REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

www.fisiokinesiterapia.biz

Siti utili

Animazione sul ciclo cellulare e su come è stata scoperta la sua regolazione:

http://www.usask.ca/biology/biol316/visgen/CELL.mov

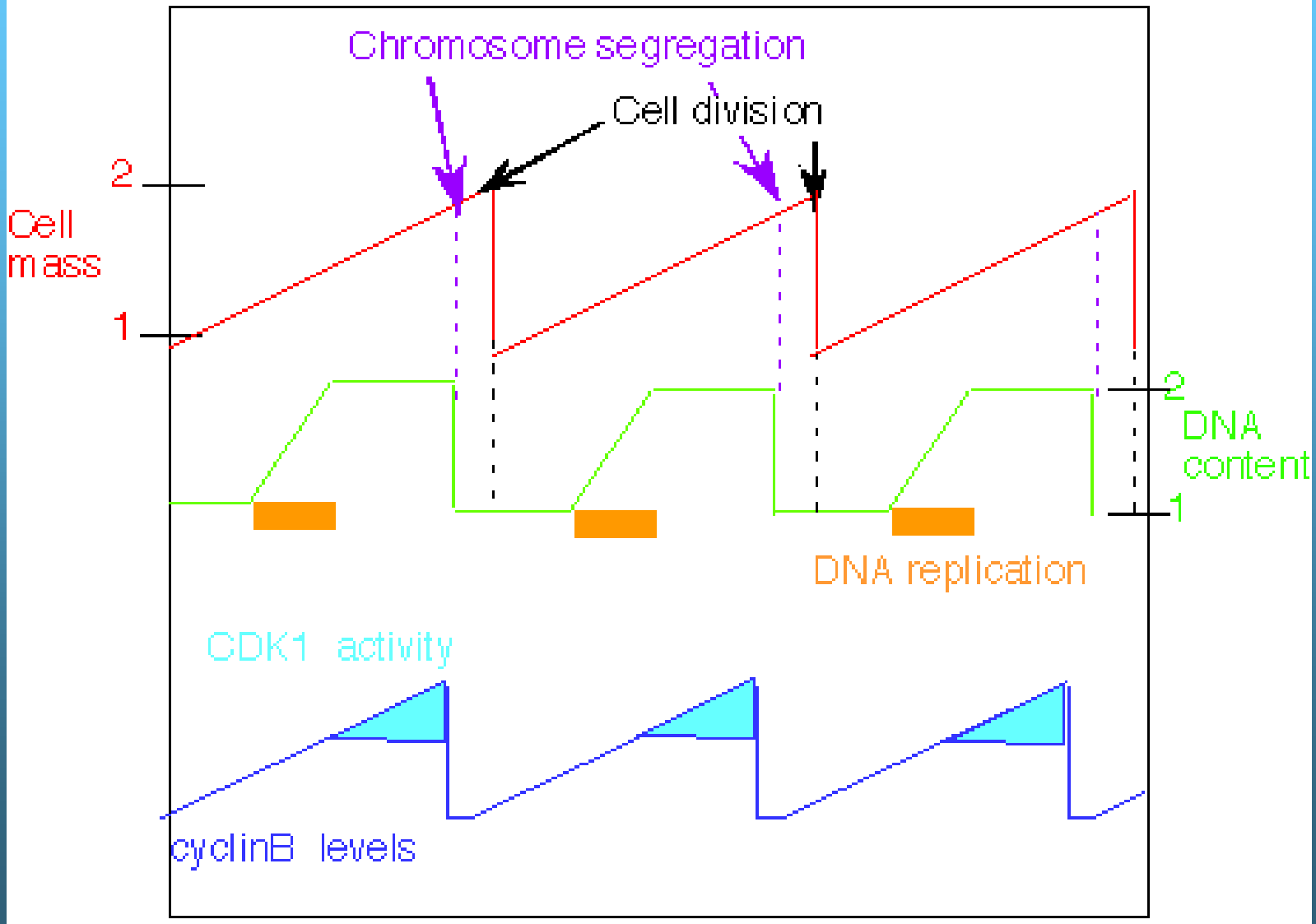
Sito sul lievito *Saccharomyces cerevisiae*:

http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/

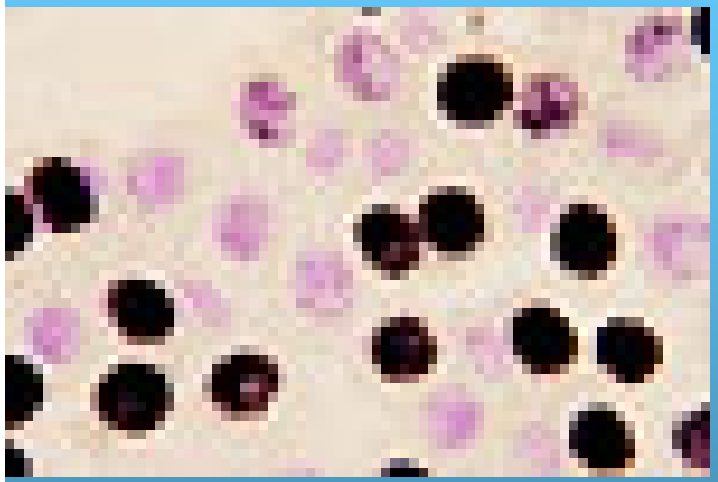
Ottimo sito sulla regolazione del ciclo cellulare, con spiegazioni dettagliate:

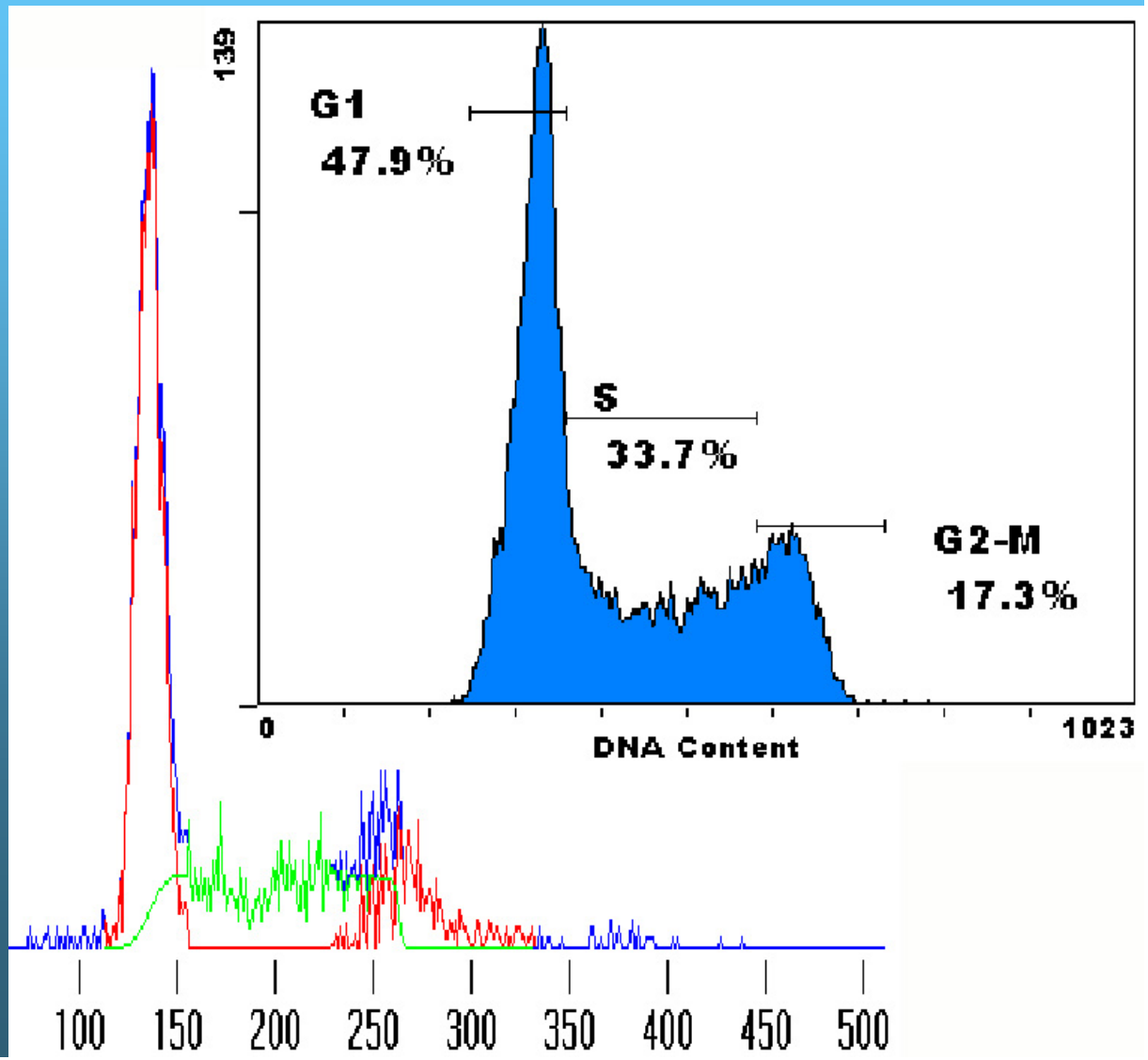
http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/cclecture.html

Il ciclo cellulare e il primo sistema di regolazione identificato



Alcune metodiche





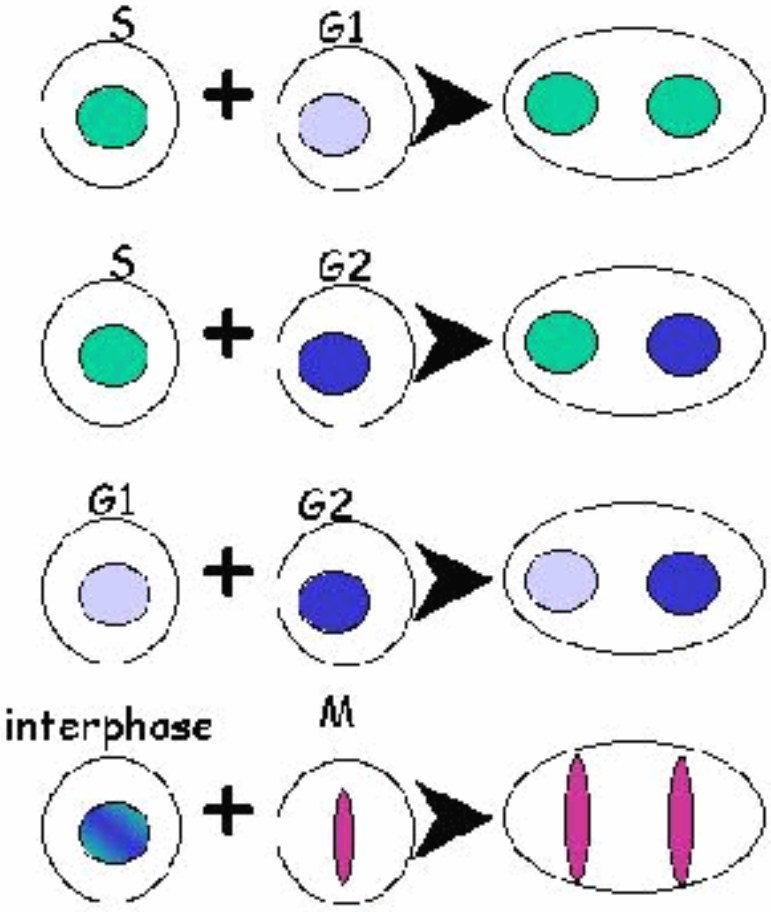
E, naturalmente, l'analisi genetica, a partire da semplici cellule aploidi, i lieviti….

rassegna delle principali scoperte

- Esperimenti di fusione cellulare
- Esperimenti con i lieviti
- Esperimenti con uova di *Xenopus*
- Esperimenti con embrioni di riccio di mare

Esperimenti di fusione cellulare

Classic Experiment: Rao and Johnson
Nuclear fusion



Conclusion: S phase nucleus Releases something that drives G1 nucleus into S

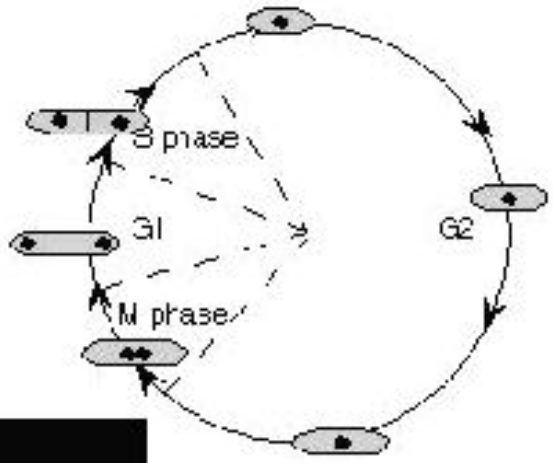
Conclusion: G2 nucleus is resistant to S phase promoting factor

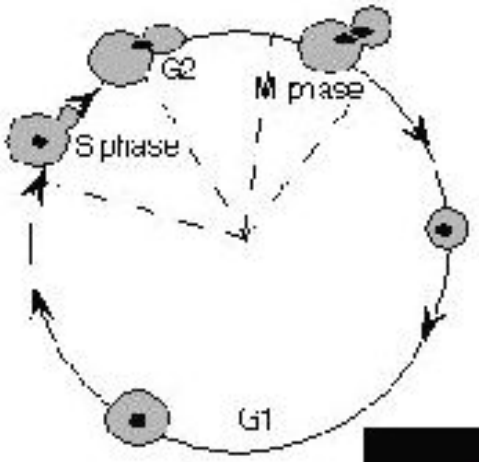
Conclusion: G1 and G2 do not influence each other

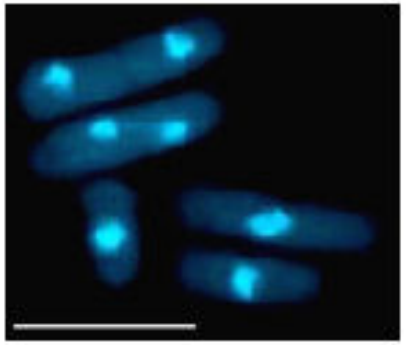
Conclusion: Mitotic nuclei release mitosis-promoting factor that affects all interphase nuclei

I lieviti

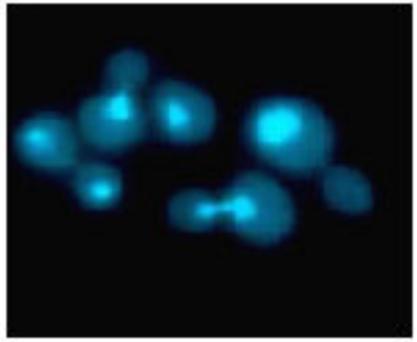
Yeast: genetic key to the cell cycle







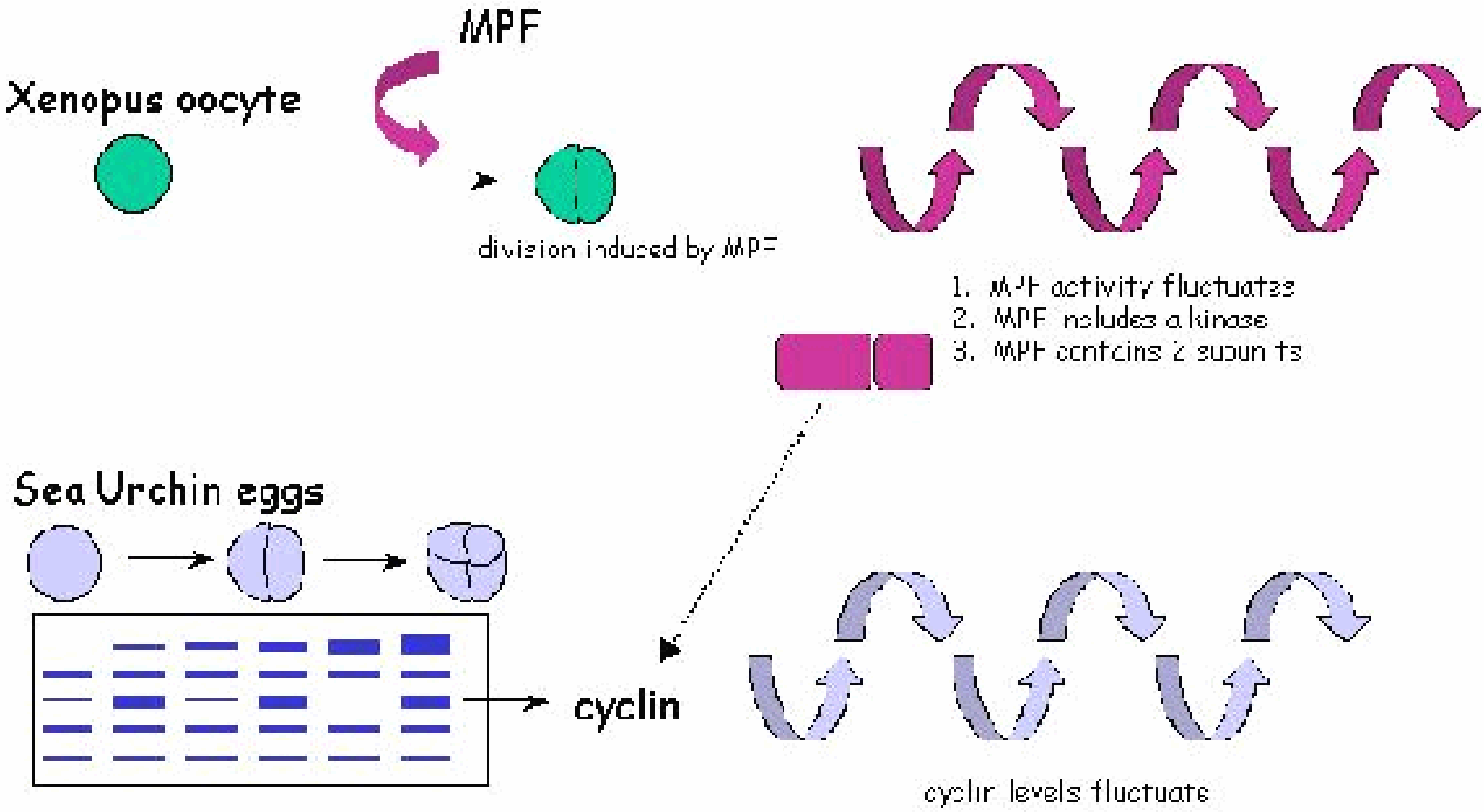
pombe significa *birra* in Swahili



Schizosaccharomyces pombe
"Fiss on yeast"
Long G2, short G1
Nurse: isolate mutants blocked at specific cell cycle points: growth without division (cdc phenotype). Assess DNA content, nuclear morphology

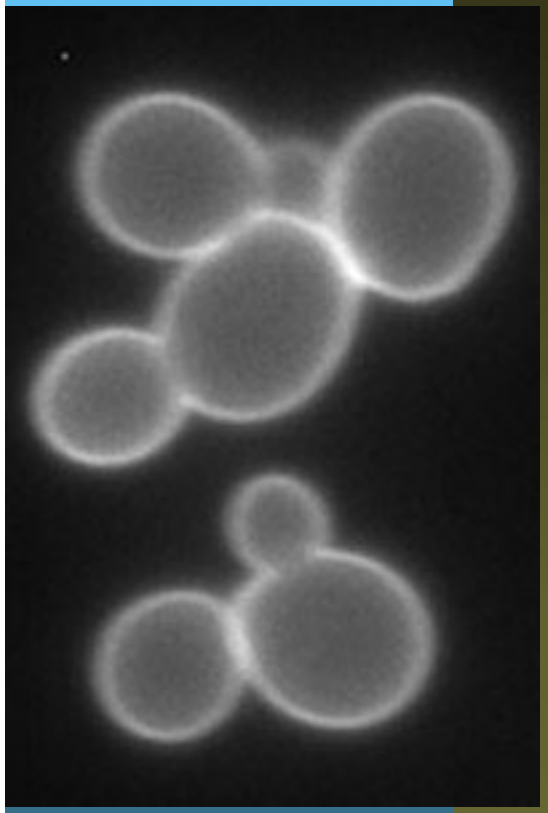
Saccharomyces cerevisice
"Budding yeast" (brewer's, baker's)
Long G1, short G2
Hartwell: isolate mutants blocked at specific cell cycle points: growth without division. Assess DNA content, nuclear morphology, and bud morphology to determine where arrested.

