

Ricerca: premio Nobel in Fisiologia e Medicina del 2017

Il premio Nobel in Fisiologia e Medicina del 2017 va a Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young per le loro scoperte circa i meccanismi molecolari che controllano i ritmi circadiani. Hall e Rosbash isolarono per primi il gene *period* e scoprirono che la proteina da esso codificata, *PER*, si accumula durante la notte e viene degradata nel corso del giorno, cosicché il livello cellulare di tale proteina oscilla in un ciclo di 24 ore. Gli studi sono stati condotti sull'organismo modello per eccellenza, *Drosophila melanogaster*.

Quando il gene *period* è attivo, viene prodotto il suo mRNA, che, trasportato nel citoplasma, dirige la sintesi della proteina *PER*. Essa si accumula nel nucleo ed inibisce la propria sintesi, mediante un circuito a feedback negativo. Il punto è, come entra *PER* nel nucleo? Young scoprì il gene *timeless*, codificante una seconda proteina necessaria per il corretto funzionamento dei ritmi circadiani, *TIM*. Egli mostrò sperimentalmente che *TIM* lega *PER* e le due proteine entrano nel nucleo. La trascrizione di *period* e *timeless* inizia attorno a mezzogiorno, grazie a specifici fattori di trascrizione; le proteine *PER* e *TIM* si accumulano durante la sera e vengono traslocate durante la notte nel nucleo, dove sopprimono i geni per i loro fattori di trascrizione, e con essi la loro stessa sintesi; la degradazione di *TIM* la mattina presto promuove la fosforilazione e la degradazione di *PER*. Di conseguenza, la trascrizione dei fattori di trascrizione viene riattivata e *PER* torna ad essere sintetizzata.

Young, in collaborazione con altri ricercatori, mise in evidenza che le componenti molecolari di un orologio biologico sono anche altre. La proteina *Importin α1*, che ha un ruolo in molti pathway di importazione nel nucleo, può importare *TIM*, che funge perciò da adattatore per il trasporto di *PER* nel nucleo. Anche *Nup53*, proteina con ruolo nei pori nucleari, è cruciale, così come *DBT*, codificata dal gene *doubletime*, la quale ritarda l'accumulo della proteina *PER*. Modelli molecolari mostrano che *TIM* presenta domini caratteristici delle cariosferine, proteine implicate nell'importazione di altre proteine nel nucleo, e ciò conferma il suo ruolo di trasportatore per *PER*.

Il ruolo dei geni sopra citati è stato scoperto grazie all'osservazione di individui con mutazioni nei geni codificanti per le componenti essenziali, i quali mostrano comportamenti non ritmici. Per esempio, individui mancanti della corretta *Importin α1* presentano un accumulo di *PER* e *TIM* nel citoplasma a qualunque ora, segno che le due proteine non vengono affatto importate nel nucleo e quindi sottoposte ai meccanismi regolatori a feedback.

Tutti gli organismi multicellulari utilizzano meccanismi simili a quello descritto. L'orologio biologico è determinante nella regolazione di molti geni, consentendo adattamenti fisiologici specifici in base alla fase del giorno. Ad esempio, nell'uomo lo stato di allerta migliore si ha attorno alle 9, quello di migliore coordinazione verso le 14. Nei vertebrati, l'orologio circadiano risiede nel nucleo soprachiasmatico, all'interno dell'ipotalamo. Le cellule del nucleo soprachiasmatico sincronizzano il corpo e modulano caratteristiche fisiologiche come la temperatura corporea.

Lezione I

La membrana plasmatica è:

- 1) **Discontinua:** le proteine integrali interrompono il doppio strato lipidico.
- 2) **Fluida:** la membrana si comporta come un fluido, i lipidi possono diffondere lateralmente; la fluidità dipende dalla composizione in lipidi. A Tab il colesterolo diminuisce la fluidità. Anche le proteine integrali possono muoversi all'interno del doppio strato fosfolipidico.
- 3) **Asimmetrica:** alcuni lipidi e molti polipeptidi sono distribuiti asimmetricamente tra le due facce della membrana ed, in particolare, gli zuccheri presenti sulle proteine sono sempre rivolti verso l'esterno. Ad esempio, nei GR gli sfingolipidi sono più abbondanti sulla faccia esterna, mentre il

fosfatidilinositolo su quella interna. Le **lipid rafts** sono regioni della membrana in cui vi è abbondante colesterolo. Ciò ostacola il movimento laterale delle proteine. Le zattere lipidiche aiutano la cellula a riunire le proteine di membrana in siti particolari.

Tra le proteine di membrana: pompe, canali, recettori, aggancio al collagene della ECM, enzimi, giunzioni cellulari. Ad esempio, i recettori possono legare i **mitogeni**, o fattori di crescita, che stimolano la divisione mitotica. L'interfaccia di comunicazione con l'ambiente esterno sono le proteine di membrana.

La membrana plasmatica è selettivamente permeabile. Per diffusione semplice possono attraversarla gas, piccole molecole idrofobiche e piccole molecole non cariche (es. etanolo, urea). Non passano, invece, aminoacidi carichi, H^+ , Na^+ , HCO_3^- , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+} . Essi devono passare attraverso i canali proteici o i trasportatori. Aminoacidi polari, nucleotidi, glucosio non passano liberamente. L'osmosi fa riferimento al movimento delle molecole di acqua. Essa può entrare nella cellula sia per diffusione semplice che per diffusione facilitata attraverso le acquaporine. L'acqua è il solvente delle reazioni metaboliche, regola il volume cellulare e la temperatura corporea, è responsabile del trasporto di nutrienti e della secrezione delle scorie metaboliche. Esistono diverse tipologie di acquaporine (AQP) nel corpo umano (). Negli occhi, nelle fibre cristalline regolano la concentrazione di acqua, così negli eritrociti, nel rene la concentrazione dell'urea, e se ne trovano anche nell'intestino e nei testicoli.

Nella diffusione facilitata, le molecole vengono trasportate secondo un gradiente di concentrazione da proteine di trasporto o da canali ad apertura regolabile, senza consumo di energia (l'entropia comunque aumenta in questo verso).

Nel **cotrasporto** (sim-, anti-), **una molecola passa secondo gradiente e l'altra contro gradiente**. Esempio di simporto è il riassorbimento di glucosio a livello renale (assorbiti Na^+ secondo gradiente; grazie all'energia di gradiente vengono assorbite anche molecole di glucosio). Lo stesso avviene a livello del lume intestinale.

I canali e le acquaporine possono essere regolati dal voltaggio, da ligandi (dall'esterno/dall'interno), meccanicamente. L'interno della cellula è più negativo e la ddp è in genere -70 mV. K^+ è più concentrato all'interno, mentre Na^+ e Cl^- lo sono all'esterno. Questi gradienti di concentrazione forniscono l'energia potenziale per formare un potenziale di membrana. Nel caso più semplice, se la membrana è permeabile al potassio, questi ioni diffondono lungo il gradiente di concentrazione, lasciando cariche negative non bilanciate all'interno. Le cariche positive non compensate all'esterno e quelle negative all'interno si allineano fisicamente lungo la superficie della membrana e si attraggono attraverso il doppio strato lipidico: il potenziale è localizzato solo nell'immediata vicinanza della membrana. La differenza di cariche è data inoltre all'ineguale distribuzione di fosfolipidi di membrana che portano una carica negativa. All'interno della cellula, questa carica negativa viene schermata di meno dalle cariche positive rispetto all'esterno.

A livello della terminazione sinaptica, il NT stimola l'ingresso di Ca^{2+} attraverso i canali ligando-dipendenti da esso stimolati; solo dopo, il segnale è convertito in un potenziale d'azione gestito da Na^+ .

Il trasporto attivo è termodinamicamente sfavorito, il sistema funziona grazie alla rottura di ATP. L' Na^+/K^+ ATPasi serve a mantenere disequilibrio tra interno ed esterno.

Mutazioni della pompa CFTR del cloro causano la fibrosi cistica. Nei pazienti malati, le vie dell'aria sono bloccate dall'accumulo di muco. La pompa presenta un poro per Cl^- , regolabile. Ha due domini di legame per nucleotidi, dove aggancia ATP, ed un dominio regolatorio all'interno, oltre a siti di legame per fosfato. Sul lato esterno presenta catene oligosaccaridiche.

Le pompe protoniche svolgono un ruolo fondamentale. Ad esempio, il pH è più basso all'interno dei lisosomi, cioè la $[H^+]$ è più elevata, grazie a tali pompe. Le idrolasi acide dei lisosomi funzionano a pH 5, quando quello della cellula è 7, tendenza evolutiva volta ad evitare i danni d'un eventuale rilascio di enzimi lisosomiali al di fuori dell'organello.

Lezione II

L'endocitosi può avvenire per fagocitosi, pinocitosi od essere mediata da recettore. Quest'ultimo caso permette un riconoscimento selettivo ed è l'unico in cui si forma una fossetta rivestita (*coating*) attorno alla vescicola. La vescicola si forma per fusione di due pseudopodi. Le interazioni con il citoscheletro sono cruciali.

Il corpo residuo è costituito dal materiale di scarto prodotto dai lisosomi, che dev'essere smaltito o accumulato in condizioni sicure.

L'**efferocitosi** consiste nella fagocitosi di cellule dello stesso organismo che non servono più. Ad esempio, vengono eliminate le cellule apoptotiche e quelle necrotiche. Le cellule da eliminare sono riconosciute grazie a segnali esposti in membrana, di tipo proteico: le cellule che non devono essere fagocitate presentano **DEM** (*Don't Eat Me*) **signals**, che sono riconosciuti dai macrofagi; il cambiamento di proteine è un segnale d'allarme per i macrofagi, che fagocitano le cellule che non presentano DEM. Non solo i macrofagi e le cellule dendritiche, ma anche i fibroblasti e le cellule epiteliali possono eseguire tale processo, che garantisce che la cellula morente sia smantellata in sicurezza, e la sua membrana non perda ossidanti, caspasi, proteasi e quant'altro. L'efferocitosi innesca pathway di trasduzione, che stimolano una risposta anti-infiammatoria e pro-crescita. La cellula che ne ingerisce un'altra produce fattori di crescita, eg per l'endotelio vascolare. Un'efferocitosi non ben funzionante è implicata in varie malattie, molte delle quali autoimmuni o legate a risposte infiammatorie croniche.

Il ferro circola nel sangue legato alla transferrina; essa viene legata dai recettori di membrana, consentendo l'ingresso di ferro nella cellula. **Legame transferrina-recettore**, endocitosi mediata da recettore, grazie a interazioni che coinvolgono la clatrina ed il citoscheletro. Si forma un'invaginazione nella membrana e gemma una vescicola, che porta sulla faccia interna la transferrina legata al recettore. La vescicola neoformata si fonde ad un lisosoma. A pH acido, il ferro è rilasciato dalla transferrina; la vescicola con la transferrina ed il recettore torna alla membrana, si fonde con essa e la transferrina viene rilasciata.

La **clatrina** si assembla in forme a **triskelion**, dal nome di un motivo decorativo miceneo, costituiti ciascuno da tre catene pesanti e altrettante leggere. Essa può polimerizzare: richiamata sotto la membrana, vari **triskelion** si organizzano in anelli a cinque o sei lati. Costruendo diverse combinazioni di pentagoni ed esagoni, si possono formare vescicole di **diverse taglie**. Le **clathrin-coated vesicles** spostano cargo selettivamente tra membrana plasmatica, trans-Golgi ed endosomi. Il reclutamento e l'assemblaggio dei **triskelion** è affidato a molecole adattatrici, tra cui l'adattina. Un recettore capta il suo ligando: questo evento richiama l'**adattina** sotto la membrana, che media il legame con la clatrina e la formazione della fossetta rivestita. La clatrina aiuta la vescicola a gemmare; nel citoplasma, la clatrina si stacca, la vescicola diventa nuda. Anche altre molecole giocano ruoli chiave, come la **dinamina**, che crea un anello che sgancia la vescicola dalla membrana. La vescicola nuda forma un endosoma, che può fondere con un lisosoma. La vescicola può riportare il recettore in membrana, quindi il recettore viene usato più volte, oppure può restare al lisosoma; in tal caso il recettore viene degradato ed in membrana ne vengono aggiunti di nuovi. È il caso dell'endocitosi mediata da recettore dell'EGF (*endodermal growth factor*). Le cellule che vanno in mitosi non formano vescicole rivestite e la clatrina svolge altri compiti: lega, con altre proteine, l'apparato del fuso e stabilizza le fibre del cinetocore, aiutando i movimenti dei cromosomi. La struttura trimerica della clatrina forma **crosslink** tra microtubuli del cinetocore.

La transcitosi. Dall'epitelio intestinale dei neonati vengono assorbite le IgA e le IgG presenti nel latte materno. Dal lume intestinale (pH acido), gli anticorpi legano recettori specifici e vengono integrati in vescicole. Queste gemmano e si dirigono al versante di membrana al polo opposto. Si fondono alla membrana e rilasciano l'anticorpo, dato che l'ambiente extracellulare ha pH neutro. A **pH diverso** cambia la ionizzazione dei gruppi funzionali e con ciò i legami intermolecolari e di conseguenza l'affinità. Possono originarsi diverse situazioni di attrazione e di repulsione elettrostatica. Le molecole che presentano tale comportamento sono dette *pH-sensitive*.

Lezione III

L'**esocitosi** permette il rilascio di neurotrasmettitori, ormoni, segnali, materiali di scarto, componenti della ECM. I prodotti della proteinsintesi che si accumulano nel RE vengono impacchettati in vescicole rivestite

dalla proteina COP-II, passano al Golgi, dove seguono la via cis-intermedio-trans-TGN e vengono glicosilati. Le vescicole provenienti dal TGN sono invece rivestite da COP-I e dirette al RE.

La **via secretoria**, mediante la quale la cellula rilascia il contenuto vescicolare per esocitosi, può essere **regolata** (le vescicole fondono in funzione di uno stimolo, eg NT), oppure **costitutiva** (le vescicole fondono direttamente con la membrana).

