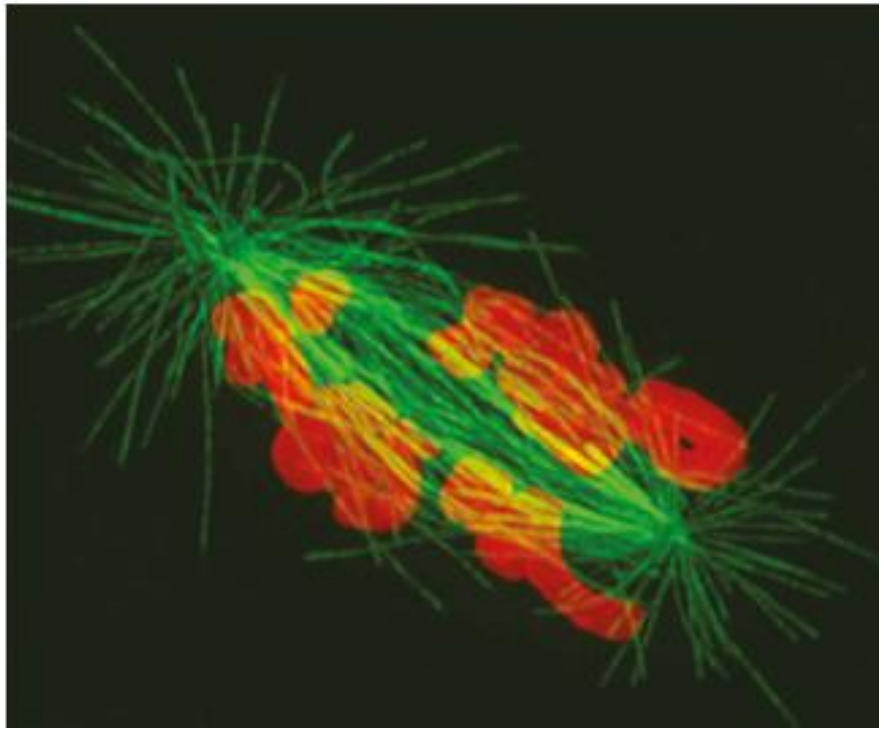




Fasi della mitosi: PROMETAFASE

- Inizio improvviso con la **demolizione dell'involucro nucleare**.
- I **microtubuli del fuso** ora possono **interagire** con i **cinetocori** (strutture proteiche sui centromeri).
- I **cromosomi** diventano **altamente mobili** → "danza dei cromosomi".
- **Attacco microtubuli-cinetocore** essenziale per successiva separazione corretta.

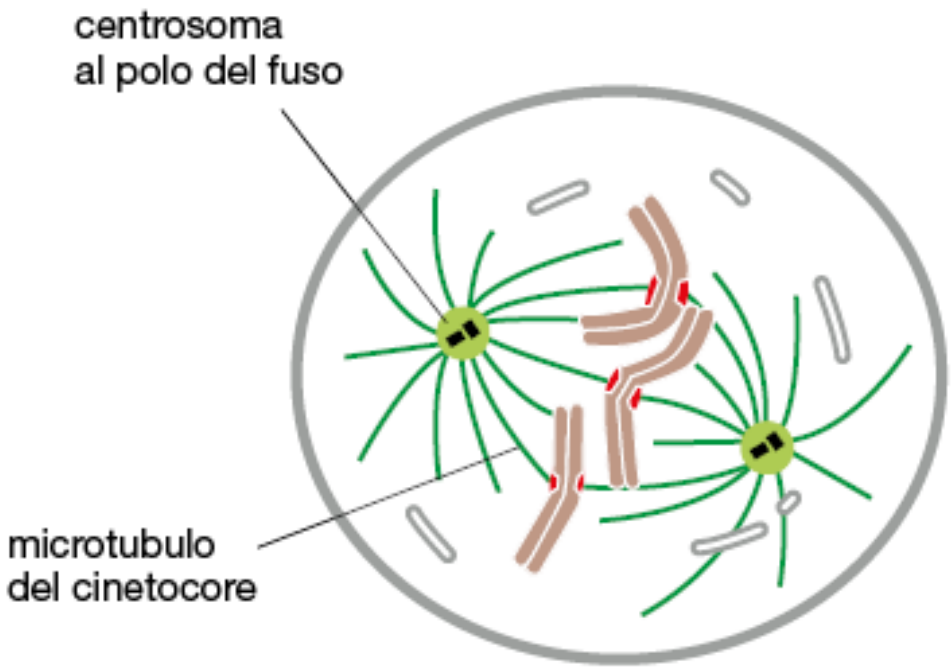


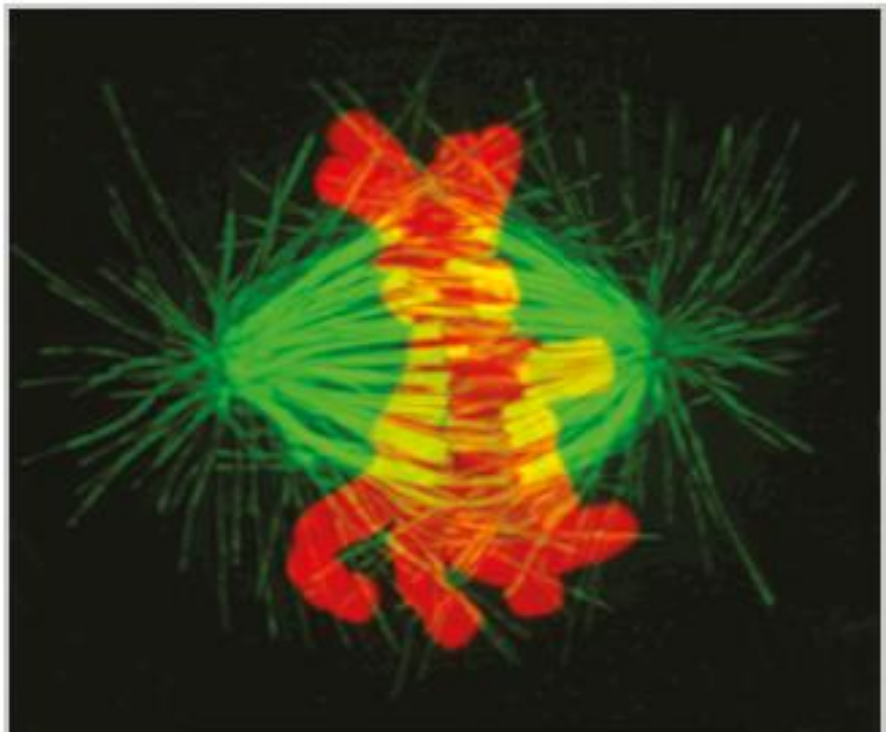


Fasi della mitosi: METAFASE

- Tutti i **cromosomi** sono **allineati all'equatore** del fuso (**piastra metafasica**).
- **Microtubuli del cinetocore attaccano i cromatidi fratelli** a poli opposti.
- **Stato di tensione bilanciata** → **checkpoint del fuso** verifica che tutti i cinetocori siano correttamente attaccati.

- *M-Cdk ancora alto; APC/C-Cdc20 pronto a essere attivato.*

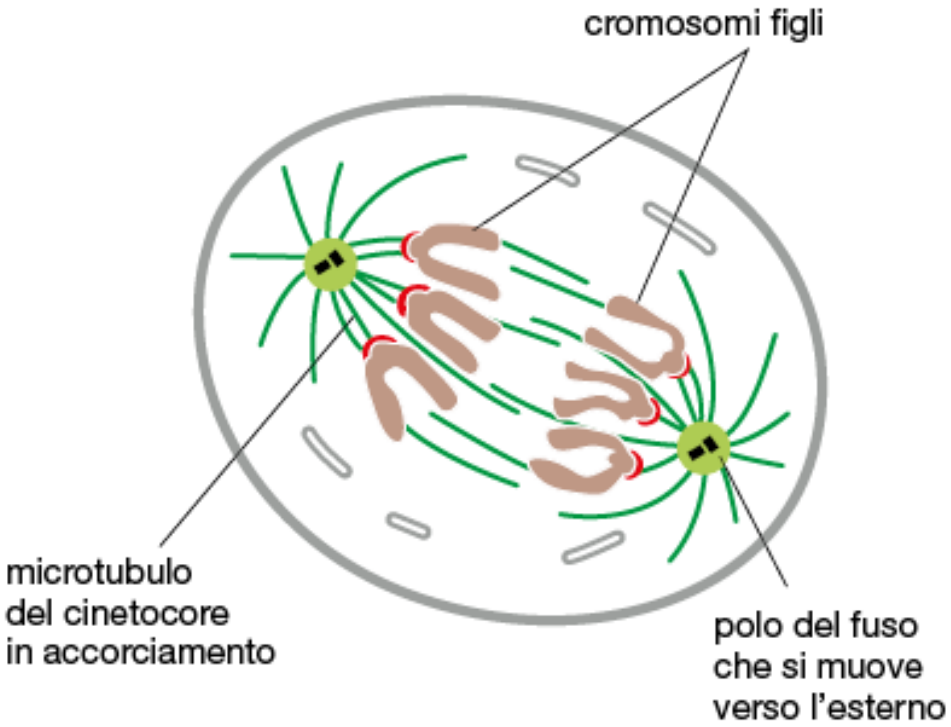


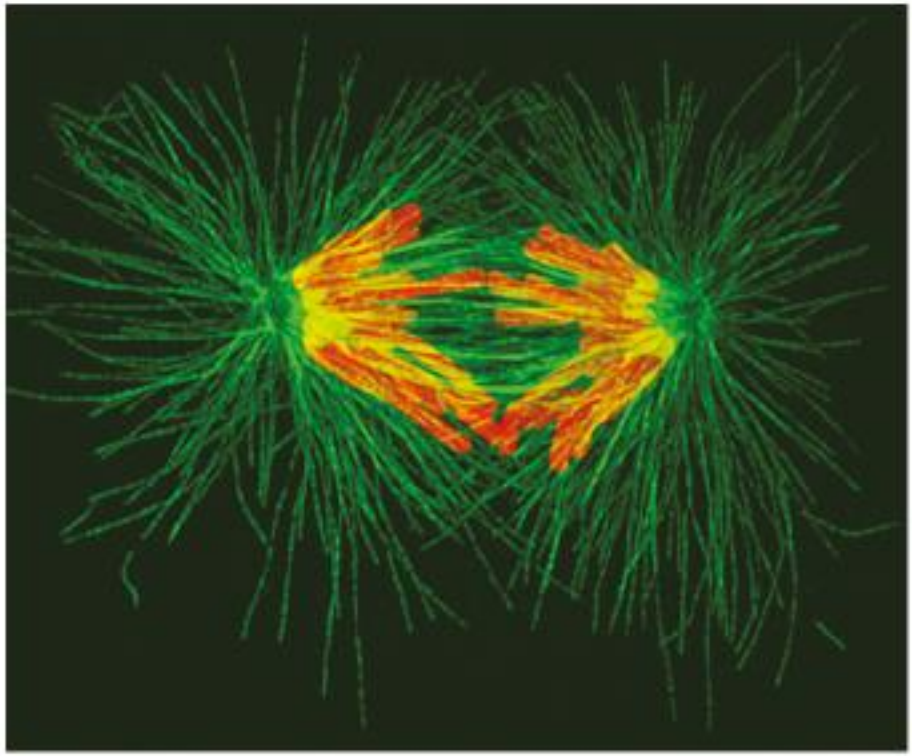


Fasi della mitosi: ANAFASE

- **Separazione sincrona** dei cromatidi fratelli → diventano **cromosomi figli**.
- **Securina degradata** → **separasi** attiva **taglia** Scc1 della **coesina**.
- **I cromatidi migrano** ai poli per due meccanismi:
  - **Anafase A: accorciamento microtubuli** del cinetocore.
  - **Anafase B: allontanamento dei poli del fuso** (microtubuli interpolari + dineine corticali).

- *APC/C attivo → innesca la cascata di separazione.*

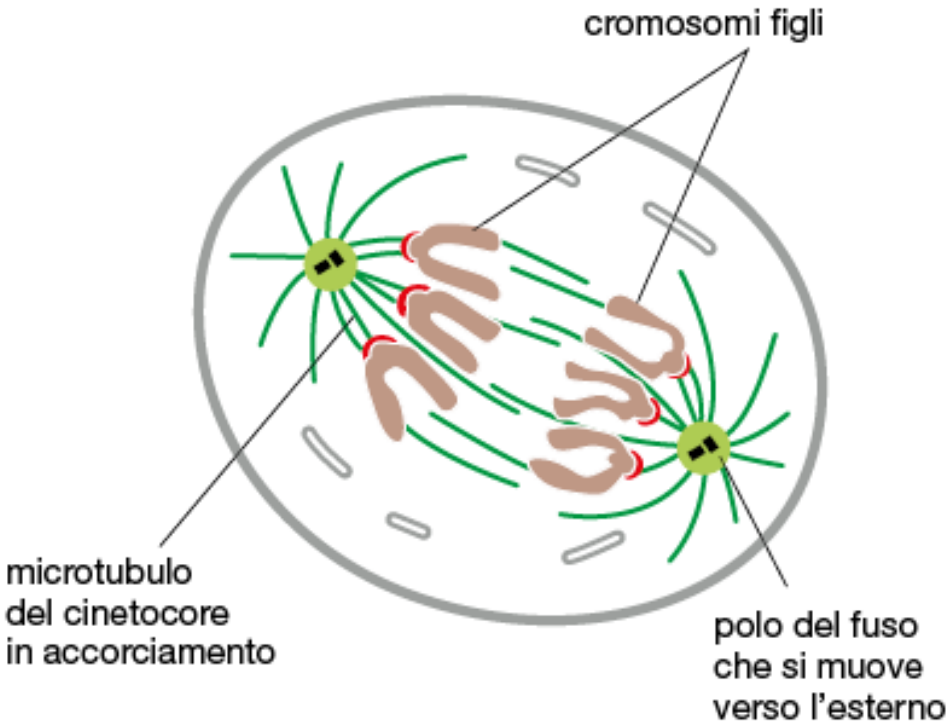


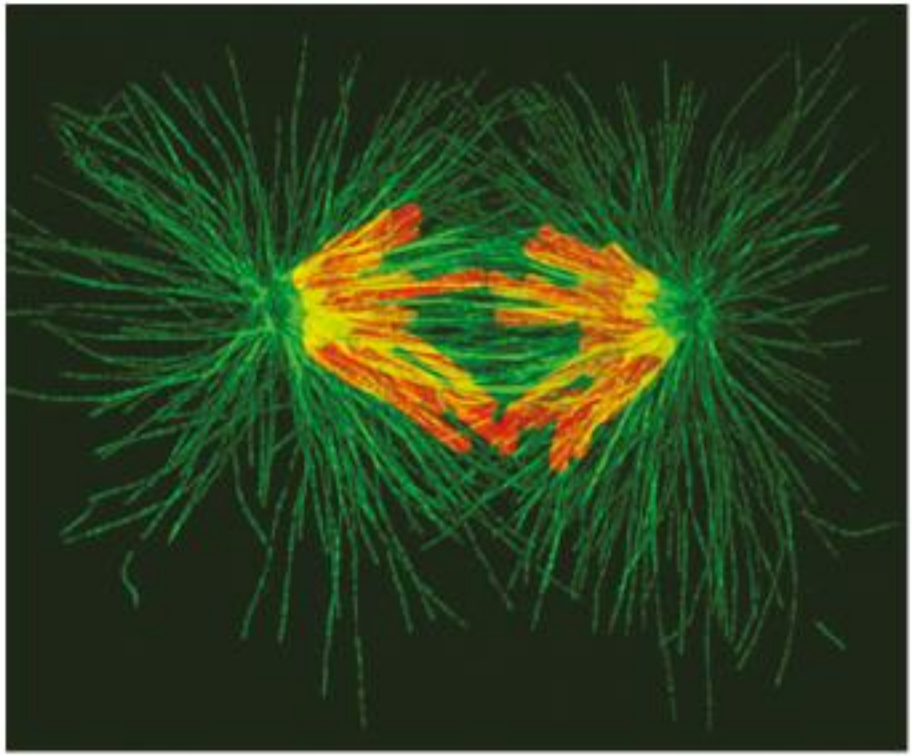


Fasi della mitosi: ANAFASE

APC/C e separazione dei cromatidi

- **APC/C-Cdc20** ubiquitina **securina** → **degradazione** → **separasi** libera.
- **Separasi** scinde la subunità **Scc1** della **coesina** → cromatidi liberi → **migrazione ai poli**.
- **APC/C degrada** anche **cicline S/M** (Ciline A e B) → **Cdk inattive** → **defosforilazione** di bersagli mitotici.

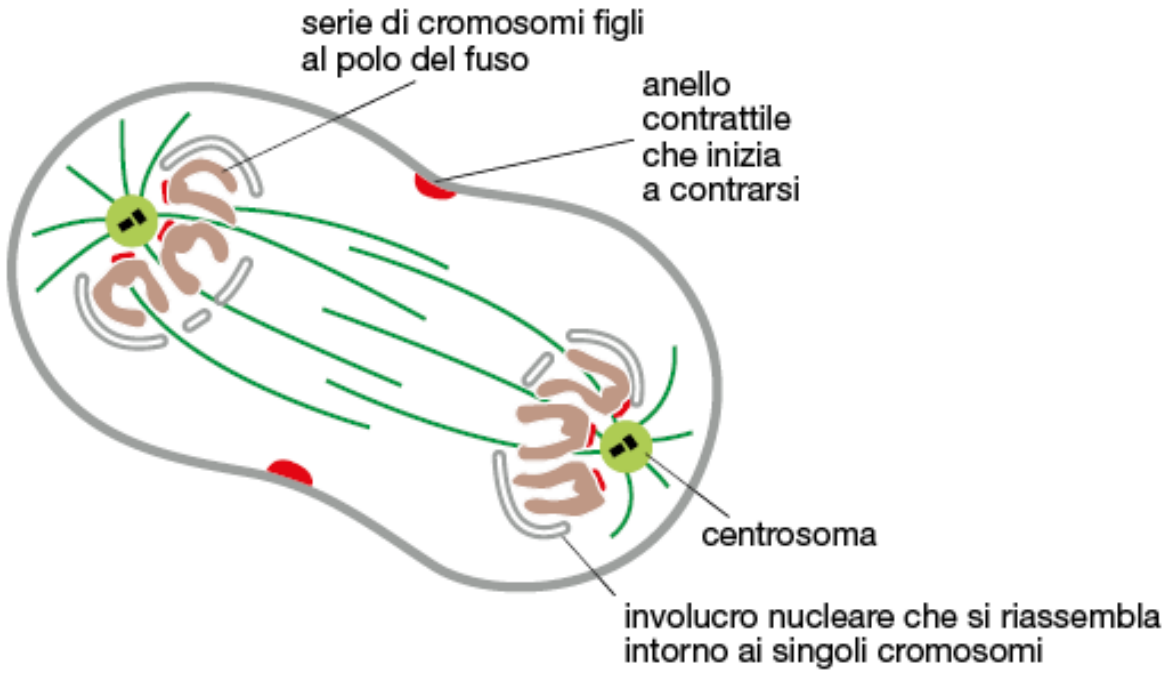


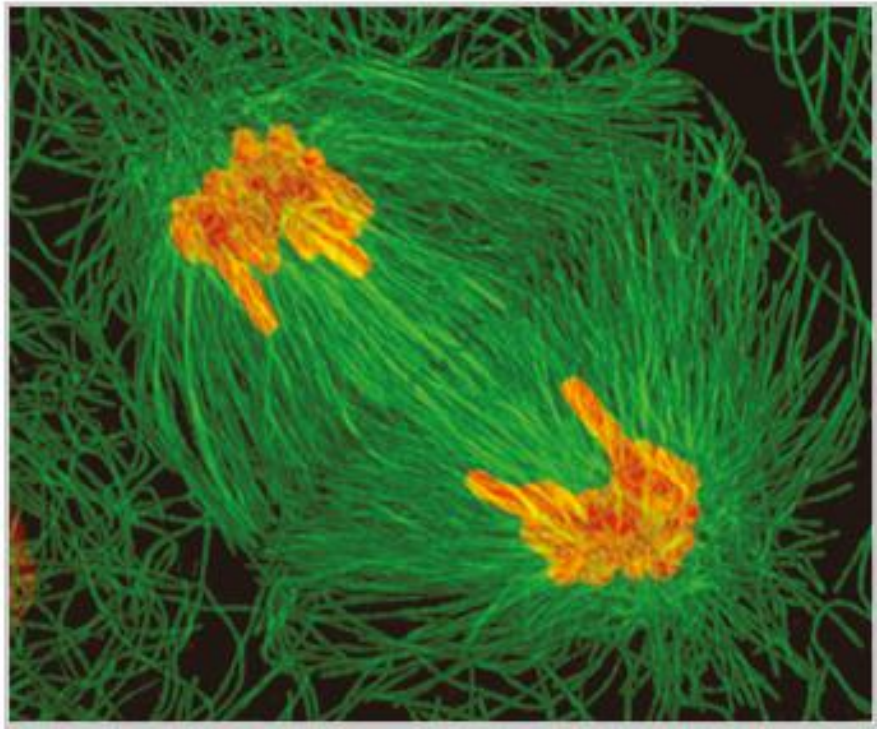


Fasi della mitosi: TELOFASE

- **Cromosomi figli raggiungono i poli** e si **decondensano**.
- **Si ricostruisce l'involucro nucleare** attorno a ciascun set di cromosomi.
- **Si riformano i nucleoli** e riparte la **trascrizione**.
- Segna la **fine della mitosi vera e propria**.