Le uova di *Xenopus* e quelle di riccio di mare

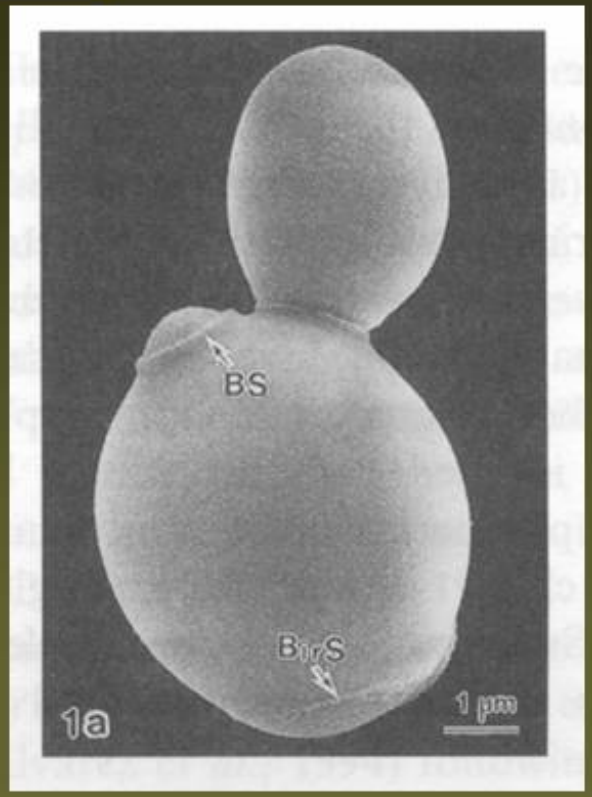


MPF = cyclin B + Cdc2 kinase

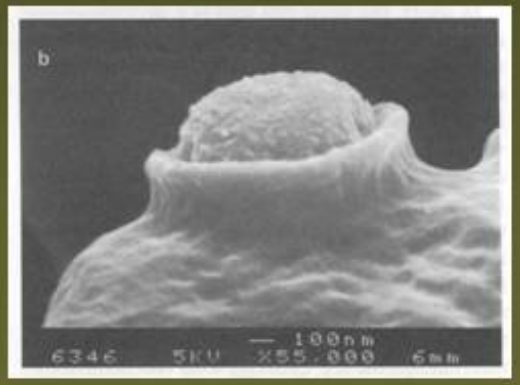
il lievito gemmante *S. cerevisiae*



YEAST BUD AND BUD SCAR



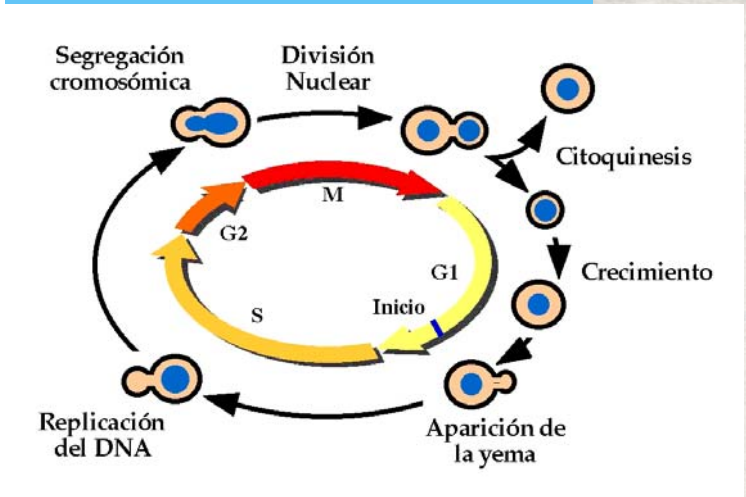
Buds normally develop close to the last bud (bud polarity)



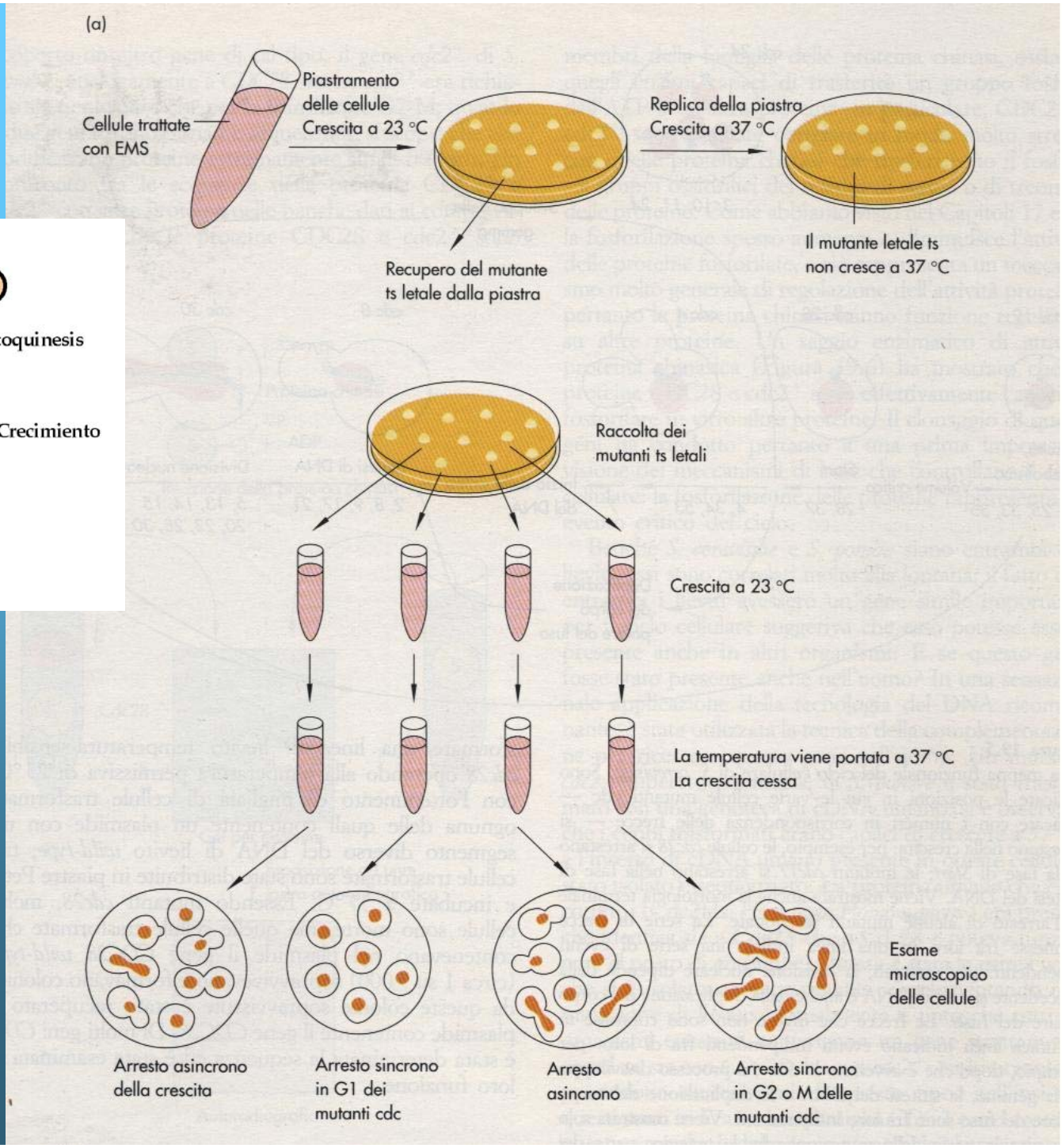
http://www-micro.msb.le.ac.uk/video/Scerevisiae.mov

Cosa è l'analisi genetica nel lievito

•L'idea base è stata quella di identificare i geni necessari per la regolazione del ciclo cellulare studiando i **mutanti.**
Punti forti a) i lieviti sono aploidi; b) le mutazioni da cercare sono quelle che bloccano la divisione; c) usare mutanti condizionali per la temperatura: le proteine mutate non funzionano a 37°C, a 23°C sì, quindi si cercheranno le mutazioni che bloccano il ciclo a 37°C; d) utilizzare sistemi semplici (morfologia) per identificare lo stadio in cui è avvenuto il blocco del ciclo e poi identificare i processi chiave: c'è stata duplicazione del DNA? E la condensazione dei nuclei? Il fuso mitotico è presente?; mutanti **cdc** ("cell division cycle").
•Usando le metodiche di complementazione, è possibile vedere quanti sono i geni implicati in un determinato blocco. Ad es., tutti i mutanti che si bloccano in G_2 corrispondono ad altrettanti geni?
•Usando le metodiche di epistasi si combinano tra loro gli effetti di

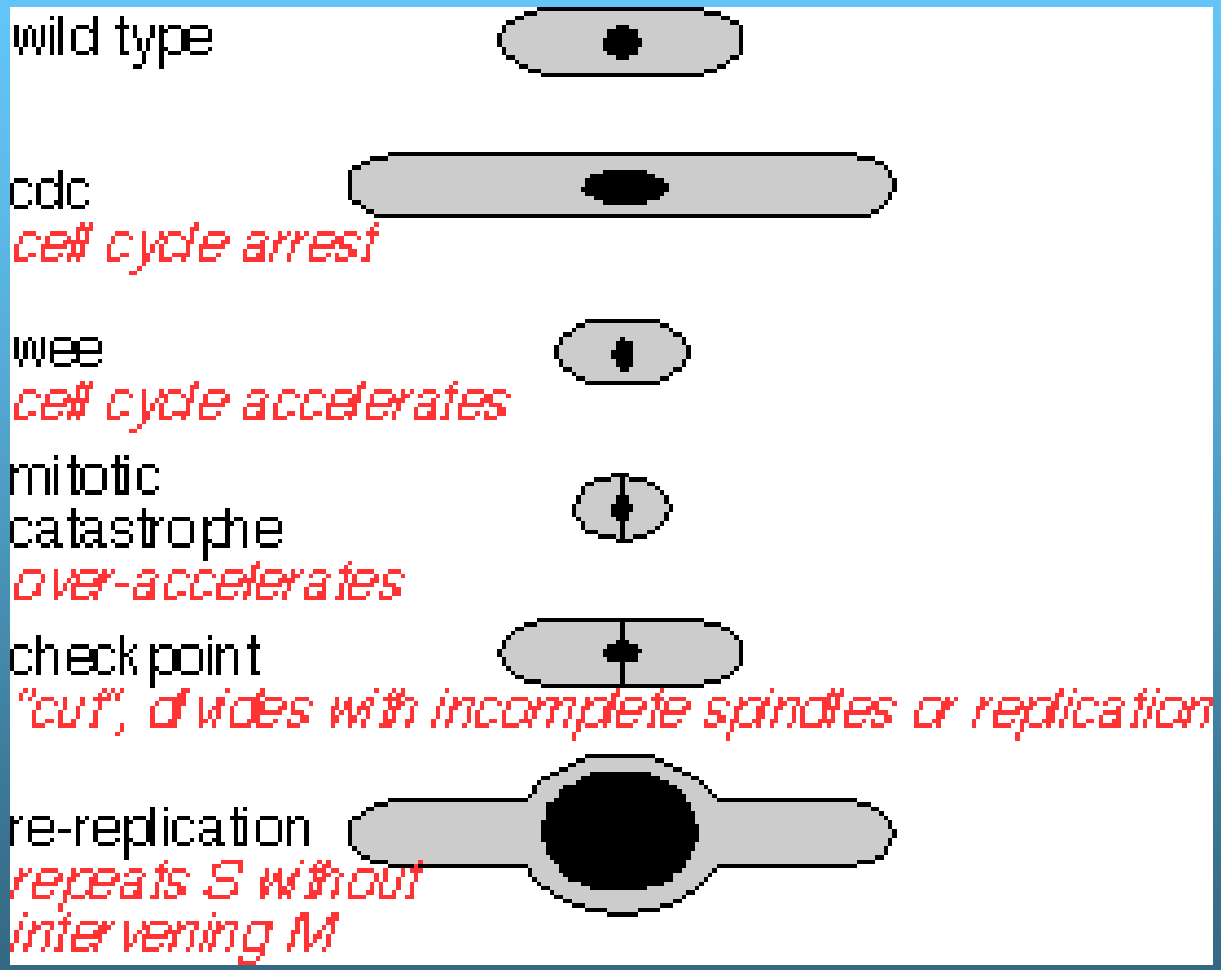


I mutanti di lievito condizionali Ts per studiare la regolazione del ciclo cellulare



Esempio di analisi genetica nel lievito *S. pombe*

cdc25	long
wee1	short
cdc2-L	long
cdc2-w	short OP
cdc25 short	
OPwee1	long
cdc13	long



Applicazione ad esperimenti di epistasi

cdc2-L wee1	long
cdc2-L OP cdc25	long
cdc2-w cdc25	short
cdc2-w OP wee1	short
cdc25 wee1	normal

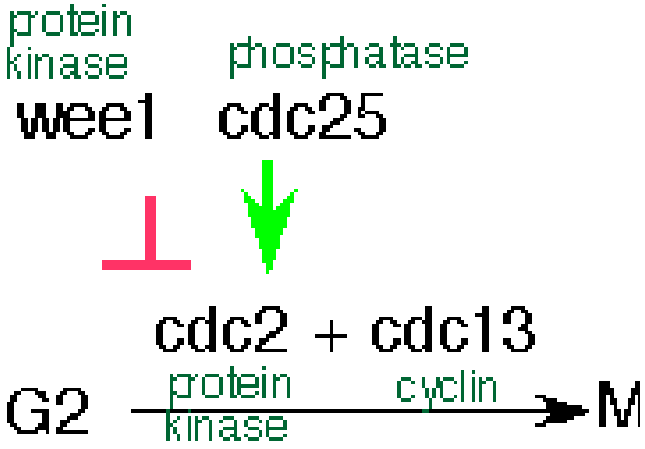
Gli esperimenti furono poi suffragati da prove biochimiche. E, soprattutto, si vide che cdc2 corrispondeva alla kinasi e cdc13 alla ciclina che, combinate insieme, davano l'attività MPF degli ovociti di Xenopus e degli embrioni di riccio di mare

Data (epistasis expt)

ts = LOF, OP = GOF

Phenotype	single mutant	double mutant
	*wild type*	*cdc25ts wee1ts*
	*cdc2ts* *cdc13ts* *cdc25ts* *OP wee1+*	*cdc2ts wee1ts* *cdc2ts OPcdc25+*
	*wee1ts* *OP-cdc25+*	*cdc2-w cdc25* *cdc2-w OPwee1+*