Le **proteine SNARE** sono una famiglia di proteine integrali di membrana e sono dei recettori di SNAP (*Soluble NFS Attachment Proteins*, NFS fa riferimento ad un'ATPasi sensibile a N-etilmaleimide). Tutte le SNARE contengono nel loro dominio citosolico un segmento di circa 70 aminoacidi disposti in eptadi ripetute, detto motivo SNARE. Si differenziano tra loro nella regione N-terminale, dove mostrano *fold* e gruppi funzionali tipici. Sono coinvolte nel trasporto vescicolare: le **v-SNARE** vengono incorporate nelle membrane delle vescicole di trasporto durante la gemmazione, le **t-SNARE** sono situate nella membrana del compartimento bersaglio. La membrana plasmatica del neurone contiene due t-SNARE, la syntaxina e la SNAP-25, mentre la membrana della vescicola sinaptica contiene una sola v-SNARE, la sinaptobrevina. Quando vescicola e membrana si avvicinano, le SNARE interagiscono tra loro formando filamenti proteici intrecciati, che tirano i due doppi strati lipidici fino alla fusione ed espellono le molecole di acqua ivi interposte. Le vescicole “sanno” dove andare grazie alle interazioni v-SNARE/t-SNARE. Un recettore di carico di una certa vescicola lega una v-SNARE, che aggancia, per riconoscimento specifico, la t-SNARE tipica del compartimento bersaglio: le vescicole si fondono solo con le membrane che presentano adeguate SNARE *proteins*. Esistono più di 20 coppie di SNARE. Le SNARE presentano una catena polipeptidica ad α -elica, che si complessa con altre due catene della proteina periferica SNAP-25. I complessi di fusione derivanti avvicinano le membrane. Le quattro catene spiralizzano, forzando l'avvicinamento delle due membrane: affinché esse si fondano è necessario che non distino più di 1,5 nm. Una vescicola endocitotica può, ad esempio, presentare v-SNARE complementari alle t-SNARE lisosomiali. Ciò media la formazione del **complesso d'attracco**, che aiuta l'aggancio della vescicola all'**endosoma** precoce, grazie a legami proteici non covalenti. Le proteine SNARE vengono in seguito districate, con consumo di ATP.

Le **Rab proteins** sono una famiglia, membro della superfamiglia delle *Ras monomeric G proteins*. Le Rab presentano, generalmente, un ripiegamento per GTPasi, che consiste in sei β -foglietti fiancheggiati da cinque α -eliche. Le Rab regolano numerosi step del traffico fra membrane: la formazione di vescicole, il loro movimento sui network actinici e tubulinici, la fusione con la membrana bersaglio, agevolando l'*uncoating*. Le Rab sono proteine periferiche di membrana, simili a **palloncini** attaccati ad essa per mezzo di una corda: sono legate covalentemente al gruppo prenile con due cisteine nel C-terminale. Le *Rab escort proteins* (REPs) guidano le Rab neosintetizzate e prenilate legando il gruppo prenile, che è insolubile, e portando le Rab nel citoplasma. Il gruppo prenile viene, in seguito, inserito in membrana, ancorando la Rab sulla faccia citoplasmatica della membrana (vescicola, plasmalemma,...). Come altre GTPasi, le Rab switchano tra due conformazioni: attiva, ovvero legata al GTP, ed inattiva, legata al GDP. Quella attiva si forma per fosforilazione di quella inattiva, grazie a fattori di scambio **GDP/GTP**. L'inattivazione è invece guidata da *GTPase-activating proteins*. Gli **effettori di Rab**, proteine che interagiscono con essa, legano soltanto la forma legata al GTP, ovvero attiva. Gli effettori sono molto eterogenei e Rab presenta varie isoforme proteiche, almeno settanta nell'uomo, cosicché le funzioni sono moltissime. Gli effettori proteici possono guidare gemmazione, selezione e *coating* delle vescicole, avere un ruolo nel trasporto, nell'*uncoating* e nella fusione. Dopo la fusione con la membrana e la dissociazione dell'effettore, dovuta alla defosforilazione, Rab viene riciclata da GDI (*GDP dissociation inhibitor*), che lega il gruppo prenile e previene lo scambio di GDP con GTP, che riattiverebbe Rab prima che essa fosse tornata alla membrana d'origine, a cui viene portata da queste GDI. L'overespressione di Rab è legata alla carcinogenesi, ad esempio gastrica. Mutazioni in Rab39b sembrano essere legate a disabilità intellettuale e Parkinson.

L'autofagia. La cellula può trarre energia da materiali intracellulari, digerendo alcune proprie componenti. Il Nobel per la Medicina 2016 è stato vinto da Yoshinori Ohsumi per le ricerche su questo potente meccanismo cellulare. L'autofagia è una risposta adattativa a condizioni di mancanza di nutrienti. Ohsumi ha lavorato sui lieviti. Tali organismi, quando posti in terreni poveri, sono in grado di inglobare in vescicole del materiale interno (organelli, macromolecole), che viene portato ad un lisosoma e digerito. Questo permette di ricavare energia per le funzioni di base, per esempio per rinnovare il pool di aminoacidi a

disposizione per la cellula. L'autofagia può essere intesa come un tentativo di sopravvivenza in condizioni difficili. Se prolungata, uccide la cellula, ma in sé è altamente benefica. Tra gli effetti benefici si annovera lo smaltimento di proteine mal ripiegate. Le proteine possono essere degradate seguendo due vie. La **via lisosomiale** permette di eliminare proteine mal ripiegate, riconosciute aspecificamente, ad esempio perché espongono sequenze che non dovrebbero esporre, sintomo della loro forma scorretta. La **via proteasomica** seguente la poliubiquitinazione, invece, permette di eliminare quelle proteine la cui concentrazione dev'essere finemente regolata dalla cellula, garantendone il turnover, e coinvolge proteine con siti ubiquitinabili, non dissimili da quelli fosforilabili. I mitocondri hanno una vita media abbastanza breve e quelli senescenti sono eliminati per autofagia, per evitare che sostanze ossidanti e riducenti siano disperse. I componenti principali possono venire riciclati. Con ciò, la cellula mantiene pulizia e vitalità: ciò che non serve, è vulnerabile e cioè vecchio, o danneggiato viene degradato. L'autofagia è un processo fondamentale negli eucarioti, conservato dal lievito fino all'uomo. Geni implicati nell'autofagia sono stati identificati nel lievito: ATG (*Autophagy Related Genes*). Essi codificano per proteine implicate nella formazione degli **autofagosomi**, tra cui 16 proteine che lavorano in maniera gerarchica. Queste proteine sequestrano porzioni di membrana dal plasmalemma o dal RE e le avvolgono attorno all'organulo da eliminare. Le proteine *misfolded* sono dirette alla degradazione autofagica grazie alla mediazione di particolari *chaperonine*. L'autofagia dev'essere sottoposta ad un'adeguata regolazione. Troppa o troppa poca autofagia sono deleterie. Con l'invecchiamento, l'autofagia funziona sempre peggio; tra le implicazioni le malattie amiloidi, eg l'Alzheimer. I livelli basali di autofagia sono cruciali nei neuroni e nei miociti, cellule non sottoposte a divisione, che devono essere rinnovate perciò in maniera diversa. Si dice che le persone anziane debbano delle volte digiunare: ciò può aiutare, stimolando l'autofagia.

Neurodegenerazione. L'autofagia è un processo omeostatico che previene l'accumulo di proteine a livelli tossici. Tuttavia, gli autofagosomi possono accumularsi e processare i precursori amiloidi nella loro forma tossica.

Cancro. L'autofagia sopprime i tumori eliminando gli organelli danneggiati ed i fattori di crescita. Tuttavia, l'autofagia agisce da meccanismo citoprotettivo, che aiuta le cellule cancerogene a resistere alle terapie ed a sopravvivere nonostante la carenza di nutrienti.

Infezione ed immunità. Batteri intracellulari, virus e protisti sono rimossi dall'ospite per autofagia e gli antigeni sono processati per la presentazione mediante MHC-II. L'autofagia aiuta a prevenire autoimmunità ed infiammazione. Tuttavia, alcuni microorganismi hanno evoluto meccanismi per sfuggire all'autofagia e stabilire una nicchia replicativa.

Malattie cardiache ed epatiche. L'autofagia può essere protettiva nei confronti dell'ischemia. L'autofagia può alleviare lo stress sul RE, degradando proteine mal ripiegate. Per contro, un eccesso danneggia il fegato.

Anzianità. L'autofagia aiuta l'organismo, eliminando gli organelli senescenti e limitando la produzione di specie tossiche dell'ossigeno.

Miopatie. L'autofagia previene l'accumulo di proteine, ma può contribuire al consumo del muscolo.

L'autofagia viene osservata nella **morte cellulare programmata**, ma ad oggi non si sa se essa tenti di ostacolare tale processo o se vi contribuisca.

I *pathway* dell'autofagia sono quattro. La **macroautofagia** elimina organelli e cellule e prevede la formazione di autofagosomi. La **microautofagia**, al contrario, prevede l'ingolfamento di materiale citoplasmatico direttamente nel lisosoma, grazie ad un'invasione di questo. L'**autofagia mediata da chaperoni** è un processo specifico e complesso, che riconosce proteine con sito di legame per il complesso **hsc70** (tipico delle proteine *heat-shock*; nell'autofagia dispiega le proteine e le trasferisce) di un *chaperone*, che lega un recettore complementare sulla membrana lisosomiale. La **mitofagia** è la degradazione autofagica, selettiva, dei mitocondri, per evitare problemi con specie ossidanti e riducenti.

L'adesione cellulare. È fondamentale per l'organizzazione delle cellule in tessuti: permette l'ancoraggio tra cellule e con la ECM, la resistenza allo stress, la migrazione (*homing*) e la comunicazione, l'**anoikis** (forma di morte cellulare programmata indotta dal distacco di cellule ancoraggio-dipendenti dalla ECM, che

fornisce segnali e fattori di crescita necessari. Le metastasi evadono.). Alcune proteine sono **molecular shock absorber**, come Talin e la distrofina. L'aumentata tensione durante gli stress meccanici causa dispiegamento (*unfolding*) di numerosi domini, scelti "arbitrariamente", che rilasciano la tensione. Durante fasi di relax meccanico, contrariamente, la tensione diminuita stimola il ripiegamento di certi domini, che causa un aumento di tensione. Ciò è tipico di proteine larghe, che presentano array lineari di domini. Queste proteine hanno un ruolo di link meccanico nei siti di adesione e proteggono la cellula dall'eccessiva pressione, contribuendo inoltre al link citoscheletro-ECM. Nella **DMD** (*Duchenne Muscular Dystrophy*), non è prodotto lo *shock absorber* distrofina, dunque le cellule sono impotenti di fronte alla tensione e possono rompersi, rilasciando cose come creatina-chinasi e proteine muscolari nel flusso ematico, fatto sfruttato in diagnostica. L'adesione cellulare dev'essere plastica. Le cellule animali migrano prima di differenziarsi nelle opportune regioni corporee. I sistemi di adesione devono poter essere rimossi e ristabiliti nei tempi e luoghi opportuni. Questo è importante nello studio delle metastasi. Quando una cellula cambia le proteine di adesione si comporta in modo totalmente diverso.

Lezione IV

Le giunzioni cellulari possono essere occludenti/impermeabili (eg epitelio intestinale), aderenti (per l'integrità del tessuto, consentono il movimento coordinato delle cellule), desmosomi (salda associazione tra cellule, eg muscolari sottoposte a trazione), emidesmosomi (ancoraggio alla lamina basale – ECM), comunicanti.

Le **giunzioni occludenti** sigillano le membrane. Le due cellule adiacenti portano in membrana proteine transmembrana come occludine e claudine, che entrano in contatto nello spazio extracellulare. Quando necessarie, queste proteine possono contornare tutta la cellula. Si trovano in tessuti epiteliali ed endoteliali ed in genere sono situate subito sotto la zona apicale della cellula, e limitano il passaggio di soluti negli spazi fra le cellule, costringendoli ad entrarvi.

L'**occludina** è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene OCLN ed ha peso molecolare 65kDa. Essa presenta nove domini: N-terminale, transmembrana, extracellulare, transmembrana, intracellulare, transmembrana, extracellulare, transmembrana, C-terminale. Il C-terminale è direttamente responsabile della formazione della *tight junction*. Il C-terminale, inoltre, interagisce con molte proteine citoplasmatiche e molecole segnale, tra cui quelle che specificano per la sopravvivenza cellulare: le occludine giocano un ruolo anche nella morte cellulare programmata, se una cellula sana perde le occludine, entra in apoptosi. L'N-terminale è implicato nel sigillare la giunzione. L'occludina non serve ad assemblare la giunzione, quanto più funge essa stessa da barriera. Esperimenti su modelli murini mostrano che il ruolo dell'occludina è molto più complesso di quanto non si credesse: una sua mutazione con perdita di funzione causa iperplasie ed infiammazioni croniche nell'epitelio gastrico, calcificazione nel cervello, atrofia testicolare e varie. Inoltre, l'assenza di occludina è stata correlata con un più facile sviluppo di metastasi, perché le proprietà di adesione sono ridotte. Si è notato, inoltre, che pazienti con metastasi esprimono meno occludine.

Le **claudine** sono proteine transmembrana piccole, 20-27 kDa, che si rinvencono dai nematodi all'uomo simili a livello proteico ma differenti a livello genico (convergenza). Hanno N-terminale e C-terminale nel citoplasma e due loop extracellulari, spannando la membrana per quattro volte. Sembra che le cisteine di diverse claudine possano formare ponti disolfuro. Le claudine legano le proteine scaffold.

Le **JAM** (*Junctional Adhesion Molecules*) sono una famiglia di glicoproteine con ruoli diversificati: le troviamo nelle giunzioni occludenti delle cellule endoteliali ed epiteliali polarizzate, come sui linfociti, che li aiutano a migrare tra diversi tessuti, e nelle piastrine, delle quali contribuiscono a determinare l'attivazione. Per l'appunto, le JAM sono in grado di legare numerosi ligandi, citoplasmatici quanto extracellulari. Le JAM sono importanti per l'acquisizione della polarità cellulare.

Il legame tra due cellule non si limita alla membrana plasmatica. Le giunzioni sono in stretta relazione con il citoscheletro, grazie ad opportune proteine; per esempio, Zo1 (**Zona Occludens 1**) mette in comunicazione claudine ed occludine con la F-actina). Queste zonule occludenti mantengono la cellula compatta.

Le proteine di membrana si possono muovere al suo interno, poiché essa è fluida, ma devono pur essere distribuite differenzialmente. Le zonule occludenti, come le zattere lipidiche, limitano la mobilità delle proteine in membrana. Ad esempio, nell'epitelio intestinale, le zonule occludenti limitano la mobilità dei cotrasportatori sodio-glucosio, mantenendoli in posizione opportuna. Le giunzioni compartimentalizzano perciò la membrana in zone funzionali.

Le **giunzioni aderenti**, o "a cintura", sono implicate nell'adesione cellula-cellula, nella determinazione della polarità cellulare. Le caderine posseggono una porzione extracellulare con domini proteici che riconoscono domini uguali nelle cellule adiacenti (omofilia) e formano con essi interazioni deboli, impacchettando le cellule. Le caderine sono spesso tessuto-specifiche, e si legano solo fra uguali: il riconoscimento fa sì che una caderina del tessuto epiteliale leghi solo caderine del tessuto epiteliale (E), quindi cellule di tal tessuto, e lo stesso vale per il tessuto neurale (N), ma E non lega N. Le caderine sono legate al citoscheletro (porzione actinica), grazie ad altre proteine, come le vimentine e le catenine.