- *La caduta di M-Cdk e la defosforilazione (PP2A) consentono la riassemblazione nucleare.*

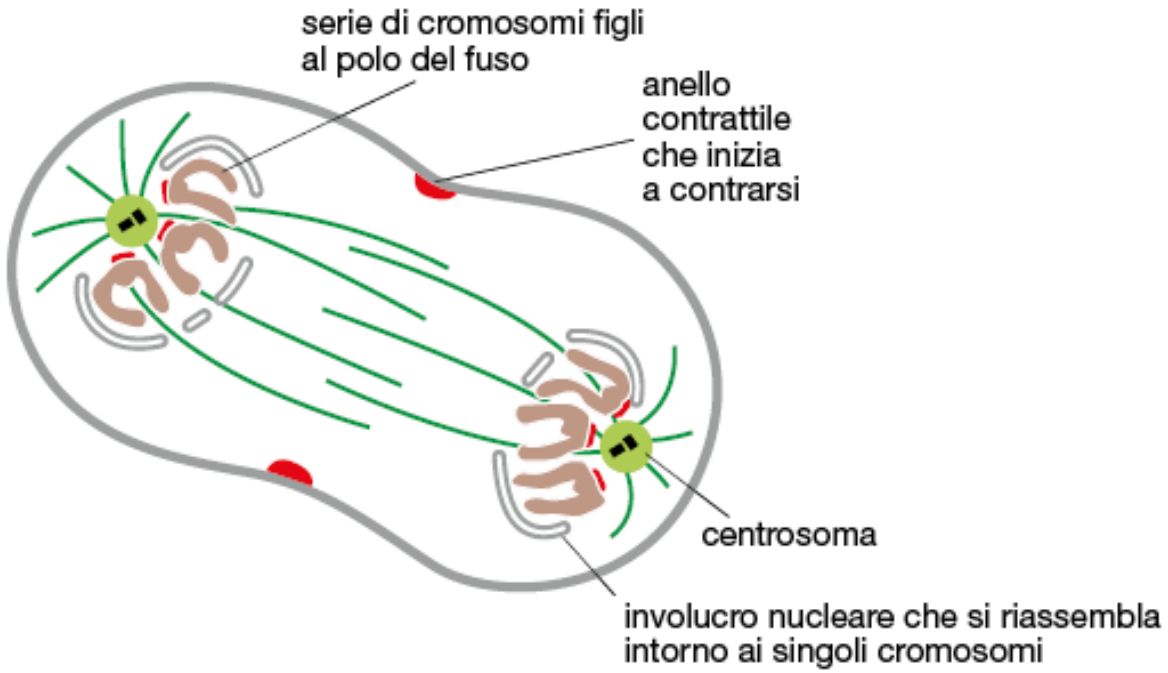


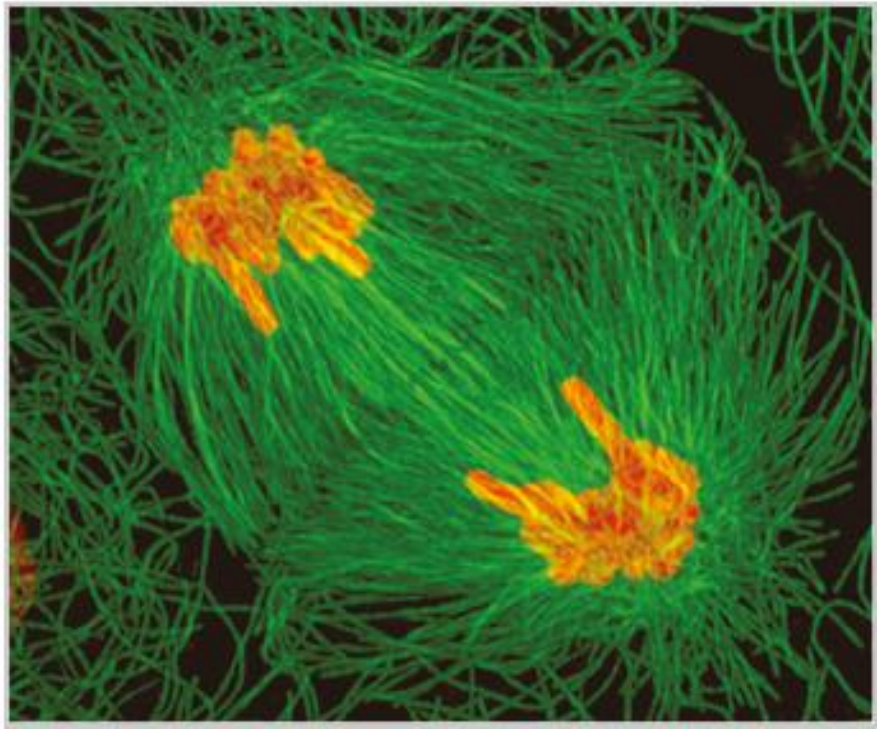


Fasi della mitosi: TELOFASE

Inattivazione delle Cdk e defosforilazione

- Necessaria per:
  - **Disassemblare** il **fuso mitotico**,
  - **Riformare involucro nucleare**,
  - **Avviare citochinesi**.
- **Fosfatasi PP2A** rimuovono i fosfati dai substrati Cdk → ritorno allo stato interfase.

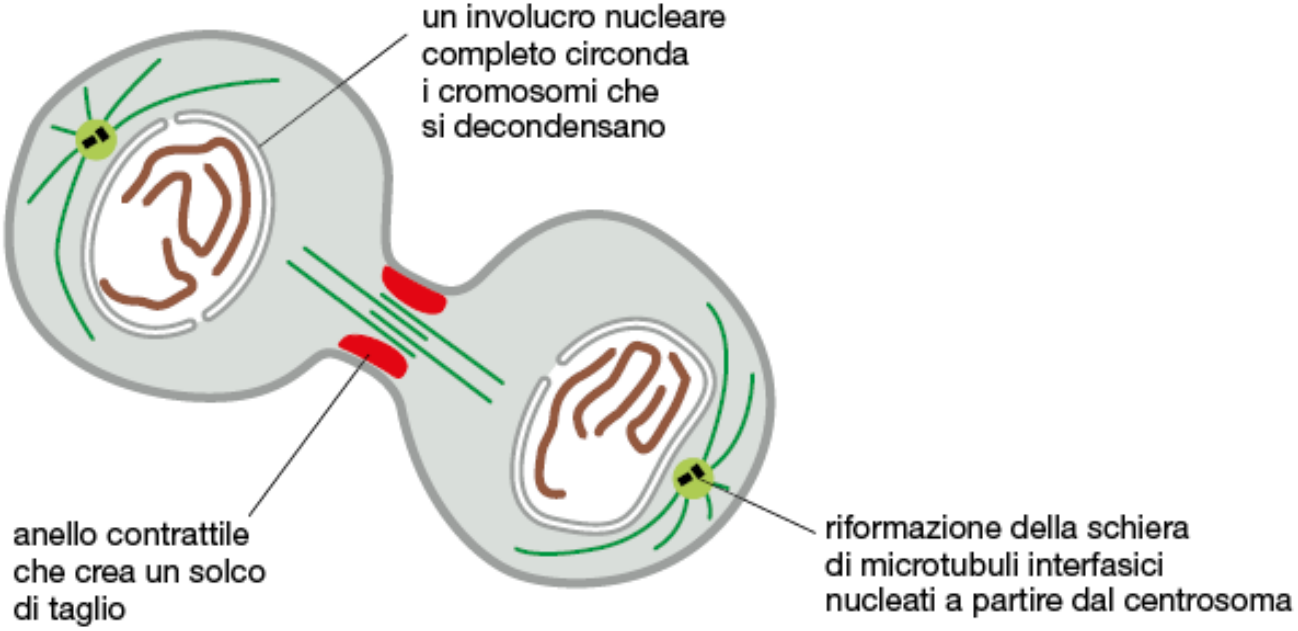


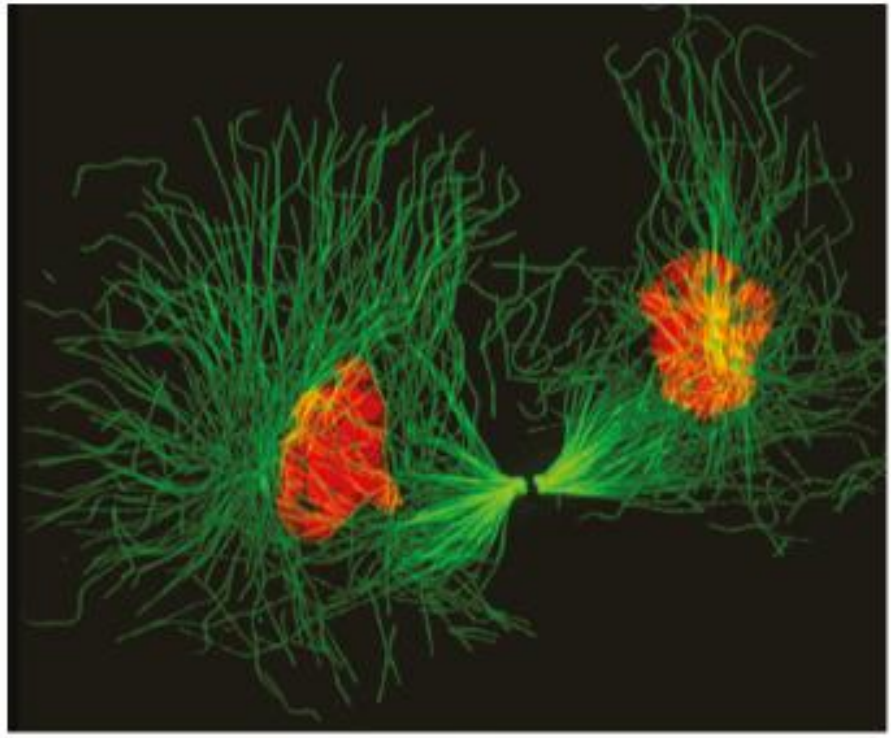


Fasi della mitosi: CITOCHINESI

- **Divisione fisica** del citoplasma → **2 cellule figlie**, ciascuna con un nucleo identico.
- Guidata da un **anello contrattile** di **actina e miosina II** sotto la membrana plasmatica.
- **L'anello si forma perpendicolarmente al fuso** nella regione mediana → **solco di divisione**.

- *Richiede calo Cdk e azione di fosfatasi per attivare le proteine contrattili.*





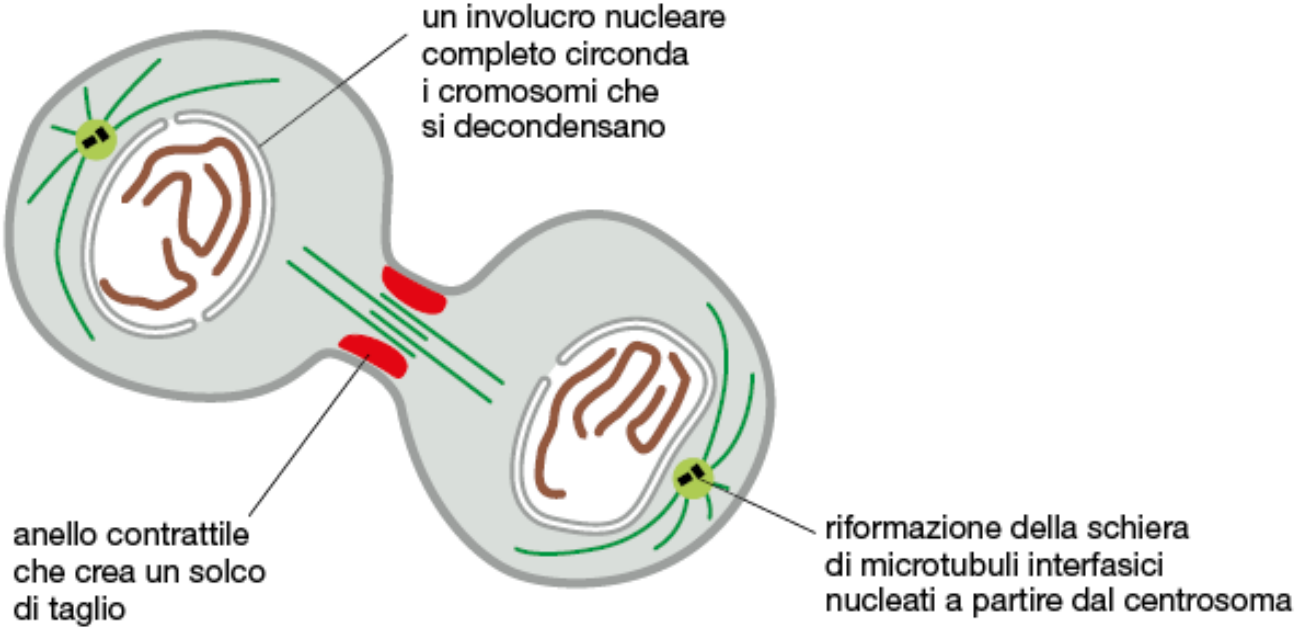
Fasi della mitosi: CITOCHINESI

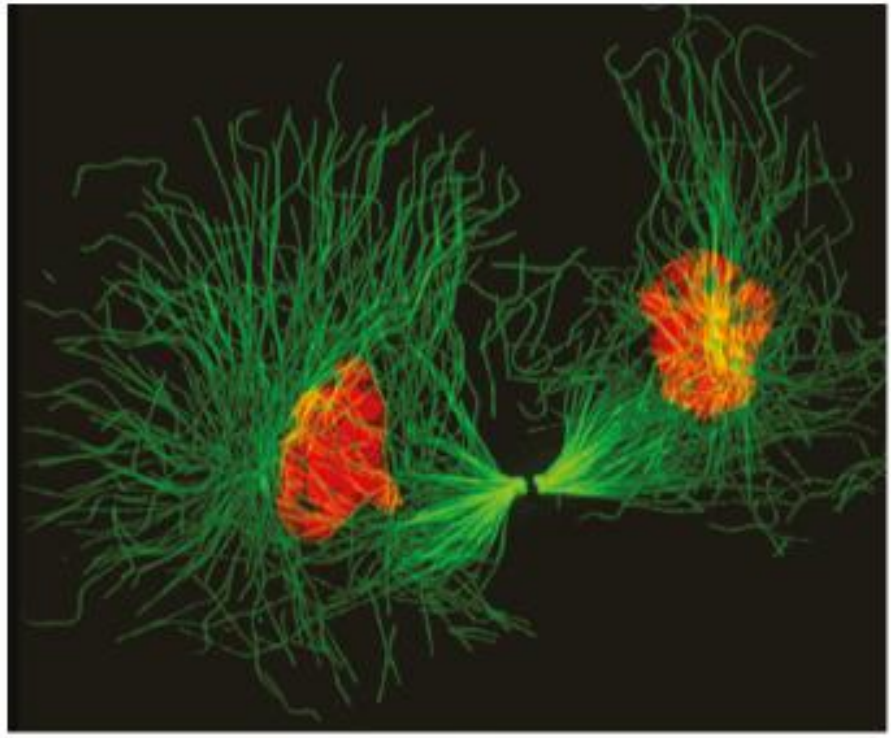
Meccanismo del solco di divisione

1. **Formazione dell'anello**: **Nucleazione** dei filamenti di **actina** (formin) e **reclutamento** di **miosina II**.
2. **Contrazione**: **Miosina II** scorre sui filamenti di actina → **costringe la membrana** verso l'interno.
3. **Abscissione**: I **bordi della membrana si fondono** → **separazione** completa.

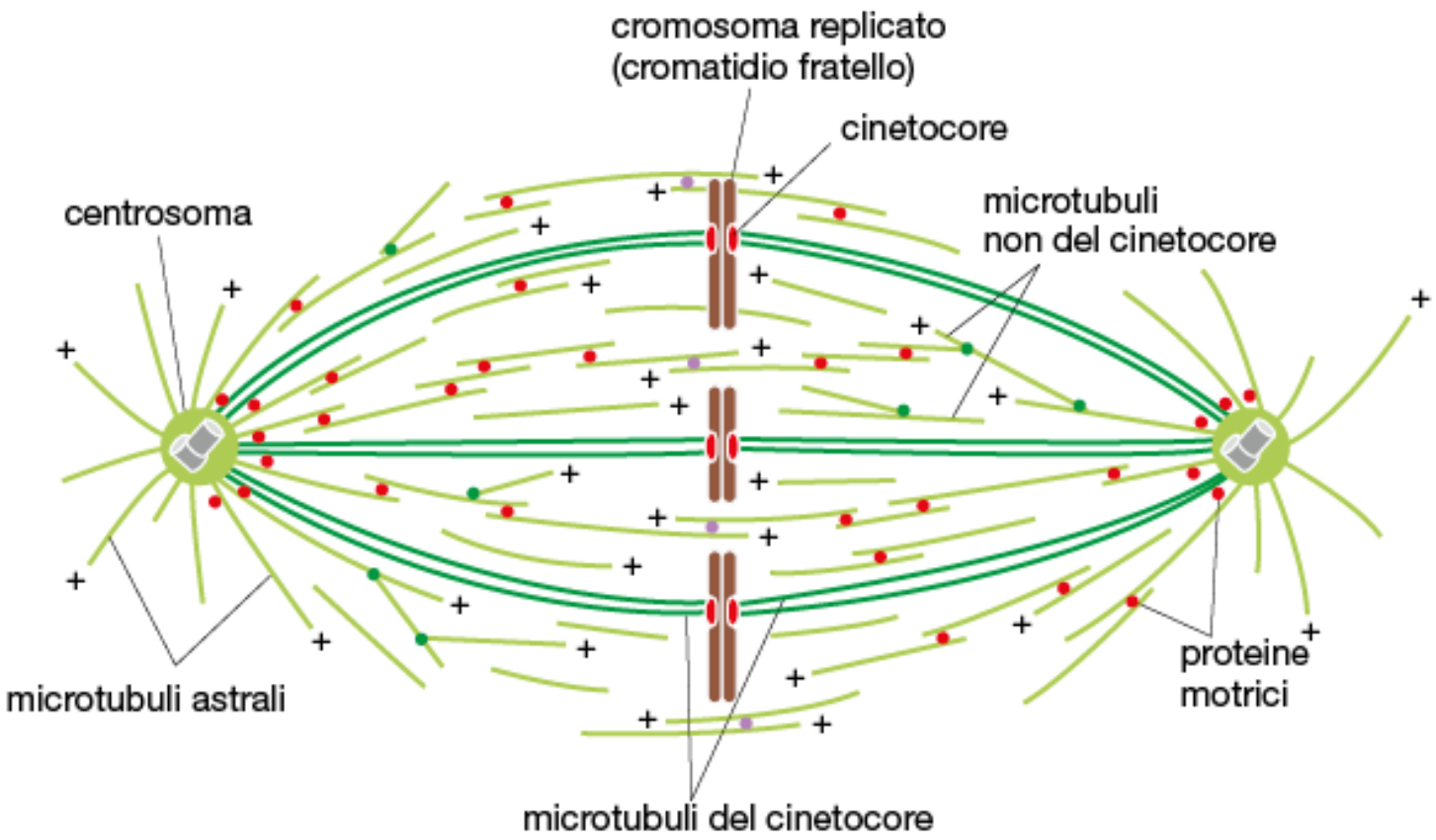
Coordinamento mitosi–citochinesi

- Il **fuso mitotico** determina il **piano di divisione**.
- Il **checkpoint del fuso** assicura che la **citochinesi** inizi **solo dopo** la corretta **segregazione cromosomica**.
- **Inibizione di Cdk** e **attivazione PP2A** → rilascio del programma di citochinesi.





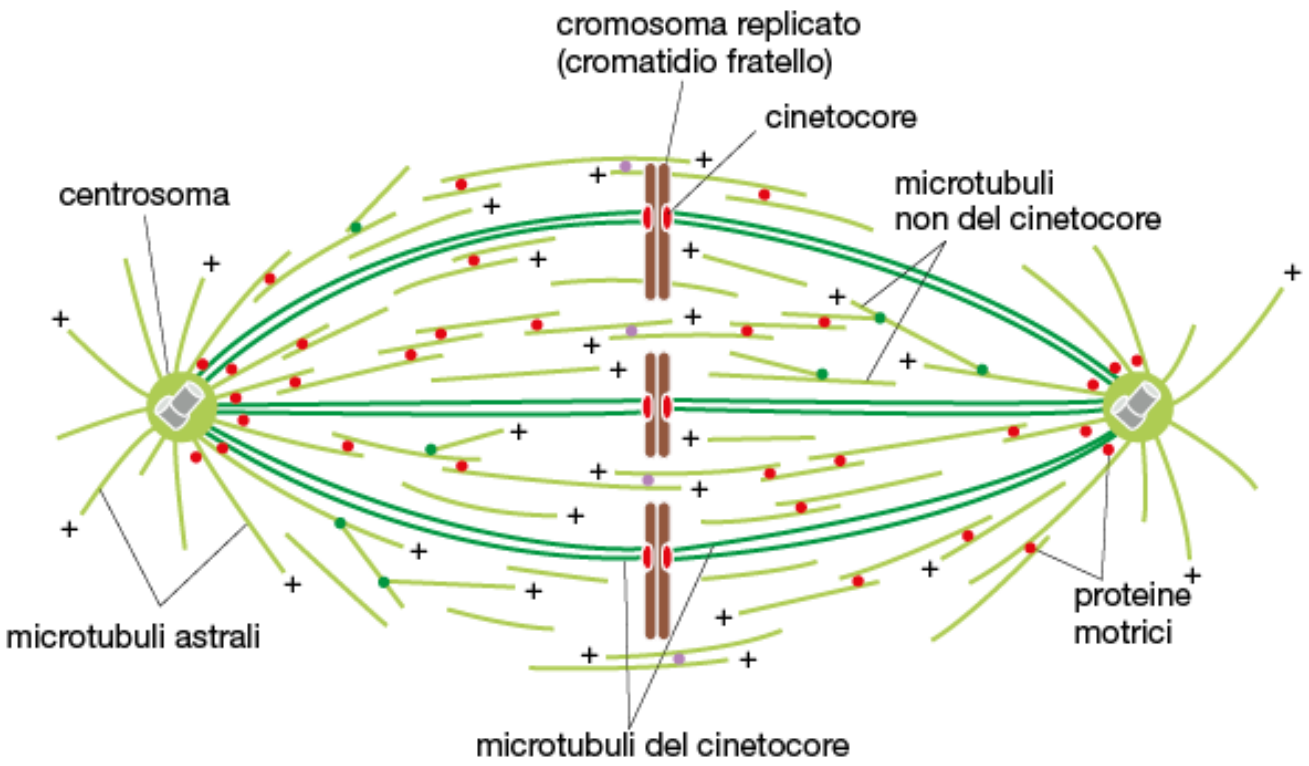
Il fuso mitotico: macchina dinamica a microtubuli



Il fuso mitotico: macchina dinamica a microtubuli

- **Evento centrale** della mitosi: **segregazione dei cromosomi** tramite **fuso mitotico**.
- **Fuso**: schiera **bipolare** di **microtubuli (MT)** che separa i **cromatidi fratelli** in **anafase**, organizzando due **nuclei figli** ai poli opposti.
- **M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)** ne **innesca l'assemblaggio** all'inizio della fase M, in parallelo alla riorganizzazione dei cromosomi.

Architettura del fuso in metafase



Polarità e organizzazione dei microtubuli

- Microtubuli = polimeri **polari**: estremità **(–)** verso il **polo**, estremità **(+)** verso l'esterno. Migliaia di MT si irradiano dai **due poli**; la rete è **dinamica e adattabile**.

Classi principali di microtubuli

1. Microtubuli del cinetocore (K-fiber)

- **Le loro (+)** si **attaccano dai cinetocori al centromero**.
- Più MT per cinetocore, **interconnessi** → **fibre K** spesse.
- **Responsabili** del **movimento dei cromatidi verso i poli** in **anafase**.

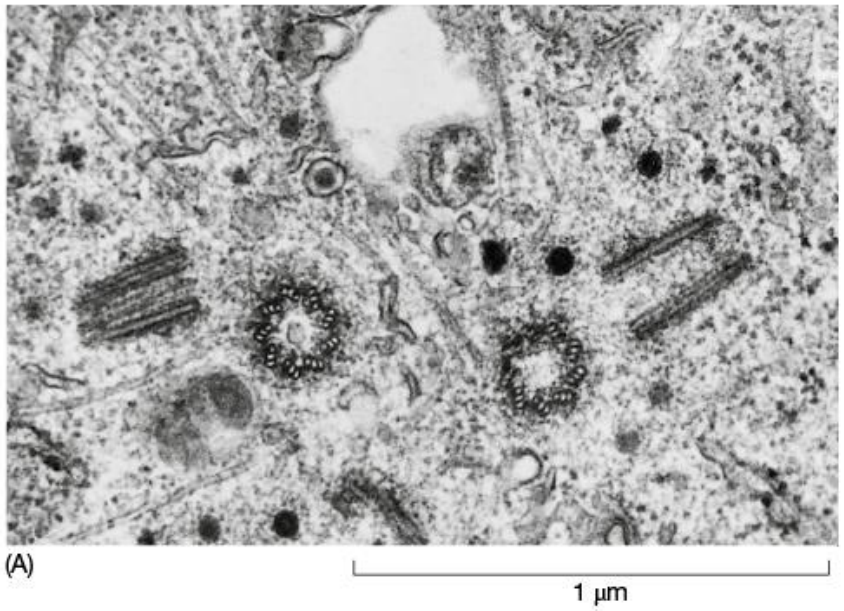
2. Microtubuli non-cinetocore / interpolari

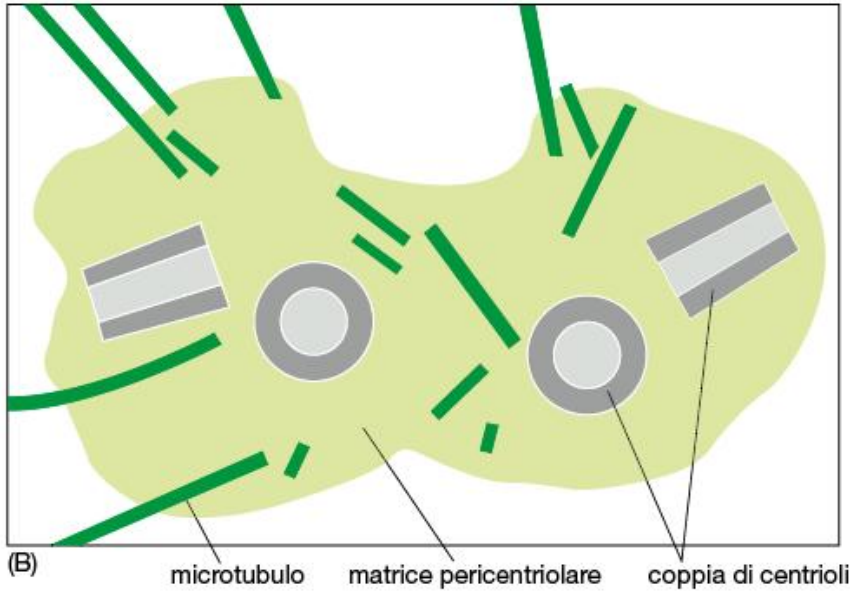
- **Più numerosi**; relativamente **corti** e **instabili**.
- **Formano una maglia** connessa da **MAP** (proteine associate ai MT).
- **Vicino all'equatore**: molte **coppie antiparallele interconnesse da motori** e altre proteine → stabilità e forza di spinta.