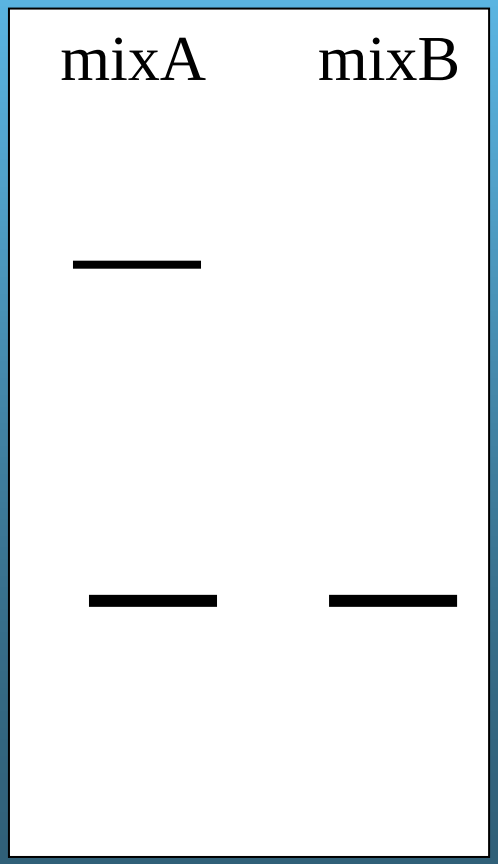
model

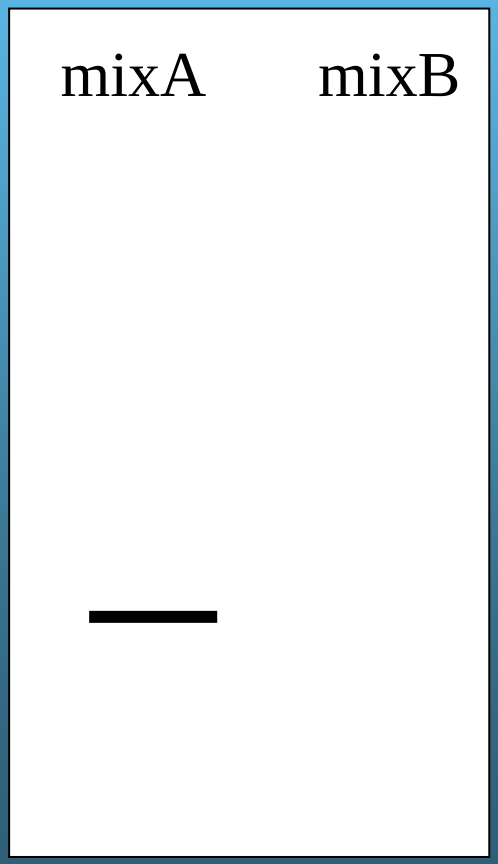


Dimostrazione che Cdc28/Cdc2 è una kinasi

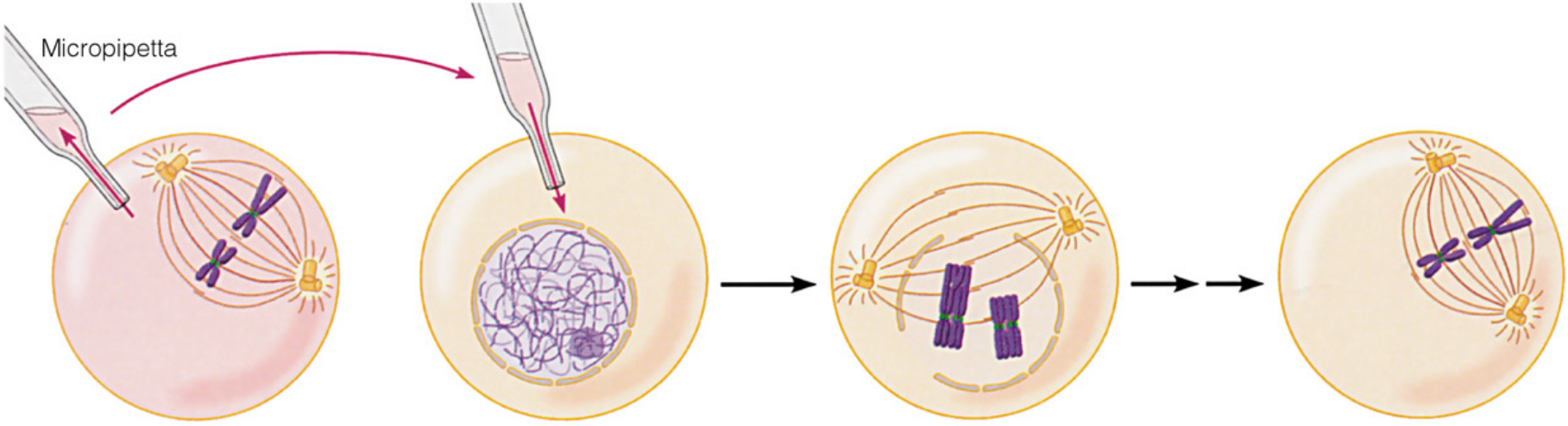
Mix A = Cdc28 + proteina substrato + γ-^{32}P-ATP

Mix B = proteina substrato + γ-^{32}P-ATP





Dimostrazione dell'attività MPF in cellule uovo di *Xenopus*



❶ Si estrae il citoplasma da una cellula uovo matura

❷ Questo citoplasma è iniettato in un oocita

❸ È indotta la mitosi

❹ La cellula diventa un uovo maturo

Figura 17-32

Ciclicità dell'attività MPF

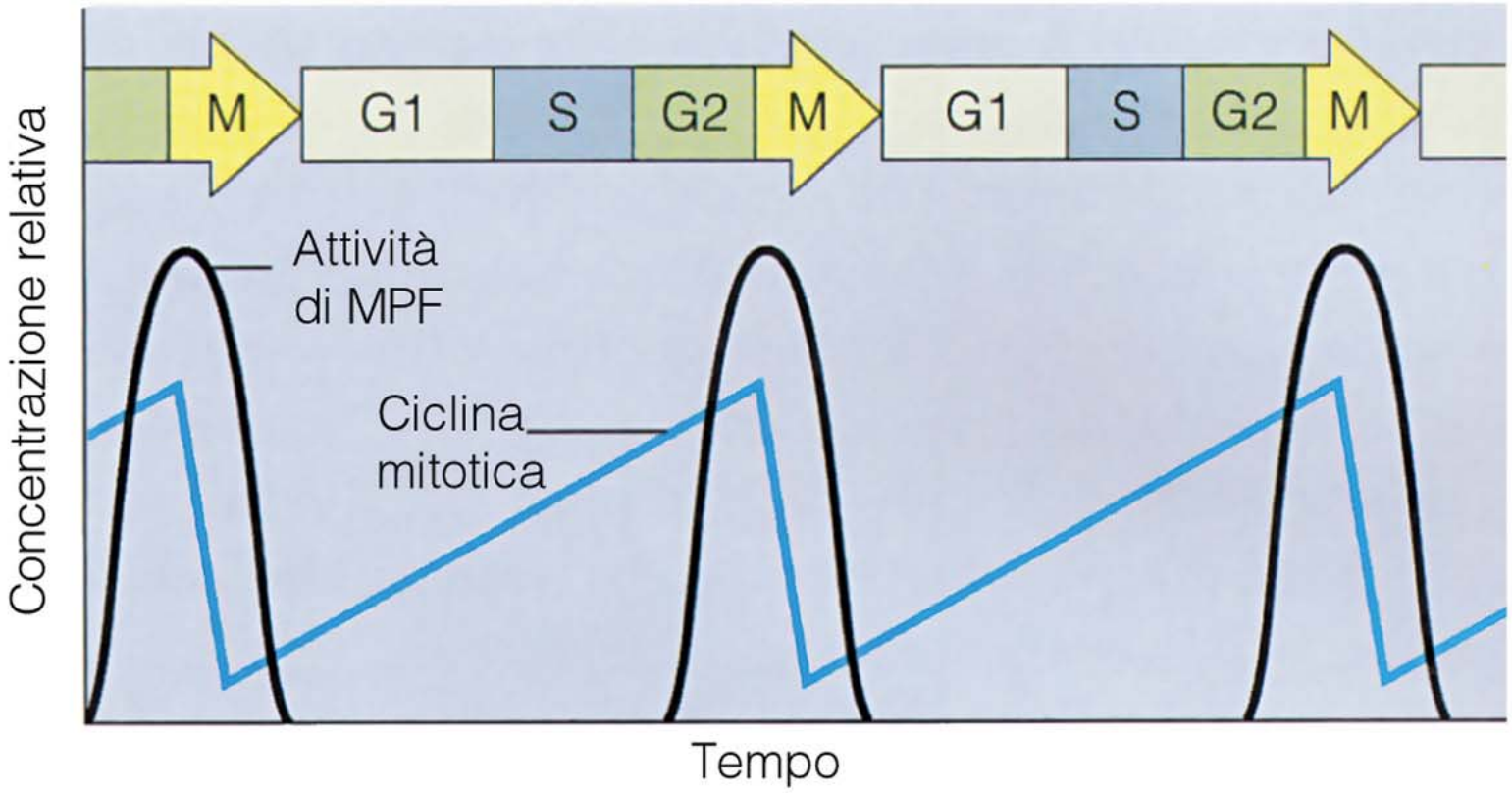
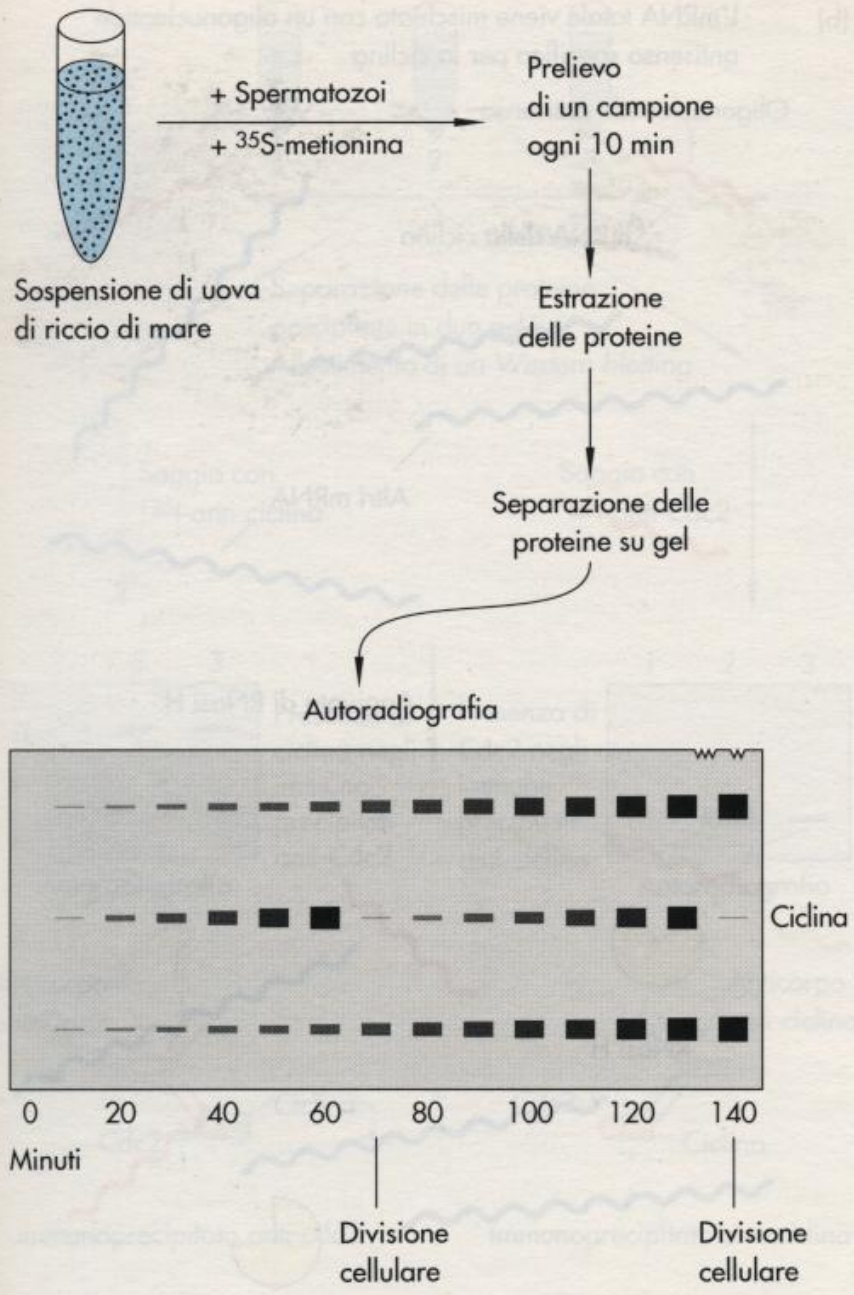
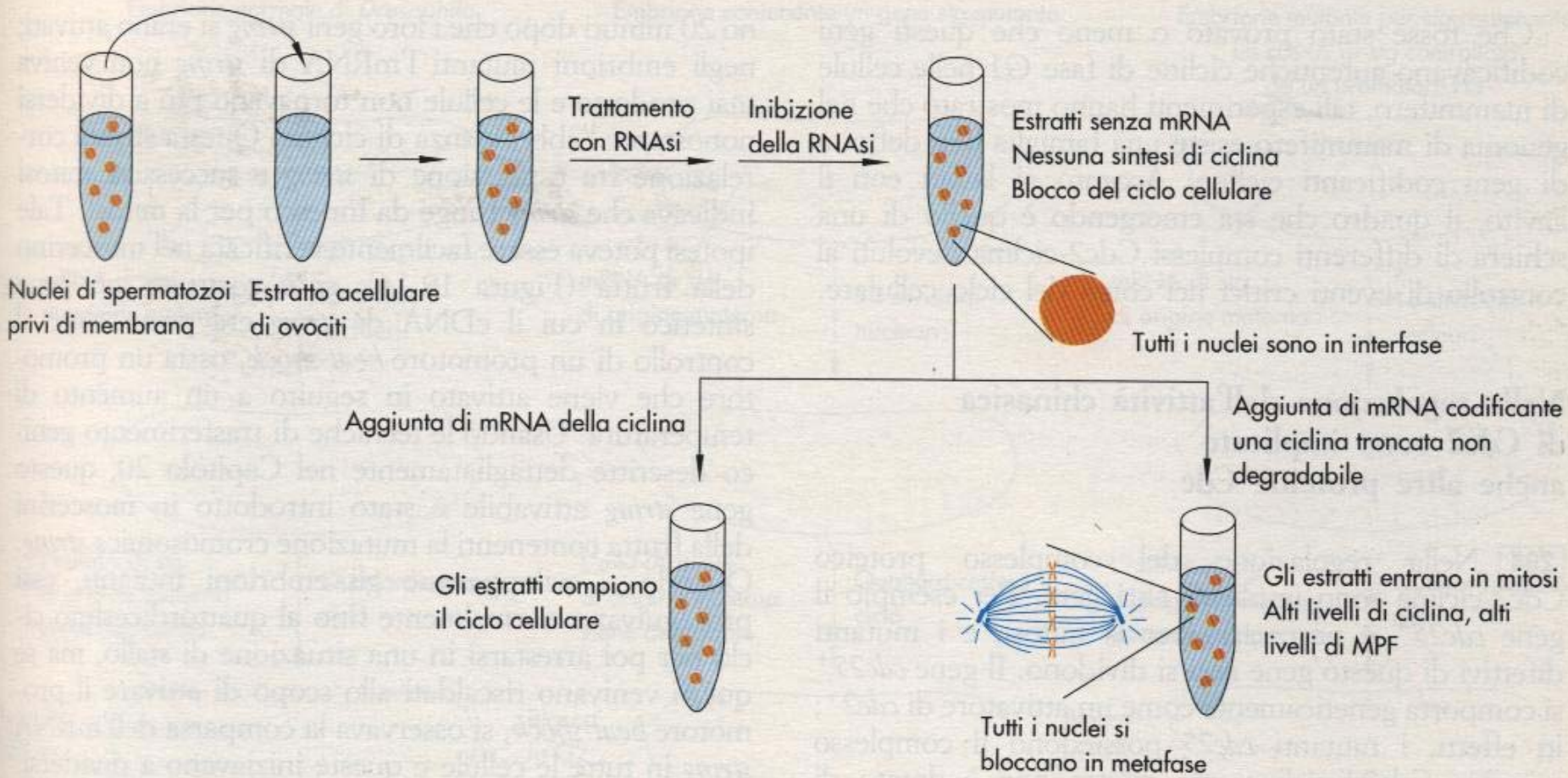


Figura 17-33

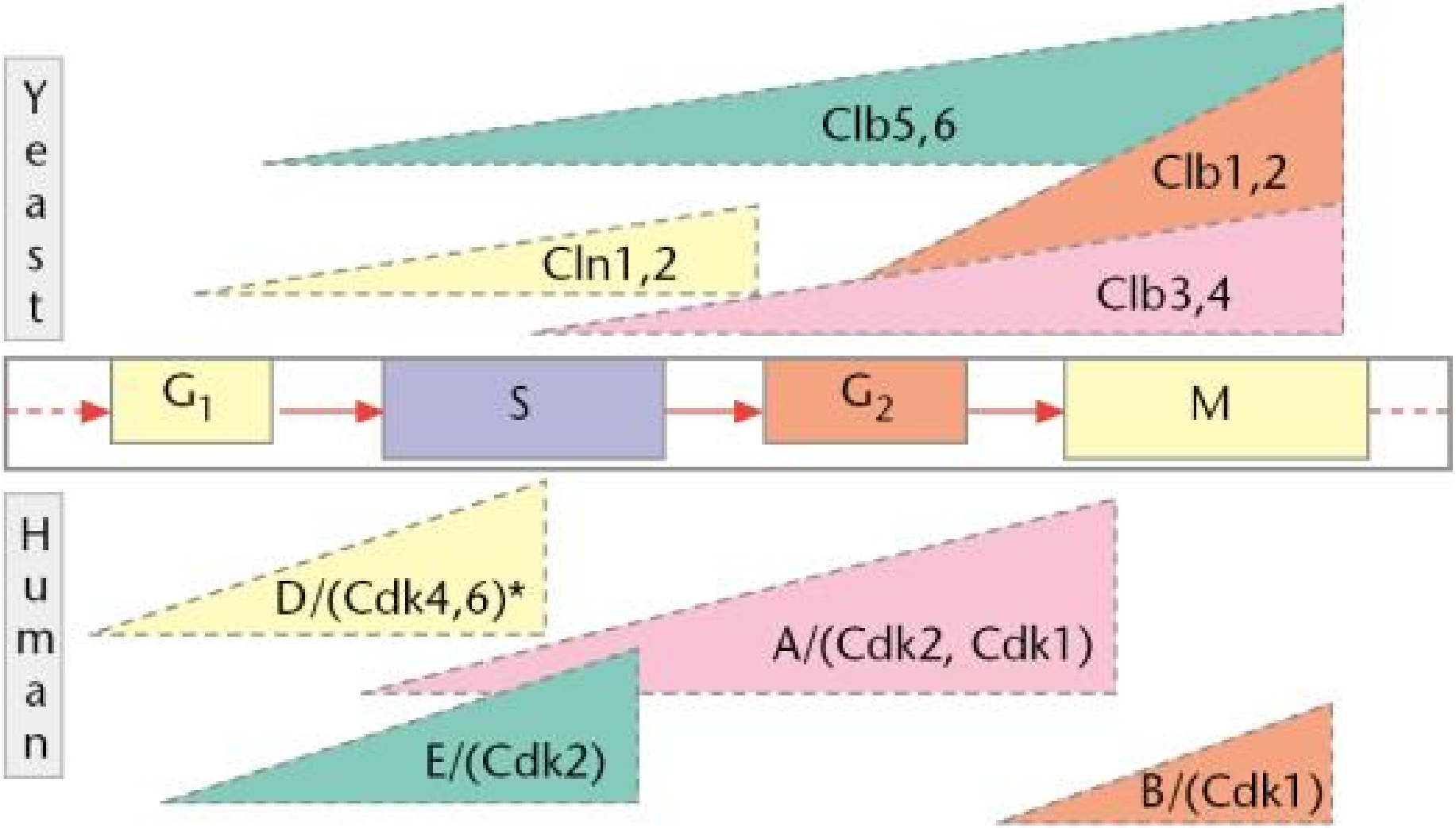
Identificazione della ciclina nei primi stadi embrionali di riccio di mare