Caderine e adesione cellulare isotipica. Come detto, le caderine mediano un riconoscimento cellulare specifico. Sono stati condotti esperimenti su embrioni di rana, scelti perché relativamente grandi e caratterizzati da uno sviluppo esterno. Da embrioni in fase di neurulazione, sono state prese cellule epidermiche e cellule neurali, dissociate in una soluzione che in grado di alterare tutte le giunzioni e lasciate riaggregare. Si è verificato che, dopo qualche ora (il tempo di risintetizzare le caderine) le cellule mostravano segregazione tra epidermiche e neuronali.

Caderine e transizione epitelio-mesenchimatica (EMT). La transizione, tipica dello sviluppo embrionale e della carcinogenesi, è caratterizzata dal cambiamento delle proteine di adesione espresse in membrana. I tumori esprimono proteine che legano le loro cellule tra loro, formando una massa. Le metastasi si formano quando alcune cellule cambiano il set di proteine espresse in superficie, si staccano e colonizzano altri tessuti: distacco, invasione della ECM con protrusioni pseudopodali, intravasazione nel sangue, nuovo tessuto, sintesi di opportune molecole di adesione. () La transizione ha anche luogo nelle cellule delle creste neurali. ()

I **desmosomi**, o macule aderenti, sono costituiti da proteine con domini extracellulari e placche proteiche di adesione poste sotto la membrana, le quali rinforzano la struttura. I desmosomi sono particolarmente resistenti e perciò rappresentati in tessuti sottoposti a stress meccanico, come cuore, muscoli. I desmosomi sono legati ai filamenti intermedi, spesso quelli di cheratina, e sono disposti a macchia di leopardo sulla membrana. Desmocolline e desmogleine mostrano attrazione omofilica tra i domini extracellulari, che tengono appiccate le cellule coinvolte. Tra le proteine delle placche, si annovera la placoglobina, che svolge un ruolo anche nella trasduzione del segnale.

Gli **emidesmosomi** presentano anch'essi una placca in una cellula, che viene ancorata non ad altre cellule, bensì alla ECM: la placca fa da ponte tra filamenti intermedi e filamenti della ECM. Tra le proteine transmembrana in ciò coinvolte si annoverano le integrine.

I **contatti focali** sono contatti cellula-matrice che consentono un'adesione temporanea al substrato e sono coinvolte perciò nei fenomeni di **migrazione**, proliferazione e differenziamento. Le proteine associate prendono contatto con i microfilamenti. I complessi proteici vengono assemblati e disassemblati continuamente, cosicché la cellula adotta misure per il ciclo cellulare e può muoversi in avanti (ripetendo assemblaggio/disassemblaggio). Le adesioni focali sono strutture *hub* in grado di mediare effetti regolatori, come eventi di segnalazione, in risposta all'adesione alla ECM. Sono presenti anche in cellule sessili, in cui sono piuttosto stabili. Per visualizzare il ruolo svolto da questo tipo di adesioni in una cellula che migra, si veda un globulo bianco che migra all'interno di un epitelio. Le proteine del complesso di adesione focale sono connesse alla ECM mediante integrine, che legano proteine extracellulari grazie a brevi sequenze aminoacidiche, come il motivo RGD (Asp-Gly-Asp). Le adesioni focali sono importanti nella migrazione collettiva. Quando due cellule collidono, si ha inibizione del contatto, le due cellule cambiano direzione del moto e formano nuove protrusioni. Ciò avviene per molte coppie di cellule ed il tessuto si disaggrega.

La **durotaxis** consiste in una forma di migrazione cellulare, in cui le cellule sono guidate da un gradiente di rigidità, che dipende dalle caratteristiche fisiche della matrice extracellulare. La maggior parte delle cellule normali migra verso dove la rigidità aumenta. Cellule individuali sono in grado di detectare la rigidità del

substrato secondo un'esplorazione tattile attiva, cioè esercitando forze sul substrato e rilevandone la deformazione (Ipotesi di Lo). La rigidità dell'ECM è molto variabile nei tessuti, dal fragile tessuto nervoso a quello rigido dello scheletro. I principali responsabili sono collagene ed elastina. Il collagene dà rigidità, l'elastina ha un ruolo nei polmoni, nei vasi sanguigni e nella pelle per il ritorno del tessuto alla forma originaria dopo una deformazione. Matrici extracellulari di varia durezza possono essere prodotte per fini terapeutici. Il meccanismo molecolare della *durotaxis* coinvolge le adesioni focali, il citoscheletro e numerosi robot proteici. La risorsa per la trazione del citoscheletro sta nella contrattilità acto-miosinica.

Un'aumentata rigidità della ECM induce una cascata trasduzionale che attiva *small GTPase Rho* e *Rho-associated kinase (ROCK)*; quest'ultima controlla la fosforilazione della catena leggera della miosina, che ne innesca l'attività ATPasica e la contrazione delle fibre di actina; ciò spinge la matrice. La cellula deve tastare continuamente la matrice. Le proteine dell'adesione focale e le loro interazioni fosforilazione-dipendenti, sono adatte per la trazione in matrici a rigidità assai variabile.

Lezione V

Le **giunzioni comunicanti** (*gap junctions*) mettono in comunicazione il citoplasma di due cellule adiacenti. Connexine transmembrana si associano a sei a sei formando un connessone a rosetta, un emicanale, che viene allineato con quello della cellula adiacente. I canali comunicanti sono idrofili ed hanno un diametro pressappoco di 1,5 nm (megappiccolo ()). Nell'uomo ci sono almeno venti geni che codificano per le connexine, che sono espresse in moltissimi tessuti. La struttura delle connexine è modulabile: il cambiamento conformazionale delle stesse regola l'apertura del canale. Le giunzioni comunicanti permettono la propagazione dell'impulso nervoso nel tessuto cardiaco. ()

Il **citoscheletro**. Dal 1930-60, sono state identificate le proteine coinvolte nella contrazione; i filamenti citoscheletrici sono visibili solo grazie alla microscopia elettronica (l'"orletto striato" per i primi biologi). Il citoscheletro è una rete tridimensionale di filamenti, la cui struttura è altamente dinamica. Si parla di **tensegrity**, *biotensegrity* o continuità tensionale, in riferimento al ruolo funzionale del citoscheletro: dare stabilità, forma ad una struttura, equilibrando le tensioni e le forze interne. Gli organelli non possono affatto nuotare liberamente, sono avvolti dal citoscheletro, vincolati. Il citoscheletro ingabbia organelli e complessi molecolari voluminosi, ne regola il movimento ed agevola l'organizzazione spaziale della cellula.

Vedi appunti del corso di botanica.

I **microfilamenti** sono filamenti (F-actina), polimeri di G-actina (monomero globulare). Nel muscolo è presente α -actina, negli altri tessuti troviamo β -actina e gamma-actina. La G-actina non è simmetrica, ma presenta un sito di legame per il GTP. I monomeri associati sono evidenziabili mediante immunoistochimica e decorrono in tutto il citoplasma. I microfilamenti sono responsabili anche dell'emanazione di **filopodi**. Ogni legame G-actina/G-actina consuma 1 ATP: l'actina G-ATP lega il filamento e l'ATP perde un fosfato, così il monomero legato è actina G-ADP. Ogni filamento di actina è costituito da due protofilamenti, i quali si avvolgono l'uno sull'altro, in un giro che si ripete ogni 36 nm. Il filamento si accresce direzionalmente (aggiunta al +, estremità a crescita veloce, o estremità a barbigli, mentre al - si ha degradazione - estremità appuntita o a crescita lenta). Questo permette alla cellula di cambiare forma. La costruzione del filamento procede in quattro stadi: attivazione del monomero, nucleazione, allungamento, *annealing*. () La crescita inizia lentamente, poi si fa più rapida, fino a quando si raggiunge una situazione di equilibrio dinamico, in cui tanti monomeri vengono aggiunti quanti ne vengono persi (*steady state*, derivata dal grafico t_F-actina nulla). Nel processo intervengono numerose proteine. Il complesso multiproteico **ARP2/3** recluta monomeri di G-actina, e lega un filamento a livello della coda (+); inoltre, provoca la formazione dei rami collaterali. ()

La **formina** recluta monomeri di G-actina, allunga il filamento di F-actina al + solo linearmente; può, inoltre, aiutare la formazione di filopodi e pseudopodi, sostenendo la membrana, eg nella fagocitosi di un battere. Il *trademilling* dei microfilamenti può essere sfruttato dalla cellula per far spostare proteine, che scorrono unite ai microfilamenti che si spostano in funzione di assemblaggio/disassemblaggio. Altre proteine citosoliche, come la **timosina P4**, possono sequestrare il monomero di actina, inibendo la polimerizzazione. La **profilina** può stimolare il rilascio di actina dalla timosina. A riposo, la timosina

sequestra la G-actina. La filamina e le proteine gelificanti stabilizzano le ramificazioni dei microfilamenti. Le proteine cappuccio legano una delle due estremità del microfilamento, impedendo in tal sito l'aggiunta o la disgregazione. La tropomiosina è una proteina di collegamento laterale; la gelsolina è in grado di spezzare i filamenti.

Le proteine che associano i filamenti di actina regolano le interazioni tra di essi, formando, a seconda delle esigenze, strutture contrattili, a rete o parallele (). I filamenti di actina fanno assumere alla cellula una grande varietà di forme: microvilli, fasci contrattili citoplasmatici (*stress fibers*), espansioni lamellari (**lamellopodii**) e digitiformi (filopodi), anello contrattile (citodieresi), filamenti sottili del muscolo striato. I microfilamenti contribuiscono al movimento cellulare interagendo con le adesioni focali ed esercitando una pressione sulla membrana. Tutti i fenomeni descritti sono finemente regolabili grazie a segnali molecolari.

La α -actina è una proteina organizzatrice, eg nei **microvilli**, che ampliano notevolmente la superficie di assorbimento, i filamenti di actina sono disposti ordinatamente paralleli fra loro e fungono da sostegno al plasmalemma. I microfilamenti si trovano anche nelle **stereociglia**, simili ai microvilli ma più allungate, che si ritrovano sulla superficie apicale delle cellule sensoriali dell'organo del Corti, dell'organo dell'equilibrio, dei tubuli seminiferi. Le stereociglia sono visibili già al microscopio ottico.

La distrofia muscolare può essere l'effetto di mutazioni diverse: le proteine di membrana o la **distrofina**, la quale lega al citoscheletro la membrana. Nel caso sia mutata la distrofina (eg DMD), la perdita di contatto tra citoscheletro e membrana è sufficiente per la degenerazione della cellula muscolare.

Miosina e contrazione muscolare. La miosina ha una struttura quaternaria costituita da un esamero: due catene pesanti e due coppie di catene leggere. I monomeri si associano longitudinalmente e sono ruotati di 60°, con le teste verso l'esterno. La tropomiosina si autoassembla e si dispone lungo i solchi dell'elica di actina; ad ogni molecola di tropomiosina se ne associa una di troponina. () Le teste di miosina presentano siti di legame per l'ATP e l'actina.

Lezione VI

I microtubuli. Monomeri di α e β -tubulina (globulari) formano dimeri, i quali polimerizzano in protofilamenti, dai quali originano i microtubuli. L'unione di due monomeri (GTP-tubulina) può scindere il GTP della beta, ma non quello della alfa. La fase log riflette una barriera cinetica al processo di nucleazione. Dai protofilamenti si forma un foglietto semiplanare, che poi si chiude in un tubo cavo. Le tubuline sui microtubuli stabilmente polimerizzati possono venire modificati chimicamente, ma se un monomero viene rilasciato, esso viene immediatamente riconvertito nella sua forma standard.

Le proteine cappuccio. *“I microtubuli possono stabilizzarsi se alla loro estremità positiva si forma un cappuccio a GTP, che si forma se prima che la tubulina- β idrolizzi il GTP si attacca al microtubulo un altro eterodimero. Un microtubulo che nasce dal centrosoma può non depolimerizzarsi se alla sua estremità positiva (quella più lontana da centrosoma) si va ad attaccare una molecola o una struttura cellulare.” (Wikipedia)*

Altre proteine facilitano la polimerizzazione iniziale, eg gamma-tubulina. Alcune sostanze inibiscono la polimerizzazione dei microtubuli: la colchicina impedisce la polimerizzazione e stimola la depolimerizzazione, vinblastina e vincristina sono inibitori della polimerizzazione, usati come chemioterapici, perché così la divisione è ostacolata (distruzione del fuso mitotico). La colchicina è usata in laboratorio per fare il cariotipo.

Le **MAPs** (*Microtubule-Associated Proteins*) possono essere ad alto o a basso peso molecolare. Nel secondo caso, hanno un peso di circa 60-70 kDa e comprendono le proteine Tau, tutte prodotte per splicing da un singolo gene, negli umani MAPT (*Microtubule-Associated Protein Tau*). Esse sono termostabili. Sono IDP (**Intrinsically disordered protein**): mancano di una struttura tridimensionale fissa e stabile. Questo mette in crisi il concetto di una forma, una funzione, suggerendo che la dinamica del sistema proteico riveste un ruolo di primo piano. Le IDP possono formare strutture stabili se legate al proprio ligando. Fungono da *linker* flessibili, motivi lineari (localizzazione di proteine, forma cellulare, *turnover* proteico) e *fuzzy complexes*

(molteplicità strutturale, che determina molteplicità funzionale, eg diverse modalità di legame dei nucleasomi).

Tau è importante per polimerizzazione e stabilizzazione del sistema microtubulare. Ha domini specifici, che legano le tubuline (legame ionico tra i residui positivamente carichi al C-terminale e le cariche negative dei microtubuli). Se Tau è iperfosforilata può perdere adesione ai microtubuli, staccarsi e perdersi nella cellula, che può smaltire dosi normali; con l'invecchiamento, gli accumuli proteici non vengono smaltiti bene, possono formare fibrille, che possono risultare estremamente tossiche per la cellula; inoltre, i microtubuli tendono a depolimerizzare. I neuroni degenerano per accumulo di aggregati, ammassi, grovigli o *tangles* (taupatie, tra cui Alzheimer e Parkinson). Alterazioni di Tau, che si comporta da tipica fibrilla amiloide, possono passare attraverso la sinapsi da un neurone all'altro, mediando la trasmissione prionica. Il processo fu identificato per la prima volta in casi di mucca pazza.

I **centri organizzatori dei microtubuli** (MTOC = *Microtubule Organizing Centre*) possono essere uno o più. Nel fuso mitotico, sono due, agli estremi, poiché i centrioli si duplicano prima della mitosi. Nei neuroni un centro dei microtubuli si trova all'inizio dell'assone; un centro organizzatore di un ciglio è sostenuto da microtubuli (corpo basale), ben diverso da microvilli e stereociglia: il ciglio ha motilità propria. In un MTOC, una serie di proteine innesca la polimerizzazione, che è energeticamente sfavorita. I componenti principali del **centrosoma** sono i due centrioli; partecipano anche proteine adattatrici, gamma-tubulina e, se alla base del ciglio, proteine di membrana. I centrioli si posizionano ortogonalmente fra loro. Sono costituiti da triplette di microtubuli legati da particolari proteine. La nucleazione parte dalla matrice pericentriolare e dalla gamma-tubulina.