3. Microtubuli astrali

- **Si irradiano dai poli verso** la **corteccia**; **posizionano** il fuso.

I poli del fuso e il centrosoma





Il centrosoma

- **Organulo proteico** che **focalizza** ciascun polo del fuso.
- Composto da **materiale pericentriolare (PCM)** che circonda una **coppia di centrioli** (perpendicolari).
- Il **PCM nuclea un ventaglio radiale di MT**: **(+)** verso l'esterno, **(–)** ancorate al centrosoma.

γ-TuRC: il nucleatore principe

- **Complesso ad anello di γ-tubulina (γ-TuRC)**: nuclea dall'estremità **(–)**, lasciando crescere la **(+)**.
- **Centrosoma**: **grande concentrazione** di **γ-TuRC** nel **PCM**
- **Maturazione del centrosoma all'inizio della mitosi**: **↑ γ-TuRC** e attività nucleante.

Nucleazione "sul fianco" dei MT: augmina

- Complesso **augmina ancora γ-TuRC sui lati dei MT esistenti (simile Arp2/3)**→ **ramificazioni** con **(+)** orientate come il "ramo madre".
- Fornisce **MT aggiuntivi** all'interno del **corpo del fuso**, aumentando **densità** e **connettività**.

Nucleazione vicino ai cromosomi

- I **cromosomi mitotici** generano **segnali locali** che **attivano γ-TuRC** in loro prossimità → **MT de novo** vicino ai cinetocori.

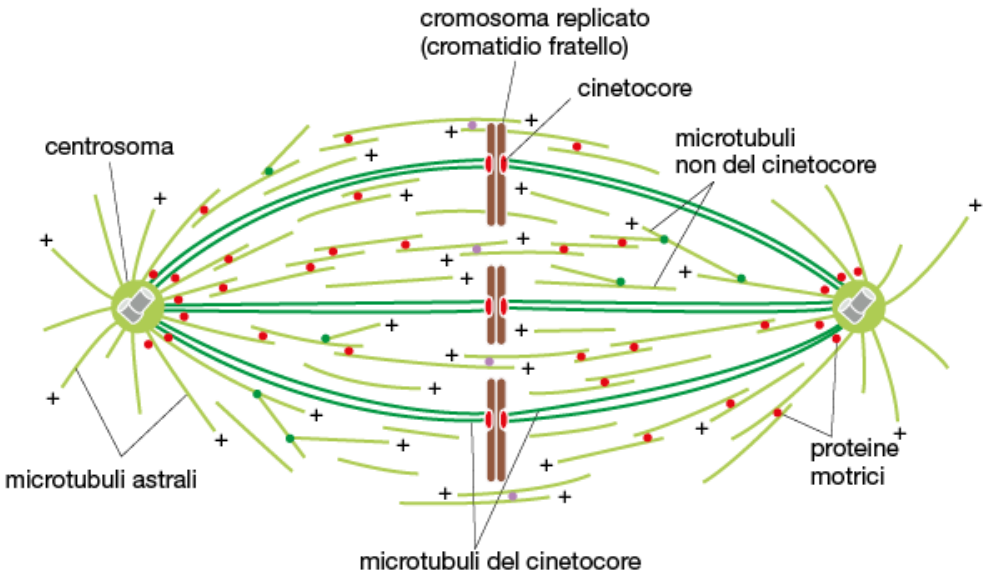
Tre famiglie funzionali di regolatori dei MT del fuso

Tre famiglie funzionali di regolatori dei MT del fuso

1. **Nucleatori: γ-TuRC** (centrosomi, **lati MT** tramite **augmina**, cromosomi).

2. **Regolatori della dinamica:** Proteine che controllano **polimerizzazione e depolimerizzazione** a **(+)** e **(−)**, modulando **stabilità** e **lunghezze** dei MT.

3. **Motori molecolari: Chinesine** e **dineine** che **collegano** MT e li **spostano** tra loro:
   - **Fasciano** MT **paralleli/antiparalleli**,
   - Generano **forze** per **allineare**, **mantenere** e **allontanare** i poli,
   - Collaborano con MAP per **posizionare** il fuso (via **astri** e **corteccia**).



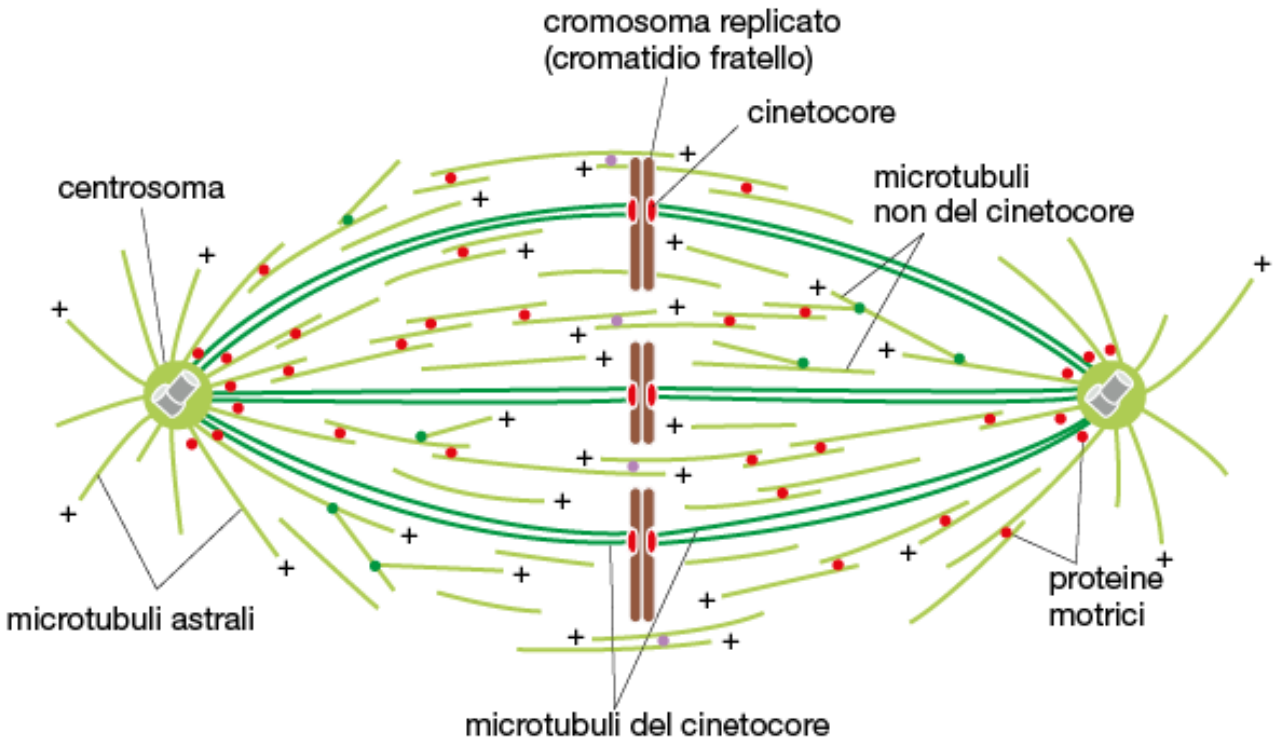
- **M-Cdk (Ciclina B-Cdk1)** accende il programma mitotico → fuso in **costruzione**.

- Il fuso **metafasico** è **bipolare**, con **K-fiber** ai cinetocori e **interpolari** intrecciati al centro; **astri** ancorano alla corteccia.

- I MT sono **nucleati** da **γ-TuRC** al **centrosoma**, **sui MT** (via **augmina**) e **presso i cromosomi**.

- **Nucleatori + regolatori di dinamica + motori** → **assemblaggio** e **funzione** del fuso.

Instabilità dinamica dei microtubuli in mitosi



Instabilità dei Microtubuli

- L'instabilità dei microtubuli è il **processo di rapida crescita e contrazione** di queste strutture citoscheletriche, fondamentale per la dinamica cellulare.
- È **regolata dall'idrolisi del GTP** legato alla tubulina: **i dimeri di tubulina con GTP si aggiungono** al microtubulo, allungandolo**, ma una volta idrolizzato in GDP, diventano instabili** e **tendono a staccarsi**, portando a una depolimerizzazione rapida.
- **Questo processo** è **controllato** da proteine che possono stabilizzare (come le **MAP** stabilizzatrici) o destabilizzare (come la statmina o la catastrofina) i microtubuli, ad esempio durante la mitosi.

Chi regola la dinamica dei MT?

- **MAP** stabilizzanti ↔ **fattori di depolimerizzazione** alle **(+)**.
- **M-Cdk (Cilcina B-Cdk1)** e altre chinasi mitotiche **fosforilano regolatori chiave** → **riprogrammano crescita/accorciamento**.
- Risultato: MT **rapidi**, **corti** e **riciclabili**, **ideali per catturare i cinetocori e riorganizzarsi**.

Instabilità dinamica dei microtubuli in mitosi

a) Chinesina-5 (tetramera)

- **Chinesine**: in generale verso **(+)**.
- **Dineine**: verso **(–)**.
- **Incrocia MT antiparalleli** e li **fa scorrere** in direzioni opposte → **spinge i poli** lontano → **genera bipolarità** del fuso (midzone).

b) Dineina citoplasmatica

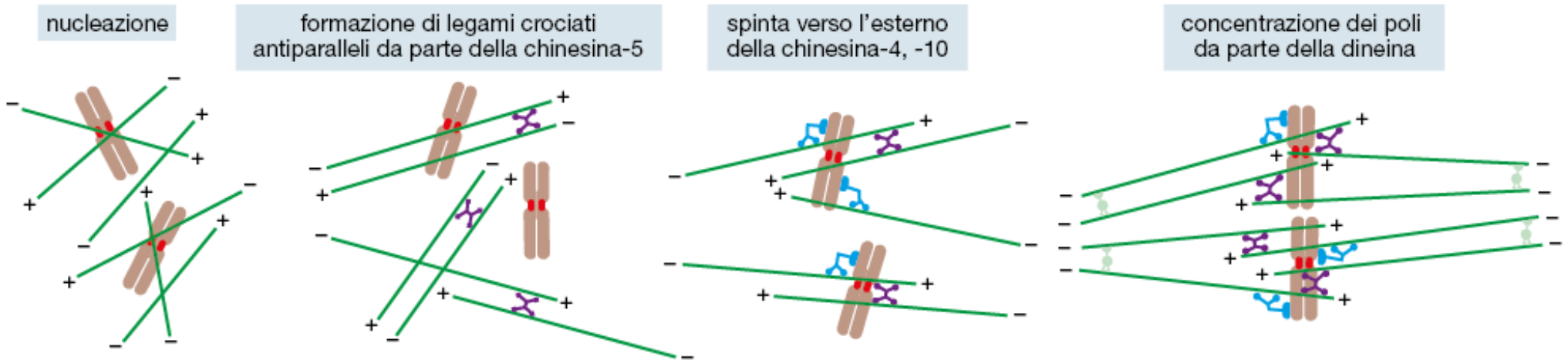
- Motore verso **(–)**; **collega** MT tra loro e al **centrosoma**.
- **Focalizza i poli**: "riporta" le **(–)** dei nuovi MT verso i poli centrosomali.
- **Alla corteccia** (su astri): tirando verso **(–) allontana i poli** → posizionamento del fuso.

c) Chinesina-14 (verso (–), caso atipico)

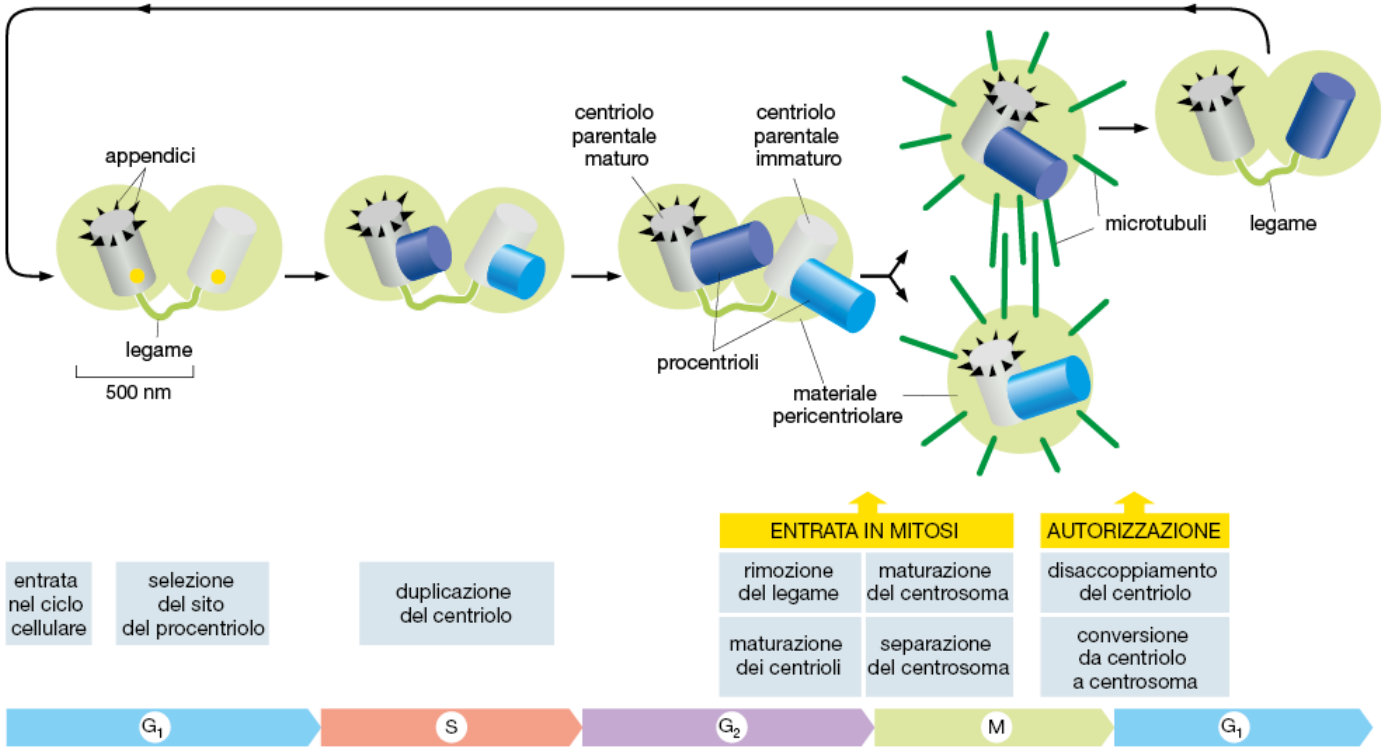
- Incrocia MT **antiparalleli** nella midzone e **tira i poli insieme** (forza opposta a kinesina-5).
- Contribuisce al **bilancio** di forze lungo l'asse del fuso.

d) Chinesina-4 e Chinesina-10 (cromochinesine; verso (+))

- Associate ai **bracci dei cromosomi**; generano forze **polo-repulsive**.
- Aiutano a **allontanare** i cromosomi dai poli e **promuovere l'allineamento** in metafase.



Duplicazione dei centrosomi



In **interfase** c'è **un solo centrosoma.**

- **Inizio duplicazione /ingresso in S**:
  - **G1/S-Cdk (ciclina E–Cdk2)** + **Plk4** avviano la **duplicazione dei centrioli**.
  - **Ogni centriolo parentale** genera un **procentriolo** → allungamento in **S/G2**.

- In **ingresso in M**:
  - Si **rimuove** il legame che teneva unita la coppia.
  - **Maturazione**: il **PCM** si espande (**maturazione del centrosoma**), ↑ nucleazione MT; il centriolo "immaturo" acquisisce **appendici**.
  - I **centrosomi si separano** → **nascono** i **due poli del fuso**.

- **Dopo M**: disaccoppiamento dei centrioli + conversione del centriolo "nuovo" in **centrosoma competente** → **licenza per la duplicazione nel ciclo seguente.**

NEBD e avvio dell'assemblaggio del fuso

1) Separazione iniziale dei centrosomi (cellule animali con centrosomi)

- In **profase**, i due **centrosomi** si **separano** lungo l'**involucro nucleare**:

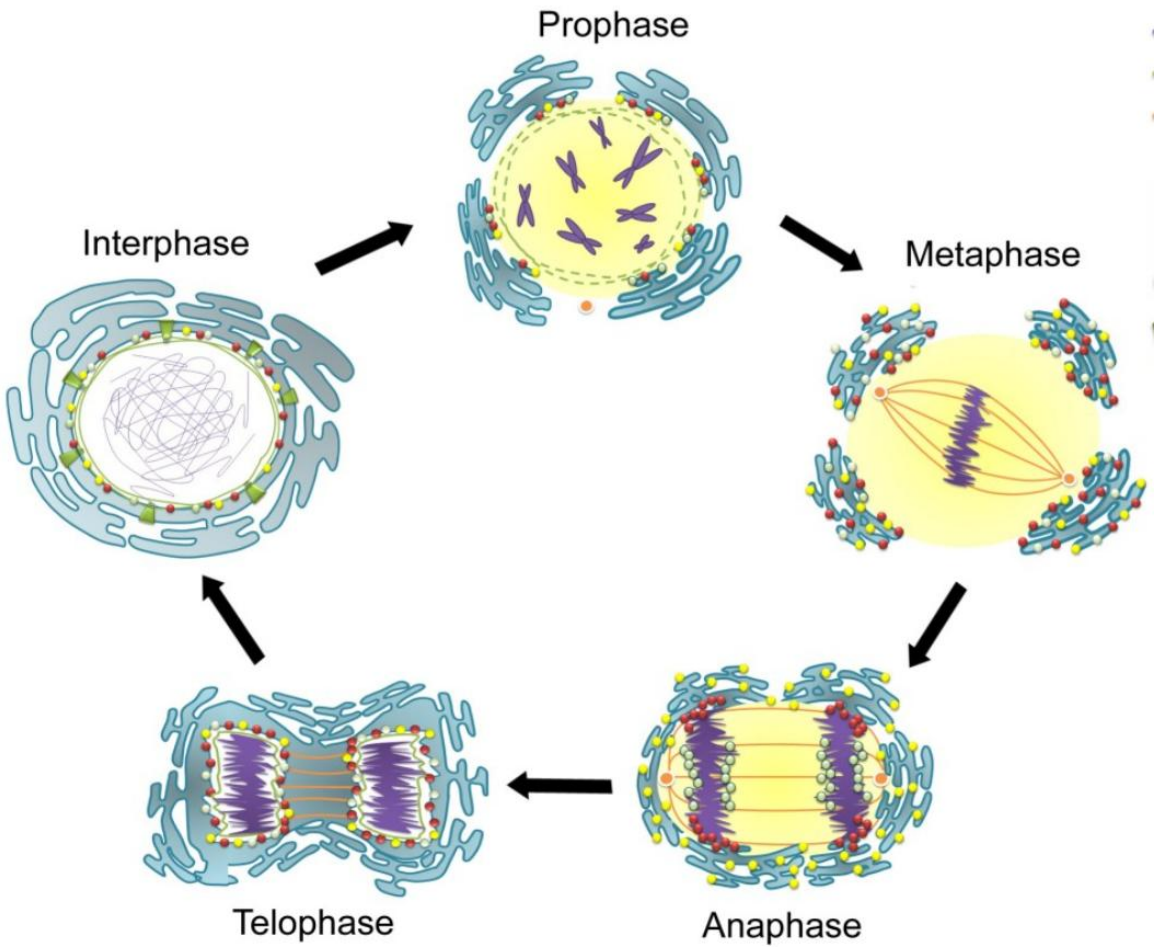
2) Perché serve abbattere l'involucro?

- **Centrosomi/MT** sono **citoplasmatici**, **cromatidi** sono **intranucleari** → serve accesso reciproco.

3) Meccanismo della NEBD (Nuclear Envelope BreakDown)

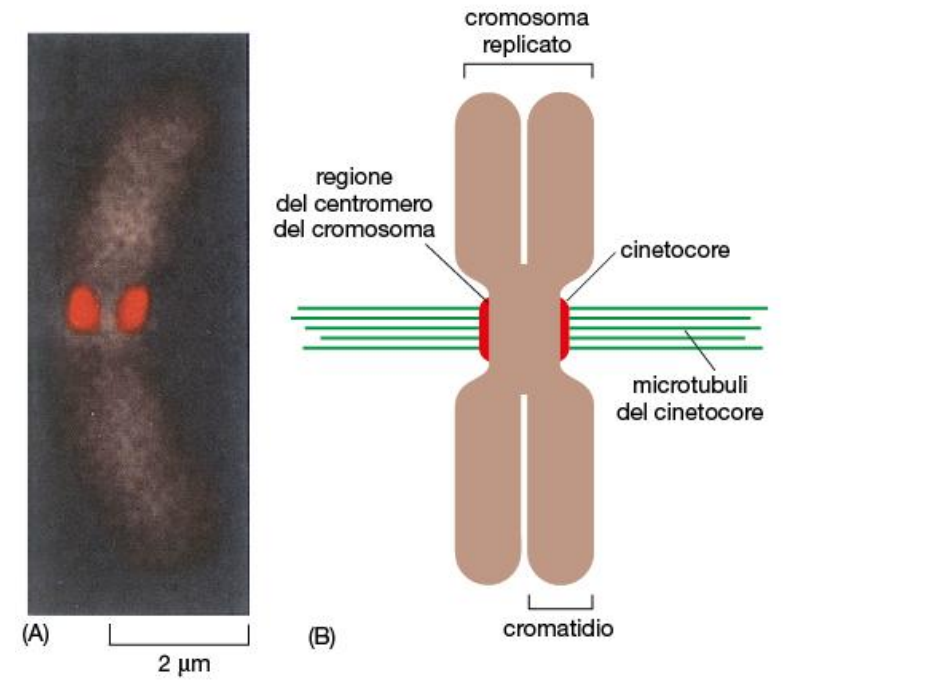
- **M-Cdk** fosforila:
  - **Subunità dei pori nucleari (NPC)** → **disassemblaggio** e distacco dai fogli della membrana.
  - **Lamine nucleari** → **smontaggio** della **lamina**.
  - **Proteine della membrana nucleare interna** → **distacco** da lamina/cromosomi.