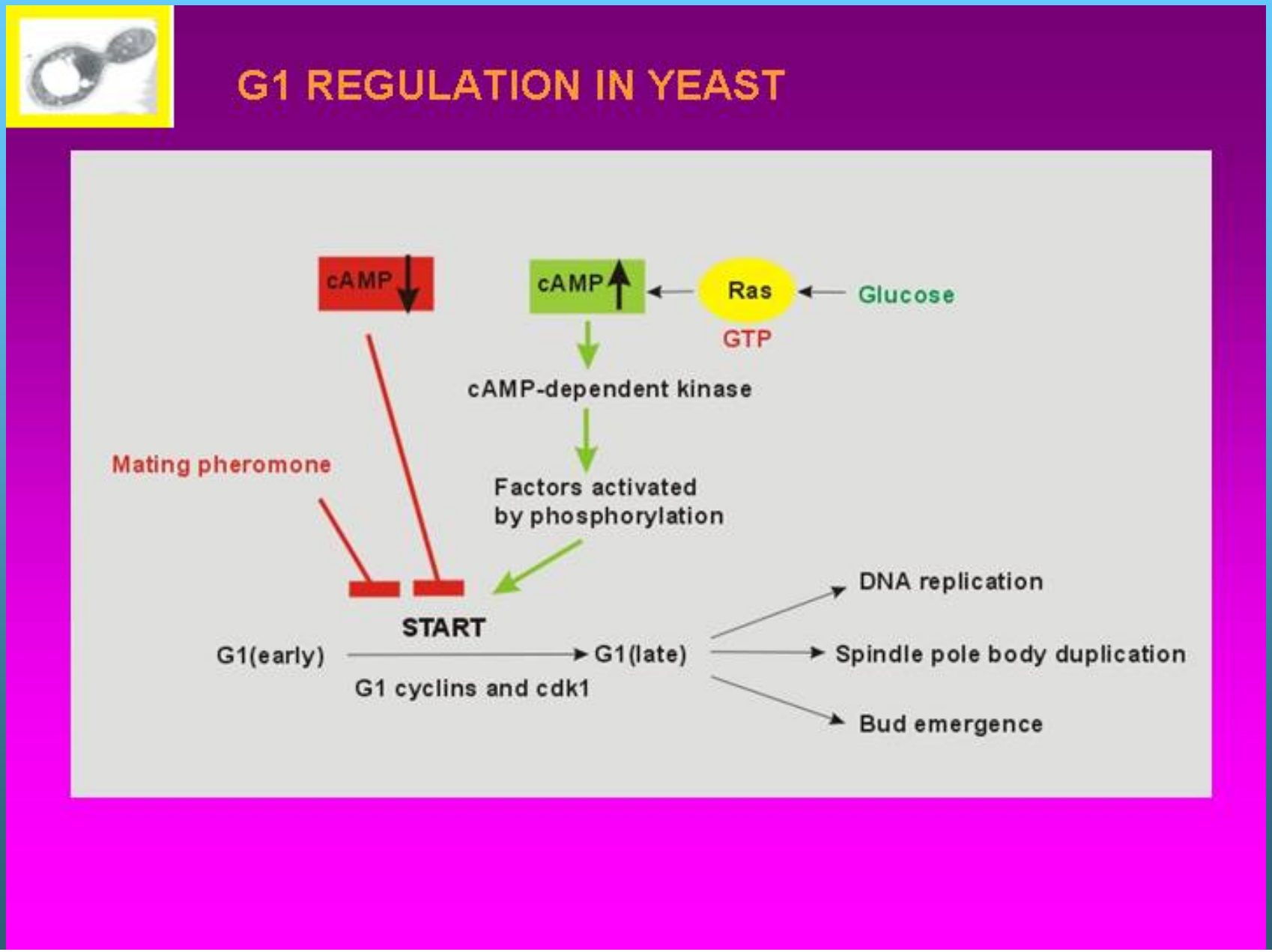
Dimostrazione che la ciclina deve essere neo-sintetizzata e demolita nel corso del ciclo cellulare



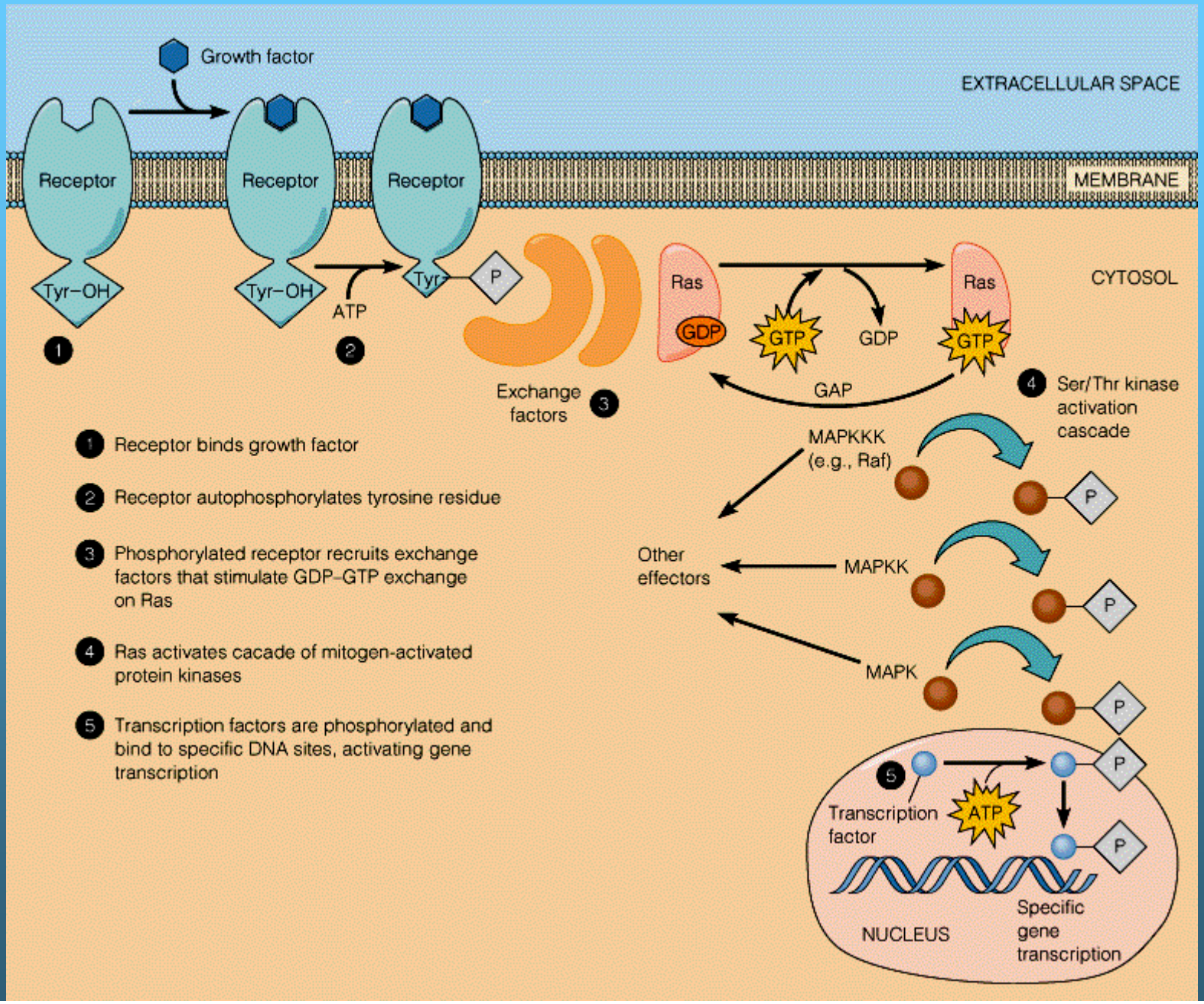
Confronto tra cicline del lievito e dell'uomo



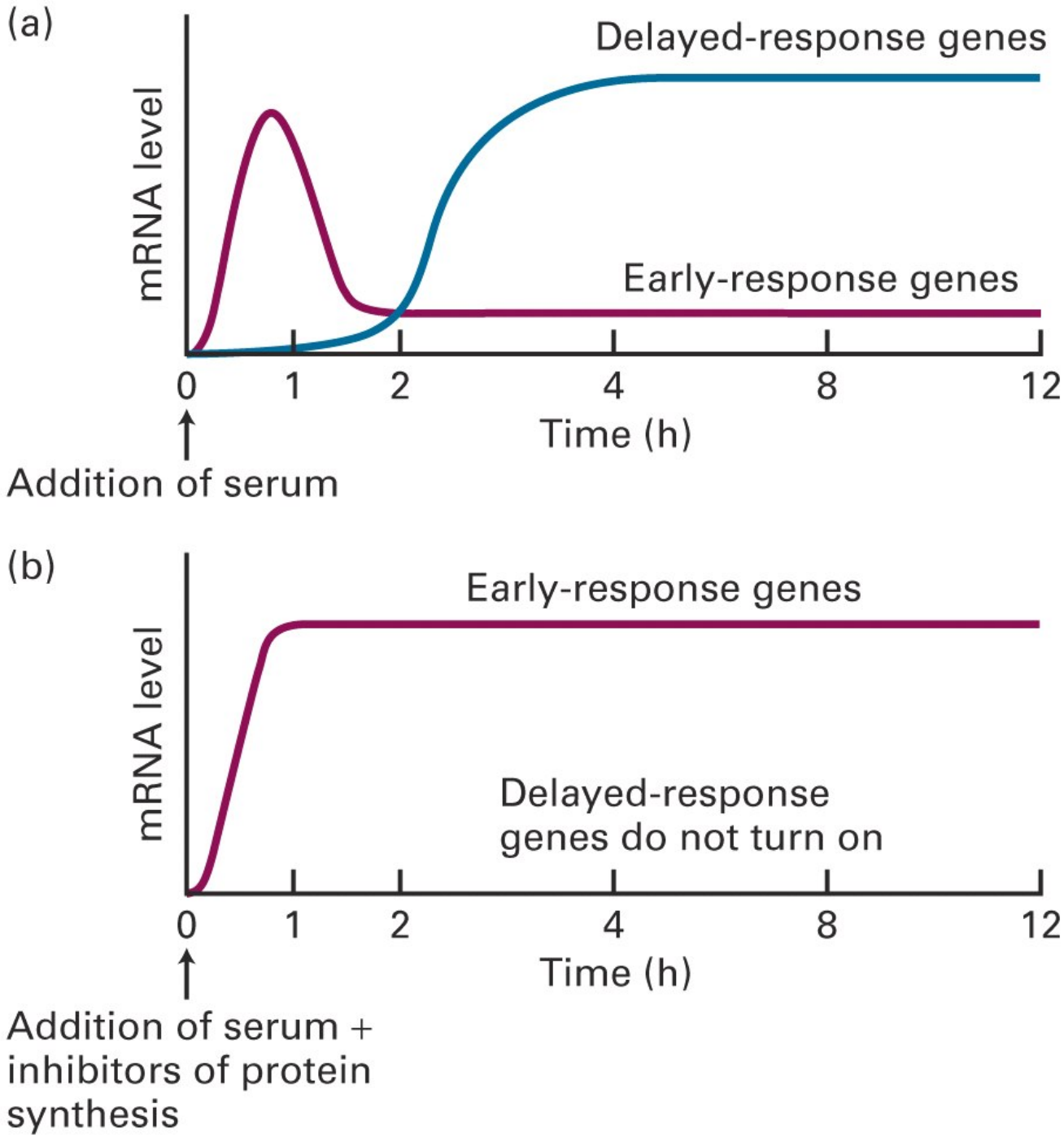
La funzione di Ras nella progressione di G_1 nel lievito



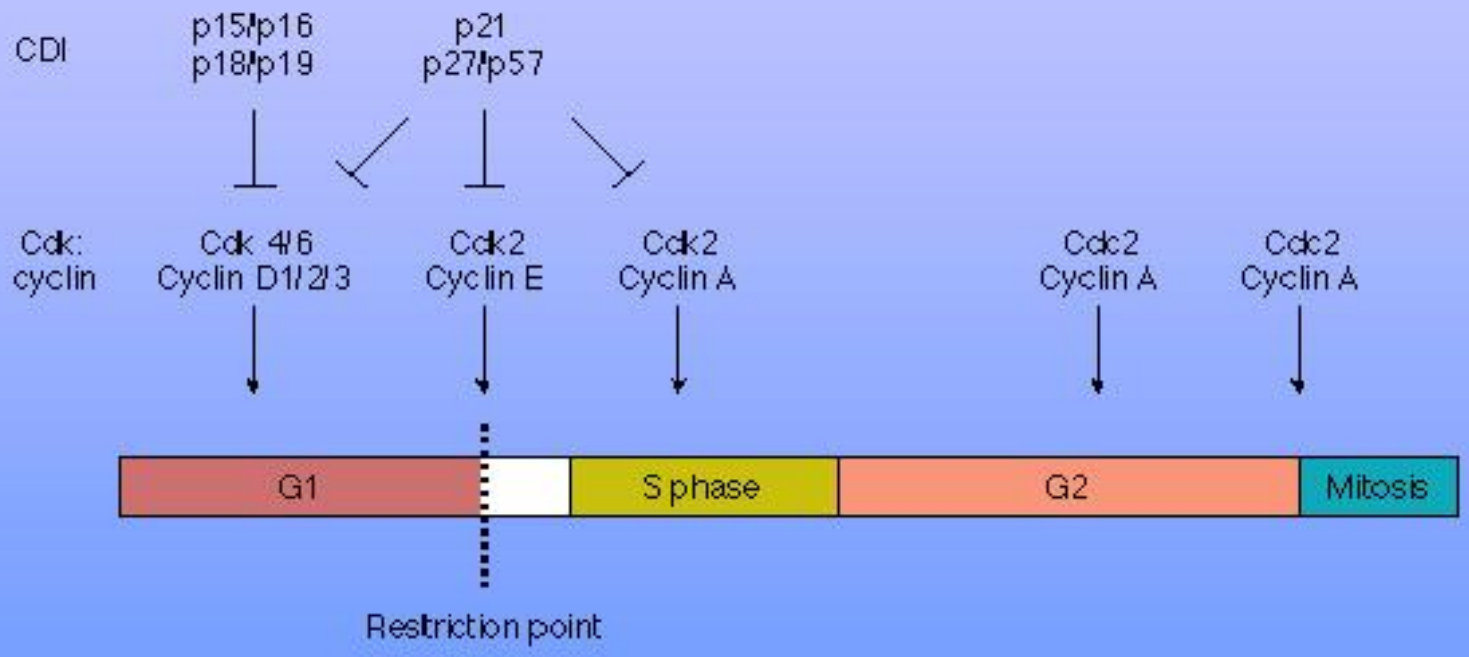
I segnale di Ras negli eucarioti superiori



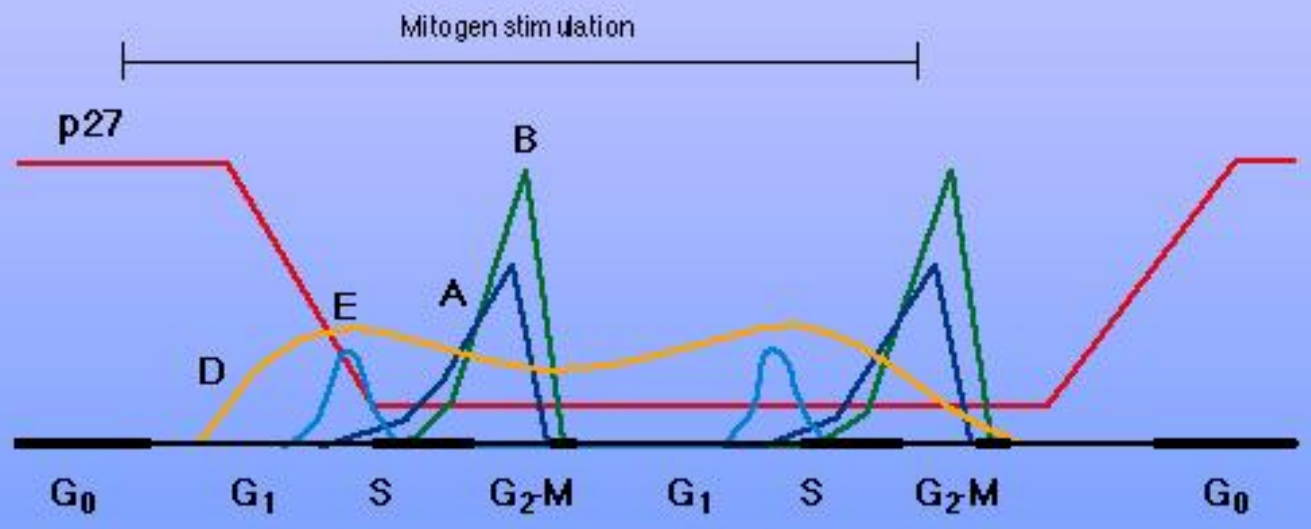
Controllo della proliferazione nelle cellule degli organismi pluricellulari