Movimento cigliare e flagellare. Le ciglia ed i flagelli rendono possibile il movimento nei protozoi; nei metazoi, invece, le ciglia rimuovono particelle e liquidi dalla superficie cellulare, mentre il flagello è tipico degli spermatozoi e ne garantisce la motilità. Le ciglia presentano l'organizzazione microtubulare 9+2 (**assonema**) all'interno del tratto espanso e si caratterizzano per una struttura che include tratto espanso, zona di transizione, piastra basale, corpuscolo basale, sistema a radichetta. Le nove coppie sono formate da microtubuli fusi, uno completo e l'altro no. Il ciglio è rivestito di membrana, la **nexina** connette le coppie di microtubuli ed i bracci di **dineina** ne consentono il moto relativo. Ponti/raggi connettono le nove coppie con il centro. La struttura 9+2 si origina da un **corpuscolo basale**, subito al di sotto dell'estroflessione del ciglio. Esso presenta triplette di microtubuli, dalle quali dipartono i doppietti del ciglio. Le ciglia possono essere motili (eg. tube di Falloppio, trachea) o statiche (terminale dendritico del poro olfattivo). Il movimento del ciglio è a frusta: il ciglio viene piegato, scatta in avanti nella fase attiva e ritorna in posizione durante quella di equilibrio; il processo consuma ATP. I microtubuli non scorrono, ma si piegano: lo slittamento è prevenuto dal legame a livello del corpuscolo basale e dai *crosslink* formati dalla nexina. I flagelli hanno struttura simile alle ciglia; tuttavia, possono muoversi con più libertà, mentre le ciglia solo su un piano. Sono preceduti da un collo. La motilità dei flagelli può essere compromessa gravemente da agenti come il fumo di sigaretta (eg spermatozoi che si muovono scorrettamente, attorno a se stessi). Si ricorda che il flagello procariotico non ha nulla a che vedere con quello eucariotico a livello strutturale. Il flagello procariotico è una struttura che si diparte dalla parete ed è ancorato alla membrana; ha un corpo formato da flagelline disposte a tubo cavo. Alla base, motori proteici fanno ruotare la struttura con moto elicoidale. Ciò funziona similmente al propulsore dell'elica di un battello. Il motore è alimentato dalla diffusione secondo gradiente di H⁺, dopo che essi sono stati espulsi dalla cellula da pompe protoniche ATP-dipendenti.

Lezione VII

I microtubuli svolgono diverse funzioni. Negli assoni sono rotaie per il **trasporto vescicolare assonico**. Il corpo cellulare è spesso distante dalla sinapsi; ciò agevola l'evidenziazione del trasporto.

Il trasporto retrogrado coinvolge mitocondri senescenti, lisosomi, autofagosomi, endosomi per il segnale, *lipid droplets*, NT da *reuptake*, proteine recettoriali di membrana da riciclare dirette ai lisosomi attraverso corpi multivescicolari. Si svolge dal + al - grazie a dineine, quindi dalla periferia verso il soma.

Il trasporto anterograde caratterizza invece vescicole sinaptiche, recettori neurotrofici inseriti in vescicole, mitocondri, vescicole secrete (eg NT). Si svolge dal - al + grazie a chinesine, quindi dal soma verso la periferia. Si ritiene che un flusso più lento e simile sia presente anche sui microfilamenti.

I microtubuli costituiscono il **fuso mitotico**. In anafase, i microtubuli dei cinetocori si accorciano, tirando i cromatidi verso i poli. Al segnale di corretto allineamento e aggancio dei cromosomi, proteine motrici fanno scorrere i cromosomi, congiuntamente all'effetto tirante dei microtubuli.

I **filamenti intermedi** non presentano instabilità dinamica, anche se sono sì elastici, e sono tessuto-specifici (cheratine, vimentine, desmine, lamine, ...). Una proteina dei filamenti intermedi particolare è la nestina, ad alto pm, tipica delle staminali neuronali e generalmente trascritta solo a livello basale negli altri tipi cellulari e perciò non evidenziabile altrove. Ciò che porta a classificare i filamenti intermedi come una classe unica è la correlazione per omologia. I filamenti di tipo V, o **lamine**, si ritrovano in tutte le cellule non nel citoplasma, ma all'interno del nucleo, dove formano la **matrice nucleare**. Sostengono la membrana, mantengono integro il nucleo, interagiscono con proteine per l'ancoraggio della cromatina alla lamina, **Le porzioni più periferiche del nucleo sono trascritte più attivamente**: la disposizione della cromatina nel nucleo influenza il tasso di trascrizione. I geni per componenti dello spliceosoma sono inoltre raggruppati in specifici domini (dimostrato immunologicamente). Le **S/MAR** (*Scaffold Matrix Attachment Regions*) mediano l'organizzazione della cromatina nel nucleo in domini strutturali, con interazioni con la matrice nucleare. Esse hanno anche un ruolo nella regolazione genica. Si trovano al 5' degli introni delle regioni attivamente trascritte. Non hanno sequenze consenso tipiche, ma sono ricche in AT.

La **progeria** (Sindrome di Hutchinson-Gilford) è una grave malattia rara, che causa invecchiamento precoce, anche se non altera la mente del malato. Causa nel bambino l'insorgere di malattie tipiche degli anziani, e porta a morte precoce. La sostituzione di una C con una T causa uno splicing scorretto, con perdita di una sequenza per 50 aminoacidi, nella *coding region* per la lamina A. si formano nuclei lobati e non tondeggianti, il DNA non resta in posizione e ciò influenza la trascrizione.

L'assemblaggio dei filamenti intermedi procede per arrotolamento dei monomeri gli uni sugli altri: i dimeri (*coiled coil*) si associano in coppie formando tetrameri (dimeri *coiled coil* sfalsati), questi si uniscono in protofilamenti, che si riarrotolano fra loro formando fibrille. I monomeri hanno testa uguale, le code possono essere diverse. Quando si forma il fuso mitotico, la rete dei filamenti intermedi si apre e stretcha, così da dividersi fra le cellule figlie.

Il reticolo endoplasmatico porta una serie di sacculi membranosi in continuità fra loro e con la membrana nucleare. Il REL è più tubulare, il RER a sacchi.

Il **REL** sintetizza lipidi, nel fegato demolisce farmaci, tossine, alcol (detossificazione), immagazzina e rilascia Ca^{2+} (muscolari).

Il **RER** modifica e folda le proteine. Se il *folding* è corretto, la proteina va al Golgi mediante vescicola, se è scorretto passa al proteasoma dopo la poliubiquitinazione ed è degradata. La traduzione di 1/3 proteine prevede il trasferimento nel RER. La sequenza aminoacidica segnale per il RER viene legata da una particella di riconoscimento (*Signal Recognition Particle*, SRP). Una proteina recettore lega il complesso, attaccando il ribosoma al RE. La struttura si posiziona in prossimità di un complesso proteico che costituisce un poro in membrana (**traslocone**), poi riprende la sintesi proteica. La sequenza segnale viene eliminata da una peptidasi. Con l'età i controlli si fanno meno efficienti.

Lezione VIII

Nel reticolo endoplasmatico, il ripiegamento ha luogo mediante varie modalità. I **ponti disolfuro** si formano per ossidazione delle catene laterali di cisteina, con liberazione di due H^+ e due elettroni. L'ambiente interno è ossidante.

- **Formazione**: proteina substrato + **PDI** ossidato \rightarrow PDI ridotto + proteina con ponti disolfuro (ripiegata).

- **Riarrangiamento**: proteina con ponti disolfuro scorretti + PDI ridotto -> legame disolfuro PDI-proteina substrato (rompe i ponti errati) -> PDI ridotto + proteina con ponti disolfuro corretti.

Il RE agisce anche **glicosilando** proteine con brevi residui oligosaccaridici poco ramificati (grazie alla oligosaccaride transferasi). La modificazione influenza il destino, eg per la via secretoria, ad esempio gli zuccheri possono avere funzione antigenica e caratterizzano l'individualità cellulare. La modificazione può essere co- o post-traduzionale.

Il RE è un **magazzino regolabile per ioni Ca^{2+}** . L'entrata e l'uscita sono regolate da pompe ATP dipendenti e recettori rianodici che regolano i canali. Il legame di un ligando extracellulare può stimolare l'apertura dei canali per Ca^{2+} . Il calcio funge da secondo messaggero nella via del **PIP₂**: molecola segnale su *G-coupled receptor*, la subunità α attiva la fosfolipasi C-beta, che scinde PIP₂ in IP₃ e DAG. IP₃ controlla l'apertura dei canali per Ca^{2+} nel RE, Ca^{2+} e DAG attivano proteine come pKs.

Nella via secretoria, vescicole con proteine gemmano dal RE e vanno al Golgi (vescicole ricoperte da COPII), mentre si muovono con *coating* di COPI intra Golgi, verso il plasmalemma ed il RE (retrograda). Le vescicole dalla membrana plasmatica derivanti da endocitosi recettore-mediata si muovono verso il TGN ed i compartimenti cellulari in vescicole inizialmente coperte di clatrina (poi il *coating* è perso).

Il **bulk flow** fa riferimento al processo mediante il quale proteine solubili viaggiano tra compartimenti cellulari in conseguenza ai segnali individuali di trasporto e di ritenzione. Ciò può avvenire per via diretta o per vero e proprio *bulk flow*: la proteina senza particolare segnale si accumula nel comparto e gemma in vescicole quando se n'è accumulata troppa all'interno di quel comparto. Si pensa che sia uno dei modi con cui le proteine viaggiano tra i compartimenti golgiani. Recenti esperimenti mostrano che è molto veloce ed efficiente come modalità di trasporto.

Il segnale KDEL specifica per il RE, e compare in proteine che ad esempio ritornano per la via retrograda dal Golgi per esplicare la loro funzione nel RE.

I modelli del trasporto vescicolare e della maturazione delle cisterne sono difficili da verificare empiricamente, al microscopio elettronico si vede una gran confusione di vescicole che ballano nella cellula e le proteine marcate si vede che passano nel cis e sbucano fuori dal trans, ma non sappiamo di più.

Nel **Golgi**, gli enzimi per la glicosilazione sono compartimentalizzati. Cis: Mannosidasi I, mediale: GlucNac transferasi, Mannosidasi II, trans: Galattosiltransferasi, Sialiltransferasi. Nel complesso, vengono aggiunte catene più complesse di zuccheri. La glicosilazione nel Golgi ha luogo su aminoacidi specifici, come Asp, Ser, Thr, Hyp. Inizia nel RE con zuccheri semplici e prosegue nel Golgi con ramificazioni ed aggiunta di zuccheri complessi.

Dal trans-Golgi, gli enzimi idrolitici lisosomiali si dirigono al lisosoma, dove divengono attivi. Un **precursore di enzima lisosomiale** passa nel RE e poi nel cis Golgi, ove è fosforilato con mannosio-6-fosfato (**M6P**), riconoscimento univoco per i recettori del Golgi che gemmano vescicole dirette al lisosoma. Qui, a pH 5, il fosfato si stacca e l'enzima lisosomiale viene attivato per proteolisi.

Lezione IX

I **lisosomi** sono organelli piccoli, vescicolari, ovoidali, solo animali. Posseggono almeno sessanta enzimi idrolitici diversi (idrolasi: proteasi, glicosilasi, nucleasi, fosfolipasi, fosfatasi, lipasi, solfatasi, ...). L'ambiente acido a cui sono attivi gli enzimi (**pH=5**) è mantenuto grazie a pompe H ed è frutto della tendenza evolutiva volta alla riduzione del rischio connesso allo sversamento di enzimi nel citosol. I lisosomi scindono molecole per fornire nuovi costituenti per la cellula, smaltire patogeni, cellule morte, senescenti, ed organelli obsoleti. Proteine di membrana possono importare sostanze particolari per trasporto attivo, via alternativa a quella endosomica. Al di sotto del *bilayer* lipidico è presente una **superficie luminale glicosilata**, di glicoproteine, volta a proteggere la membrana dall'azione digestiva delle fosfolipasi (forma di glicocalice). I lisosomi si formano per fusione di una vescicola golgiana con un endosoma tardivo.

Il lisosomatropismo fa riferimento all'accumulo di basi deboli con proprietà lipofile all'interno del lisosoma. La membrana è permeabile a specie neutre di basi deboli, ma le specie protonate non passano e si accumulano internamente.

I lisosomi portano in membrana proteine del macchinario di smistamento, come Rabs e SNAREs. Hanno funzioni diversificate: eterofagia (dopo fagocitosi o endocitosi), autofagia, autolisi, digestione extracellulare.

Mutazioni a carico dei geni per gli enzimi lisosomiali causano gravi patologie, dette di **accumulo lisosomiale**: alcuni substrati non sono degradati e s'accumulano nel lisosoma. Conseguono problemi connessi a neurodegenerazione, cancro e malattie cardiovascolari. L'accumulo primario di un substrato specifico può ostacolare il normale *trafficking* lisosomiale, determinando accumuli diversi. Si scatenano disastri, come perdita dell'omeostasi del calcio, anomalie nei pathway di segnalazione, permeabilizzazione della membrana, disaccoppiamento dell'autofagia, con difetti di legame lisosoma-autofagosoma, causando accumulo terziario del materiale autofagosomico.

Gli enzimi dei lisosomi sono prodotti dai ribosomi sul RE, passano al Golgi, ricevono M6P e vanno al lisosoma. La classe più rappresentata da enzimi idrolitici sono le **catepsine**, proteasi presenti in tutti gli organismi. Hanno un ruolo vitale nei mammiferi nel riassorbimento osseo. Molte sono proteasi a cisteina, serina od aspartile. La catepsina A, ad esempio, ha ruoli svariati: regola la stabilità delle proteine (degradazione/aggregazione), è implicata nel metabolismo dei glicosfingolipidi, nella proteolisi, nell'autofagia chaperone-mediata, nel trasporto intracellulare, nella regolazione positiva di altri enzimi, nell'esocitosi regolata di granuli secretori contenenti mediatori preformati come proteasi, lipasi e infiammatori.

I lisosomi sono organelli altamente adattabili. Il macchinario **LYNUS** (*Lysosomal Nutrient Sensing*) include numerosi complessi proteici che interagiscono sulla superficie del lisosoma ed ha ruolo di percepire il contenuto nutritivo dell'organello e comunicarlo al nucleo. All'interno del LYNUS si trova la vATPasi (vacuolare), ampio canale multimerico, che dall'idrolisi dell'ATP ricava l'energia per l'importo attivo di H⁺ nel lisosoma. Molti canali e trasportatori si trovano in membrana. LAMP2A media l'**autofagia chaperone-mediata**, legando substrati proteici citosolici alla membrana lisosomiale per favorirne l'importazione. NPC11 media l'esporto di glucosio dal lisosoma. **LAAT-1** (*Lysosomal AminoAcid Transporter*) sposta lisina ed arginina dentro e fuori, giocando un ruolo cruciale nell'omeostasi degli aminoacidi. Enzimi sulla membrana lisosomiale includono HEPARAN-alpha, che partecipa alla degradazione per step dell'eparan solfato, la cui mutazione causa la mucopolisaccaridosi IIIC.