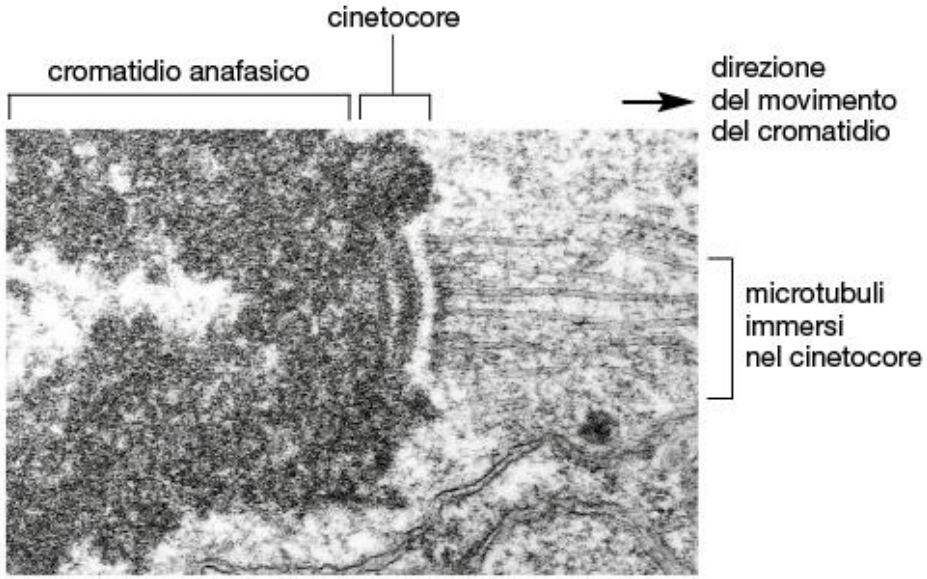
- Le membrane dell'involucro vengono **assorbite** nel **reticolo endoplasmatico**.



Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nuclear_envelope_breakdown_and_reassembly_in_mitosis.jpg

Cinetocori: l'ancora dei cromosomi al fuso





Cinetocori: l'ancora dei cromosomi al fuso

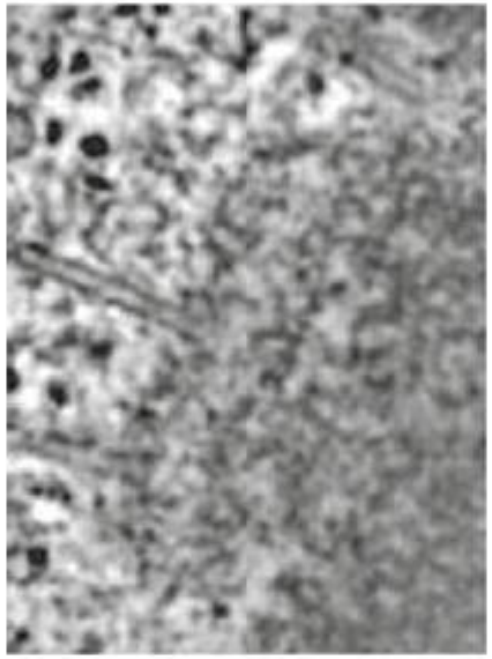
- Dopo che il fuso è **bipolare**, serve l'**attacco ai cromosomi**.
- **Cinetocore**: struttura **gigante e multistrato** sul **centromero** di ciascun **cromatidio**.
- In **metafase**, le **estremità (+)** dei MT **entrano di testa** in **siti specializzati** del **cinetocore esterno** (lontani dal DNA).
- **Centromero** = sede di **CENP-A** (istone H3 modificato delle regioni centromeriche)

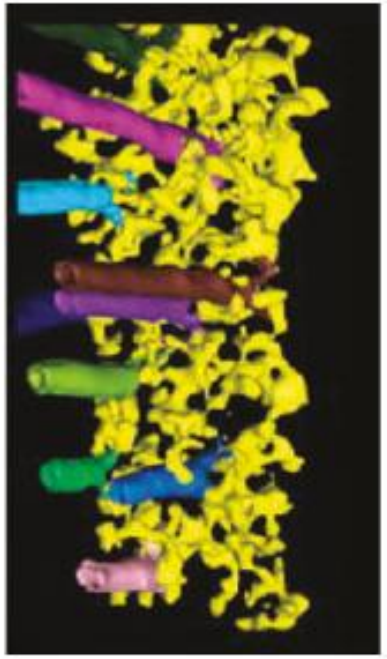
Il complesso Ndc80 e l’attacco “end-on”

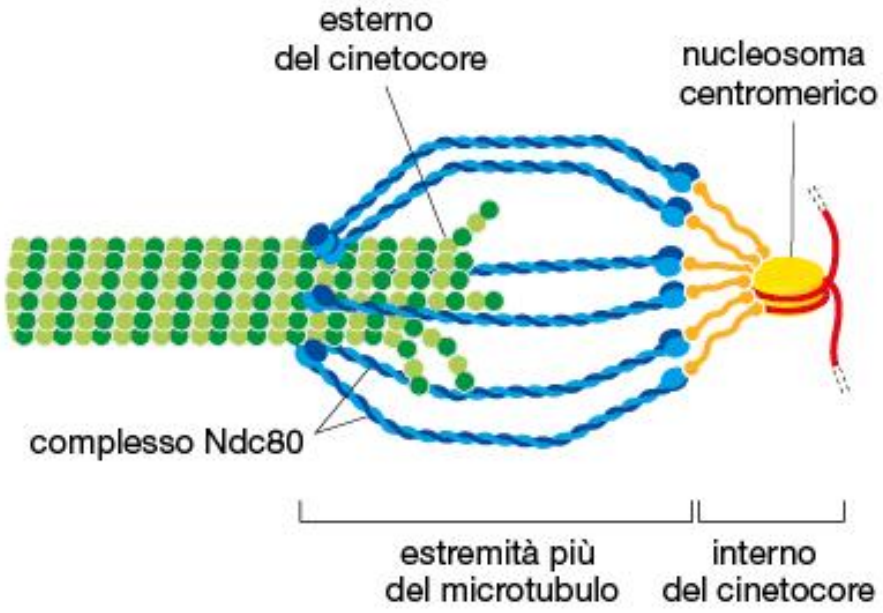
Il complesso Ndc80 e l’attacco “end-on”

- **Ndc80** = bastoncino ripiegato;
  - **un’estremità ancorata al cinetocore**, connessa a nucleosomi **CENP-A** tramite proteine ponte;
  - **l’altra estremità** abbraccia il fianco del **MT vicino alla punta (+)**.

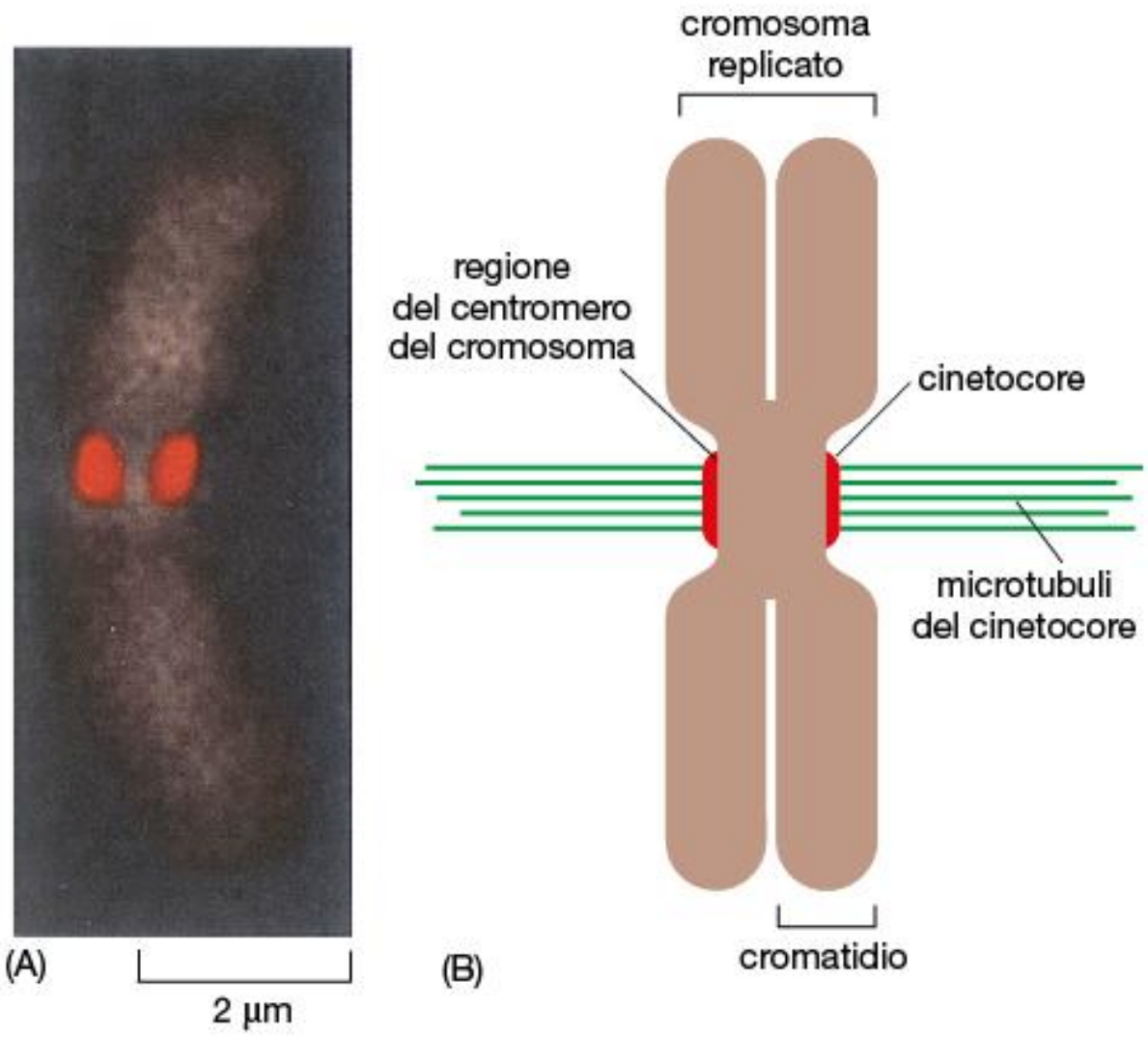
- Consente **polimerizzazione/depolimerizzazione senza perdere l’aggancio** (“sliding clamp”).
- La **dinamica** all’estremità (+) è ciò che “muove” i cromosomi.







Come si forma l'attacco: dalla lateralità al "end-on"



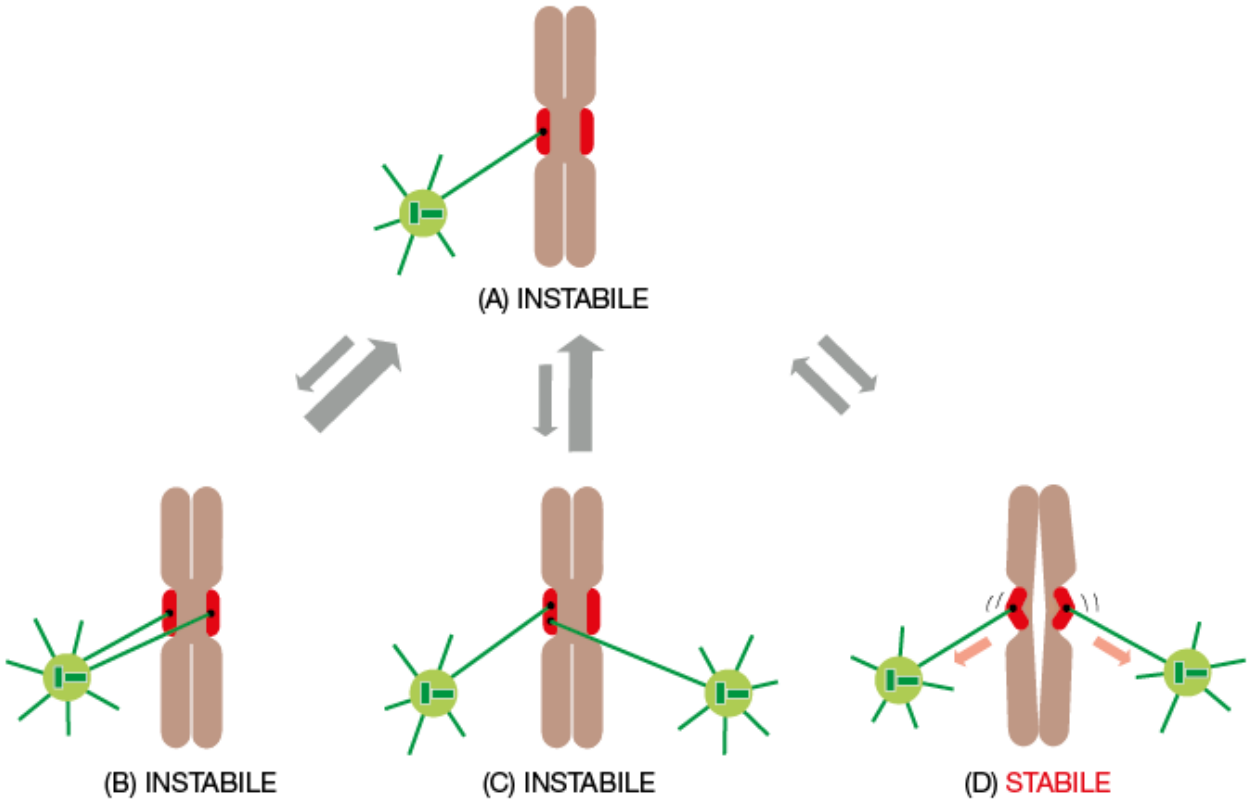
Sequenza tipica nelle cellule animali

- All'uscita da profase e **dopo NEBD**, **MT arrivano da entrambi i poli**.
- **Attacchi iniziali**: per lo più **laterali** ai MT di passaggio, **stabilizzati da dineina** nel cinetocore esterno
- **Maturazione**: **cattura "end-on" prima su un cinetocore**, poi sul gemello, nella **corretta orientazione**.

Secondo meccanismo (rilevante senza centrosomi)

- **MT corti** nascono **vicino ai cromosomi** ed entrano **di punta** nei siti del cinetocore.
- Crescono verso l'esterno dalla punta **(+)**; le **(–)** vengono **agganciate e trainate** da **dineina** fino a **poli** già formati → **focalizzazione**.

Biorientamento dei Microtubuli



Obiettivo

- Ogni coppia di **cromatidi fratelli** deve **collegarsi** a **poli opposti** → **biorientamento**.

Perché non sempre riesce al primo colpo?

- I cinetocori **back-to-back** riducono errori, ma possono verificarsi:
  - **Monotelico**: un solo cinetocore legato;
  - **Sintelico**: entrambi al **medesimo polo**;
  - **Merotelico**: un cinetocore a **entrambi** i poli (combinazioni stabili ma **pericolose**).

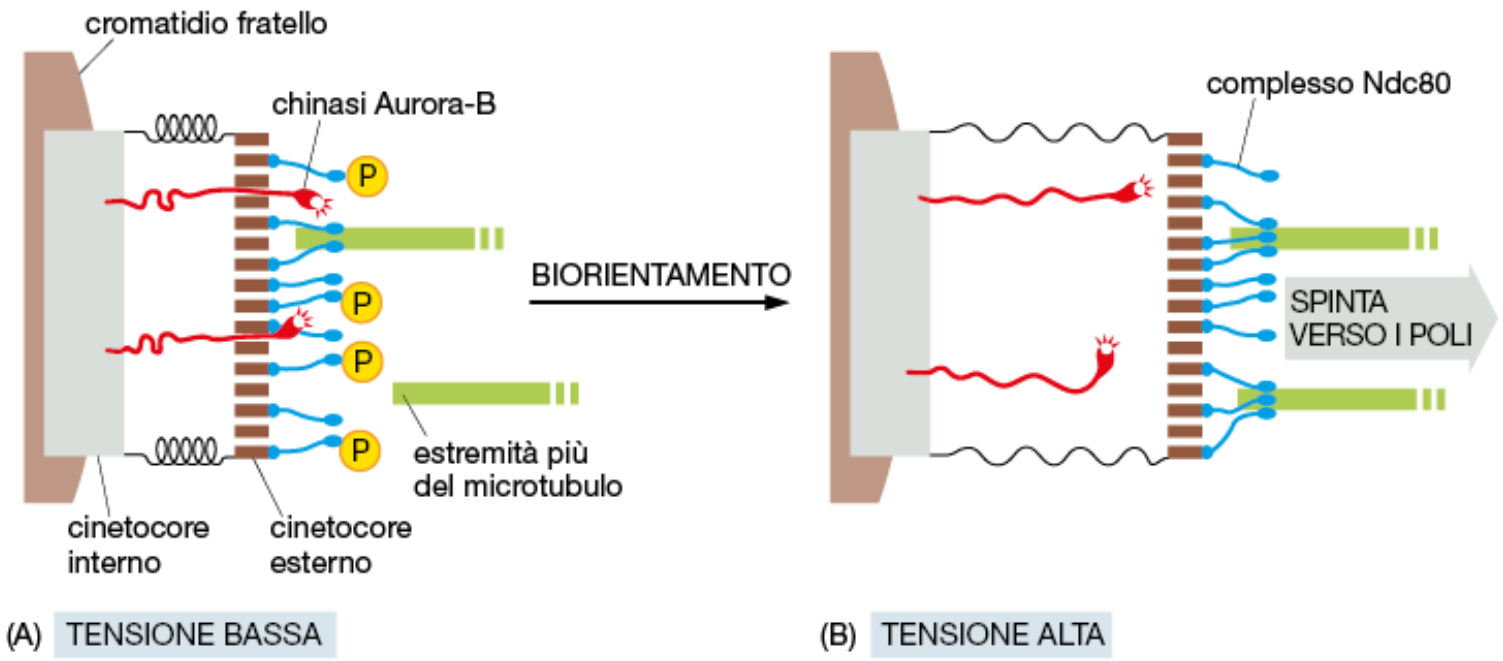
Principio di selezione

- **Gli attacchi corretti** sono **stabilizzati**; molti attacchi **errati** sono **instabili** e si **dissociano**.
- **Chi decide?** → **Tensione**.

La tensione come segnale: ruolo di Aurora B

Stato "bassa tensione"

- **Cinetocore non biorientato** o collegato a un solo polo → **bassa tensione** tra **cinetocore interno** ed **esterno**.
- **Aurora B** (sul cinetocore interno) **fosforila siti di attacco** (es. **Ndc80**) → ↓ **affinità** → attacco labile → **favorisce rilascio/correzione**.



Stato "alta tensione" (biorientato)

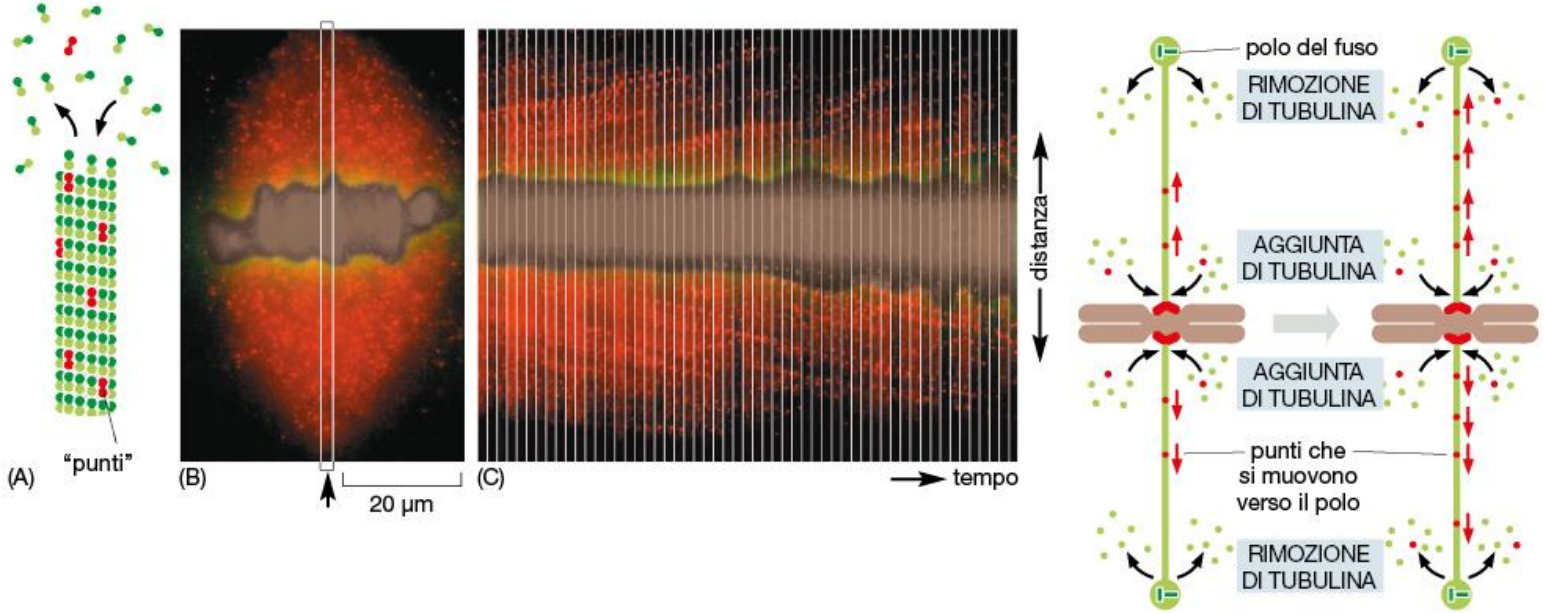
- **Forze opposte** ai due poli **allontanano il cinetocore** esterno **da Aurora B**.
- ↓ **fosforilazione** dei siti di attacco → ↑ **affinità** → **stabilizzazione** del legame.
- Nelle cellule animali, **la tensione recluta ulteriori MT** → **costruzione** di una **fibra K** robusta (multi-MT).
- Una **fosfatasi** (non dettagliata qui) **de-fosforila** i target, consolidando l'attacco.
- **"Tensione spegne Aurora B"** = **switch** meccano-chimico.

Forze che muovono i cromosomi sul fuso

Forze che muovono i cromosomi sul fuso

- Il fuso **metafasico** appare stabile, ma è un sistema **altamente dinamico** in equilibrio di **forze multiple**:
  - **Motori** proteici,
  - **Polimerizzazione/Depolimerizzazione** dei MT.

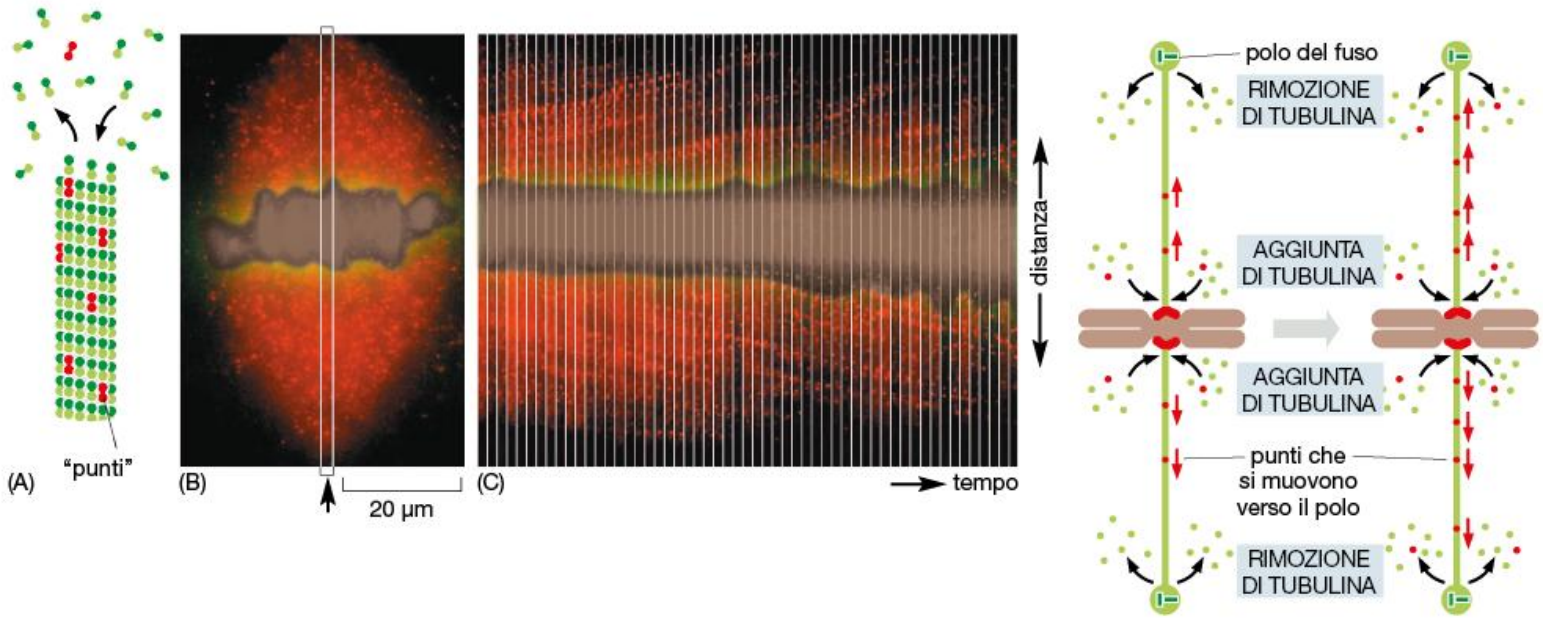
- Queste forze **generano la tensione che stabilizza gli attacchi corretti** e, in **anafase**, spingono i cromatidi ai poli.