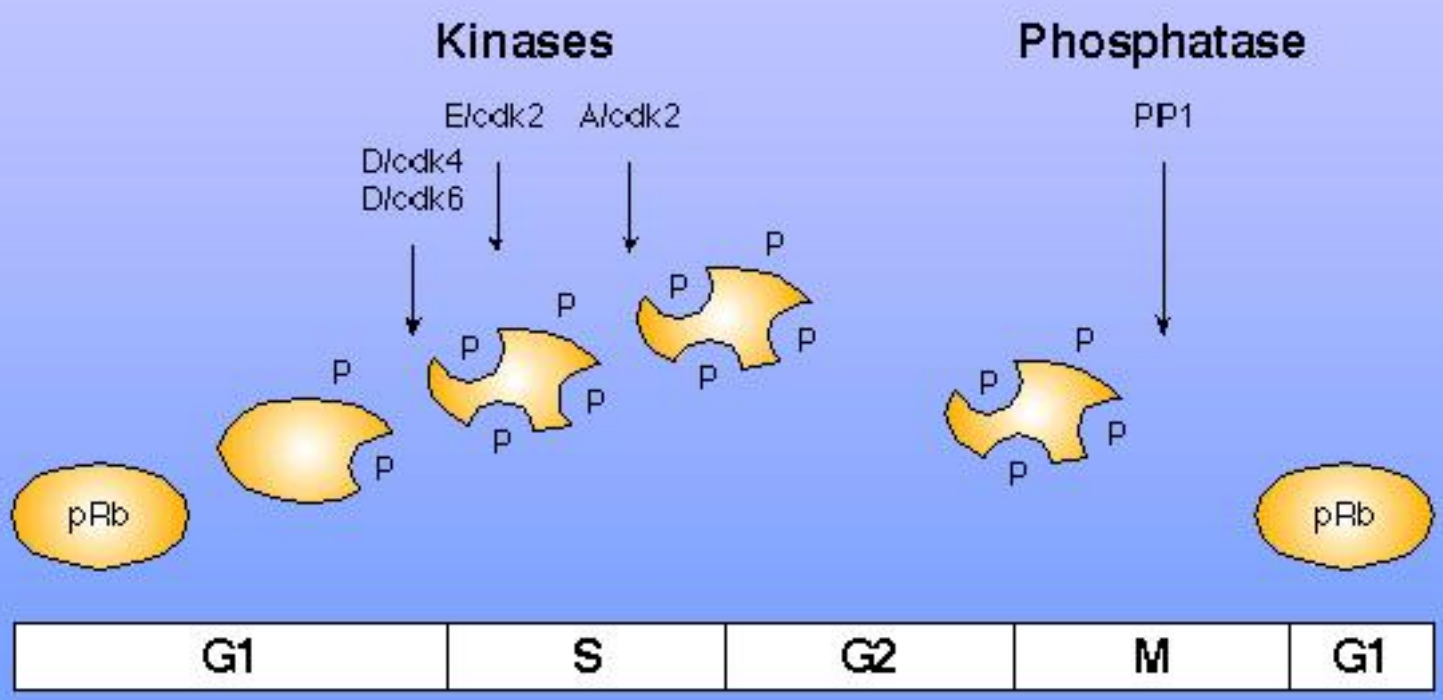
The mammalian cell cycle



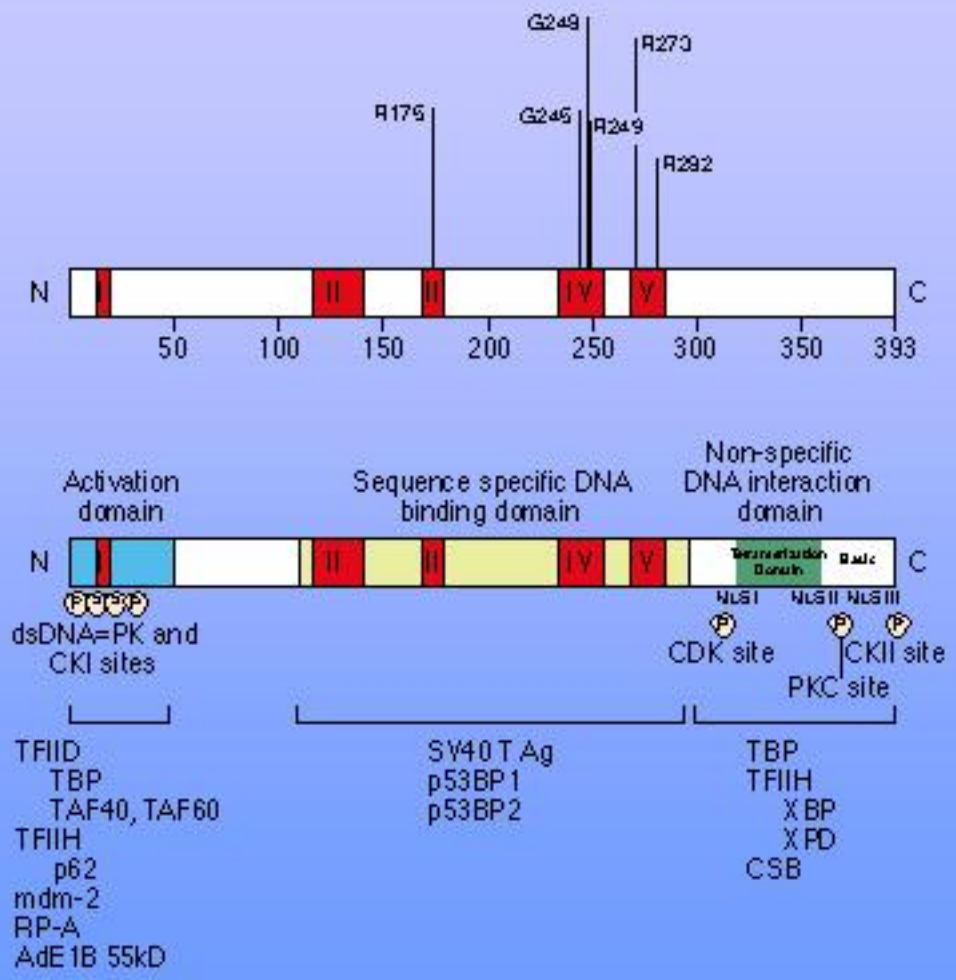
Cyclin regulation during cell cycle progression



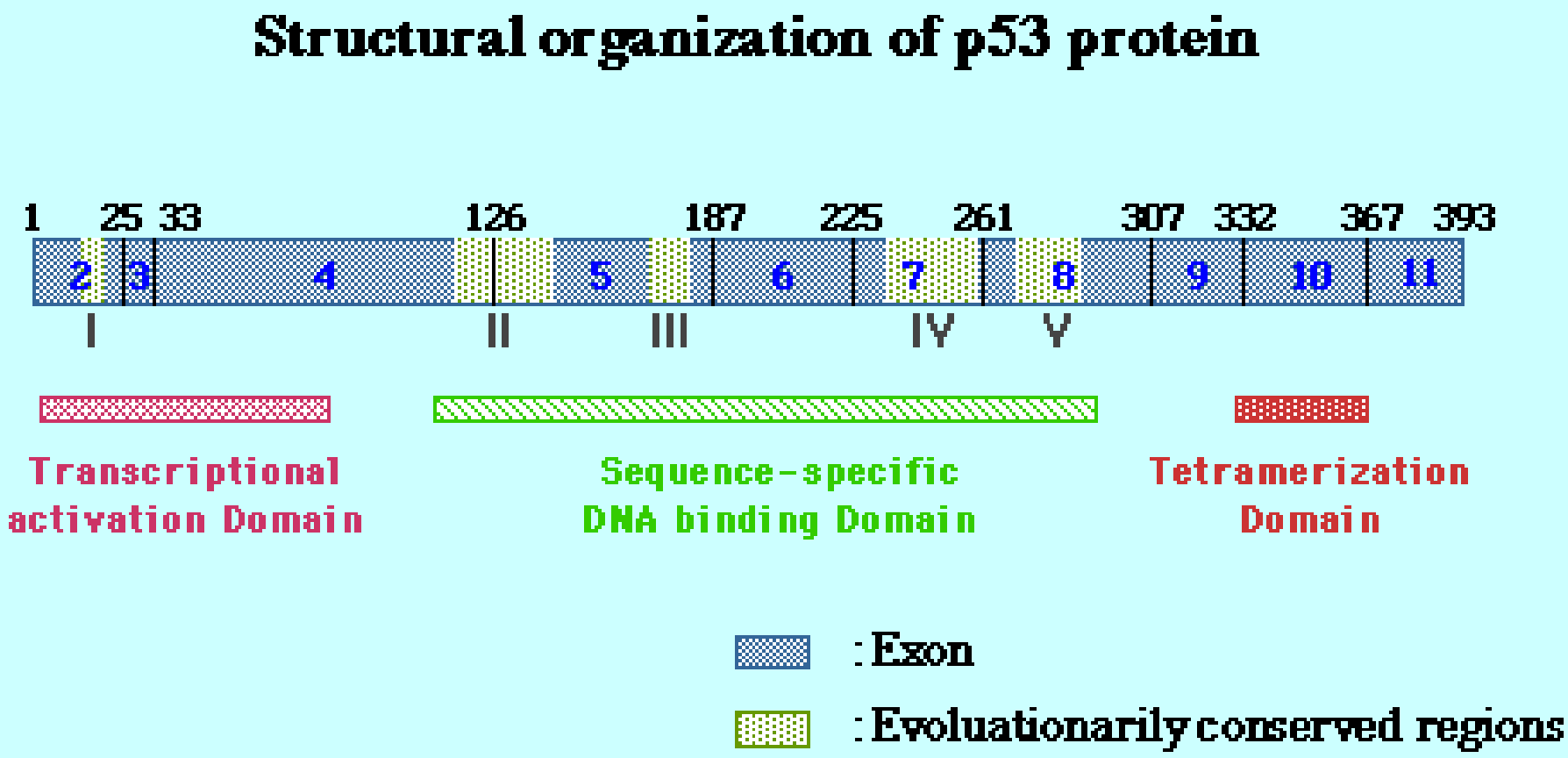
Control of pRb



The p53 tumour suppressor protein



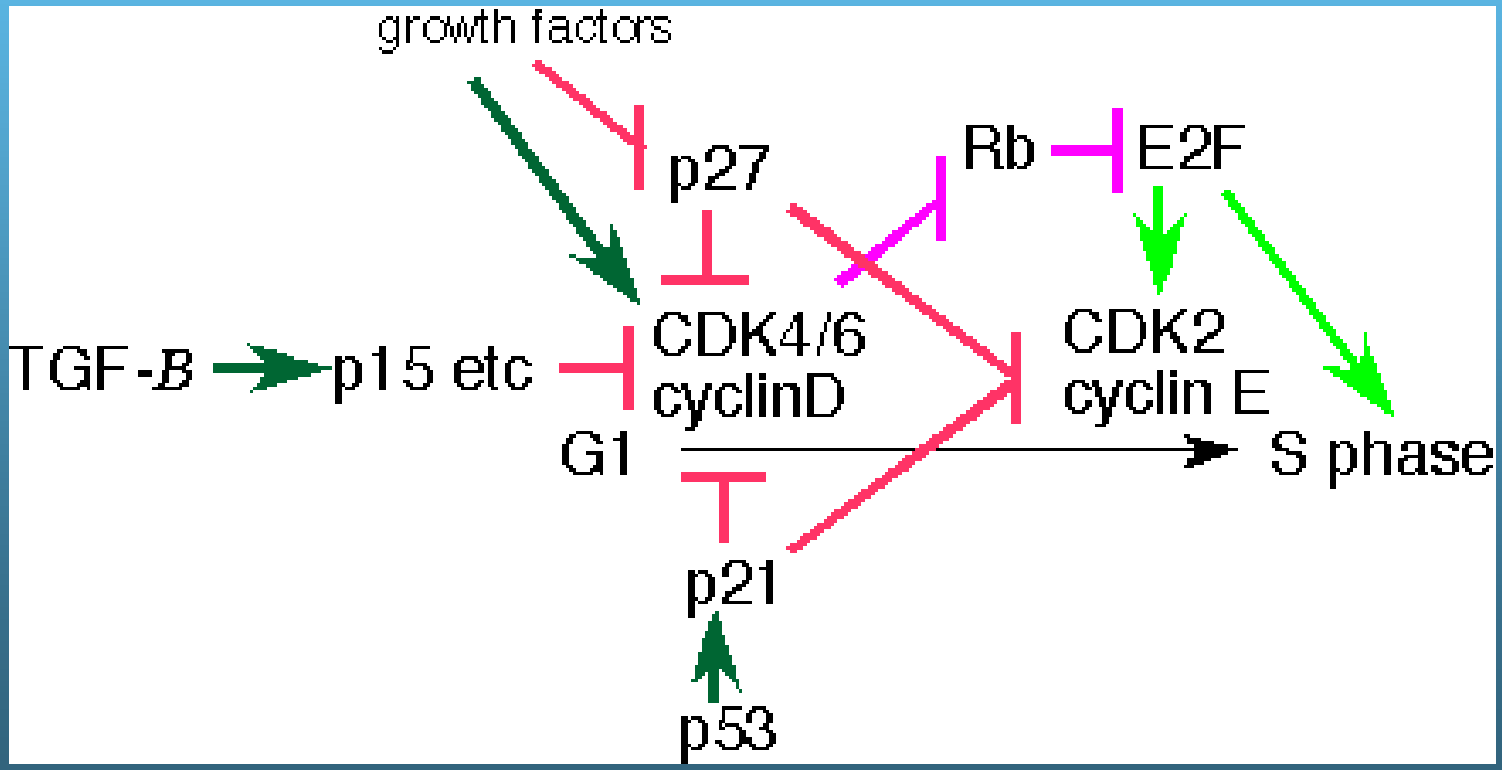
La proteina p53



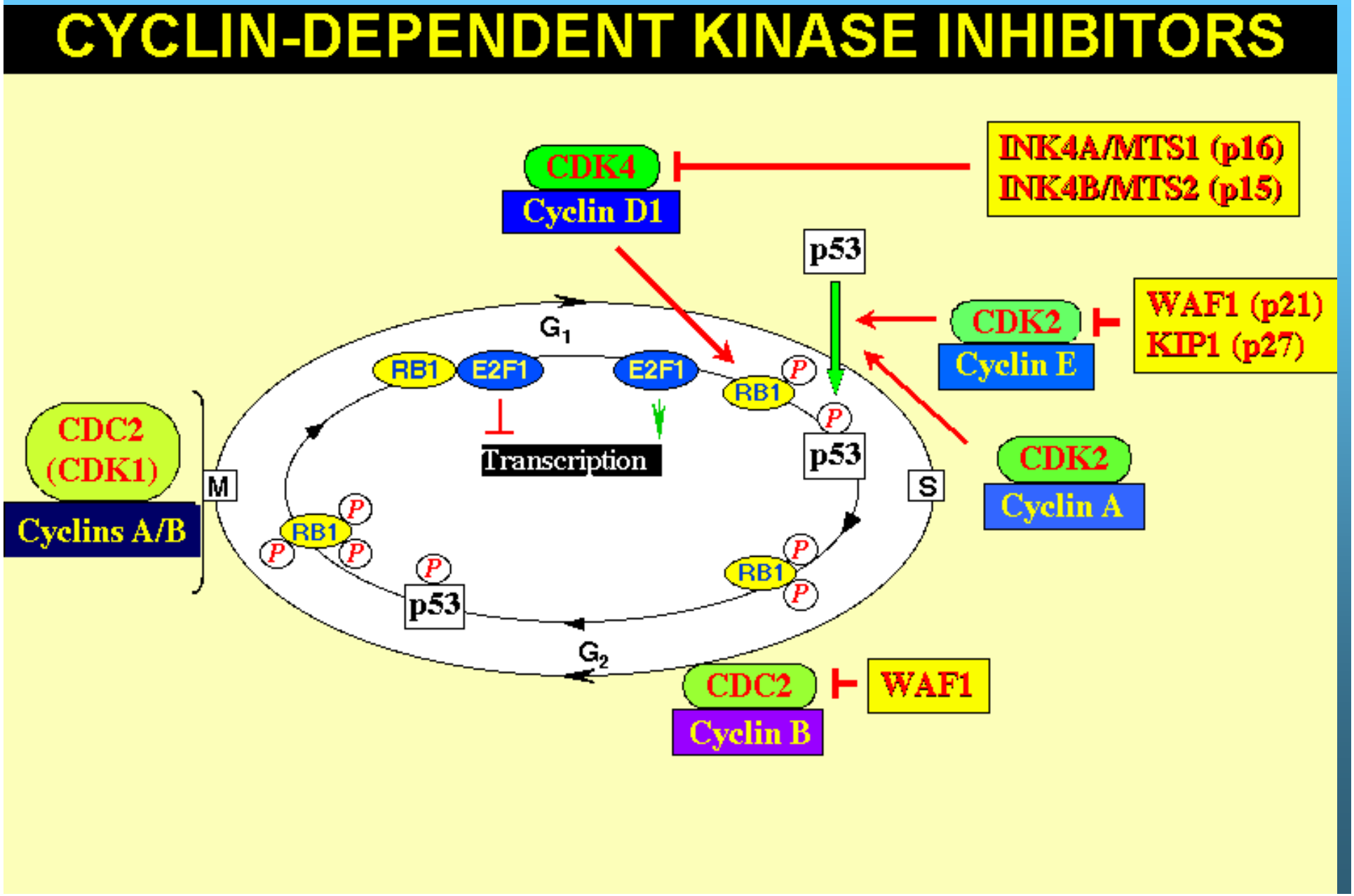
p53, il *guardiano del genoma*

p53 contiene all'N-terminale un forte dominio di attivazione genica; in forma di tetramero si lega al DNA in maniera specifica. Oltre ad attivare la trascrizione dei geni in cui è presente il suo elemento-risposta, è in grado di inibire la trascrizione di altri geni.
Diversi virus tumorali esprimono prodotti che si legano a p53 e ne inattivano le funzioni (es. SV40 large T antigen, le proteina E1B 55-kD dell'adenovirus e E6 delle forme oncogene del papillomavirus umano HPV E6).
p53 si trova spesso mutata nei tumori.
Nelle cellule, p53 può associarsi ad una proteina di 90kD, il prodotto del'oncogene *mdm-2*, che è amplificato in molti tumori. Il legame con mdm2 inattiva le funzioni di p53 (inibizione, avvio alla distruzione, sequestro nel nucleolo…)
Alti livelli di p53 (*normale, non mutante*) portano all'arresto del ciclo cellulare e/o all'apoptosi. Come fattore del checkpoint, la sua funzione equivale a quella del gene *fad9* del lievito.