I lisosomi possono secernere materiale fondendosi al plasmalemma (**esocitosi lisosomiale**, ad esempio negli osteoclasti e nei melanociti per la secrezione di sostanze extracellulari). Essa è evidente dalla traslocazione di proteine marker della membrana lisosomiale nel plasmalemma. È stato verificato che molti geni per proteine lisosomiali sono coespressi in molti tessuti e condizioni diverse. Noti geni lisosomiali presentano nel promotore un sito specifico di dieci basi, legato dal fattore di trascrizione TFEB. Il network genico è noto come **CLEAR** (*Coordinated Lysosomal Expression And Regulation*).

I **perossisomi** sono organuli molto piccoli, hanno un *core* cristallino carico di enzimi e svolgono la **beta ossidazione** degli acidi grassi. Posseggono **catalasi**, enzimi che catalizzano $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Il perossido di idrogeno è infatti prodotto costantemente dalle reazioni catalitiche del lisosoma e viene smaltito direttamente in loco. I perossisomi derivano direttamente dal RE e poi acquistano le funzioni di ossidazione e perossidazione. Raccolgono i perossidi tossici, fra cui H₂O₂, formati eg $\text{RH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{R} + \text{H}_2\text{O}_2$. I perossidi vanno smaltiti poiché potrebbero contribuire alla formazione di radicali liberi. Le catalasi possono usare come donatori di elettroni molte sostanze nocive, come etanolo e metanolo, svolgendo così una funzione di **detossificazione**. I perossisomi regolano sintesi e degradazione dei composti azotati, come gli aminoacidi e la degradazione di sostanze insolite, come D-aminoacidi.

I **radicali liberi** si formano in conseguenza a inquinamento, fumo, UV, radiazioni, infiammazione, metabolismo. Possono causare danni a DNA, membrane e macchine proteiche. La formazione di tali specie altamente reattive può essere prevenuta. Antociani, polifenoli, vitamina C, carotenoidi, alcuni minerali ed altro bloccano la reazione a catena innescata dai radicali liberi, cedendo un elettrone senza diventare essi stessi radicali liberi.

Lezione X

I **mitocondri** producono l'energia necessaria per tutte le funzioni cellulari. In una cellula sono presenti in numero variabile ed hanno forme diverse, così come localizzazione variabile. Ogni cellula ha 1000/2000 mitocondri e cellule come miociti e neuroni con un grande fabbisogno energetico possono averne anche 3000. I mitocondri si riproducono per scissione binaria. In alcuni tipi, le creste possono avere aspetto tubulare o essere disposte parallelamente all'asse maggiore (neuroni e miociti). Le creste possono essere semplici, ramificate o disposte a formare reti. Le creste forniscono una superficie ampia per la sintesi di ATP. La membrana esterna ha composizione simile a quella del RE, quella interna a quella dei batteri: contiene la **cardiolipina**, un particolare fosfolipide a quattro code di acidi grassi, tipicamente batterico. La membrana interna porta una serie di specifici trasportatori per regolare ingresso ed uscita delle molecole ed i complessi proteici per la fosforilazione ossidativa. Il NADH cede elettroni alla NADH deidrogenasi, seguono ubiquinone, coenzima Q, citocromo b-c1 (11 proteine che ricevono elettroni dal coenzima Q ridotto e li cedono al citocromo C), citocromo C (fa da navetta e sposta un elettrone per volta). La citocromo ossidasi trasferisce, infine, gli elettroni all'ossigeno. Sulla membrana esterna, il mitocondrio porta una proteina scambiatrice ATP/ADP. I geni dell'mtDNA codificano per 7 polipeptidi per la NADH deidrogenasi, 1 polipeptide per citocromo C riduttasi, 3 per citocromo C ossidasi, 2 per ATP sintasi, 2 rRNA ribosomiali, 22 per tRNA mitocondriali. mtDNA non ha introni né nucleosomi, ma è associato a proteine ed ancorato a ripiegamenti membranosi. Il codice genetico è leggermente diverso da quello nucleare ed i cromosomi si replicano in maniera indipendente. mtDNA codifica anche per proteine per la *repair*, la DNA polimerasi gamma, un'elicasi di riparazione TWINKLE che può unire filamenti di DNA singoli. Malattie mitocondriali possono colpire quasi tutti i sistemi, con danni più gravi per quelli con elevato fabbisogno energetico (i.e. muscoli e neuroni). Le mutazioni possono interessare il DNA nucleare o quello mitocondriale. I mitocondri sono trasmessi per via matrilineare. Nuovi approcci sono stati sviluppati per ostacolare la trasmissione delle patologie mitocondriali per madri consapevoli d'essere portatrici di mutazioni nei geni dell'mtDNA (eg, mitocondri abnormi): ad esempio, da un uovo di una femmina *donor* si scarta il DNA genomico e si tengono i mitocondri, aggiungendo poi il genoma nucleare di un uovo della madre e fecondandolo in vitro con uno spermatozoo paterno. La tecnica è approvata per la clinica in GB.

L'origine endosimbionte del mitocondrio preuppone l'ingolfamento di un alfa proteobattere in un eucariote ancestrale. Successivamente, forma e funzione dell'endosimbionte sono cambiate radicalmente. La gran parte del DNA è stata trasferita al genoma nucleare; rimane un piccolo genoma circolare di 16kb in un numero eccessivo di copie. Il genoma mitocondriale umano contiene le regioni per 13 proteine, costituenti essenziali per la catena respiratoria della membrana interna, regolati in loco (v. *CORR Theory*). Il potenziale elettrochimico di H⁺ creato dalla catena è sfruttato anche per funzioni diverse, come isolare lo ione Ca²⁺, implicato nella trasduzione del segnale, nella membrana interna, e per importare sostanze grazie a macchine di trasporto poste in membrana. Un minor **potenziale elettrochimico** è un utile *read-out* per lo stato funzionale del mitocondrio, che crea segnali per attivare pathway che riparano od eliminano i mitocondri difettosi. I mitocondri hanno **composizione proteica plastica**, con oltre 1000 proteine diverse, composizione variabile tra specie e tessuti, mix di *old-bacterial* e *new-eukaryotic-derived*. L'assemblaggio dei ribosomi della matrice mitocondriale è un processo abbastanza sofisticato e molto regolato, che coinvolge il processamento dell'rRNA mitocondriale, la maturazione e l'assemblaggio delle proteine. Si suppone che le proteine ribosomiali specifiche del mitocondrio si siano evolute per regolare la coordinazione della traduzione mitocondriale con pathway extramitocondriali. Negli uomini, la regolazione trascrizionale della biogenesi mitocondriale ha luogo attraverso l'azione della famiglia di **coattivatori PGC-1**, che risponde ai cambiamenti nello stato dei nutrienti (eg, livelli di NAD⁺/NADH e AMP/ATP, letti da macchine come SIRT1 e AMPK) e segnali ambientali. La regolazione è di tipo combinatorio, con tf associati che specificano per i maggiori pathway mitocondriali inducibili. Evidenze sperimentali nei lieviti suggeriscono che **mRNA nucleari** che codificano per proteine mitocondriali vengano locati posttrascrizionalmente **nella membrana esterna** del mitocondrio in una maniera altamente regolata a livello spaziale e temporale e tradotti in modo coordinato. L'eteroplasia fa riferimento alla situazione nella quale cellule umane contengono un rapporto variabile tra mtDNA wildtype e mutato, con conseguenze più o meno gravi a seconda del rapporto. In molte linee cellulari non esistono mitocondri individuali, ma formano un **sincizio** con molte copie di mtDNA. Nell'**uomo**, a differenza che nel lievito, la replicazione dell'mtDNA è **ricombinazione-indipendente**.

Lezione XI

I **mitocondri** sono una famiglia diversificata e ubiquitaria di organuli, presenti in più forme in distinti punti dell'albero della vita, alcune delle quali mostrano convergenza evolutiva.

- I mitocondri dei mammiferi, di altri animali, di molte piante e dei protisti svolgono la respirazione cellulare nota;
- I mitocondri di alcuni vermi e molluschi **non usano O₂ come accettore terminale** e ricavano appena 5 mol ATP/1 mol glucosio. I prodotti di secrezione sono CO₂, acetato, propionato, succinato (derivanti da riarrangiamenti del ciclo di Krebs e della catena di trasporto). Questi mitocondri sono di fatto anaerobi.
- Alcuni protisti **non hanno una catena di trasporto** e sintetizzano ATP grazie al breakdown del piruvato mediante semplici fermentazioni che coinvolgono la produzione di idrogeno molecolare come prodotto terminale. Si parla di **idrogenosomi**, scoperti nei tricomonadi, poi trovati in citridiomietti del ruminante dei bovini. Gli enzimi degli idrogenosomi si ritrovano anche in aerobi, nel citosol, o anche nei plastidi.
- Alcuni posseggono **mitosomi**, piccoli mitocondri non coinvolti affatto nella sintesi di ATP, che è invece sintetizzato da enzimi tipici degli idrogenosomi nel citosol, con una scarsa resa (2/4 ATP/1 glucosio). Producono CO₂, acetato, etanolo. Giardia possiede mitosomi. Si specula sul fatto che possano aver svolto la funzione di mitocondri ed averla persa in seguito all'acquisizione del ruolo ecologico parassitario oppure se non abbiano mai svolto un ruolo di centrale energetica.

Le modalità dell'endosimbiosi mitocondriale sono controverse. Una prima teoria suppone che una cellula eucariotica ancestrale anaerobica, dotata di nucleo, abbia avuto un ruolo di host per un procariote fagocitato simile ai moderni del genere *Rickettsia*. Questo procariote avrebbe svolto un ruolo di **detossificazione dall'ossigeno**. La teoria ha due problemi: assume il corollario che tutti i parenti e discendenti dell'host che non acquisirono il mitocondrio s'estinsero; il ruolo di detossificazione da O₂ è dibattuto poiché gli anaerobi sono più danneggiati dalle **ROS** (*Reactive Oxygen Species*) che dall'O₂ in sé, comunque. Le ROS possono risultare dalla catena di trasporto: i mitocondri creerebbero solo più problemi, quindi; inoltre, permane il dubbio circa il motivo per cui molte specie di mitocondri anaerobi funzionanti si trovino in un così grande numero di linee evolutive.

Una seconda teoria prevede che l'*host* che acquisì il mitocondrio era un archeobattere. Il mitocondrio ancestrale sarebbe stato metabolicamente versatile, **aerobio facoltativo**, come i moderni *Rhodobatteri*. **Il beneficio iniziale sarebbe stato la produzione di H₂**, come risorsa di energia ed elettroni. Molte comunità batteriche ospitano endosimbionti procariotici che producono H₂. Le varie forme di mitocondri sarebbero indipendenti e linea-specifiche.

Per l'importazione delle proteine nei mitocondri, è importante la presenza di una **struttura ad α -elica con aminoacidi a carica positiva su un versante ed aminoacidi non carichi ed idrofobici sull'altro**; non è invece rilevante la tipologia del singolo aminoacido: conta la disposizione delle cariche. La sequenza segnale viene legata e riconosciuta da **heat-shock proteins**, che mantengono la proteina **non ripiegata**. Si forma un complesso con recettori di membrana mitocondriale ed un traslocone **TOM** (*Translocator of Outer Membrane*). Per l'indirizzamento alla matrice mitocondriale è necessario un altro complesso, **TIM** (*Translocator of Inner Membrane*), che dev'essere perfettamente allineato con TOM. Il processo d'importazione necessita di ATP. All'interno, la sequenza segnale è rimossa, la proteina viene ripiegata ed assume la sua forma 3D. Se la proteina è destinata allo spazio intermembrana, allora la sua forma non modificata possiede una sequenza particolare.

I mitocondri svolgono molte altre funzioni: accumulo di Ca²⁺, sintesi di ormoni steroidei, gluconeogenesi, ossidazione degli acidi grassi (animali), posseggono desmolasi che possono distaccare catene laterali dal colesterolo, hanno un ruolo in processi come apoptosi, produzione di calore, regolazione del potenziale di membrana, reazioni di sintesi dell'eme, sintesi di steroidi, segnalazione attraverso specie reattive dell'ossigeno. È oggi noto che a basse concentrazioni alcune ROS possono svolgere un ruolo di segnalatori trasduzionali e non sono soltanto nocive.

La **necrosi** è un evento accidentale, spesso causato dall'ipossia. Uno stress leggero attiva pathway alternativi per la resistenza; uno grave, invece, determina perdita di ATP, problemi nel rinnovamento del

set proteico, alterazioni varie, fino alla degradazione della membrana. La cellula letteralmente scoppia, rilascia il citoplasma e si disgrega. L'evento è potenzialmente dannoso ed il rilascio di materiali citoplasmatici provoca un'inflammatione locale e richiama i macrofagi fagociti. Nel caso di un infarto cardiaco, situazione di ipossia per le cellule cardiache, la necrosi richiama linfociti, i quali secernono molecole per la ricostruzione del tessuto. Si viene a costruire, tuttavia, un tessuto cicatriziale, fibrotico, che si contrae decisamente male rispetto ad uno muscolare: la necrosi non è indolore per l'organismo, ma lascia un segno negativo, contrariamente all'apoptosi, evento programmato e di sofisticato adattamento.

Durante l'**apoptosi**, la cellula si frammenta in maniera controllata in **corpi apoptotici**, frammenti circondati da membrana: il citoplasma non si sversa ed è ripartito in corpi simil-vescicolari in modo organizzato. Si tratta d'una morte pulita: nessuna infiammazione, le cellule quasi non lasciano traccia ed i detriti sono ordinatamente smaltiti dai macrofagi. I macrofagi riconoscono i corpi apoptotici in conseguenza al set di proteine esposte in membrana. L'apoptosi è cruciale nello sviluppo ontogenetico.

I mitocondri possono subire danni e la disfunzione mitocondriale (eg, stress ossidativo, ipossia, eccesso di radicali liberi, ...) può condurre a crisi energetiche e necrosi. I mitocondri hanno un ruolo anche nell'apoptosi. Quando attivato il processo apoptotico, nel nucleo vengono trascritti i geni per proteine che si infilano come canali nella membrana mitocondriale e lasciano **fuoriuscire** da essa molecole che solitamente si ritrovano esclusivamente confinate all'interno del mitocondrio, in particolare il **citocromo c**. Una volta fuoriuscito, il citocromo c **attiva a cascata una serie di proteine** e infine le caspasi, che possono attivare le nucleasi. Queste proteine si trovano già nella cellula in forma inattiva e la loro attivazione è mediata solo dal citocromo c, normalmente esclusivo del mitocondrio. L'evento è tutt'altro che casuale: l'attivazione del *pathway* è specifica.