Trazione al cinetocore (verso il polo)

Forza #1 — Trazione al cinetocore (verso il polo)

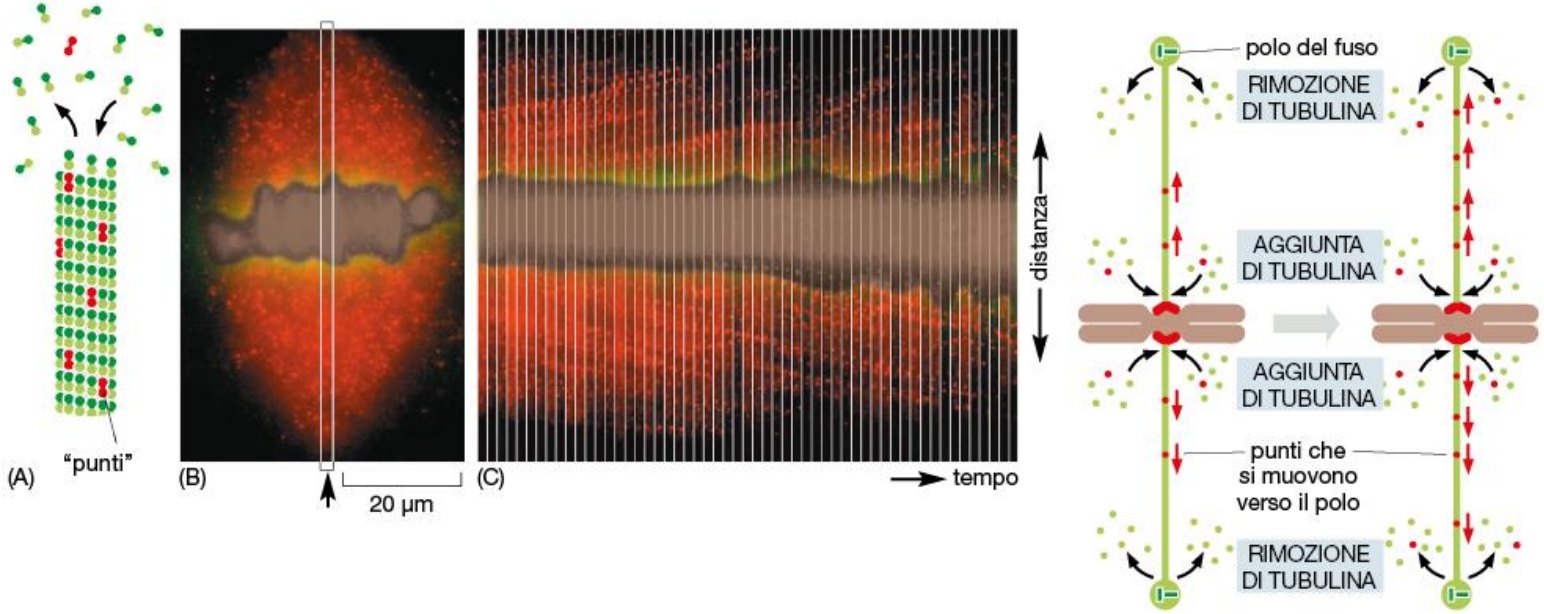
- Guidata da **depolimerizzazione** alla **(+)** dei MT del cinetocore (**K-fiber**).
- **Non richiede ATP** né motori al cinetocore: **l'energia proviene dall'idrolisi del GTP tubulinico** accumulata nel MT.
- **Meccanismo:** il **complesso Ndc80** forma **molti legami deboli** col **fianco del MT** vicino alla punta; mentre la punta depolimerizza, i legami si **rompono/riformano** → il cinetocore **"scivola"** verso il polo.



Flusso dei microtubuli (poleward flux)

Forza #2 — Flusso dei microtubuli (poleward flux)

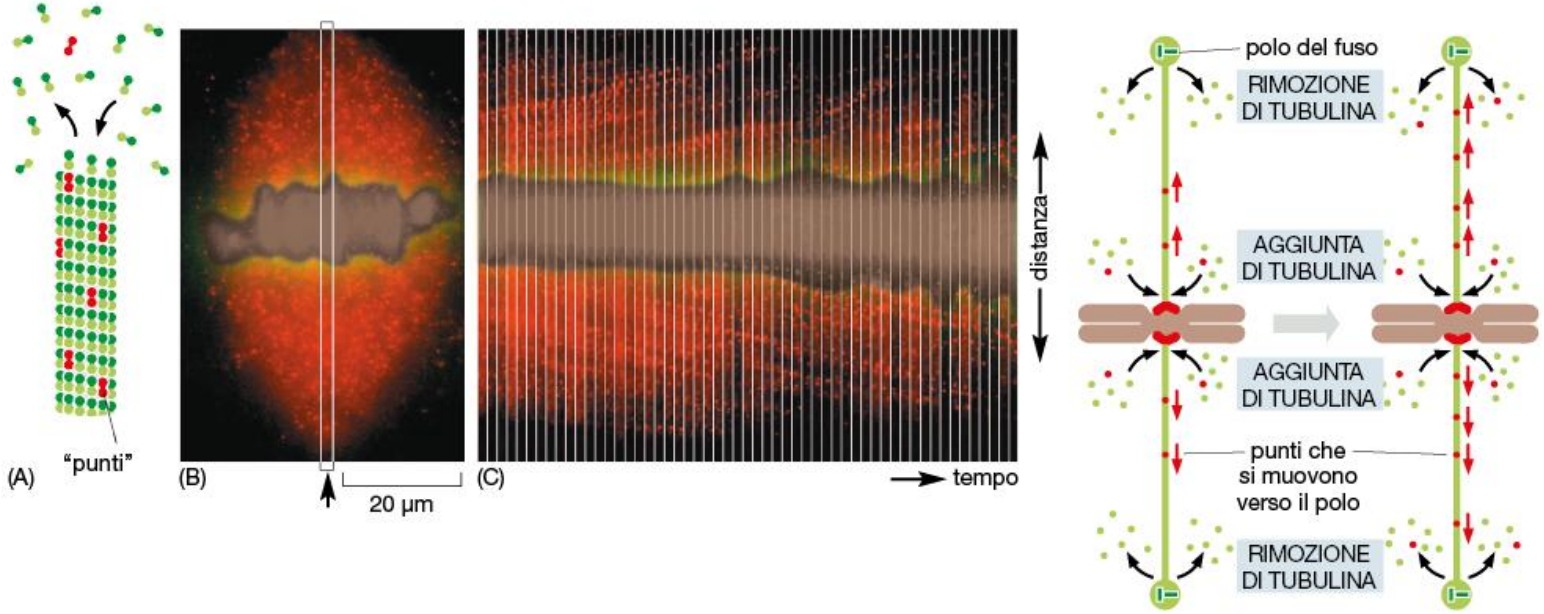
- In alcune cellule, i **MT dell'intero fuso** scorrono **verso i poli** e **vengono smantellati** alla **(−)**.
- In **metafase**: l'**aggiunta** di **tubulina alla (+) = perdita alla (−)** → **lunghezza costante** ma **flusso netto verso i poli.**
- Un cinetocore attaccato a un MT in flusso subisce una **forza poleward** che **aumenta la tensione** in metafase e aiuta il movimento in **anafase**.



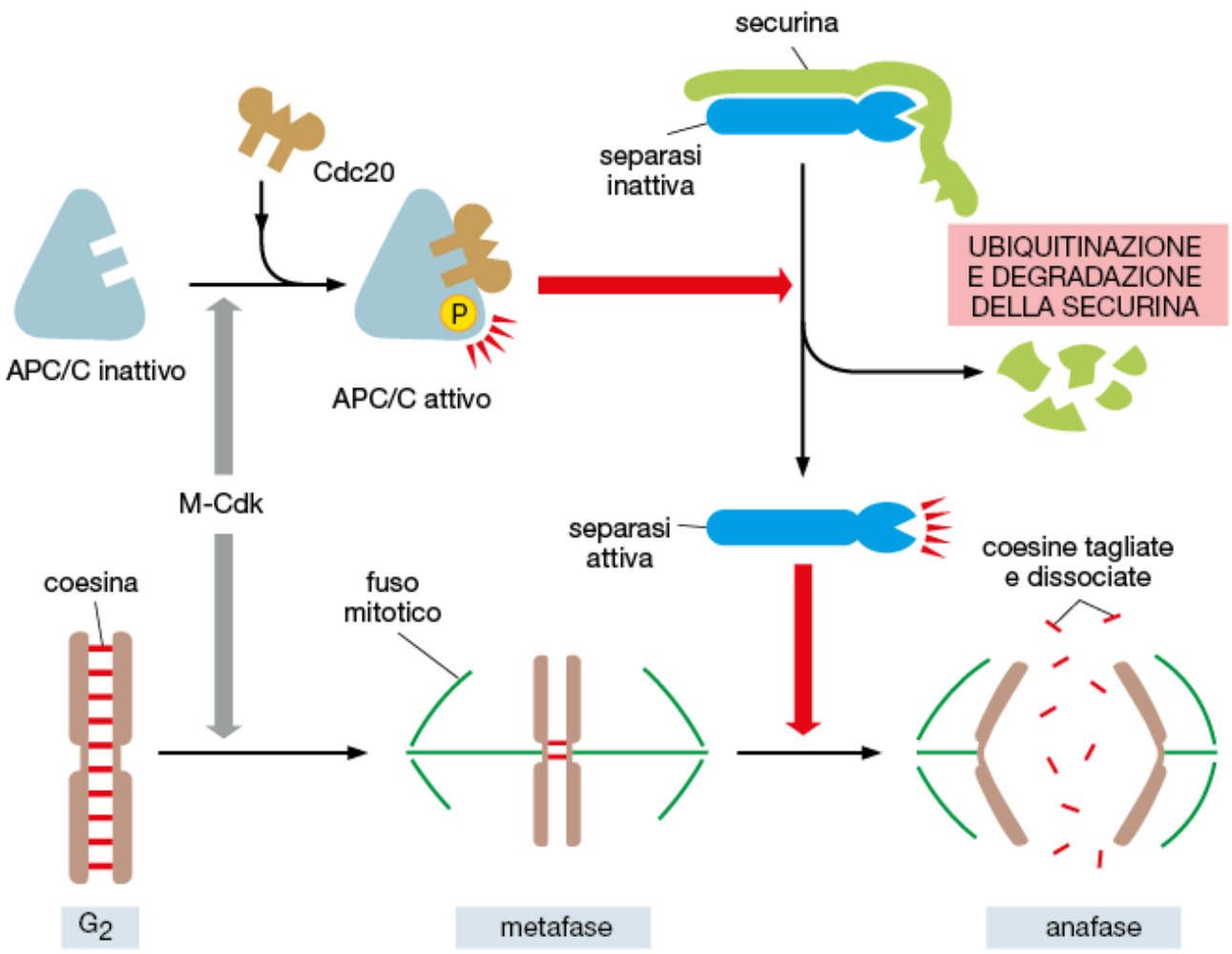
Espulsione polare (“vento polare”)

Forza #3 — Espulsione polare (“vento polare”)

- **Chinesina-4** e **Chinesina-10** (cromochinesine) sui **bracci** dei cromosomi, **dirette a (+)**.
- **Interagendo con i MT**, **allontanano** i cromosomi dai **poli**.
- Importante in **prometafase/metafase**: spinge i bracci **fuori dal fuso** e favorisce l’**allineamento sulla piastra**.



Metafase → Anafase: ruolo di APC/C



Metafase → Anafase: ruolo di APC/C

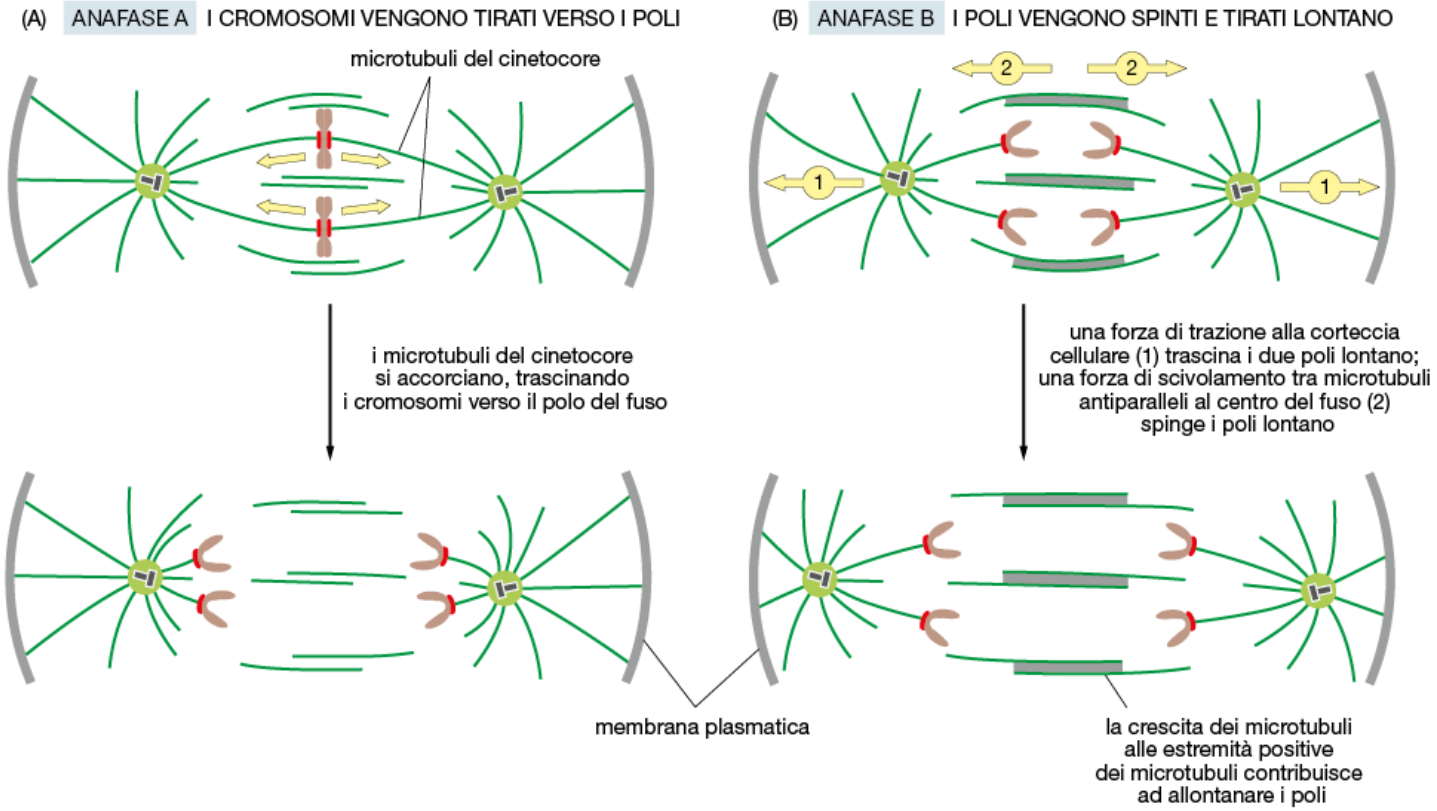
Innesco della separazione

- **APC/C-Cdc20 ubiquitina** la **securina** → **distruzione**.
- Si **libera la separasi**, che **taglia Scc1** nella **coesina** → **perdita coesione** residua (centromerica) → **cromatidi si separano**.
- In parallelo, **APC/C** dirige alla distruzione le **cicline S e M** (Ciclina A e B) → **inattivazione Cdk**.

Checkpoint dell'Assemblaggio del Fuso (SAC)

Blocca la transizione **metafase→anafase** finché **tutti** i cromosomi non sono **attaccati correttamente** e **biorientati**.

Due processi sovrapposti: Anafase A *vs* B



Due processi sovrapposti: Anafase A vs B

Anafase A — "cromosomi verso i poli"

- **Accorciamento delle K-fiber** (MT del cinetocore).
- Somma di **due forze poleward**:
  - **Depolimerizzazione alla (+)** al cinetocore → **trazione** (**Ndc80 mantiene l'aggancio**).
  - **Poleward flux**: scorrimento dei MT verso i poli con **depolimerizzazione alla (−).**

Anafase B — "poli che si allontanano"

- **Allungamento del fuso** dopo l'inizio dell'Anafase A:
  - **Dineina corticale** tira sulle **astral MT → poli verso la corteccia, lontani tra loro.**

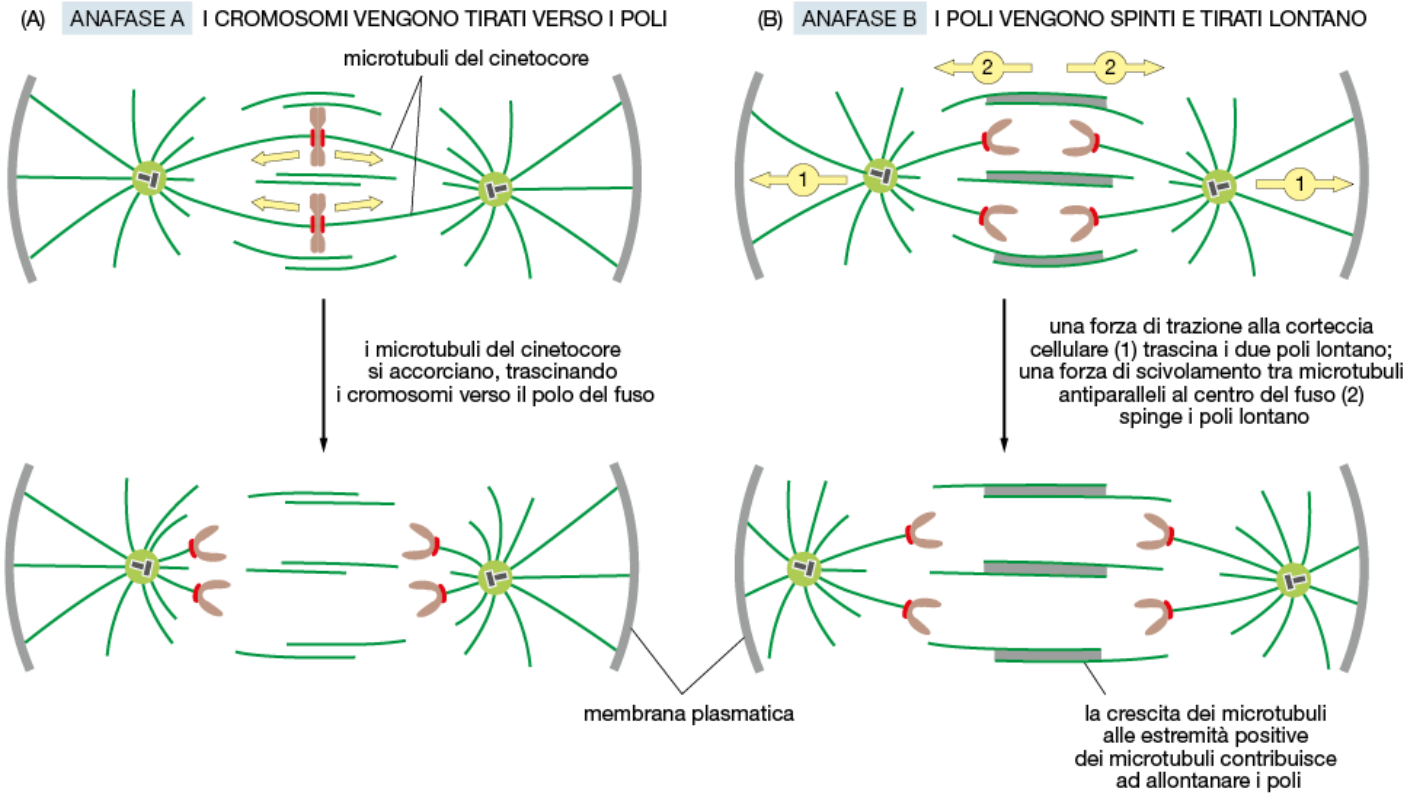
Due processi sovrapposti: Anafase A *vs* B

Trazione "senza ATP" al cinetocore

- Energia dal **rilascio** dell'energia di **GTP** immagazzinata nel MT che **depolimerizza**.
- **Ndc80** crea **legami multipli** a bassa affinità sul **fianco** del MT vicino alla (+) → **attacco dinamico** che consente lo **scivolamento** verso il polo.

Contributo del poleward flux

- In **metafase**: **polimerizzazione (+)** ≈ **depolimerizzazione (–)** → lunghezza K-fiber **costante**, ma **flusso** verso il polo.
- In **anafase**, lo stesso flusso **contribuisce** al movimento poleward dei cromosomi.