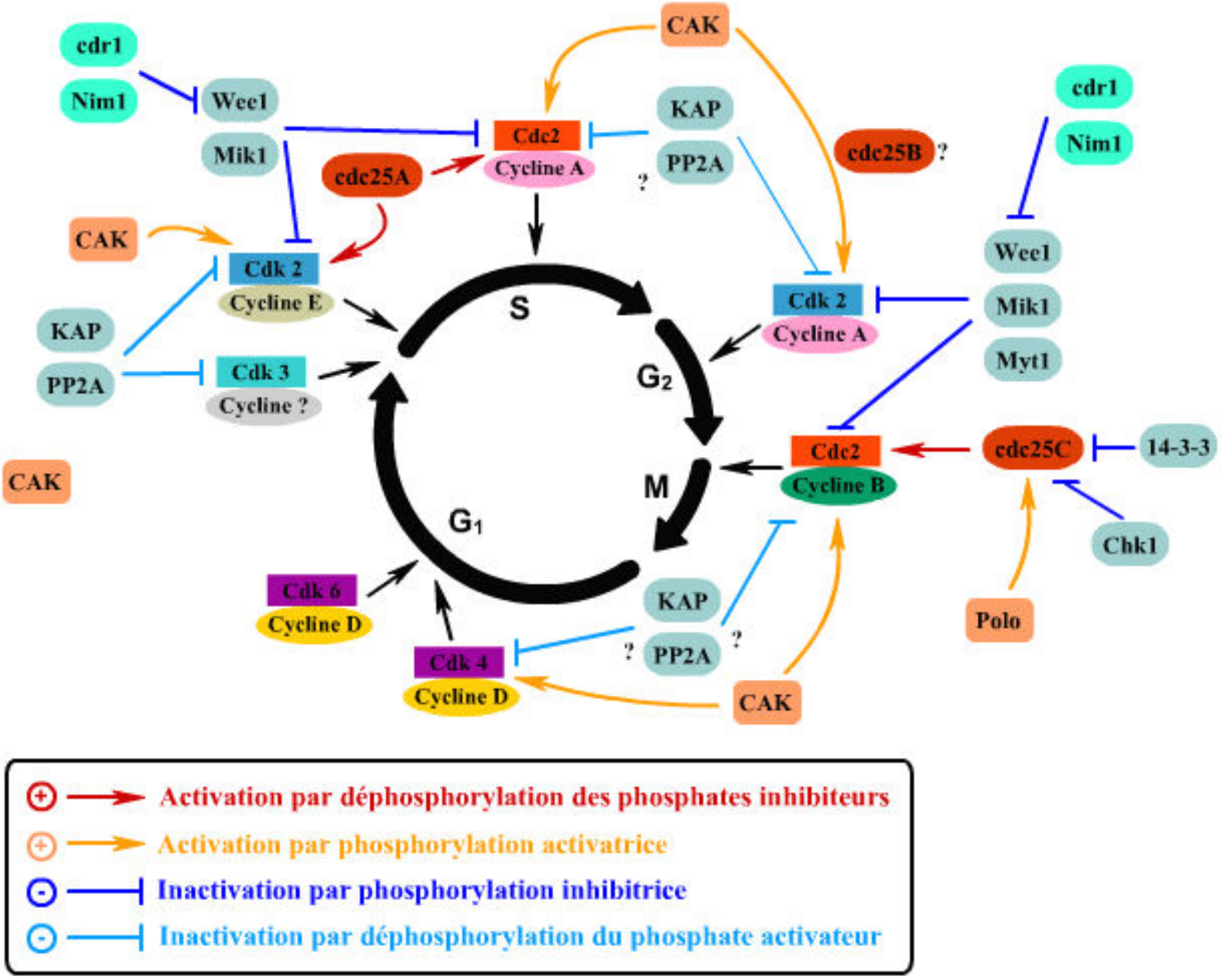
Controllo della progressione in G_1



Gli inibitori dei complessi ciclina-kinasi

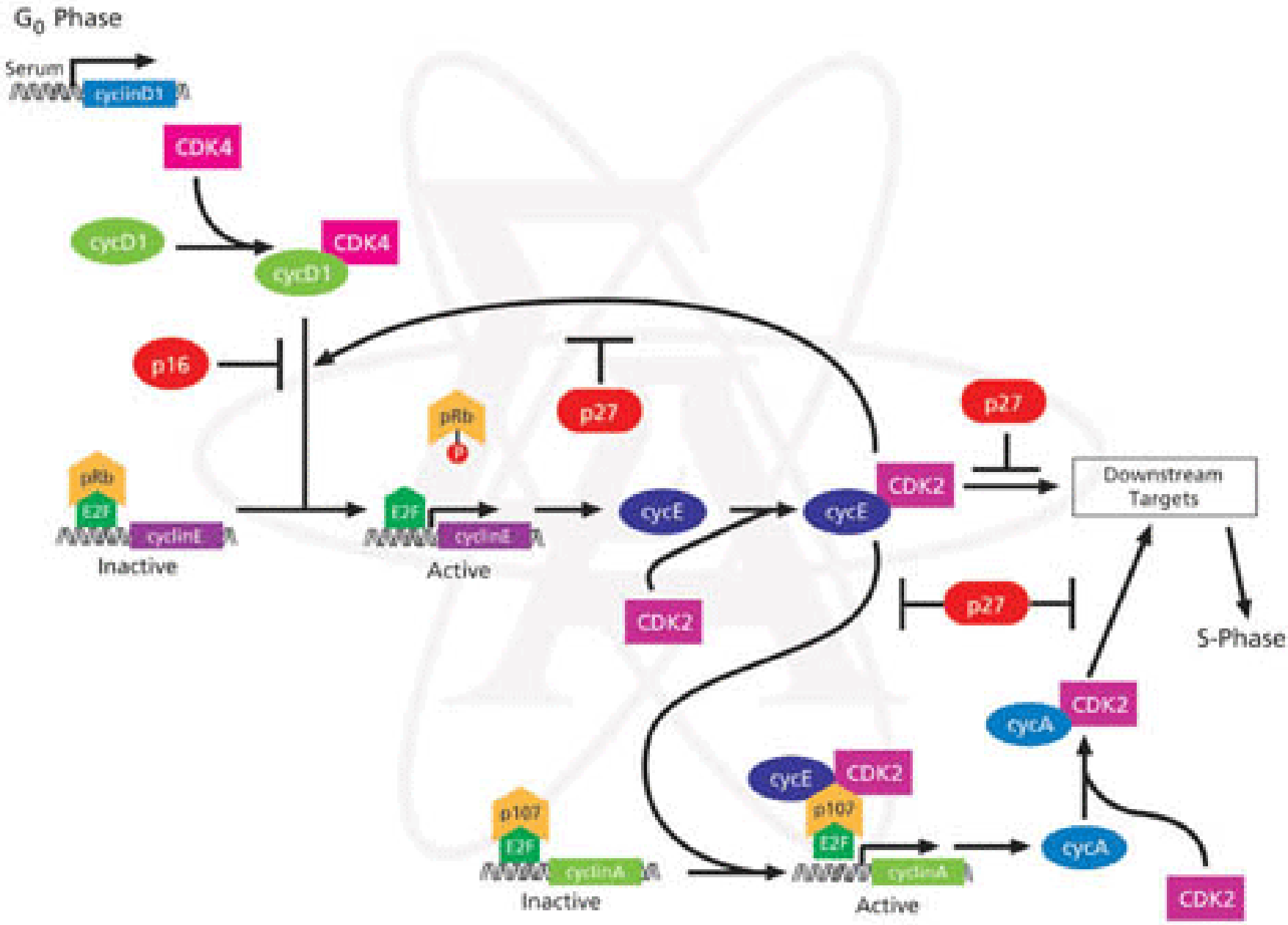


La regolazione per fosforilazione dei complessi ciclina-CDK

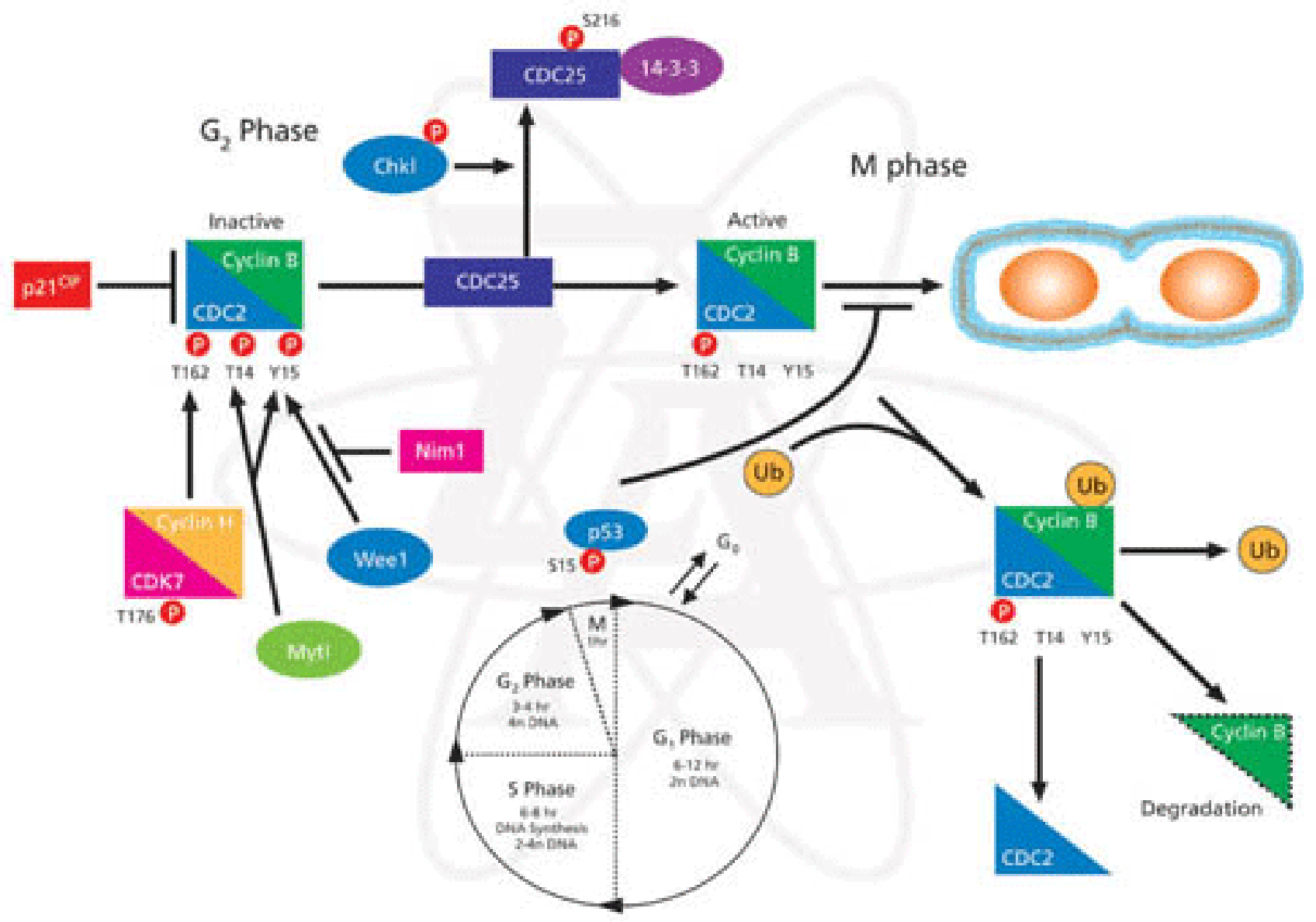


Régulation des complexes cdk/cyclines par phosphorylation

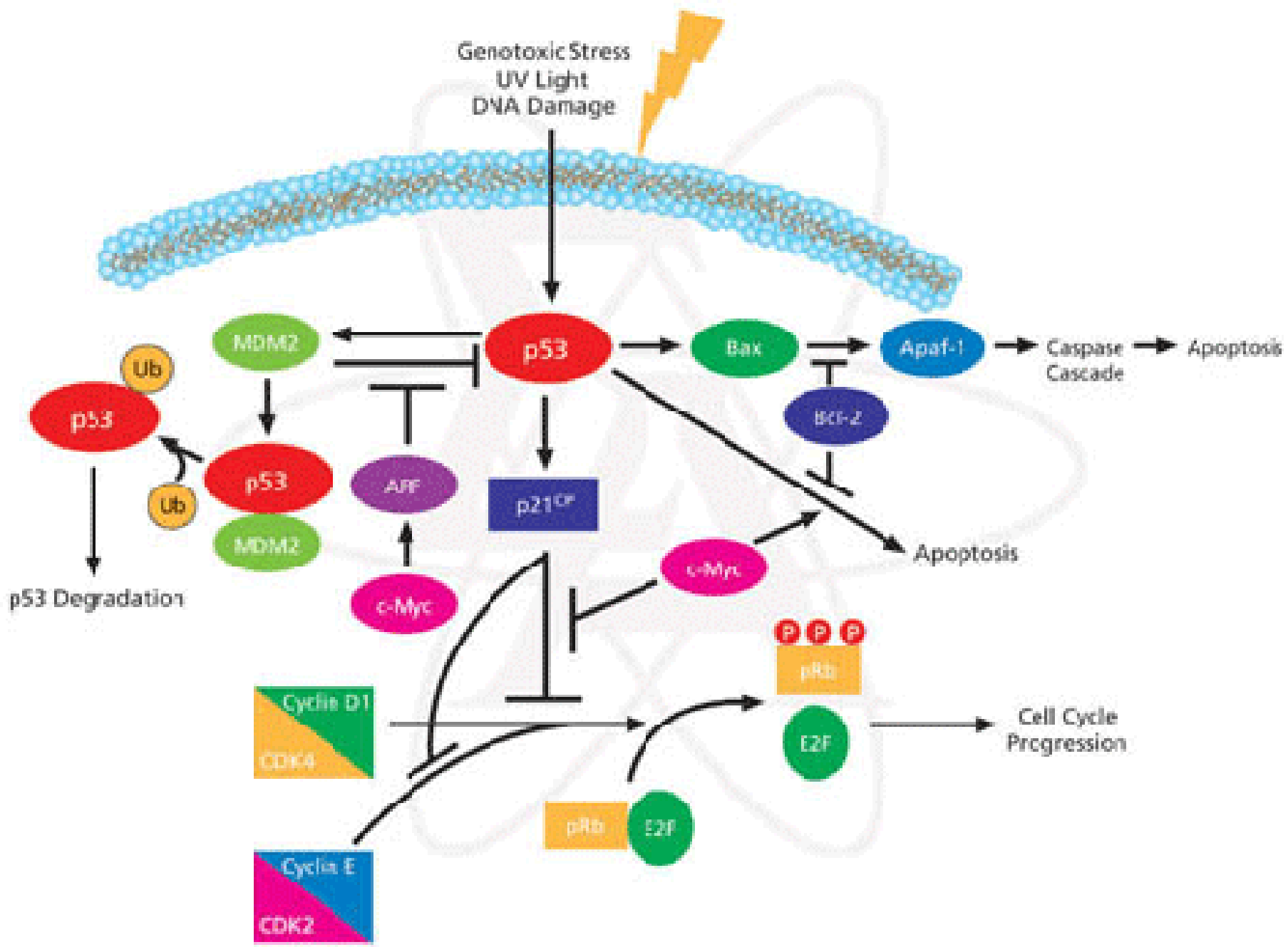
La progressione in G_1 e la transizione $G_1 \rightarrow S$



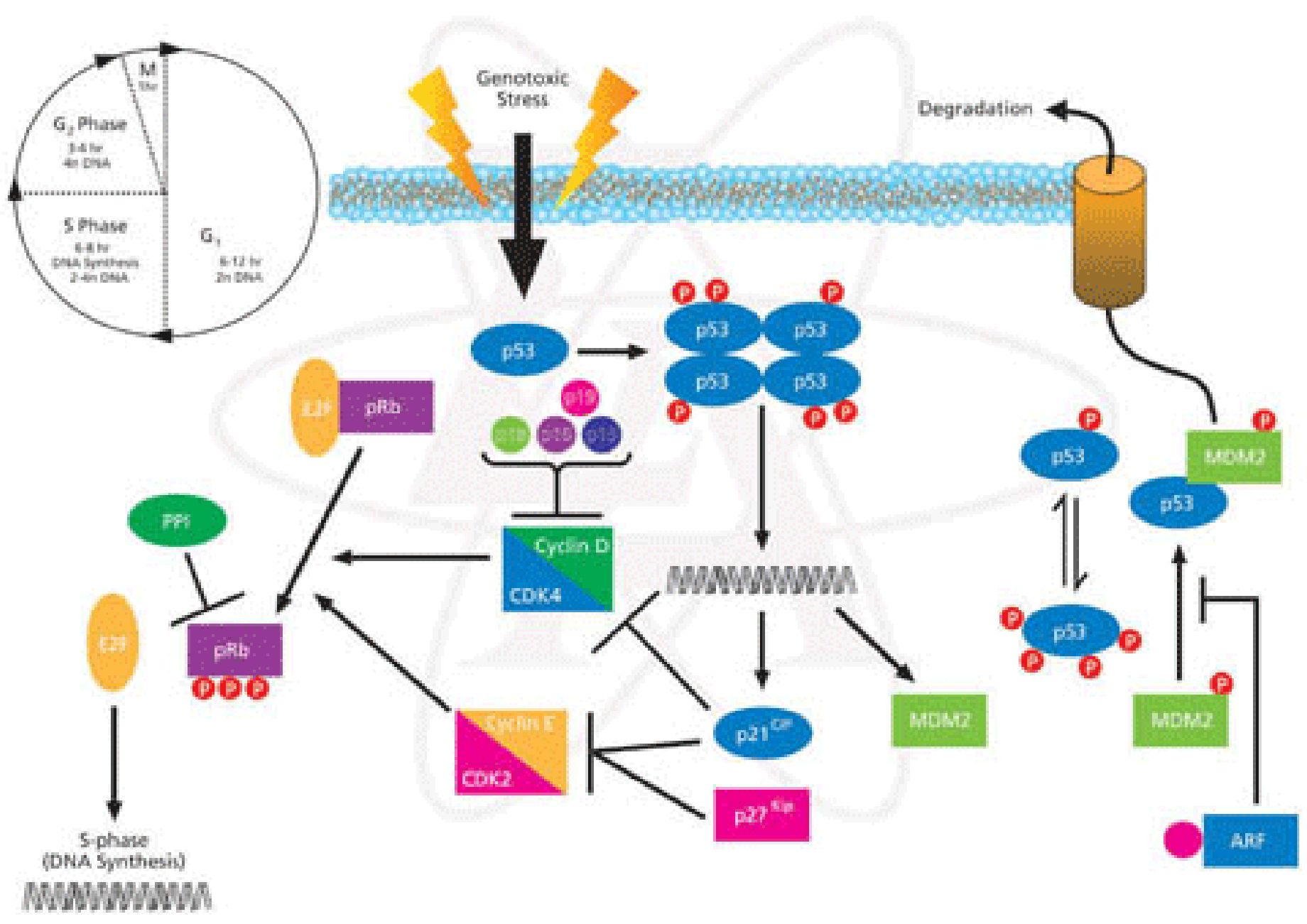
Attività MPF: il complesso ciclina B-CDK1 (detto anche CDC2) e la sua regolazione