Le cellule tumorali sono sottoposte a stress costante, instabilità genomica, ipossia. In condizioni normali, questi sono stimoli apoptotici, che attivano il pathway intrinseco (mitocondriale). Nelle cellule tumorali, tuttavia, spesso il pathway è disattivato. L'inattivazione genica di membri delle BH3only e caspasi portano a resistenza nei confronti di stimoli apoptotici ed accelerano la progressione tumorale nel topo. Terapie antitumorali cercano di indurre l'apoptosi e bypassare i meccanismi di resistenza, attivando un'apoptosi specifica. Si sta cercando di attivare gli enzimi attivati dalla via intrinseca con farmaci adatti (via estrinseca).

Antibiotici che targettano i mitocondri effettivamente eradicano alcune staminali cancerose, in diversi tipi tumorali. Il cancro viene trattato come una malattia infettiva, sfruttando la somiglianza tra ribosomi batterici 70S (grande 50S, piccola 30S) e mitocondriali (grande 39S, piccola 28S). Sulla subunità grande agiscono cloramfenicolo ed eritromicina, sulla piccola glicilciclina e tetraciclina. Bloccare l'attività esagerata di sintesi proteica del tumore significa ridurre i componenti della catena di trasporto e con ciò rallentare il metabolismo.

Lezione XII

Il **nucleo** ha forma variabile durante il ciclo cellulare, così come la posizione, caratteristica dei vari tipi cellulari, ed il numero per cellula (da 0 a n). Le cellule embrionali hanno un nucleo centrale; cellule secernenti (eg, B plasma) hanno un nucleo eccentrico sul versante opposto a quello esocitotico, con interposti vasti RE e GA. I neuroni hanno nuclei centrali rispetto al soma, mantenuti in posizione dal citoscheletro; gli adipociti hanno nucleo eccentrico, spostato dalle masse lipidiche.

Il nucleo ha una doppia membrana, in continuo con il RER (**reticolo nucleoplasmatico**). È sorretto e tenuto in posizione dall'actina citoscheletrica, ha un diametro di circa 6 micrometri ed occupa circa il 10% del volume cellulare. Contiene carioplasma, simile al citosol. Il peso secco del nucleo è portato in ordine da **proteine acide** (65%), proteine di vario genere (14%), istoni (11%), DNA (9%), RNA (1%). Al nucleo è associato esternamente il centrosoma. Le due membrane che avvolgono il nucleo sono attraversate da pori. Il complesso del poro ha maniglie, un canale, filamenti citoplasmatici del citoscheletro associati, anelli citoplasmatici per la regolazione del diametro, un'intelaiatura centrale con un canestro nucleare, un anello nucleare all'interno di 30-40 nucleoporine e altro: consiste in un sofisticato sistema proteico altamente organizzato. I pori regolano un traffico intenso. Essi spaziano attraverso lo spazio perinucleare, cioè tra le due membrane. Escono mRNA, tRNA, ribosomi. Entrano proteine ribosomiali, fattori di trascrizione,

proteine per la replicazione, per la lamina, istoni. L'RNA esce con consumo di ATP, e così le proteine entrano consumando ATP. Piccole molecole, invece, diffondono per i canali secondo gradiente.

Un singolo **NPC** (*Nuclear Pore Complex*) è costruito attorno ad un anello ottagonale di **nucleoporine**, il quale può trasportare 60.000 macromolecole attraverso la membrana ogni minuto. Si distinguono almeno tre classi funzionali di nucleoporine: quelle strutturali, che formano lo scaffold ottagonale, quelle di membrana e le FG. Queste ultime presentano il **repeat del peptide FG** (fenilalanina-glicina) sono evolutivamente molto conservate ed hanno una porzione globulare che le ancora al NPC. Le **cariosferine** con il loro cargo passano attraverso i **repeats** FG, fino a che diffondono secondo il loro gradiente di concentrazione attraverso il NPC (incerto: gradiente, ATP o entrambi possibili??). Le cariosferine fungono da **importine** o da **esportine**. Il rilascio del cargo è gestito da **Ran**, una G protein, che si sposta per gradiente di concentrazione. Nel nucleo, RanGTP cambia l'affinità del cargo per la cariosferina e ne determina il rilascio, lega esportine, esce nel citosol, è rilasciata e compie un nuovo ciclo.

L'importazione nel nucleo delle proteine presentanti il NLS coinvolge il legame con importine che svolgono il ruolo di carrier citoplasmatici verso i recettori nucleari per **proteine già ripiegate** nella propria conformazione attiva. Alcuni virus producono proteine che si sostituiscono alle importine e mediano l'ingresso del genoma virale nel nucleo. **Il segnale di localizzazione nucleare non viene affatto rimosso**: la divisione cellulare comporta la dissoluzione prometafasica dell'involucro nucleare e la dispersione dei materiali ivi presenti nella cellula, che sono poi ripartiti fra le cellule figlie e, grazie alla presenza del NLS, le proteine nucleari vengono importate rapidamente nei nuovi nuclei. La frammentazione dell'involucro nucleare è dettata dalla fosforilazione della **lâmina**, la quale è una sorta di scaffold, la cui forma è ben regolabile. La lâmina ed altre proteine (G-actina, profilina, tf, ...) costituiscono nel complesso il nucleoscheletro, che media l'aggancio del DNA in certi punti del nucleo.

L'ancoraggio è specifico e tessuto-tipico. Ciò influenza la trascrivibilità. Le membrane sono separate da 10-50 nm. Quella esterna è associata ai ribosomi.

Il nucleo è tutt'altro che uniforme. Una prima regione particolarmente evidente è il **nucleolo**, ove alloggiato i siti del DNA codificanti per rRNA e dove vengono montati i ribosomi. All'elettronico, la regione è decisamente elettrondensa, appare una sorta di suborganello, formato attorno a **tandem repeats di rDNA**, regioni note come NOR (*Nuclear Organizer Regions*). La coesione strutturale del nucleolo dipende dalla sua attività, dal momento che l'assemblaggio del nucleolo risulta dall'**associazione transiente delle sue componenti**. Il modello è supportato dall'osservazione che l'inattivazione dell'rDNA risulta nel (intermingling sputtanamento) delle strutture nucleolari. L'rRNA viene sintetizzato per trascrizione e clivato in tre subunità, 5.8 S, 18 S, 28S. trascrizione, processamento posttrascrizionale ed assemblaggio sono coadiuvati da **snoRNA**, alcuni dei quali derivati dagli introni splicati dall'mRNA codificante dei geni relazionati all'attività ribosomiale. Le subunità pronte sono il materiale più voluminoso che passa attraverso i pori. Il nucleolo presenta tre regioni funzionali: FCs (*Fibrillar Centres*: trascrizione rDNA), DFC (*Dense Fibrillar Component*: clivaggio e modificazione rRNA), GC (*Globular Component*: ultimi step di modificazione). Il nucleolo scompare all'inizio della mitosi e ricompare nel corso della telofase.

Ci sono altri corpi subnucleari, zone non delimitate da membrana. Molte sono standard, altre associate a patologie.

- 1) **Corpi di Cajal**: da uno a dieci, di diametro tra 0,2 e 2 micron, con alta concentrazione di coilina. Sono coinvolti nel processamento dell'RNA, degli snoRNA, degli snRNA e nella modificazione degli mRNA codificanti per gli istoni.
- 2) **Gemelli di Cajal**: virtualmente indistinguibili al microscopio dai corpi (i.e. gemelli), non contengono snRNPs, ma contengono SMN (*Survival of Motor Neuron*), la cui funzione è legata alla biogenesi degli snRNPs, assistendo i corpi. I gemelli non hanno coilina. SMN è una proteina regolatrice della trascrizione, implicata nella rigenerazione dei telomeri come nel *trafficking* cellulare, la cui deficienza dovuta a mutazione risulta in grossi difetti di splicing (cercare!), soprattutto nei motoneuroni spinali (causa l'atrofia muscolare spinale). SMN ha anche un ruolo in migrazione e differenziamento dei neuroni.
- 3) **Domini RAFA**: la funzione è ancora poco chiara, spesso hanno alte concentrazioni di un tf per snRNA.
- 4) **Corpi PML** (Promyelocytic Leukaemia): ancorano i cromosomi, regolano la replicazione, il silenziamento epigenetico, la trascrizione.

- 5) **Splicing speckles**: sono ricchi di fattori per lo splicing, localizzate nelle regioni intercromosomiche del nucleoplasma (osservazione cellule di mammifero).
- 6) **Paraspeckles**: nello spazio intercromatinico prossimi agli *speckles*, sembrano fornire indicazioni per la localizzazione delle proteine nel nucleo e pare abbiano ruoli regolativi, anche se non v'è certezza. Sono state identificate per la prima volta in cellule HeLa (cellule immortali del cancro alla cervice di Henrietta Lacks, incredibilmente durature), ma sono presenti in tutte le cellule primarie. Sono strutture dinamiche, alterate in conseguenza a cambiamenti nell'attività metabolica. Disappaiono in assenza della RNA Pol II e le proteine associate formano un cap sul nucleolo. Scompaiono durante la telofase, in cui non c'è attività trascrizionale della Pol II.
- 7) **Fibrille pericromatiniche**: attorno alla cromatina trascrizionalmente attiva, si ipotizza che siano i siti del processamento del pre-mRNA.
- 8) **Clastosomi**: si formano in condizioni di vasta proteolisi e si degradano quando la proteolisi rallenta, ad esempio fornendo inibitori dei proteasomi. Sono rari e non necessari, comunque sono zone di degradazione di proteine.

La compartimentazione del nucleo rispetto al citoplasma previene la traduzione di RNA non processati e splicingati.

Lezione XIII

Gli **istoni** sono proteine basiche. Gli istoni del *core* esistono in forma di dimeri, simili, poiché tutti posseggono il dominio di ripiegamento istonico, cioè tre α -eliche linkate da due *loop*. La struttura ad elica permette interazioni tra dimeri distinti in un motivo testa-coda. I risultanti quattro dimeri distinti si uniscono per formare un core nucleasomico ottamerico, di 63 Å di diametro (*solenoid-like particle*). Circa 146 bp si impacchettano attorno al core 1,65 volte in un turn levogiro, dando una particella di diametro di 100 Å. L'istone linker H1 lega il nucleosoma nei siti di entrata e uscita del DNA. L'avvolgimento prosegue ed il grado di compattazione è finemente regolabile e strettamente correlato alla fase del ciclo cellulare ed all'attività trascrizionale della cromatina. L'eucromatina è trascritta, l'etero può essere facoltativa (eg. Corpo di Barr per compensazione del sovradosaggio; varia tra tessuti in seguito al differenziamento) o costitutiva (mai espressa, telomeri, centromero ecc).

Negli animali, i geni codificanti per istoni canonici sono tipicamente clusterizzati lungo il cromosoma, mancano di introni, usano al 3' del mRNA una struttura a *loop* invece di una coda poliA.

I geni codificanti per **varianti istoniche**, invece, in genere non sono in *cluster*, hanno introni ed usano la poliA.

Oltre alle note funzioni, gli istoni e le loro varianti (le proteine istoniche note sono un gran numero) hanno ruoli in regolazione, *DNA repair*, condensazione mitotica, spermatogenesi (meiosi). Gli istoni possono essere infatti modificati chimicamente. Il **codice istonico** consiste nella sequenza delle modificazioni covalenti agli istoni. L'ipotesi del codice istonico prevede che le interazioni cromatina-DNA siano specificamente guidate da cambiamenti di modificazioni istoniche. Le code possono venir metilate, acetilate, fosforilate, ubiquitinate, sumoilate, citrullinate.

La **sumoilazione** fa riferimento a *SUMO proteins* (*Small Ubiquitin-like Modifier*), famiglia di piccole proteine unite covalentemente e distaccate da altre proteine per modificarne la funzione. La modifica è post-traduzionale ed è coinvolta in processi quali trasporto nucleo-citosol, regolazione della trascrizione, apoptosi, progressione del ciclo cellulare. La modificazione è agevolmente reversibile grazie a desumoilasi. Spesso l'aggiunta di SUMO a regolatori trascrizionali determina **inibizione** della trascrizione. SUMO fanno anche da colla molecolare per **assemblare i complessi NER** per il *DNA repair*.

La **citrullinazione** (o deiminazione) consiste nella conversione dell'arginina nell'aminoacido citrullina, modifica post-traduzionale, catalizzata dall'arginina deaminasi. L'arginina ha carica positiva a pH neutro, la citrullina invece non è carica: la conversione specifica per più idrofobicità, i.e. cambio di *folding*. Nei soggetti sofferenti di artrite reumatoide o sclerosi multipla, autoanticorpi attaccano le proteine citrullinate.

I **telomeri** ostacolano la fusione di porzioni terminali di cromosomi diversi. I telomeri si accorciano nel tempo (senescenza replicativa).

Il centromero porta una piastra interna del cinetocore, formata da proteine attaccate al DNA satellite α e da una piastra proteica esterna.

La pecora Dolly è noto che “invecchiò in anticipo”. Una delle possibili spiegazioni sostiene che il nucleo posto nell'uovo enucleato cominciò a dividersi troppo presto, mentre nell'embrionogenesi normale la percentuale di CpG metilate oscilla nel tempo e cambia prima della prima divisione mitotica, cambiamento che non sarebbe avvenuto perché la divisione sarebbe iniziata da subito.

L'imprinting genomico è un processo ereditario indipendente dalla classica eredità mendeliana, che coinvolge la metilazione di DNA ed istoni, senza alterazione della sequenza nucleotidica. Il padre porta alcuni geni silenziati epigeneticamente, la madre degli altri. I geni soggetti a imprinting sono meno dell'1% sembrerebbe, ma alcuni cruciali, come quello per **IGF2**. Per i geni imprintati, un individuo riceve una copia dal padre e una dalla madre, ma solo uno dei due alleli viene espresso. Questi geni hanno espressione genitore-specifica: IGF2 espresso viene tramandato per via paterna. Questo significa che il gene materno per IGF2 di un individuo maschio è imprintato e cioè silenziato, ma verrà espresso nei discendenti di questo individuo che ricevono tale allele. Infatti, il pattern è stabilito nel momento della produzione dei gameti, dove, in questo caso, l'allele IGF2 materno viene riattivato, mentre nelle femmine entrambi gli alleli risultano nei gameti silenziati. Si realizza così una **trasmissione di caratteri genitore-dipendente**. I geni imprintati condividono comuni elementi regolatori, come DMRs (*Differentially Methylated Regions*), che hanno stato epigenetico dipendente da tessuti, fase di sviluppo ecc. L'imprinting coinvolge anche RNA non codificanti. La comprensione dei meccanismi molecolari è ancora incompleta.

La **paramutazione** consiste nell'interazione tra due alleli dello stesso locus per cui uno induce un cambiamento ereditabile nell'altro, ad esempio nel pattern di metilazione del DNA o delle modificazioni istoniche. Ciò può alterare i livelli di espressione genica.