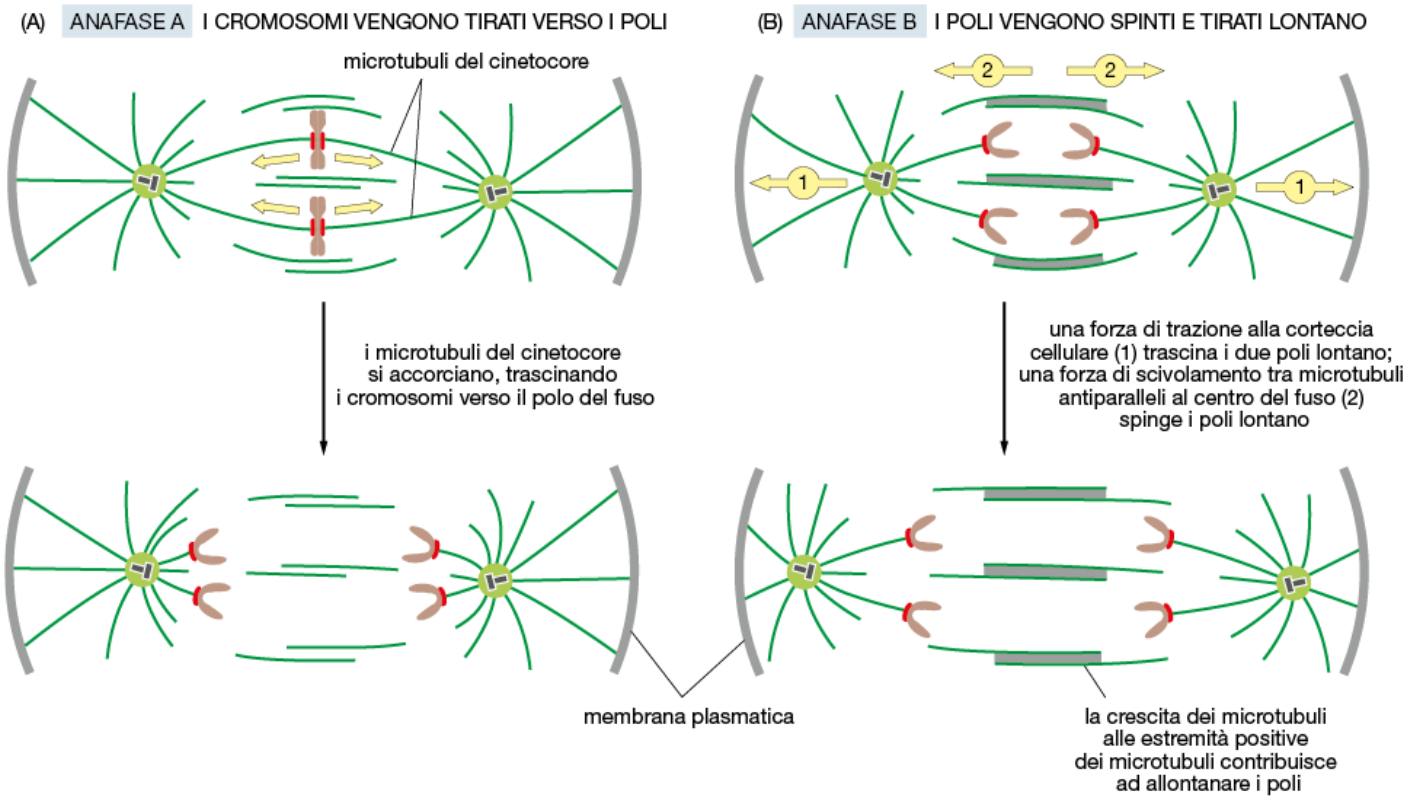
Due processi sovrapposti: Anafase A *vs* B

Motori chiave

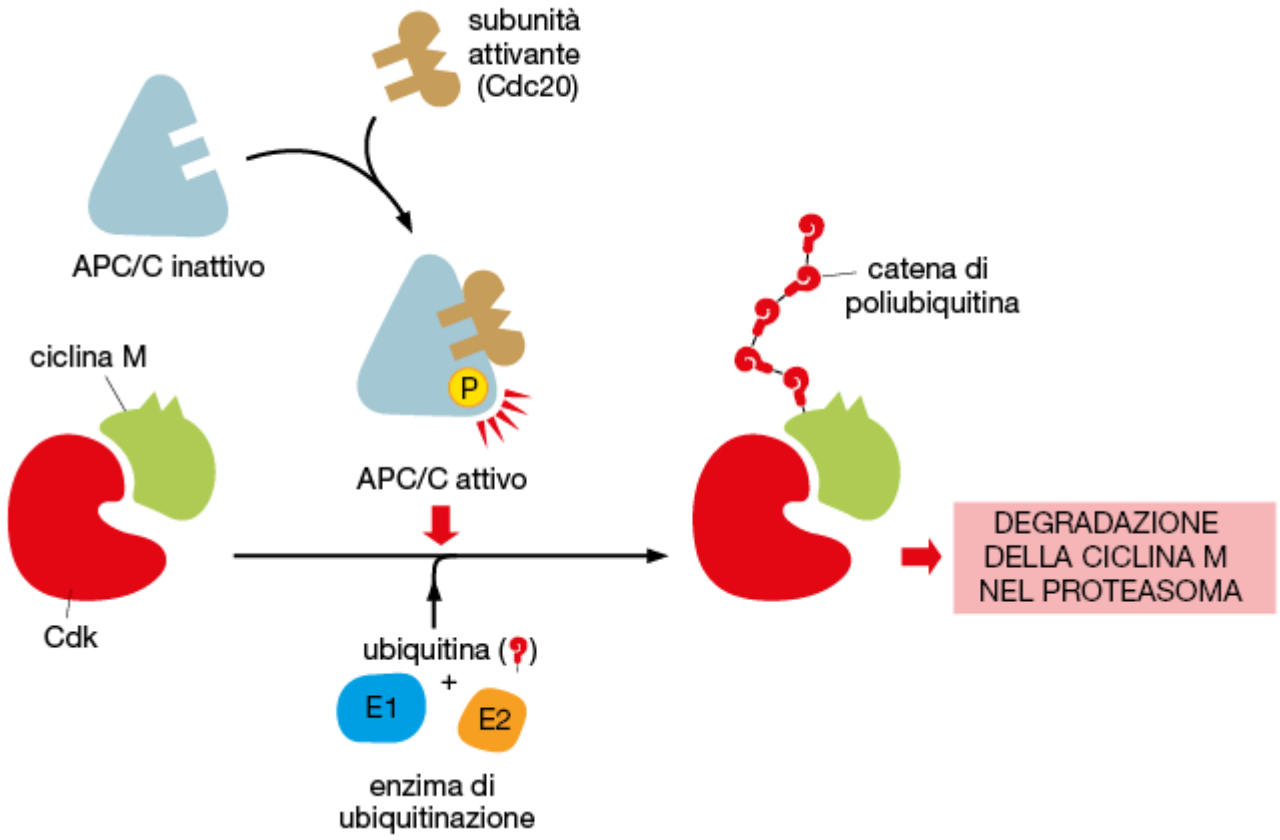
- **Dineina (corticale)**: ancora le **(+) astrali** e **tira** i poli.
- **Kinesina-5**: nella **midzone**, scorrimento **antiparallelo** → **spinta dei poli**.

Condizione necessaria: Cdk↓ & defosforilazione

- **APC/C** distrugge **cicline S/M** (Cicline A e B)→ **Cdk** si **inattivano**.
- **PP2A-B55** e altre fosfatasi **defosforilano** i **bersagli** → comportamenti MT **normali** in anafase e **uscita** da M.
- Se la **ciclina M** (Ciclina B) **non viene degradata** → separazione può avvenire, ma **movimenti** e **dinamica MT** in anafase risultano **anormali**.



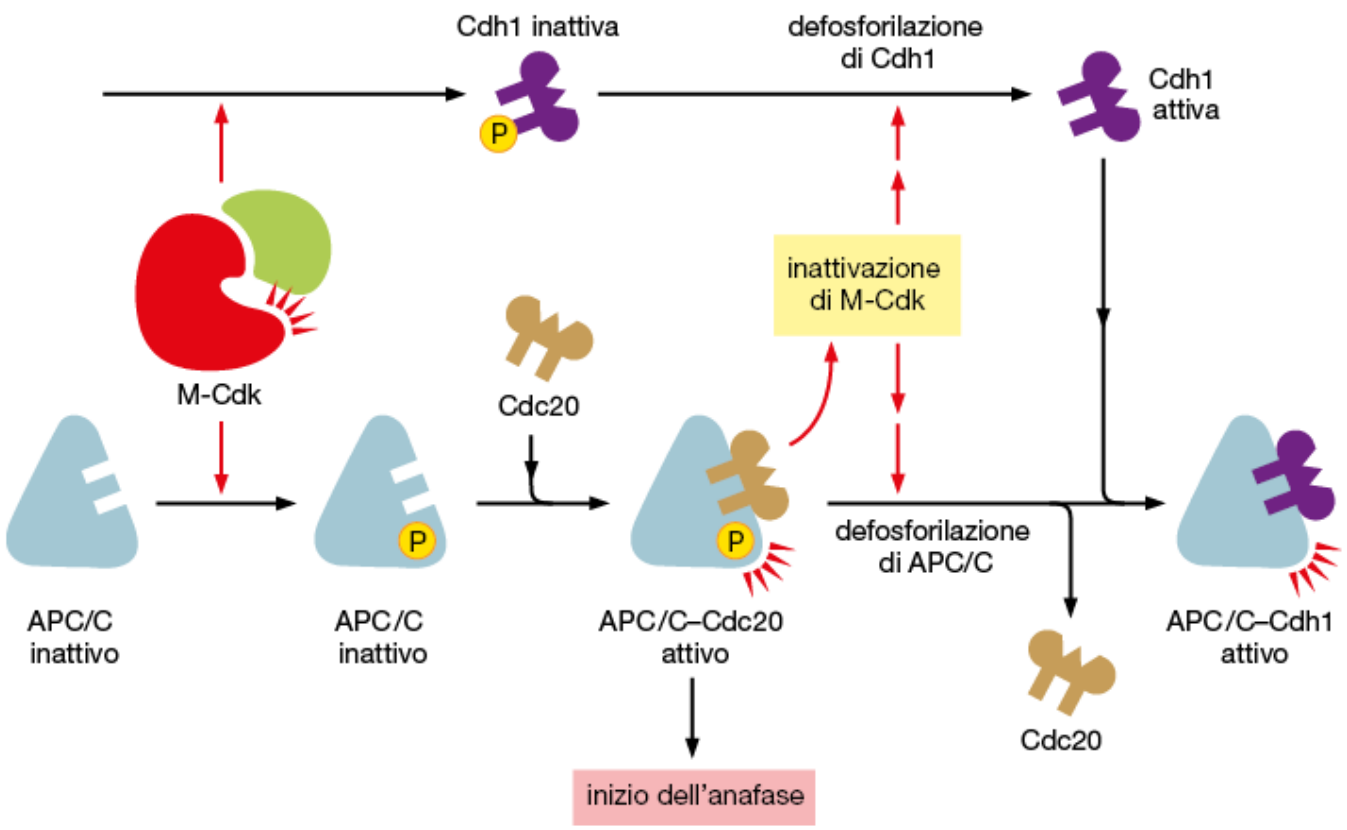
APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome)



APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome)

- Grande **ubiquitina-ligasi** che **poliubiquitina** substrati specifici → **proteasoma**.
- **Due bersagli cardine**:
  - **Securina** → la sua distruzione **attiva la proteasi** che **separa i cromatidi fratelli** → **anafase**.
  - **Cicline S e M (Ciclina A e B)** → **la loro distruzione inattiva** la maggior parte delle **Cdk** → **permette defosforilazione** (**PP2A**, ecc.) necessaria per **completare la mitosi** e avviare **citochinesi**.
- **Tempistica**: attività **APC/C** ↑ a **metà mitosi**, **rimane alta in G1**.

Attivatori di APC/C: Cdc20 → Cdh1 (sequenza temporale)



Attivatori di APC/C: Cdc20 → Cdh1 (sequenza temporale)

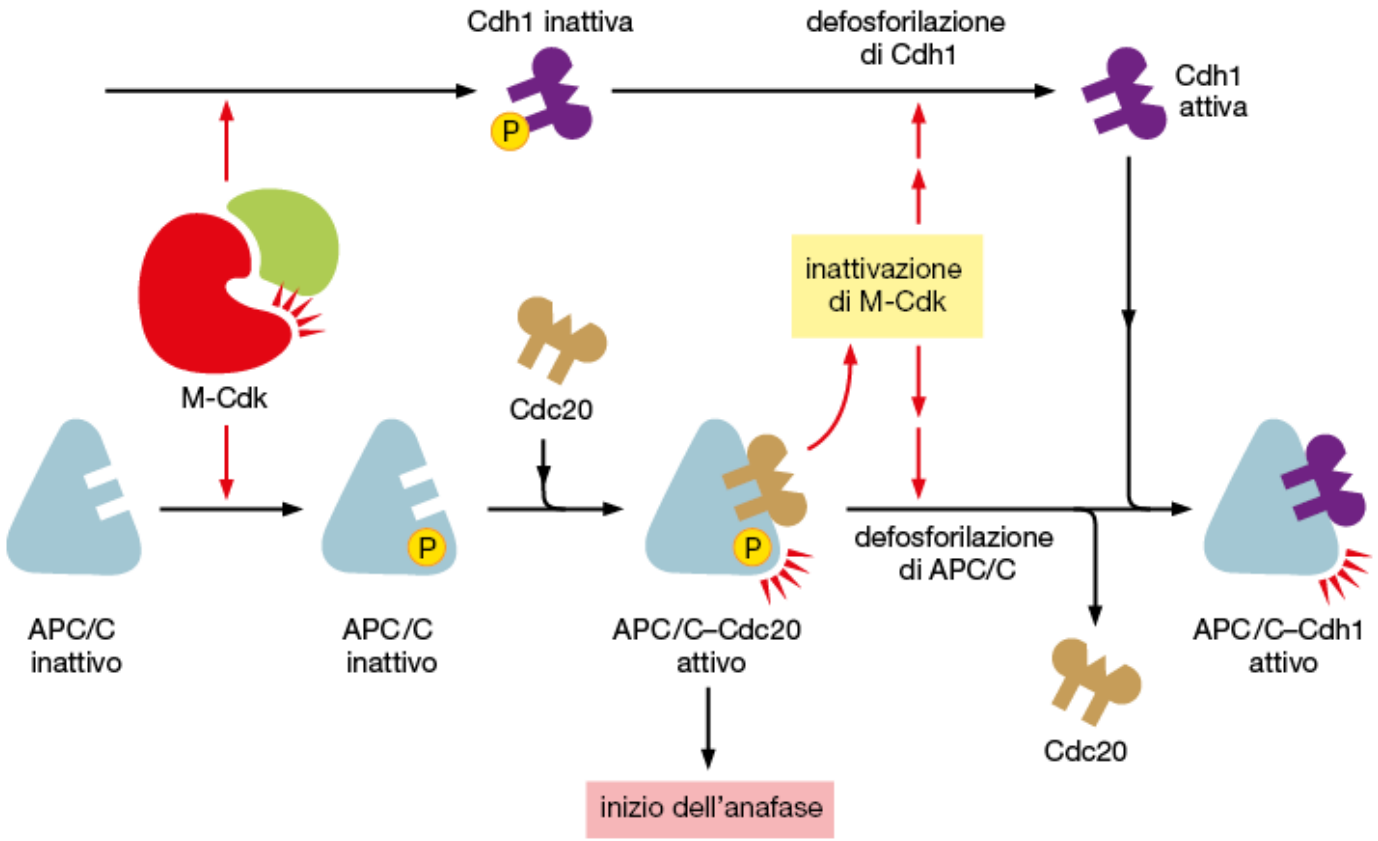
Perché servono:

- legame → **cambio conformazionale** che **potenzia l'attività APC/C**;
- **forniscono** il **sito di docking** per i **substrati** (motivi peptidici specifici).

Sequenza:

- **Cdc20 per primo** (in **metafase**): avvia la **distruzione di securina e cicline** → **anafase**.
- **Cdh1 poi** (**mitosi tardiva** → **G1**): **mantiene** APC/C attivo → **cicline basse** fino al ciclo successivo.

Attivatori di APC/C: Cdc20 → Cdh1 (sequenza temporale)



Come si alternano Cdc20 e Cdh1

M-Cdk (Ciclina B-Cdk1) ha effetti opposti:

- **Attiva APC/C-Cdc20** (**fosforila APC/C** → favorisce l'**associazione** con **Cdc20**).
- **Inibisce APC/C-Cdh1** (**fosforila Cdh1** → **ne impedisce il legame** all'APC/C).

Conseguenza dinamica:

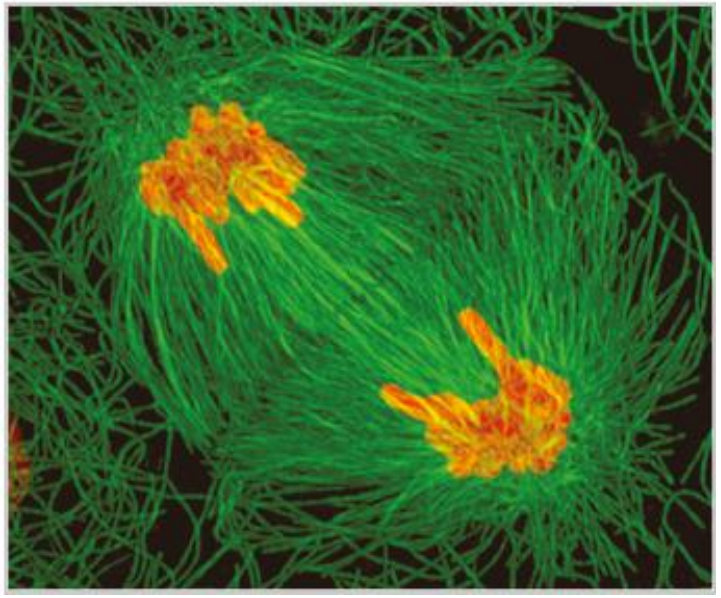
- In **mitosi precoce** (**M-Cdk alta**) → **APC/C-Cdc20 ON**.
- In **anafase** (cicline degradate → **M-Cdk ↓**) → **Cdh1 si defosforila** → **APC/C-Cdh1 ON** (persiste in **G1**).

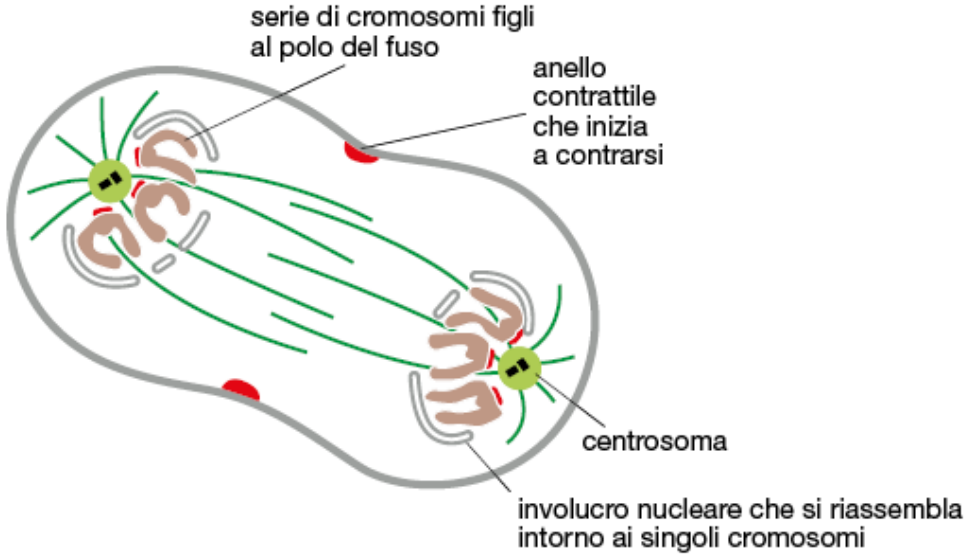
Feedback negativi:

- **M-Cdk avvia** la **propria inattivazione attivando APC/C-Cdc20.**
- **APC/C-Cdc20**, **abbattendo cicline**, **si spegne da solo** (Cdk ↓ → APC/C si **defosforila**).

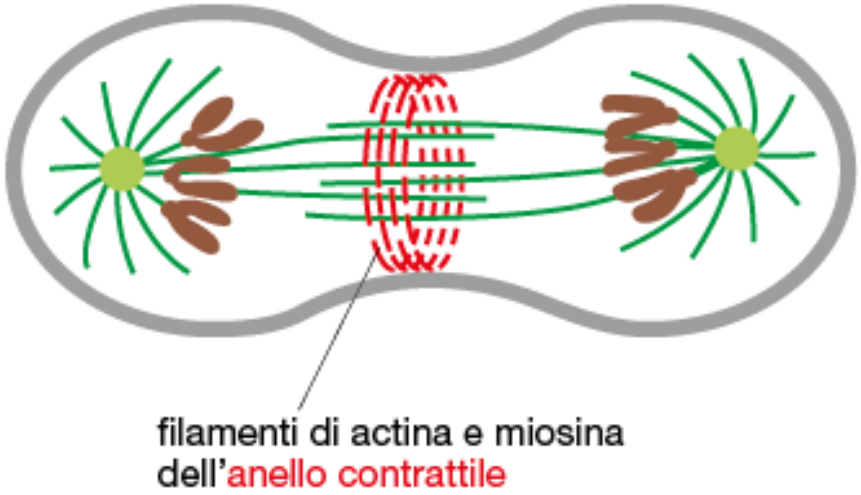
Telofase: rientro dei cromosomi nei nuclei figli

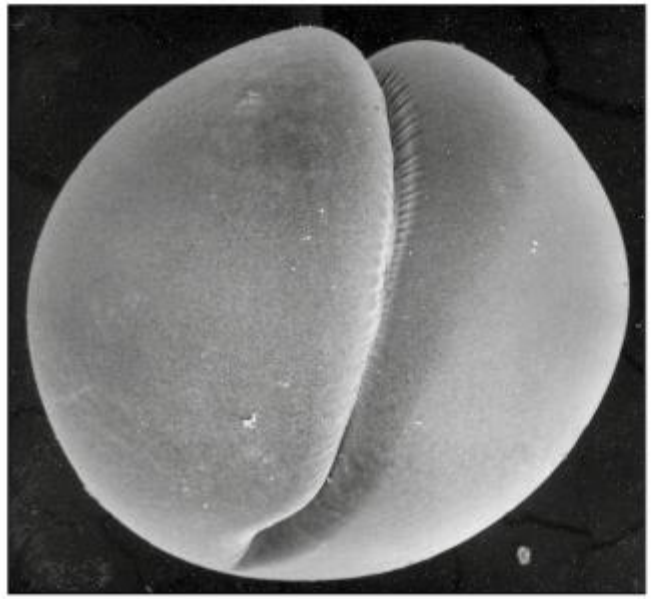
1. **Disassemblaggio del fuso**.
2. **Coalescenza** dei cromosomi in **gruppi compatti** per nucleo.
3. **Membrane del RE** con proteine dell'**involucro nucleare interno** si **associano** alla superficie cromosomica.
4. **Fusione** dei frammenti → **involucro nucleare completo**.
5. **Inserzione** dei **complessi del poro**; **riformazione** della **lamina**.
6. **Import nucleare**: i pori **pompano** proteine nucleari → **nucleo si espande**.
7. **Decondensazione** dei cromosomi → ritorno allo **stato interfase**.
8. La **riformazione dell'involucro è collegata alla defosforilazione** (Cdk↓ → PP2A↑).





Citochinesi: il passaggio finale





Citochinesi: il passaggio finale

- **Definizione**: divisione del **citoplasma** che segue la mitosi.
- **Tempistica tipica**: inizia in **anafase**, termina poco dopo la **telofase**.
- **Eccezioni**: mitosi **senza** citochinesi → cellule **polinucleate** (es. **Drosophila** embrionale precoce; **epatociti**; **cardiomiociti**).
- **Speaker note:** sottolinea che M può avvenire senza citochinesi; qui trattiamo la via "canonica" delle cellule animali.

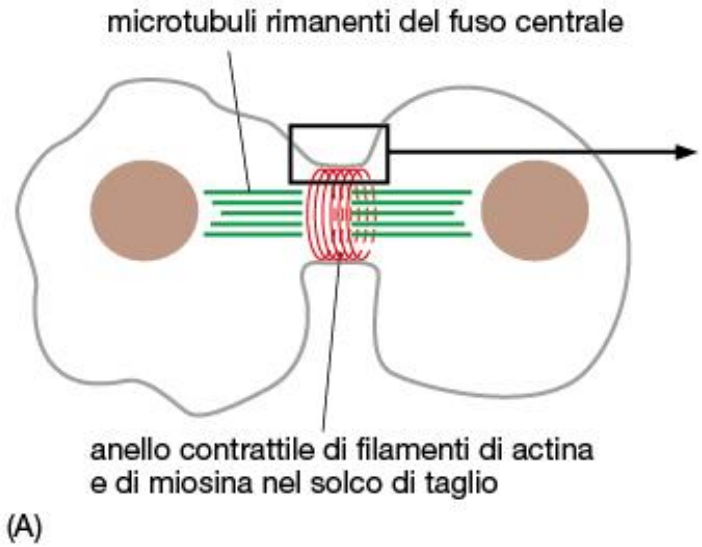
L'anello contrattile

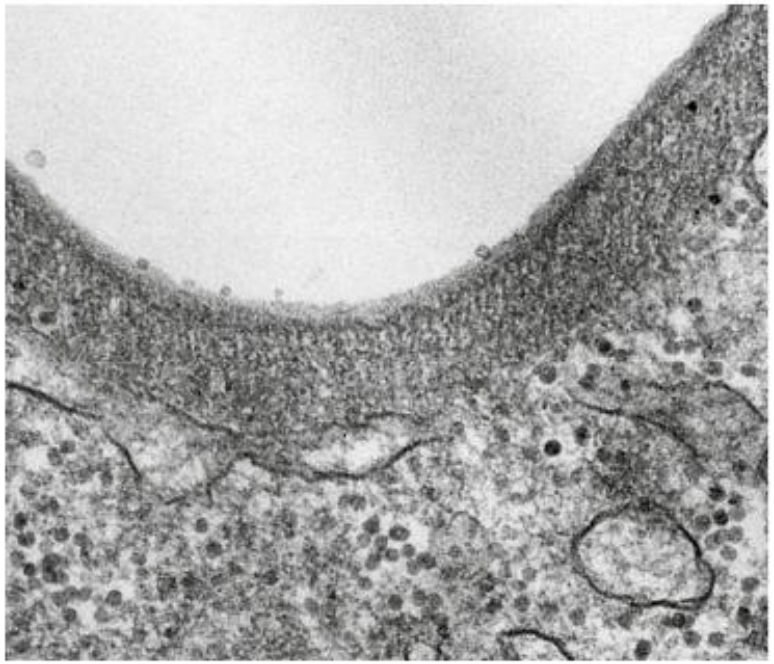
- Struttura **dinamica** sotto la membrana: **actina**, **miosina II**, proteine **strutturali/regolatrici**.
- **Assemblaggio**: **anafase**; **contrazione** progressiva + **aggiunta di membrana** da **vescicole** per compensare la superficie.