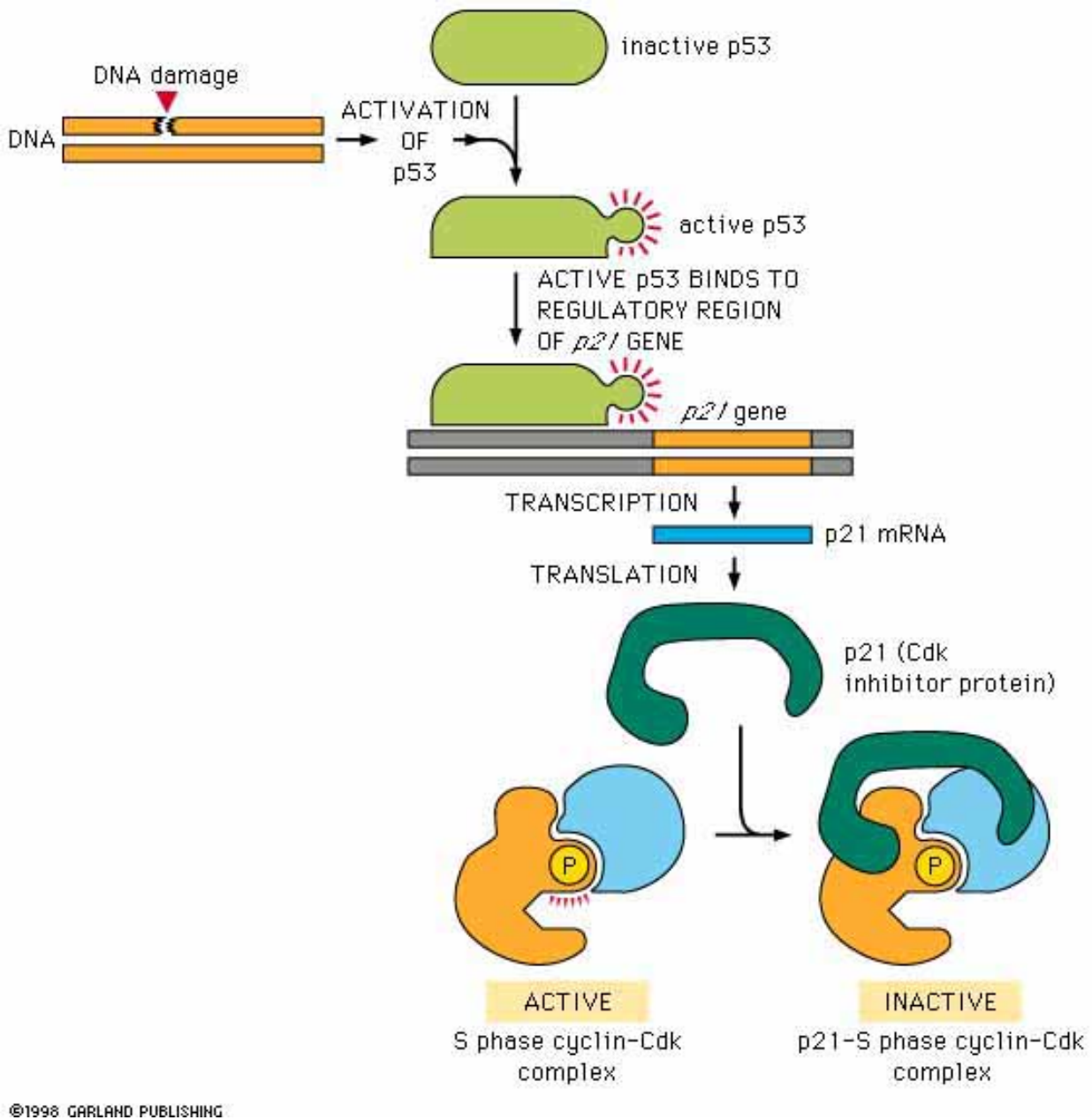
Come p53 regola la fase G_1 in caso di danno al DNA