La quota di regolazione epigenetica include anche l'RNAi. I **piRNA** (*Piwi-Interacting RNA*) sono RNA non codificanti che formano complessi RNA-proteine con le Piwi, delle proteine, implicati nel silenziamento dei retrotrasposoni nelle cellule germinali. I **rasiRNA** (*Repeat Associated Small Interfering RNA*) sono piRNA coinvolti nel mantenimento della struttura della cromatina e nel controllo dei trascritti emergenti da sequenze ripetute, come dei trasposoni. In laboratorio per l'RNAi si usano spesso RNA artificiali con basso tasso di degradazione e scarso *turnover*, detti **shRNA** (*short-hairpin RNA*).

Lezione XIV

Il ciclo cellulare: note. Al termine della mitosi, l'involucro nucleare si riforma dal RE, relativamente povero in proteine intrinseche, se non quelle per l'importazione proteica, sostituite dai complessi dei pori nucleari; anche il nucleo è abbastanza povero di transmembrana. In una cellula di mammifero, la fase S dura circa 10-12 ore, occupando metà del ciclo cellulare, mentre la fase M dura meno di un'ora. Un cambiamento biochimico netto si registra tra metafase ed anafase; una volta conclusa la transizione tra queste due fasi, la cellula è inequivocabilmente diretta verso il completamento della mitosi e la citochinesi. La divisione cellulare può essere stimolata dai mitogeni. Tanti cambiamenti biochimici dipendenti da CdK orchestrano il ciclo cellulare. Ad esempio, l'istone H3 fosforilato in conseguenza alla sintesi di CdK1 stimola la condensazione del DNA, la quale aiuta la progressione del ciclo cellulare verso la mitosi. Le cicline ciclano: vengono prodotte in una fase e poi degradate.

Nelle fasi gap, la cellula monitora l'ambiente interno e quello esterno per assicurarsi condizioni di divisione opportune. La durata temporale della G1 è variabilissima, a seconda dei segnali intra- ed extracellulari. Se la cellula incontra un ambiente esterno sfavorevole, ritarda la progressione e si assesta per un po' di tempo in una fase **G0**, anche per anni, prima di riprendere a proliferare. Superato il punto di restrizione in G1, la cellula è destinata all'ingresso in fase S, anche se vengono rimossi i segnali extracellulari che stimolano la crescita e la divisione. I **checkpoint** permettono il controllo della qualità del ciclo cellulare. Il danno al DNA può essere rilevato prima, durante o dopo la fase S. la formazione del fuso mitotico viene monitorata dallo *spindle checkpoint*, che detecta la corretta organizzazione dei microtubuli ed il loro aggancio con i cinetocori. Se i danni sono eccessivi, i checkpoint inducono l'avvio delle attività

d'apoptosi. La formazione del fuso mitotico e l'aggancio dei cromosomi sono un evento dinamico, per tentativi: la cellula ritenta fino al corretto aggancio ed allineamento di tutti i cromosomi.

Il sistema proteico di controllo del ciclo cellulare data di più di un milione di anni ed è evolutivamente altamente conservato, tanto che quando trasferito da una cellula umana ad una di lievito funziona perfettamente. Questo punto è di grande rilievo: possiamo studiare meccanismi complessi su cellule semplici come il **lievito** e generalizzare buona parte delle conclusioni. Lo studio dei mutanti per le componenti del controllo della divisione è complicato poiché un mutante non sa completare il ciclo cellulare e propagarsi. Si fa perciò ricorso a mutanti cdc con fenotipo condizionale, espresso solo in condizioni permissive (eg, temperatura-sensibile) e non in quelle restrittive. Mutanti di lieviti possono essere bloccati in fasi diverse del ciclo cellulare, distinguibili in base alla morfologia, ed analizzati. Il lievito che pratica gemmazione studiato è *Saccharomyces cerevisiae*, che già in fase S inizia a sviluppare una protuberanza, che si distacca al termine della fase M, mentre il lievito di fissione analizzato è *Schizosaccharomyces pombe*, che si allunga durante le fasi gap e si divide in maniera classica al termine della M.

Per scoprire i geni che spingono da una fase all'altra si è usato con successo il seguente approccio. Un pool di mutanti geneticamente gemelli bloccati in una certa fase del ciclo cellulare riceve plasmidi. Ogni colonia riceve un plasmide con un gene non mutante e noto. Se il mutante **recupera la funzione** e riprende il ciclo cellulare, allora quel gene è quello codificante la componente cruciale, sballata nel mutante.

La biochimica del ciclo cellulare viene studiata più agevolmente nelle grandi uova fertilizzate di *Xenopus laevis*, che contengono 100.000 volte il citoplasma di un lievito. La fertilizzazione innesca una rapida serie di divisioni di clivaggio e l'unica molecola sintetizzata in pratica è il DNA, a fianco di poche proteine. Iniziano cicli cellulari embrionali, che rivelano la natura del ciclo cellulare e del suo sistema di controllo. In un esperimento, un grande batch di uova attivate sono state rotte per centrifugazione ed il citoplasma è stato separato dalle altre componenti cellulari. Il citoplasma non diluito è stato raccolto e sono stati aggiunti nuclei spermatici e ATP. I nuclei spermatici entravano in una serie di replicazioni ripetute, indicando che il sistema di controllo opera in un estratto citoplasmatico libero.

Le cellule di mammifero dopo un tot di mitosi entrano in senescenza replicativa e non si dividono più, risultando difficili da studiare, ma alcuni mutanti proliferano rapidamente ed indefinitamente, andando a costituire utilissime linee immortalizzate di cellule geneticamente identiche.

La progressione del ciclo cellulare può essere studiata variamente. Al microscopio, cellule ben rotondeggianti sono in mitosi; quelle in citodieresi sono identificabili in modo chiaro ed evidente. I nuclei in **fase S** sono di solito osservati per **³H-timidina autoradiografia**, dato che essa può essere incorporata nel DNA ed è radioattiva. Dalla proporzione di cellule in fase S si può risalire alla stima della durata media temporale di tale fase, e così per le altre.

p53 è nota come il “guardiano del genoma”. Riconosce il danno al DNA e può arrestare il ciclo in G1 e G2, fino a che il danno non viene riparato. Se non viene riparato, p53, oncosoppressore, induce l'apoptosi. P53 ha tre domini: N-terminale: TAD (dominio di trascrizione-attivazione, attiva altri tf), centrale: DBD, *DNA-binding core domain*, che contiene Zn⁺ e residui di Arg, C-terminale: dominio di omo-oligomerizzazione (la formazione di un tetramero di p53 in vitro ne aumenta fortemente l'attività). La maggior parte delle mutazioni che disattivano p53 nel cancro si localizzano nel dominio DBD (per fortuna sono in genere recessive queste). Mutazioni in OD sono invece dominanti perché le p53 mutate dimerizzano con quelle WT e le disattivano, causando una grave perdita di funzione. P53 interviene riparando il DNA se riparabile, inducendo la trascrizione dei geni riparatori, in seguito a danni al DNA viene fosforilata da ATM e può migrare nel nucleo ed agire da tf, bloccando il ciclo cellulare. P53 può inoltre dare inizio all'apoptosi, inducendo la trascrizione di Noxa, nel caso di danno irreparabile.

Lezione XV

Un **controllo diffuso e continuo** è costantemente attivo durante il ciclo cellulare: molecole sensore legano il DNA e detectano eventuali breaks o danni, per evitare che il danno sia perpetuato alle cellule figlie, con conseguenze in potenza disastrose. Possono, con ciò, attivare p53. “L'apoptosi è una sorta di suicidio altruista”. Oggi si conoscono oltre 14.000 mutazioni a carico di p53, che è mutata in più del 50% dei tumori umani. p53 ha 393 aminoacidi e può essere attivata mediante fosforilazione, ad esempio in ipossia,

deplezione di ribonucleotidi, danno al DNA, danno al fuso mitotico. Si attiva il sistema sensore ATM/ATR, p53 funziona come tetramero, che funge da *tf* a livello di vari geni, che vengono espressi, arrestando il ciclo cellulare o mandando la cellula in apoptosi, grazie a proteine inibitrici. Tali proteine non vengono prodotte se p53 muta e le mutazioni di p53 sono dominanti perché prevengono la corretta formazione dei tetrameri. p53 ha vari domini di legame al DNA che possono mutare. Per sopprimere tumori nascenti, in conseguenza a radiazioni o ischemia, nell'invecchiamento e nello sviluppo la cellula può optare per l'apoptosi.

Vari geni possono causare tumori:

- **Oncogeni:** acceleratori, quando mutati la cellula continua a proliferare anche in assenza di segnali di crescita, eg. Ras – le mutazioni sono *gain of function* e risultano in attivazione costitutiva.
- **Oncosoppressori:** freni, inibiscono la progressione del ciclo cellulare e provocano l'apoptosi: Rb, p16, p53. Mutazioni *loss of function* determinano la perdita di queste barriere salvifiche.
- **Geni del riparo del DNA:** non controllano direttamente la morte cellulare o la proliferazione, ma le mutazioni geniche; se mutati, le cellule possono acquisire mutazioni in oncogeni e soppressori tumorali a frequenza elevata.
- Fase G1: intensa attività trascrizionale (cromatina lassa). Le cellule che devono dividersi duplicano gli organelli, quelle che si differenziano in definitiva, come i neuroni, vanno in G0.
- Fase S: duplicazione del DNA e dei centrioli. L'ingresso in questa fase avviene se sono presenti mitogeni e sufficienti nutrienti e se sono assenti contestualmente inibitori del ciclo cellulare. Nella replicazione del DNA distinguiamo tra PolIII, polimerasi 5'-3' altamente processiva, con attività intrinseca di correzione di bozze, e **PolI**, polimerasi 5'-3' processiva con attività esonucleasica, dato che rimuove il primer a RNA sostituendolo con DNA. A livello della forcella, si trova anche un'enigmatica DNA girasi che ostacola il superavvolgimento.
- Fase G2: predisposizione della mitosi, con proteine per il fuso, ciclina B, chinasi, nuove membrane. La cellula controlla i danni al DNA, il **volume cellulare**, l'ambiente esterno ecc., es. p53, e stabilisce se proseguire o meno nel ciclo cellulare, in conseguenza della stessa.

Note sulla mitosi. In profase, la condensazione del DNA è stimolata dalla fosforilazione della proteina istonica H3. In prometafase, i microtubuli del fuso iniziano a prendere contatto con i cinetocori, placche proteiche a livello di ciascun cromatidio al centromero, formate da una piastra interna ed una esterna. Una placca consta di molte proteine, tra cui MAPs. In metafase è presente il checkpoint del fuso mitotico; in anafase, la rottura della coesina sgancia i cromatidi fratelli fra loro. Seguono telofase e citodieresi.

La **cellula tumorale** è caratterizzata da proliferazione incontrollata, capacità di invadere e colonizzare tessuti, capacità di stimolare la crescita di nuovi capillari, capacità di resistere ad apoptosi e senescenza. Le mutazioni si accumulano e si sommano. Le cellule tumorali perdono l'inibizione da contatto, mediata da caderine, si sbattono della confluenza e si accavallano come se non ci fosse un domani, assumendo forme sferoidali. Le cellule tumorali crescono indipendentemente dalla presenza o dalla mancanza di fattori di crescita, ad esempio se Ras muta. La crescita non dipende neanche dall'ancoraggio: crescono anche in mancanza di adesione ad un substrato solido matriciale. Spesso le cellule neoplastiche sono in grado di autoprodursi fattori di crescita. La **transizione epitelio-mesenchimatica** ha più fasi: epitelio normale, iperplasia, displasia, cancro in situ, cancro invasivo, cancro metastatico. La cellula mesenchimatica sa staccarsi e migrare, ad esempio se muta caderine ed integrine. Inoltre, le cellule tumorali che migrano devono aprirsi un varco nella lamina basale e lo fanno secernendo metallo-proteasi di matrice, che degradano le proteine della ECM. Inoltre, spesso, le cellule tumorali acquisiscono la capacità **neoangiogenetica**: inviano fattori di crescita, come VEGF. I nuovi vasi, oltre a rifornire il tumore, costituiscono una comoda pista di migrazione. Le cellule tumorali migranti possono colonizzare nuovi ambienti, come i polmoni, dove si arrestano, aderiscono alla parete dei vasi, migrano trans-endotelio, colonizzano, proliferano, metastatizzano. All'interno della massa tumorale ha luogo **un'evoluzione darwiniana dei cloni**. La massa tumorale è **eterogenea** e selezionata a seconda dell'ambiente. Ad esempio, in seguito ad una radio, anche una sola cellula casualmente resistente può sopravvivere e riformare il tumore. Un tumore può originare da una cellula staminale. Le cellule staminali possono dividersi simmetricamente (due figlie staminali) o asimmetricamente (una staminale, una progenitrice, primo passo verso la differenziazione tissutale). Un'altra ipotesi è che una progenitrice mutata si sdifferenzi e formi una

staminale cancerosa. Queste cellule sono responsabili delle recidive ed alimentano il cancro. Esse si è visto che espellono bene i farmaci e sanno riparare i danni da radiazione.

Meccanismi molecolari basali nella **transizione epitelio-mesenchimatica nei gliomi**. Questi tumori hanno spesso una sovraespressione di autosostentamento del GF **PDGF** (*Platelet-Derived Growth Factor*). I gliomi sono tumori molto invasivi. La mancanza di PDGF sembra ridurre l'invasività. Ma come influenza la motilità e l'invasione della cellula questo GF? Il modello eletto è *Xenopus laevis*, le cui cellule delle creste neurali migrano con gli stessi meccanismi. Fornito come RNA ad un embrione, PDGF-B sembra che sovraespresso alteri la condotta delle cellule delle creste neurali. Con marcature si osservano pattern distributivi delle cellule che sovraesprimono tale GF che sono diversi da quelli delle cellule di controllo.

Lezione XVI

Le cellule staminali. Maximov nel 1909 descrisse le staminali del midollo osseo. I primi trapianti impattarono il problema del rigetto, dovuto al riconoscimento da parte del ricevente del MHC non self. I gemelli non mostravano problematiche d'istocompatibilità. Negli ultimi anni, si sono trovate nicchie staminali in diversi distretti corporei ed i possibili usi sono promettenti. Le staminali hanno due caratteristiche: capacità di autorinnovamento, anche nei tessuti adulti possono entrare in mitosi, e potenza, nel senso che possono originare una progenie differenziata. Una staminale si divide in una nuova staminale che perpetua la linea cellulare ed una cellula che va incontro a differenziamento. Le staminali cambiano durante lo sviluppo: zigote-morula totipotenti, staminali embrionali della blastocisti pluripotenti (ICM), staminali adulte (feto, fino all'età adulta: multipotenti, unipotenti. Le multipotenti del midollo osseo possono, nelle opportune condizioni, generare anche cellule di muscolo, cartilagine ed osso). Nell'adulto si trovano staminali nel muscolo, nel midollo osseo, nella pelle, nel fegato, nella cornea, nel cervello, nelle cripte intestinali, nel sangue, nella linea germinale, forse nel cuore, nel cordone ombelicale. È fattibile ad oggi il trapianto corneale da cadaveri.