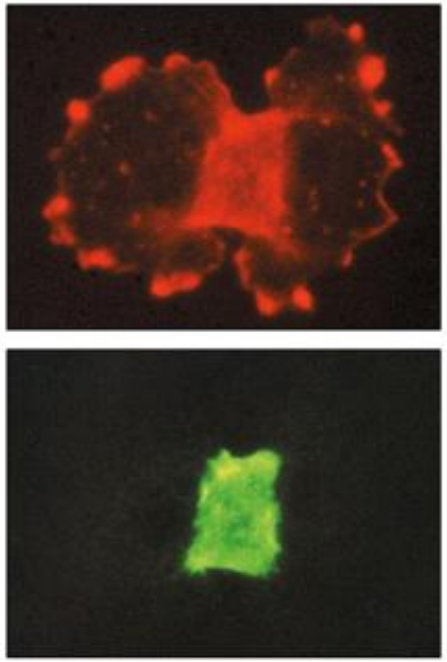
La fine della Citochinesi

- In **interfase**: actina/miosina in **corteccia** e **fibre da stress**.
- In **ingresso in M**: queste schiere si **disassemblano**; **miosina II** rilasciata.
- In **anafase**: actina e miosina II si **ri-assemblano** nell'anello; **formine** nucleano **filamenti lineari** non ramificati.

- **Contrazione**: genera forza sufficiente a **piegare un microago**; lo spessore **resta costante** mentre il diametro cala → **numero/volume** dei filamenti **diminuisce**.
- contiene il **fuso centrale** (MT antiparalleli compattati).
- La separazione finale avviene per **abscissione**: **ESCRT-III** forma **filamenti** che **strozzano e tagliano** le membrane su entrambi i lati.



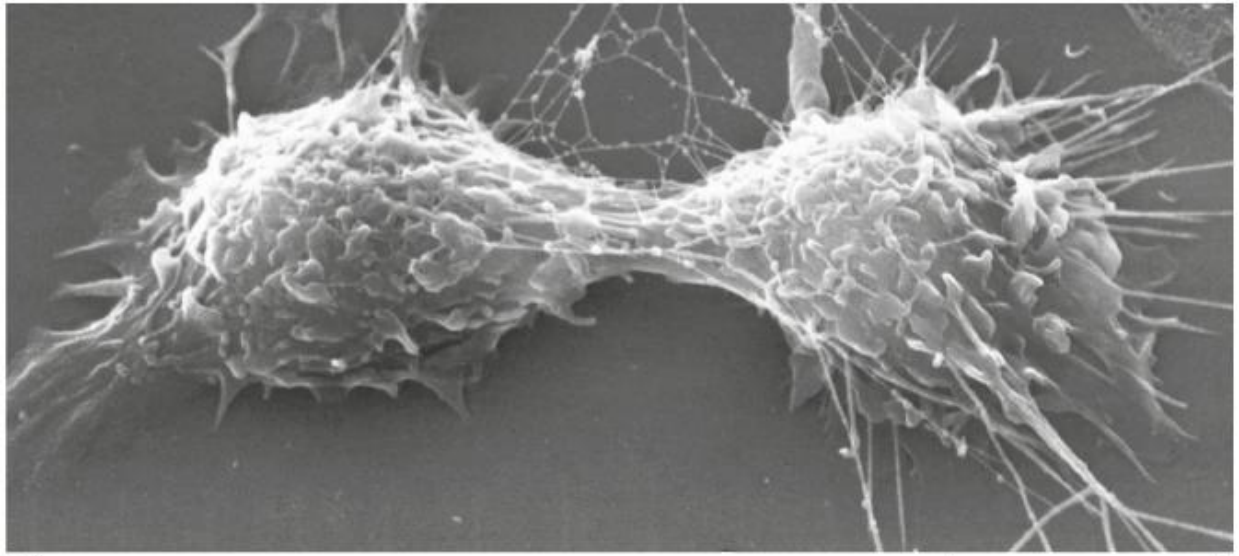




L’accrescimento e divisione degli altri Organuli

- La mitosi garantisce un set **completo di cromosomi** a ciascuna figlia, ma ogni cellula figlia deve **ereditare anche gli organuli a membrana** (RE, Golgi, mitocondri, cloroplasti, ecc.).

- **Niente “de novo”**: mitocondri/cloroplasti e anche il RE non si formano da zero; **derivano da crescita e divisione di organuli preesistenti**.



(A) 10 µm

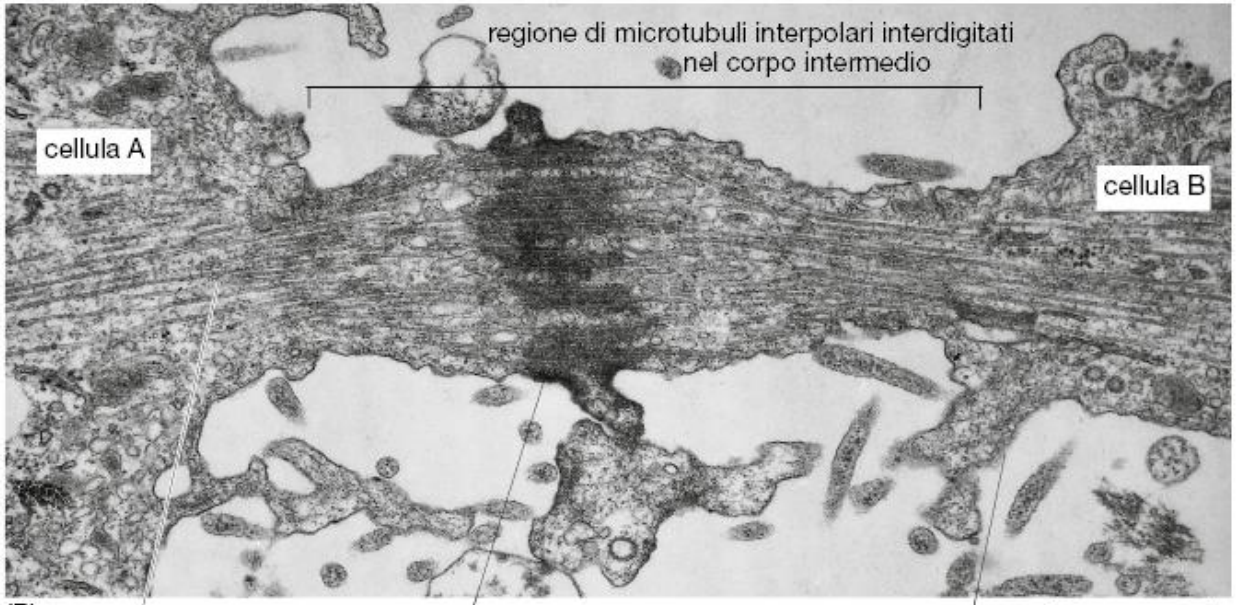
Strategie generali di segregazione

Organuli numerosi (es. **mitocondri**, **cloroplasti**):

- Se il **numero raddoppia** circa per ciclo, la **partizione stocastica** li distribuisce con elevata probabilità ad **entrambe** le figlie.

Organuli continui o poco numerosi (es. **RE**, **Golgi**):

- **Usano riorganizzazioni mitotiche** e **ancoraggi al fuso** per garantire una distribuzione **bilanciata**.



(B) microtubuli interpolari rimanenti dal fuso centrale — matrice di materiale denso — membrana plasmatica — 1 µm

L'accrescimento e divisione degli altri Organuli

Reticolo Endoplasmatico (RE)

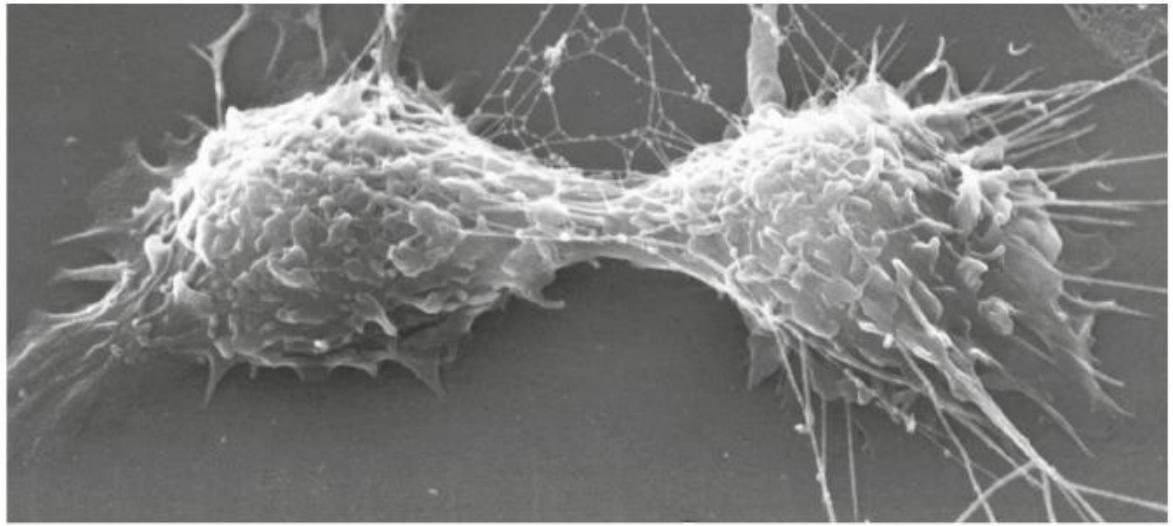
- In **interfase**: in **continuità** con la **membrana nucleare**; organizzato dai **microtubuli**.
- **Ingresso in M**: riorganizzazione dei MT + **frammentazione dell'involucro nucleare** → il **RE si libera** dai vincoli.
- **Citochinesi**: il tappeto di **RE** viene **fisicamente "tagliato in due"** dal solco → **entrambe le figl**ie ricevono **porzioni funzionali** di RE.

Apparato di Golgi

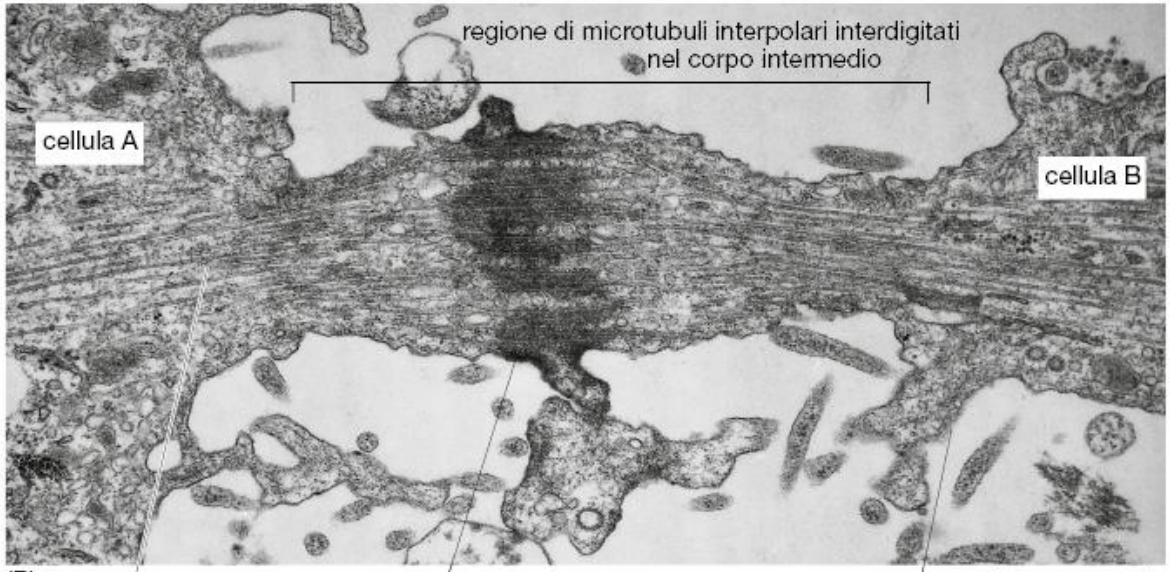
- **Mitosi**: il Golgi si **riorganizza** e **frammenta** in **vescicole/elementi**.
- I **frammenti si associano ai poli del fuso** → il fuso li **porta verso estremità opposte**.

Mitocondri e (nelle piante/altri eucarioti) cloroplasti

- **Non si assemblano de novo**; richiedono **organuli preesistenti** per crescere/dividersi.
- **In genere sono numerosi** → la **duplicazione numerica prima della divisione** + **mescolamento** citoplasmatico fa sì che **entrambe le figlie** ne ricevano una **quota sufficiente**.

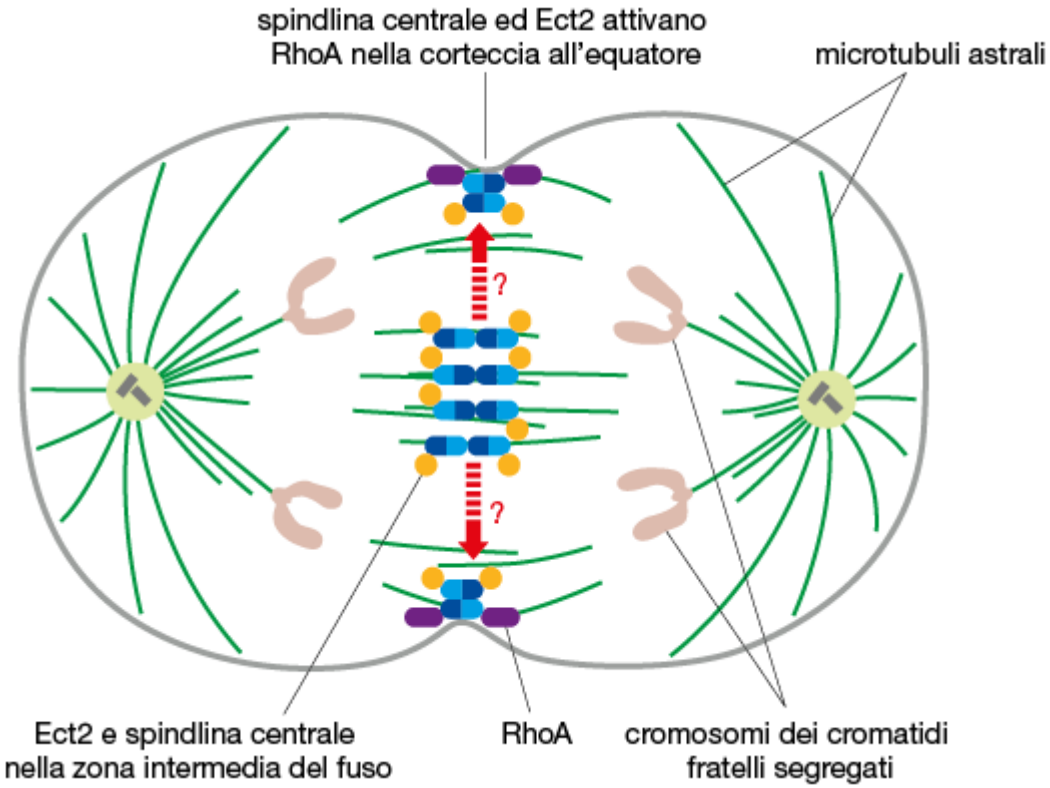


(A) 10 µm



(B) microtubuli interpolari rimanenti dal fuso centrale — matrice di materiale denso — membrana plasmatica — 1 µm

Uscita dalla mitosi: defosforilazione coordinata



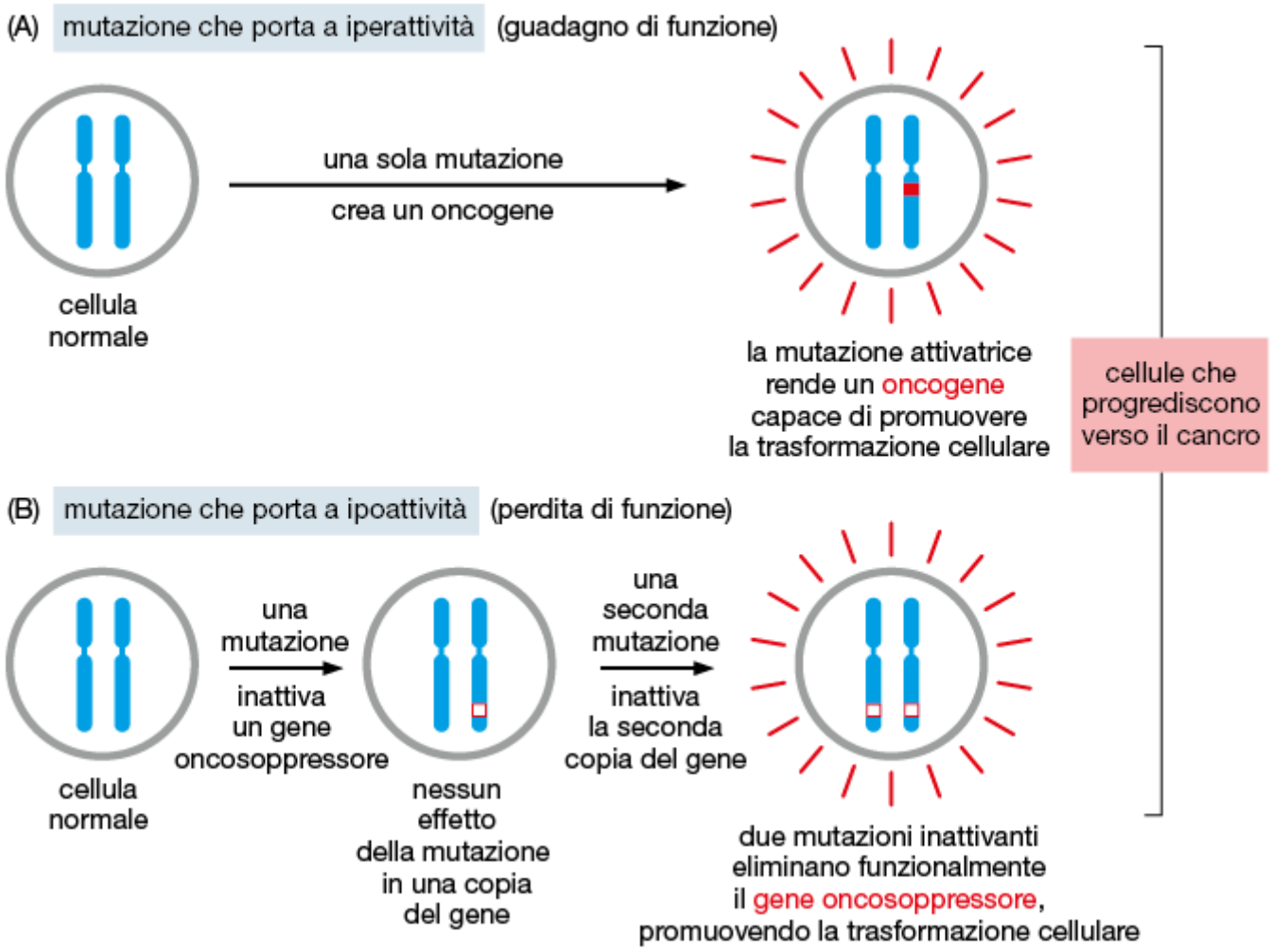
Uscita dalla mitosi: defosforilazione coordinata

La caduta di **Cdk** + attivazione di **fosfatasi** (es. **PP2A-B55**) →

- **Disassemblaggio** del fuso,
- **Riassemblaggio** dell'**involucro nucleare**,
- **Citochinesi**.

Nota: **PP2A-B55 era inibita in mitosi; si riattiva quando Cdk crollano**.

Geni cruciali per il Cancro



- Il cancro nasce da **modifiche ereditate nelle cellule somatiche** (mutazioni + cambiamenti epigenetici) che passano alla progenie.

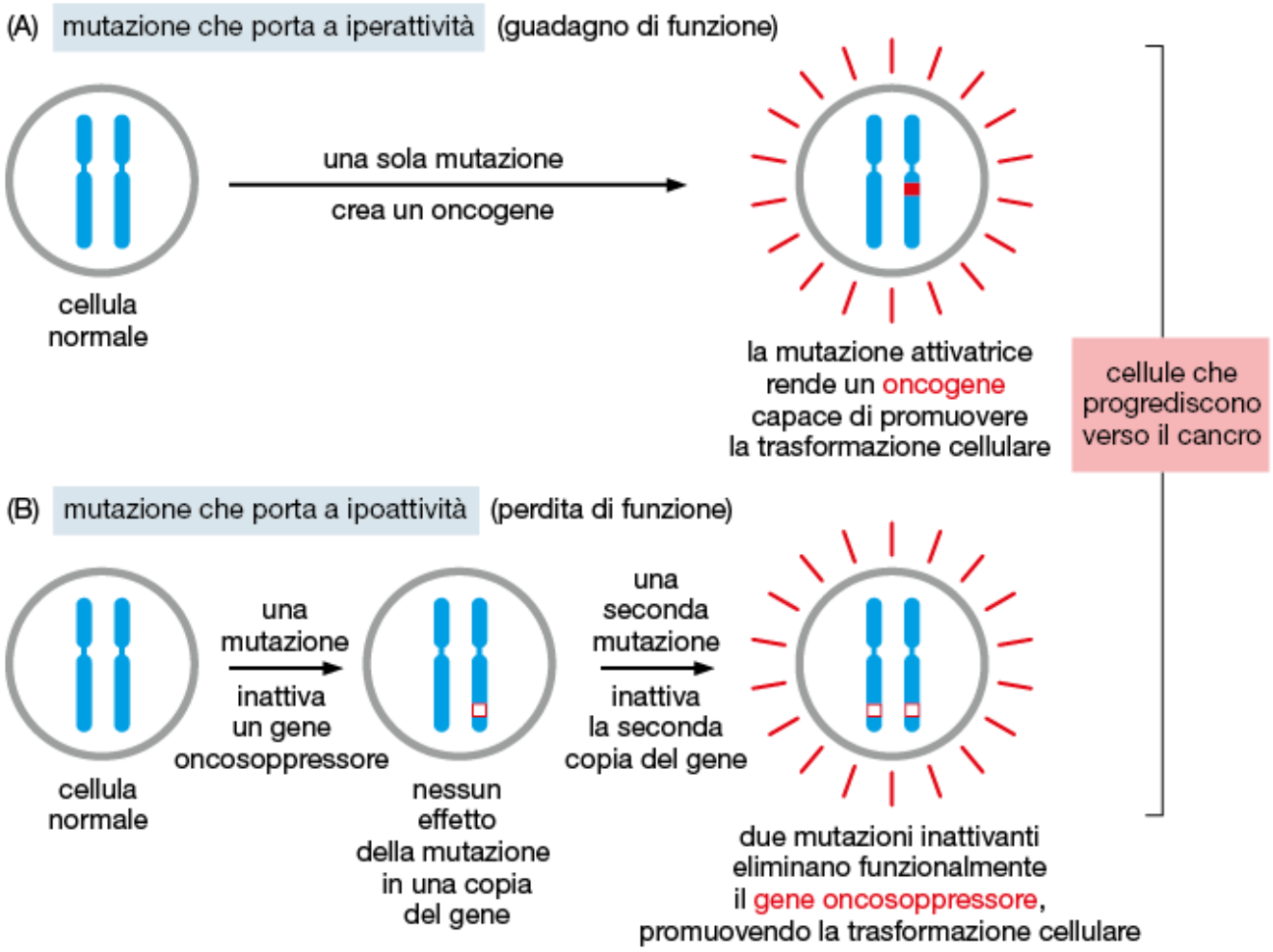
- Sfida: in un tumore coesistono **alterazioni "trainanti" (driver)** e molte **"trainate" (passenger)** dovute all'**instabilità genetica** → difficile separarle.