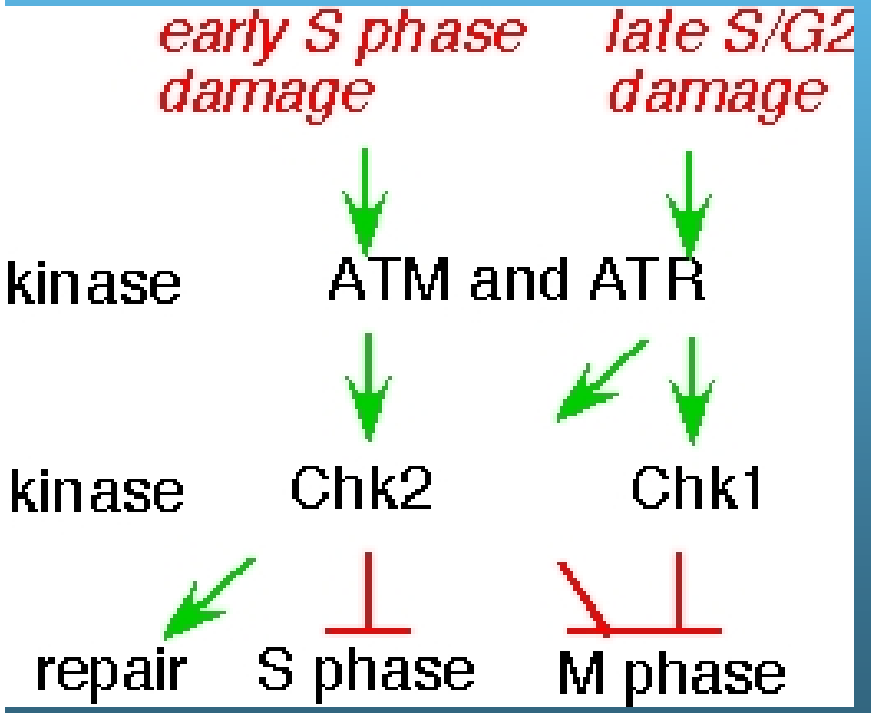
Dettagli della regolazione di p53

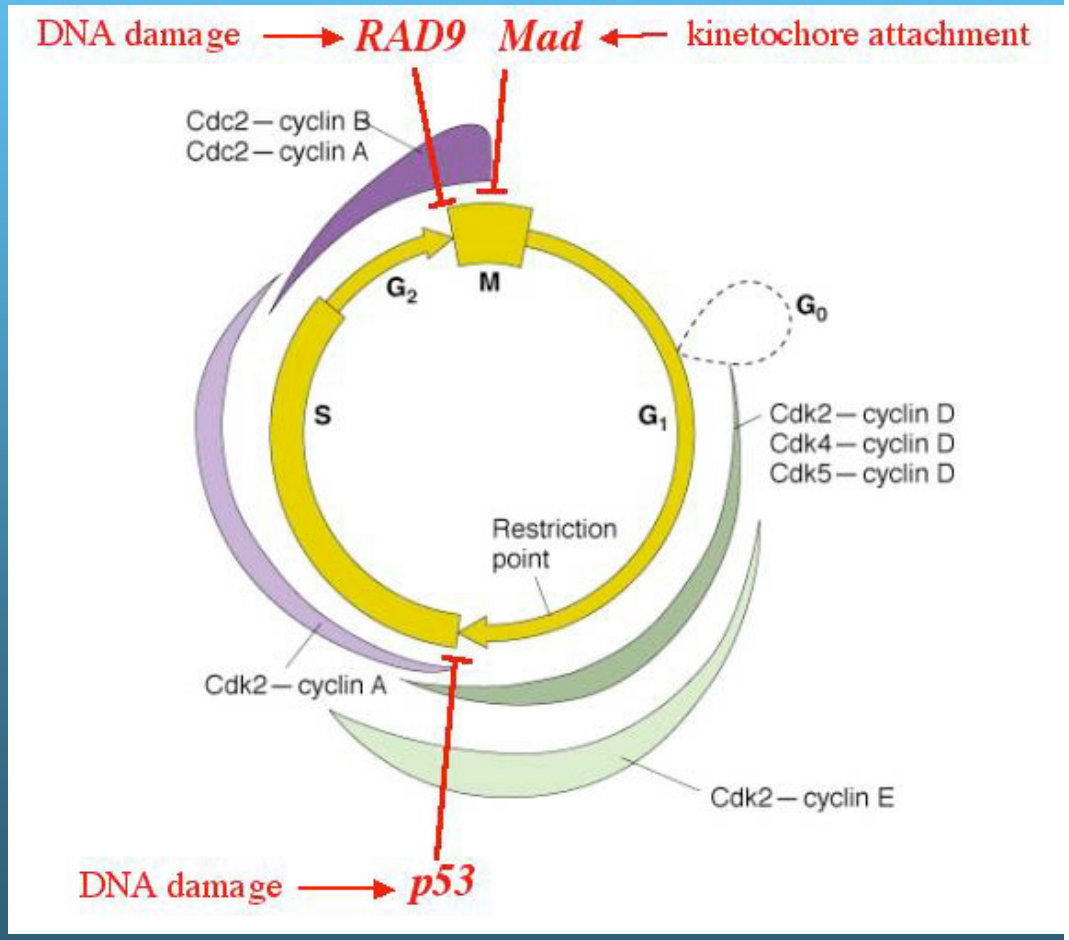


Come p53 regola la fase S in caso di danno al DNA

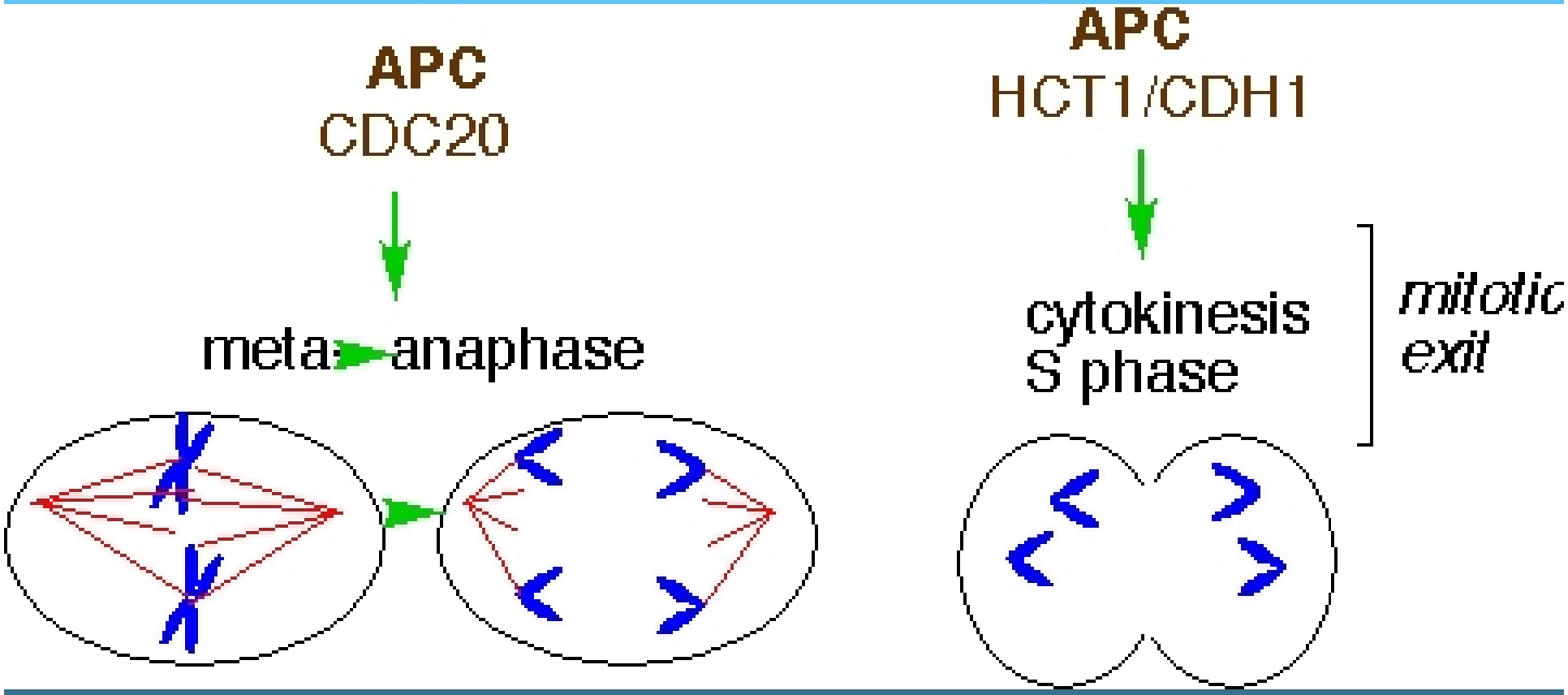


Checkpoints del danno

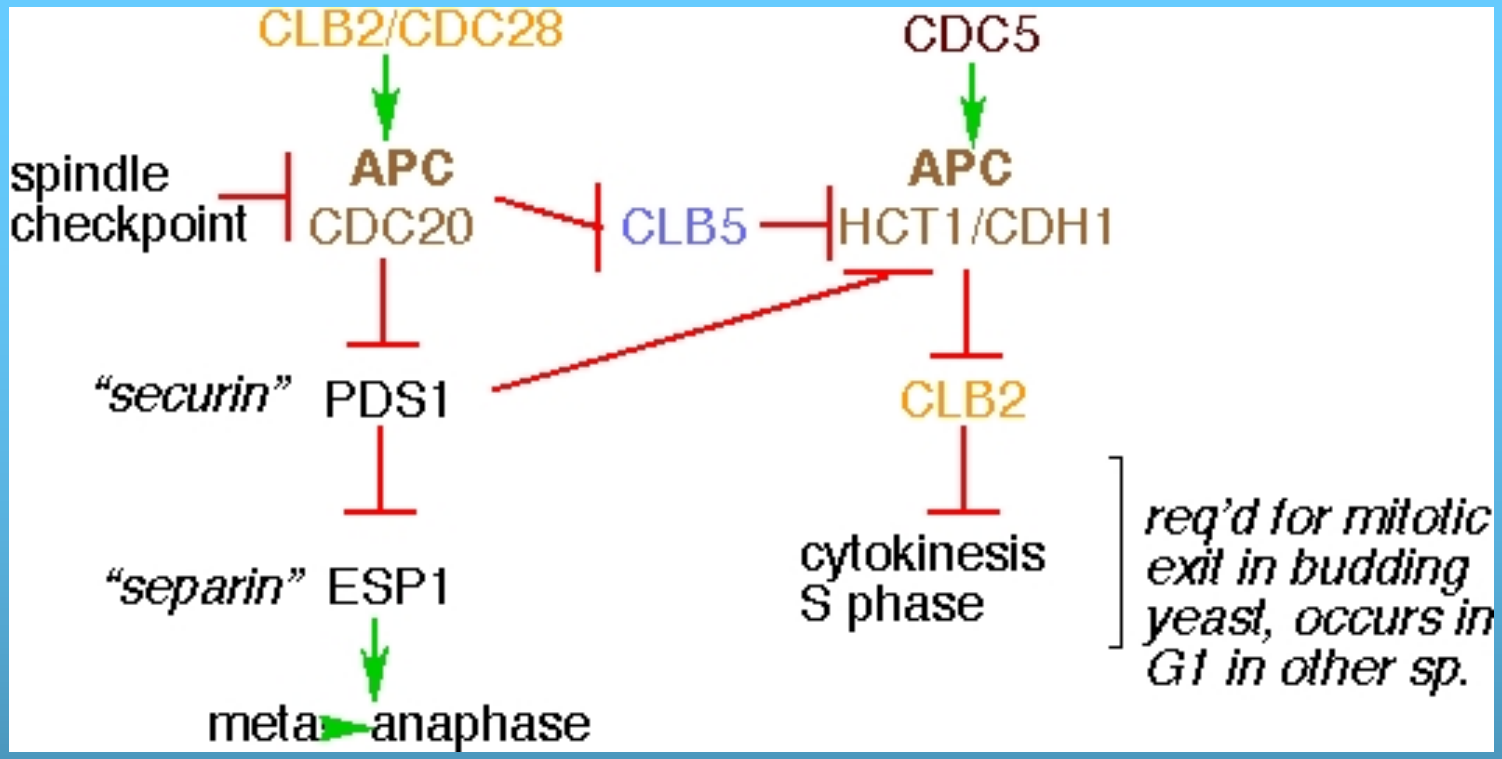


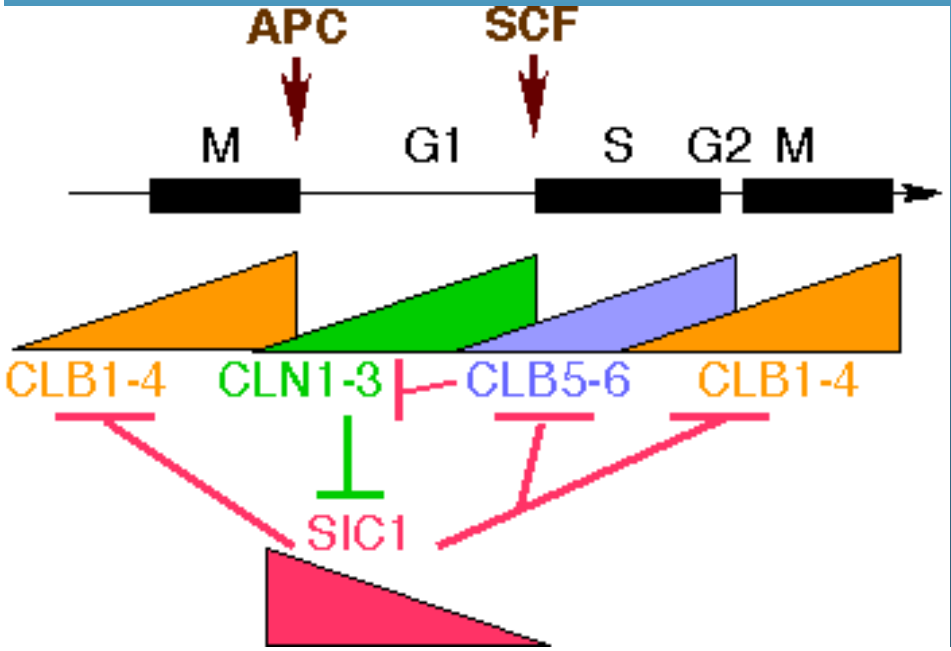


La proteolisi come metodo di controllo in metafase



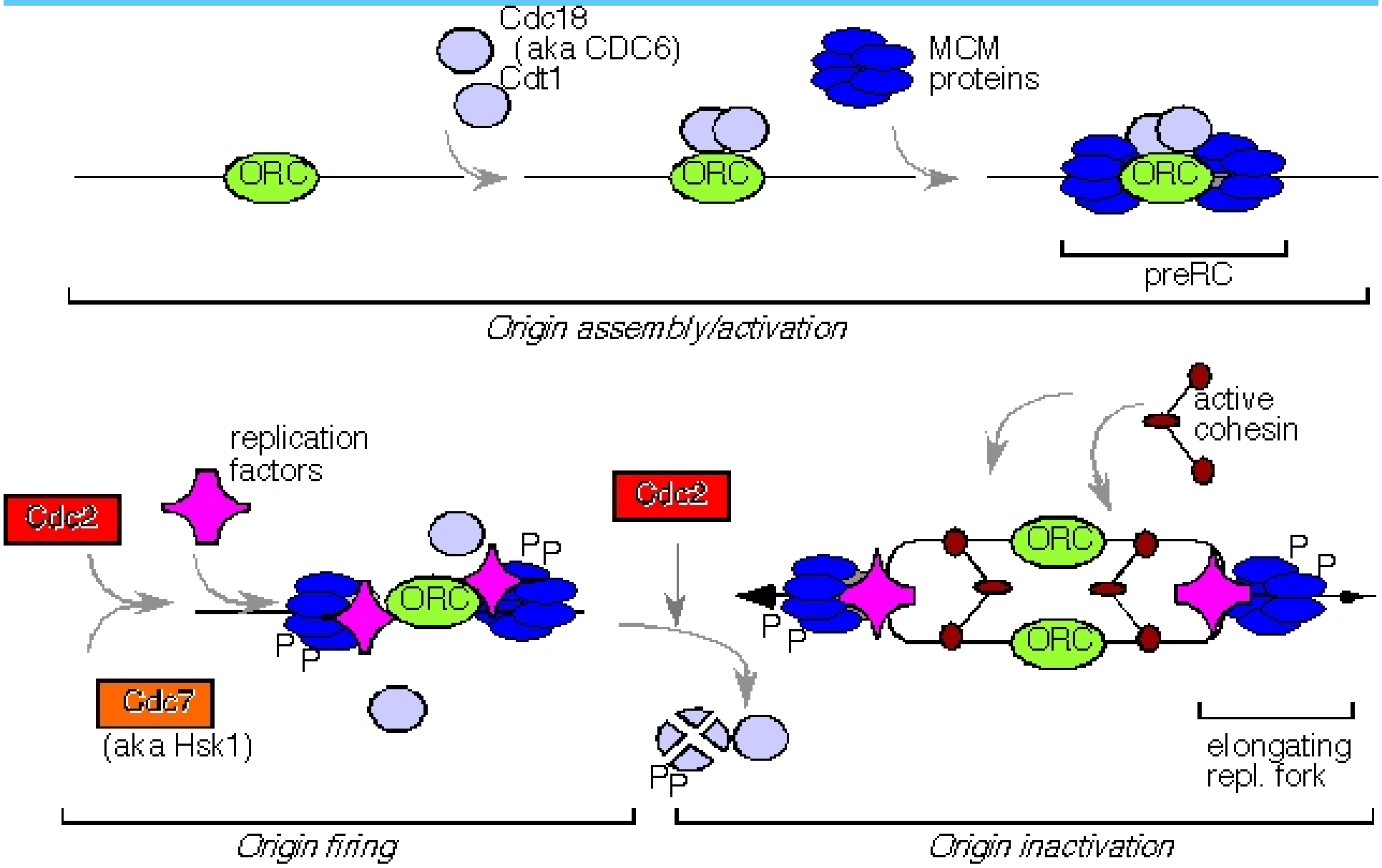
APC e SCF sono complessi molto simili tra loro



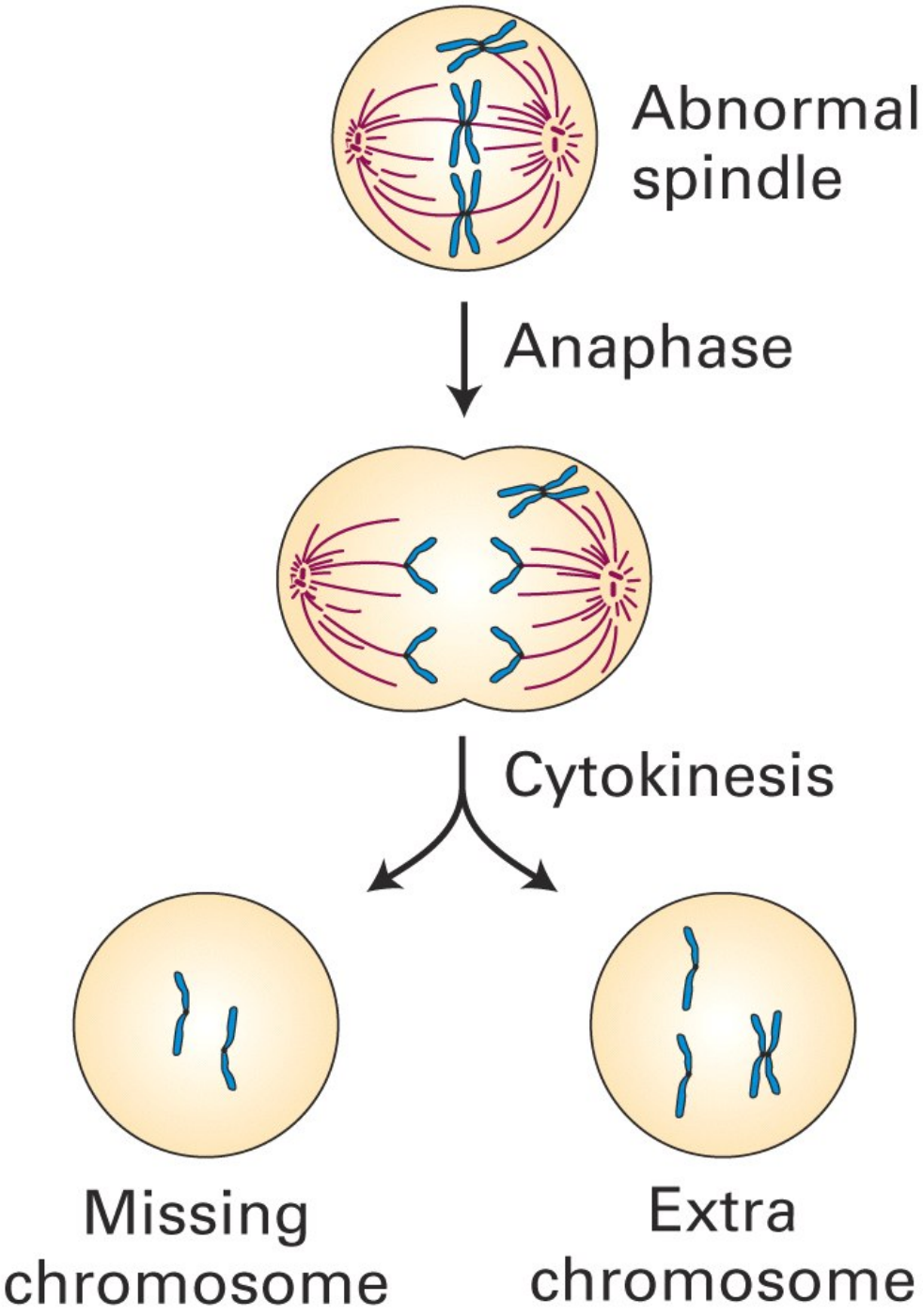


SCF degrada le proteine che inibiscono l'ingresso in fase S, come, ad es. SIC1, l'inibitore del complesso ciclina A/cdk2

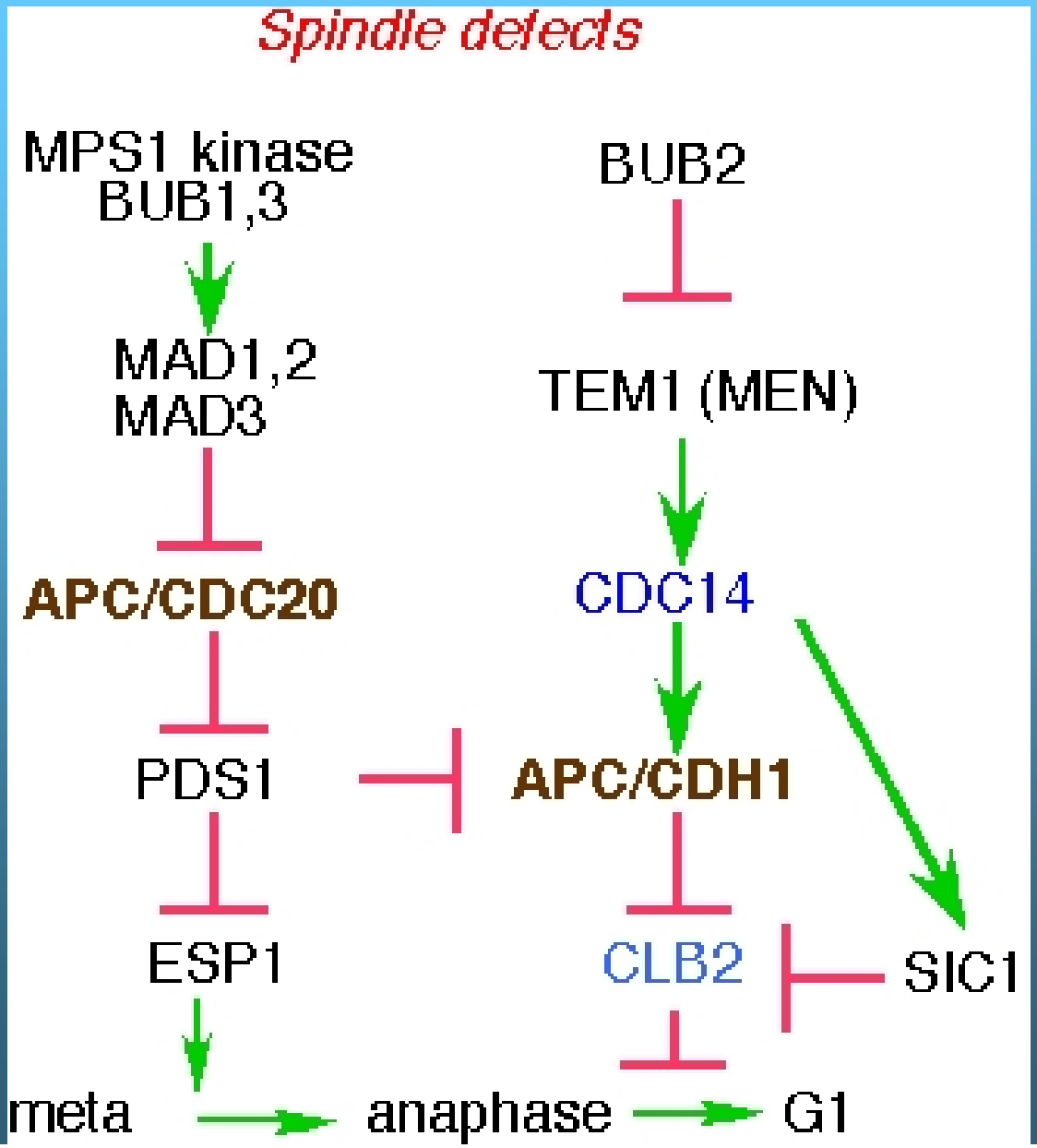
Il controllo della replicazione del DNA



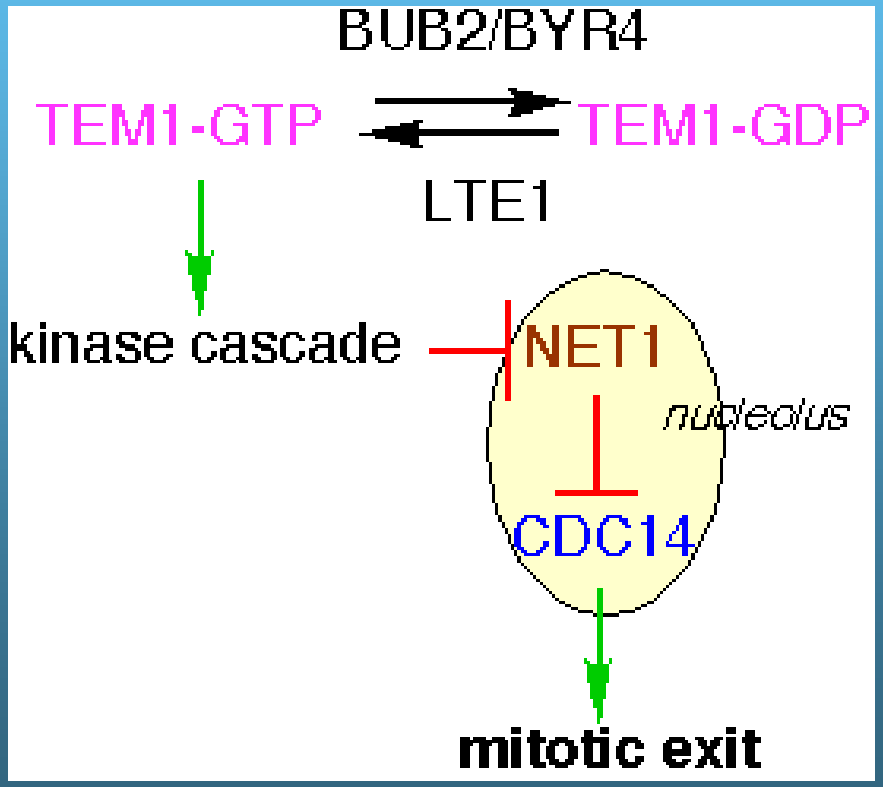
Il controllo in anafase impedisce la segregazione errata dei cromatidi fratelli

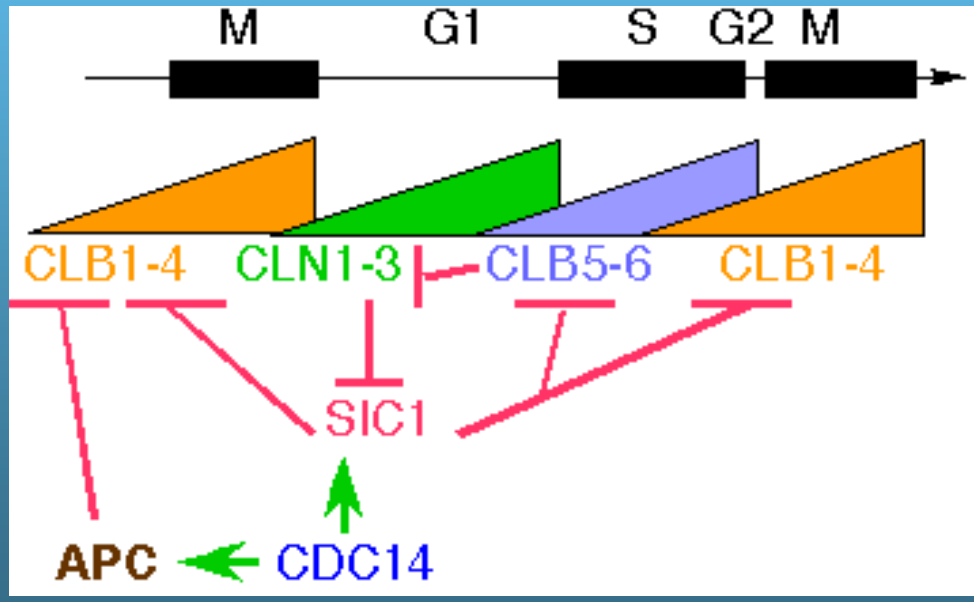


Il controllo del fuso mitotico



L'uscita dalla mitosi





La *rete* che controlla l'uscita dalla mitosi

•La rete di controllo dell'uscita dalla mitosi (MEN) coordina APC con l'inattivazione delle kinasi. Consiste essenzialmente in una cascata di kinasi attivata da GTPasi, che porta all'attivazione della fosfatasi CDC14.

•Nel lievito gemmante, la cascata ha inizio con lo spostamento di uno dei poli del fuso nella gemma, il che porta al rilascio di CDC14 sequestrata nel nucleolo.

•L'attività MEN è inibita se il checkpoint del fuso non dà il "permesso"

•CDC14 defosforila CDH1, incrementando la velocità di distruzione delle cicline mitotiche

•CDC14 induce la sintesi di SIC1 e lo defosforila

•Negli eucarioti superiori, CDC14 defosforila RB

•Tutte le protine che sono state fosforilate per effetto delle kinasi si trovano alla fine del ciclo/inizio di G_1 defosforilate.