"Geni cruciali per il cancro"

- Termine ombrello per tutti i geni le cui **alterazioni contribuiscono a causare/evolvere** il cancro.

- I set di geni alterati **variano tra individui e tumori**, ma esistono **punti in comune** per tipo istologico.

Oncogeni e Oncosoppressori



Due grandi classi funzionali

1) Proto-oncogeni → Oncogeni (guadagno di funzione)

- La mutazione **attiva** (o **iper-esprime**) la funzione → **promuove crescita**.
- **Dominanti** a livello cellulare: **basta una copia** mutata per effetto **proliferativo**.

2) Geni oncosoppressori (perdita di funzione)

- La mutazione **riduce/abolisce** un freno → **favorisce** trasformazione (**direttamente o via instabilità**).
- **Recessivi** a livello cellulare: spesso serve **perdere entrambe le copie** per vedere l'effetto.

- **Sottoclasse: geni di manutenzione del genoma**
- Alterati → **instabilità genomica/epigenetica** che **facilita** l'accumulo di ulteriori driver.

- Dal punto di vista della cellula tumorale, **entrambi** i tipi **convergono su output simili** (es. **aumento dei segnali proliferativi**).

Oncogeni e Oncosoppressori: Identificazione Sperimentale

Identificazione di oncogeni (guadagno di funzione, dominanti)

Si riconoscono dagli **effetti quando aggiunti** a cellule/animali test:

- **Trasfezione** di DNA
- **Infezione** con **vettori virali**
- Valutazione del **fenotipo trasformato/proliferativo**

Identificazione di oncosoppressori (perdita di funzione, recessivi)

- Approccio "**cosa manca**" nella cellula tumorale: cercare **perdite/disattivazioni** di geni che normalmente **frenano** il ciclo o **mantengono** il genoma.

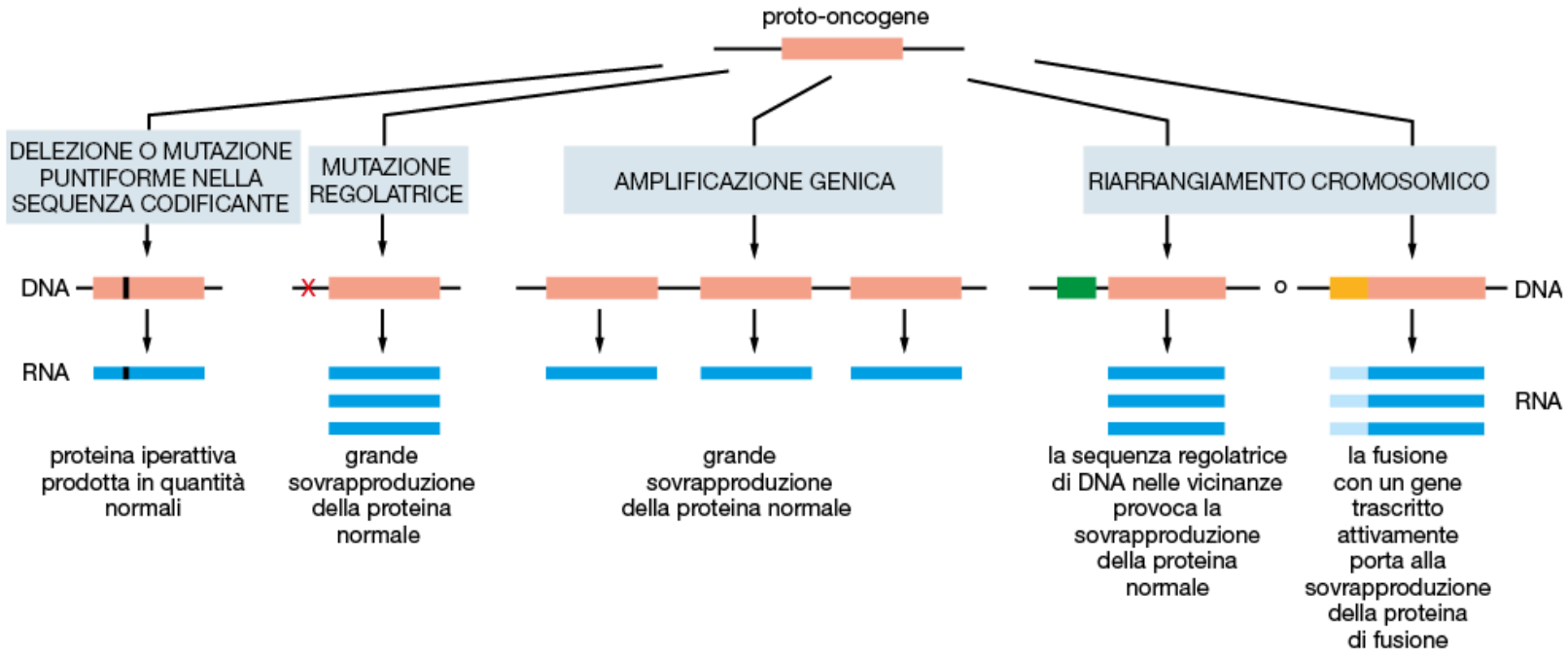
Classe	Tipo di alterazione	Effetto cellulare	Ereditarietà funzionale	Strategia di scoperta
Oncogeni	**Guadagno** (mutazione attivante / iperespressione)	**Spinta** proliferativa/sopravvivenza	**Dominante**	**Aggiunta** del gene → fenotipo
Oncosoppressori	**Perdita** (inattivazione / silenziamento)	**Rimozione del freno / instabilità**	**Recessiva** (spesso biallelica)	Cercare **perdite/disattivazioni**

Retrovirus: pista maestra verso gli oncogeni

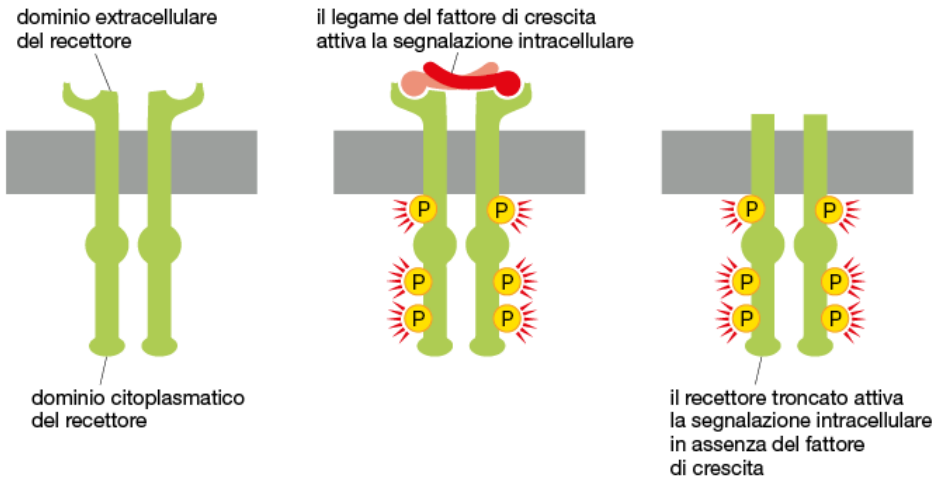
- I virus sono **minoranza** nelle cause dei tumori umani, ma gli **studi sui virus oncogeni animali** hanno fornito strumenti decisivi.
- Caso storico: **Virus del sarcoma di Rous (RSV)** → primo indizio che un virus può **indurre sarcomi** (connettivo) nei polli.
- I **retrovirus**: RNA → **trascrizione inversa** → DNA **integrato** nel genoma dell'ospite → **eredità** alle cellule figlie.

v-Src vs c-Src: il colpo di scena

- **Il DNA inserito da RSV conteneva** un gene accessorio **non essenziale per il virus**: **v-Src** (oncogene virale).
- **v-Src** è molto simile a **c-Src** (**gene cellulare** universale dei vertebrati) **ma è mutato** → **tirosina chinasi costitutivamente attiva**.
- Interpretazione: **il retrovirus ha catturato per caso** un gene dell'ospite (**c-Src**) **e lo ha alterato** → **oncogene**.
- Gli **oncogeni virali** rivelano l'esistenza di **proto-oncogeni cellulari**.



Ras: piccolo GTP-switch, grande impatto clinico



Il saggio di trasformazione con DNA tumorale umano

- Protocollo: **estrai DNA** da cellule di tumore umano → **frammenta** → **trasfetta** cellule di topo in coltura.
- **Esito**: compaiono **colonie trasformate** (fenotipo di **crescita anomala**, impilamento; "focus formation").
- Isolando e sequenziando il **frammento** responsabile → si identifica la **versione umana** di un gene già noto dai retrovirus dei ratti: **v-Ras** → **Ras umano oncogenico**.
- **Speaker note:** evidenzia la logica "aggiungo un frammento, vedo il fenotipo, risalgo al gene driver".

Ras: piccolo GTP-switch, grande impatto clinico

- **Ras normali**: **GTPasi monomeriche** che trasmettono segnali da **recettori** di superficie.
- **Oncogeni Ras** (nei tumori umani): **mutazioni puntiformi** → **Ras iperattiva** (difetto di **idrolisi GTP→GDP**) → **segnale ON** continuo.
- **Dominanza funzionale**: basta **una copia mutata** per il fenotipo pro-proliferativo.
- **Frequenza**: mutazioni in **almeno uno** dei tre geni **Ras umani** ≈ **~30%** di tutti i tumori → **tra i driver più rilevanti**.

Modi in cui un proto-oncogene diventa un oncogene

1) Mutazioni puntiformi / piccole delezioni

- **Nella regione codificante** → proteina **iperattiva** (es. dominio catalitico, siti regolatori).
- **Nelle regioni regolatrici** → **sovrapproduzione** (↑ trascrizione).

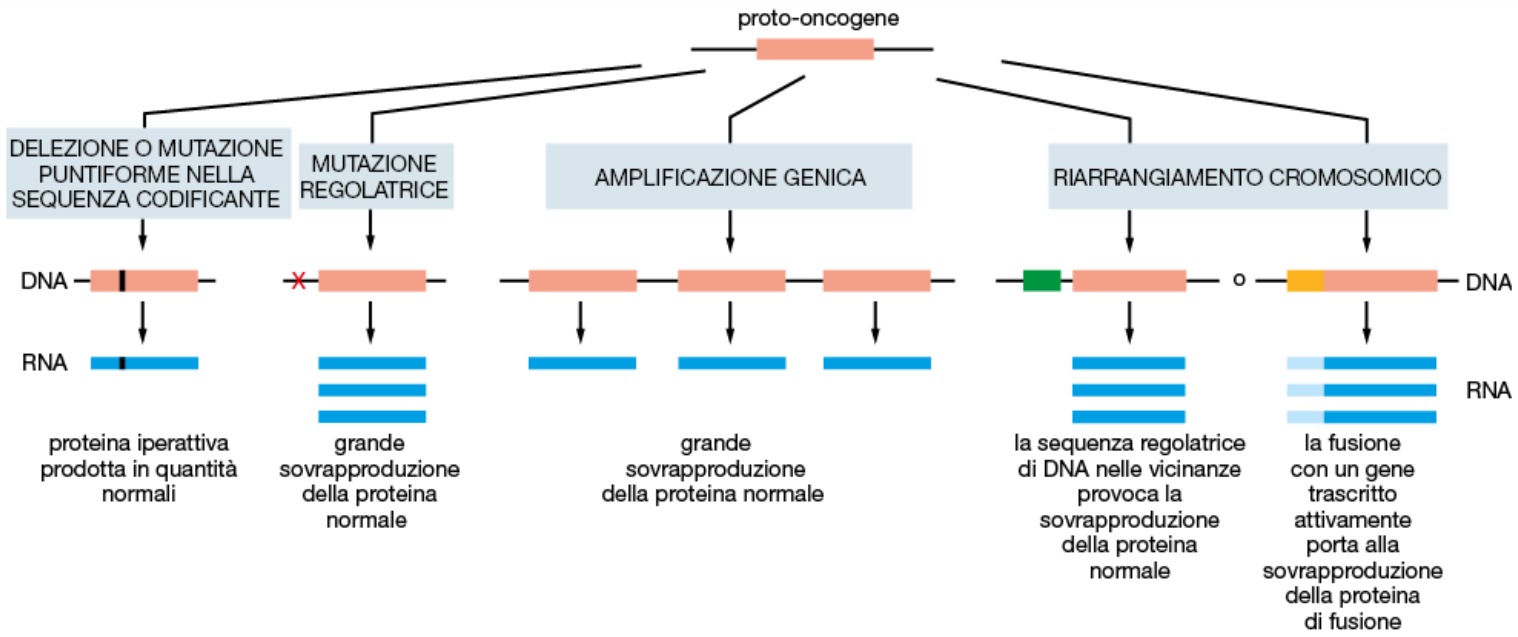
2) Amplificazione genica

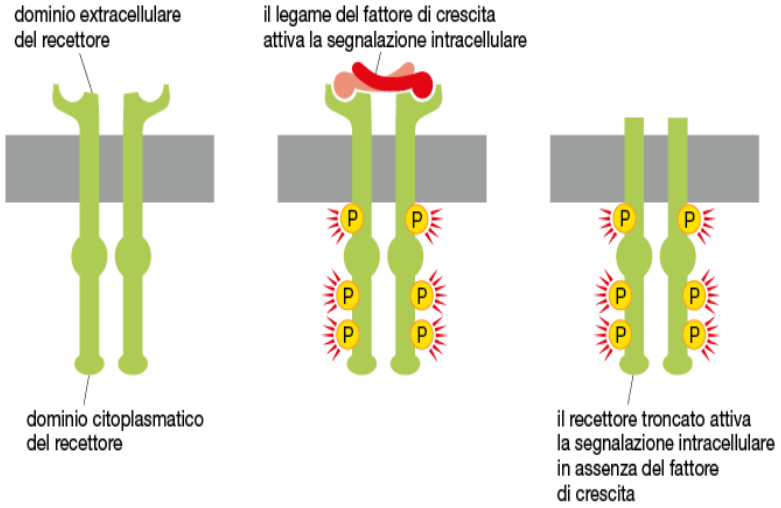
- **Errori di replicazione** → **copie extra** del gene → **overexpression** della proteina.

3) Riarrangiamenti cromosomici

- **Fusione** o **troncamento** della regione codificante → **proteina di fusione**.
- **Promoter swapping/enhancer hijacking** → gene normale sotto **controllo regolatorio forte** → **overexpression**.

- **EGFR**: **delezione** del dominio extracellulare → **attivazione senza ligando** → segnale "campanello guasto" (frequente nel **glioblastoma**).
- **MYC**: **Amplificazione** → tante copie → **MYC↑**. **Mutazione puntiforme** → **stabilizza** la proteina (turnover normalmente rapido). **Traslocazione** (es. **linfoma di Burkitt**): MYC sotto **enhancer Ig** dei linfociti B → **mRNA/proteina MYC↑** → **proliferazione** incontrollata.

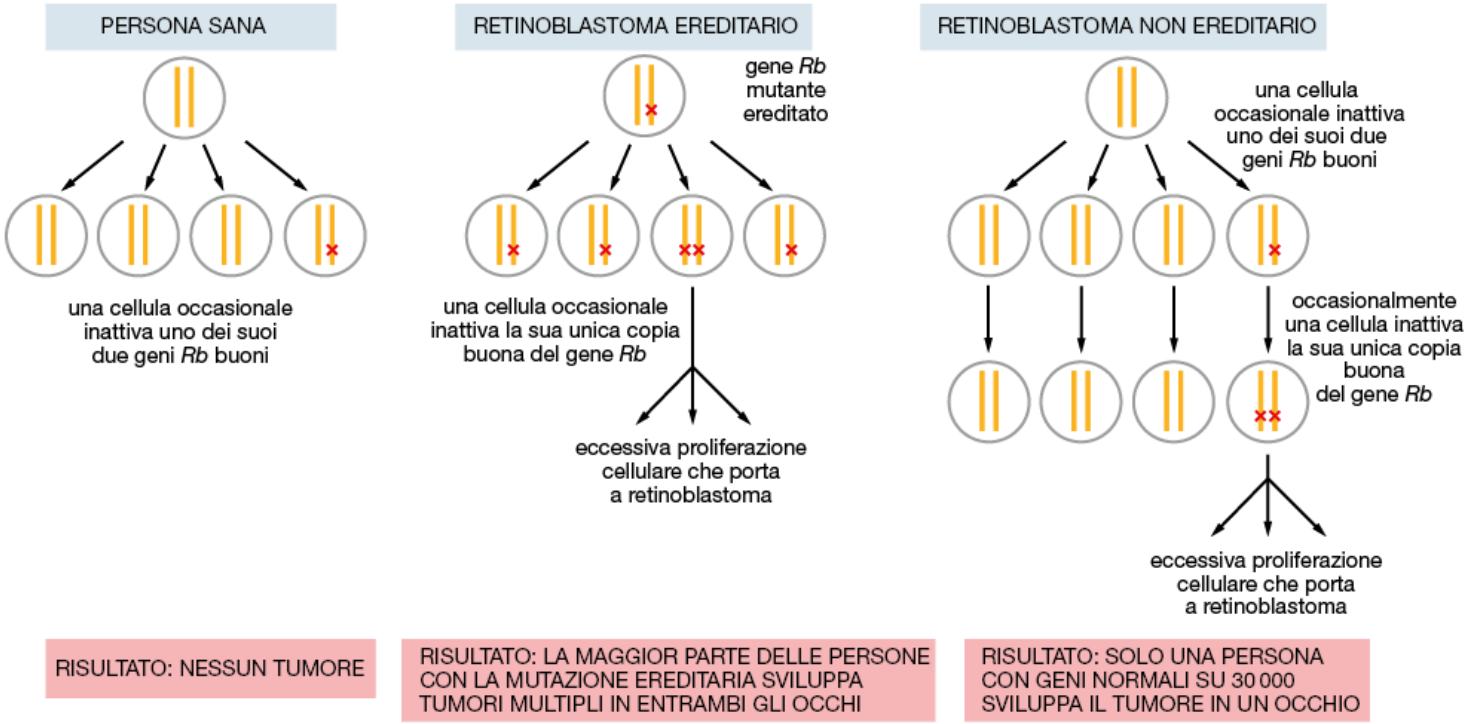




Come si scoprono i geni oncosoppressori: il caso Rb

Retinoblastoma (raro, infantile; cellule progenitrici neurali retiniche; ~1/20 000):

- **Forma ereditaria**: più tumori, **bilaterale**; i pazienti **ereditano** una **copia difettosa** di **RB1** in ogni cellula somatica → **predisposizione**. Nelle cellule tumorali: **perdita della seconda copia** (evento somatico).
- **Forma sporadica**: **nessun difetto** RB1 **nelle cellule sane**; **il tumore** sorge quando **due eventi indipendenti inattivano entrambe** le **copie** in una cellula retinica.

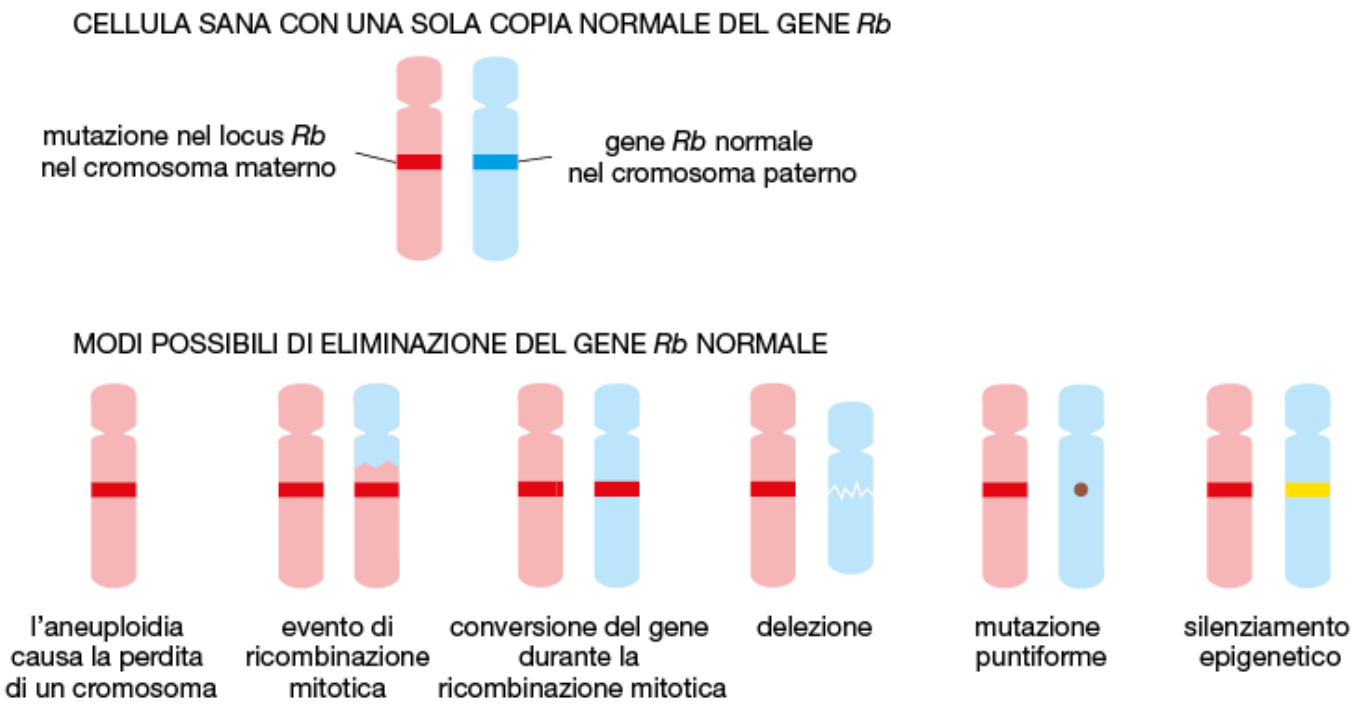


- Indizi citogenetici: **delezione di una banda di chr 13** (13q) → ha guidato al **clonaggio** di **RB1**.
- **RB1** è spesso perso anche in tumori sporadici comuni (polmone, mammella, vescica) come passo della **progressione**.
- **Funzione di Rb** - **Freno universale** del ciclo: lega **E2F** e **blocca** l'ingresso in **S**; perdita di Rb → ingresso **inappropriato** nel ciclo.

Oncosoppressori: Two-hits per inattivare il gene

Primo "colpo"

- **Mutazione puntiforme** inattivante **oppure piccola delezione** nella sequenza.

Secondo "colpo" (spesso meno specifico; cellula già instabile)

- **Perdita del cromosoma** con l'allele sano / **errori di segregazione**.
- **Ricombinazione mitotica** o **conversione genica** → copia mutante "sostituisce" quella normale.
- **Delezione più ampia** che rimuove l'allele residuo.
- **Silenziamento epigenetico (alternativo o aggiuntivo)**
- **Metilazione** ereditabile delle **CpG** nel **promotore** → **silenzia** stabilmente l'allele rimanente in quella linea cellulare → trasmesso a tutta la **progenie**.