Le staminali del testicolo sono unipotenti, tipo A sono staminali, tipo B sono amplificatrici, linea in differenziamento, spermatozoi (pronti in 74 giorni ca).

Tra multipotente e differenziata, è presente uno stadio transitorio di *committed*. Ad esempio, una staminale neurale origina una NPC neurogenica, che può originare un neurone o una NPC gliogenica, la quale a sua volta può originare oligodendrociti ed astrociti.

Le staminali neurali sono poco attive nei mammiferi, il numero di neuroni del cervello è circa 86 mld, mentre la perdita media di neuroni neocorticali è 85.000 al giorno. Nei teleostei, la rigenerazione del SN è molto più marcata. Nei mammiferi, le patologie neurodegenerative riducono drasticamente il numero di neuroni, la cui sostituzione non viene sostenuta. Le staminali neurali sono poche; se le ottenessimo in laboratorio, come impiantarle? Le troviamo a livello del bulbo olfattivo, dell'ippocampo (neuroni per i circuiti della memoria), nella zona sottoventricolare. Un approccio consiste nel tentare di mantenere le cellule staminali neurali giovani senza avviarle a neoplasia, affinché la rigenerazione si protragga ben funzionante avanti con l'età. Le staminali adulte sono una parte essenziale della nostra fisiologia, promuovono la crescita, l'omeostasi cellulare e la loro senescenza porta all'invecchiamento di tutto l'individuo. Lo studio delle staminali non è solo finalizzato alla terapia, ma ci aiuta a capire come funzioniamo e come ci ammaliamo.

Dalle staminali embrionali della blastocisti (**ESCs**) si sono ottenute cellule pancreatiche, ematopoietiche, cardiociti, neuroni, epatociti. Per valutarne la pluripotenza, le si sottopongono ai seguenti test:

- 1) Hanno la capacità di formare teratomi (neoplasie che producono un mix di cellule di tessuti diversi, come occhi e denti a casaccio) se iniettate in un topo immuno-compromesso.
- 2) Hanno la capacità di originare chimere se iniettate in una blastocisti.
- 3) Sono capaci di differenziarsi in vitro in tutti i tipi cellulari d'un organismo.

Il premio Nobel del 2007 è stato assegnato a Yamanaka e Gurdon "per la scoperta che le cellule mature possono essere riprogrammate a diventare pluripotenti" (**IPSCs**): ciò ha eradicato il dogma che le cellule mature sarebbero condannate ad esistere in uno stato specializzato. Quattro fattori di trascrizione vengono attivati con vettori retrovirali: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (proto-oncogene, pericoloso, oggi sostituito) e sono in grado di convertire cellule differenziate in IPSCs. I protocolli sviluppati per le ESCs sono stati traslati sulle IPSCs. Queste cellule sono in grado di autorinnovarsi e dare origine a tipi cellulari differenziati.

Derivate dallo stesso paziente, esse balzano il problema del rigetto. Sono anche utilizzate per creare modelli di malattie in vitro, per studiare i meccanismi e progettare farmaci.

Lezione XVII

La **matrice extracellulare** è una collezione di molecole secrete da cellule, con ruolo di sostegno strutturale e biochimico per le cellule circostanti. Dal momento che la multicellularità si è evoluta ripetutamente ed indipendentemente in diverse linee filogenetiche, la composizione della ECM varia; tuttavia, alcune funzioni sono comuni a tutte le matrici: adesione cellulare, coadiuvamento di proliferazione, migrazione, comunicazione cellulare e differenziamento. Su matrici diverse, staminali della stessa classe seguono pattern di differenziamento diversi. L'unità morfofunzionale di un multicellulare non è solo la cellula, ma la cellula con la matrice. Le cellule epiteliali siedono su una lamina basale, alla quale si legano con emidesmosomi; le cellule connettivali sono separate da una ECM interstiziale. Per le cellule, la ECM fornisce supporto meccanico, è una barriera biochimica ed una rete a maglie attraverso cui passano le molecole secrete, un medium per il posizionamento reciproco stabile nei tessuti, attraverso l'adesione. Durante lo sviluppo ed il riparo di ferite, la ECM sostiene il riposizionamento cellulare post migrazione; la ECM garantisce forza tensile ai tendini, forza compressiva alle cartilagini, elasticità agli epiteli dei vasi sanguigni; può essere calcificata per ossa e denti, entra a far parte in una certa misura della parete batterica, forma la conchiglia dei molluschi e l'esoscheletro chitinizzato degli insetti. Tutte le cellule possono produrre ECM; alcune lo fanno come attività specifica, come i fibroblasti per il connettivo, gli osteoblasti per il connettivo osseo, i condroblasti per la cartilagine. L'ECM è coinvolta in una grande varietà di disordini e di malattie, nelle quali l'adesione risulta aumentata o ridotta, vedesi distrofia di Duchenne, malaria, HIV, cancro, asma, aterosclerosi, infiammazioni varie.

I componenti della matrice sono proteine fibrose (collagene, elastina, fibronectina, laminina) e GAGs (glucosaminoglicani): acido ialuronico (HA); condroitinsolfato, dermatansolfato, eparansolfato, cheratansolfato, che associati a core proteici costituiscono proteoglicani.

I **proteoglicani** *bindano growth factors*, come FGF, e fungono da riserva extracellulare. FGF lega anche il sindacano; ciò induce un cambiamento conformazionale in conseguenza del quale FGF lega il suo recettore. Inoltre, i proteoglicani hanno una carica netta negativa, che attrae Na^+ , i quali attraggono a loro volta acqua, mantenendo la ECM e le cellule adiacenti idrate. I proteoglicani agganciano Gal-Gal-Xyl nel RE su una serina del core grazie ad un *linker* trisaccaridico; nel Golgi vengono attaccati zuccheri specifici. L'N-terminale dei proteoglicani si associa spesso all'acido ialuronico e ne derivano grossi aggregati. I proteoglicani possono essere endocitati e riciclati con la via lisosomica, che rende nuovamente disponibili zuccheri ed aminoacidi.

L'**aggrecano** ha massa molecolare di circa 2500 kDa, è un grosso cheratan/condroitin-solfato nei tessuti cartilaginei. Il suo pattern di distribuzione include anche cervello, aorta e tendini. Il core proteico di 210-250 kDa lega acido ialuronico e forma complessi sopramolecolari con proteine link. L'aggrecano fornisce un forte gel *space-filling* altamente idratato: oltre cento catene di glucosaminoglicani polianioniche legate covalentemente al core trattengono acqua e contribuiscono alla forza della cartilagine. L'aggrecano è la più grande macromolecola nei sistemi viventi, grande quanto un battere. La deficienza di matrice cartilaginea nel topo è una malattia autosomica recessiva causata da un difetto genetico di aggrecano. Gli omozigoti muoiono subito dopo la nascita a causa di un fallimento respiratorio; gli eterozigoti appaiono normali alla nascita, ma mostrano nanismo e sviluppano disallineamento spinale nel tempo. Questo agevola la ricerca di mutazioni correlate con la degenerazione spinale.

Il **versicano** è presente in varie forme, in conseguenza allo *splicing* alternativo. È spesso associato all'acido ialuronico ed è di cruciale importanza, giocando un ruolo cruciale nello sviluppo del cuore, come dimostrato dalla presenza di mutazioni inserzionali transgeniche nel topo cuore-difettivo. La perdita di versicano è associata con il fallimento nella migrazione delle cellule del cuscinetto endocardico.

Molti esperimenti in vivo ed in vitro hanno dimostrato che il versicano ed altri proteoglicani agiscono essenzialmente come barriera molecolare, influenzando, ad esempio, la **crescita assonale**, in particolare attraverso le loro catene di GAG. L'applicazione dell'enzima **condroitinasi** ad animali con lesioni spinali

risulta nella ricrescita di assoni motori e sensoriali, con il recupero di alcune funzioni locomotorie. La condroitinasi agisce degradando i GAGs. Contestualmente, anticorpi legano segnali cellula-ancorati che inibiscono la crescita nervosa, consentendo alla cellula di estendere filopodi, esplorare l'ambiente ed estendere l'assone. Si può dunque cercare di favorire la rigenerazione dell'SNC intervenendo sui GAGs.

L'**acido ialuronico** è un polisaccaride consistente in un'alternanza di residui di acido D-glucuronico e N-acetilglucosamina. Fa turgore assumendo acqua, viene prodotto da una sintasi di membrana tra l'interno e l'esterno della cellula e non si associa a dare proteoglicani. La biosintesi è affidata a tre enzimi (Has1, Has2, Has3), che pescano le unità saccaridiche dal citoplasma. L'acido ialuronico è sfruttato in approcci terapeutici contro il cancro e per interventi estetici. Il cancro overproduce ialuronato, così disidrata l'ambiente circostante, dilata la propria matrice, agevolando la divisione, facilita l'invasione dei tessuti, poiché l'acido ialuronico stimola la migrazione. Lo ialuronato è overprodotto da molti tumori, e la sua concentrazione è in alcuni casi utile per la prognosi della malignità del carcinoma.

Lo ialuronato interagisce con il recettore CD44. Il recettore ha quattro porzioni: dominio N-terminale extracellulare con dominio di legame per l'acido ialuronico, a cui sono correlati recettori per growth factors; una regione *stem* con inserzione variabile e con una catena di condroitin- o eparansolfato; una regione transmembrana palmitoilata, strettamente associata a zattere lipidiche; un dominio citoplasmatico ad *actin binding proteins*, chinasi non recettori e trasduttori di segnale. Lo ialuronato è sintetizzato dalla ialuronato sintasi direttamente in sede extracellulare. In matrice interagisce con proteoglicani e fattori. Quando interagisce con CD44, in compresenza di segnalazione nel dominio delimitato dalla zattera lipidica, una catena trasduttoria attiva *pathway* implicanti proliferazione cellulare, invasività, chemioresistenza, transizione EM.

L'eparansolfato è un polisaccaride lineare trovato in tutti i tessuti animali. Può legare ligandi ed in genere se ne trovano due o tre catene unite a proteine della matrice, come il perlacano, e in stretta prossimità della cellula. L'eparansolfato ha un ruolo in sviluppo, angiogenesi, coagulazione e metastasi.

I condroitinsolfati si trovano in cartilagini, legamenti, tendini, pareti dell'aorta ed ha un ruolo nella plasticità neurale. I cheratansolfati hanno un contenuto variabile in solfati e a differenza di molti GAGs non portano acido urico. In cornea, cartilagine, ossa, corna.

Le **fibronectine**, classe molto diffusa nelle lamine basali, hanno un sito di legame per le integrine e sono quindi di primaria importanza per l'interazione cellula-matrice. La fibronectina si presenta in forma dimerica, con due catene quasi parallele legate da due ponti disolfuro al C-terminale. Le catene portano siti di legame per eparina, fibrina (multiple) collagene, recettori della fibronectina, RGD. Le adesioni focali con le integrine vengono costruite e rimosse, permettendo il moto della cellula sulla matrice. Gli endosomi possono avviare le componenti dell'adesione alla degradazione oppure riciclarle per formare una nuova adesione. Nelle **adesioni focali**, le integrine linkano i filamenti di actina con la fibronectina extracellulare; negli **emidesmosomi**, esse connettono invece i filamenti intermedi alla lamina basale.

Le fibronectine sono secrete in forma inattiva e dispiegata; il legame con le integrine stimola la formazione dei dimeri funzionanti. Le fibronectine legano le piastrine durante la formazione del coagulo.

La **laminina** porta siti di legame per eparina, collagene IV, recettore di membrana, eparansolfato. Ha tre catene, A, B1 e B2, con una tripla elica superavvolta. Viene sintetizzata da cellule epiteliali, endoteliali e del muscolo liscio.

La **componente fibrillare** della matrice include collagene, elastina e proteine fibrose. Le fibre collagene rappresentano il 30% delle proteine presenti nel nostro organismo. Le fibre reticolari sono sottili e molto ramificate. Le elastiche, di elastina, possono stirarsi e rilasciarsi e presentano legami trasversali. L'elasticità mostra la sua importanza in polmoni, vasi sanguigni e pelle. Le **elastine** vengono sintetizzate da muscolari lisce e fibroblasti. Sono altamente insolubili e protoelastine sono secrete in forma inattiva all'interno di chaperonine, che rilasciano tale forma quando contattano un'elastina matura. Le molecole di elastina vengono poi deaminate per essere incorporate in una *strand* di elastina.

Il **collagene** viene sintetizzato dai ribosomi a partire dagli aminoacidi prolina e lisina in una catena polipeptidica di procollagene. Nel RER **prolina e lisina vengono idrossilate**; nel Golgi avviene la glicosilazione. Il collagene viene dunque secreto e si assembla in fibrille, che a loro volta si organizzano in

fibre, in sede extracellulare. Il collagene viene esocitato come procollagene e viene attivato per taglio da proteasi, che ne scatenano l'assemblaggio extracellulare.

Molti disordini clinici sono associati ad una difettosa sintesi di collagene. Lo scorbuto, grave carenza di vitamina C, consiste in un'insufficiente idrossilazione di prolina e lisina, cui conseguono fragilità capillare e deficit di crescita infantile. La **sindrome di Ehlers-Danlos** di tipo IV consiste in una deficienza di collagene III; il sintomo è la rottura dell'aorta e/o dell'intestino. Nella sindrome di Ehlers-Danlos tipo VI, una insufficiente idrossilazione conduce a iperestensibilità articolare e della cute, deformità ossee, deficit di accrescimento. Nella VII, invece, deficienza di procollagene peptidasi e mancata polimerizzazione del tropocollagene in fibrille conducono a iperlassità di legamenti ed articolazioni e lussazioni articolari frequenti. Nell'osteogenesi imperfetta, una diminuita sintesi di collagene di tipo I porta a fratture ossee in età infantile e deformazioni ossee di vario grado.

In laboratorio, le cellule non apprezzano la plastica in molti casi, e si usa ricoprirla con un *coating* di fibronectina o laminina, che facilitano la crescita della coltura.

La matrice extracellulare regola il comportamento dinamico della cellula. La ECM sequestra una gamma di fattori di crescita ed agisce da magazzino. Cambiamenti di condizioni fisiologiche possono innescare attività di proteasi che causano il rilascio di tali magazzini. Questo permette la rapida e localizzata attivazione di fenomeni cellulari dipendenti da *growth factors*, senza sintesi de novo. La durezza e l'elasticità della matrice hanno conseguenze rilevanti sulla migrazione cellulare. In generale, le cellule migrano verso substrati più rigidi, secondo il moto di **durotaxis**. Anche l'espressione genica è influenzata dall'elasticità della matrice, che la cellula è in grado di testare e leggere. Ciò ha impatto sul differenziamento e la carcinogenesi ed è perciò oggetto di ricerca. I *pathway* non sono ancora bene caratterizzati, ma si pensa che i complessi di adesione e la componente actomiosinica del citoscheletro, le cui forze contrattili sono trasmesse attraverso le strutture cellulari, abbiano un certo ruolo. Per quanto riguarda il **differenziamento**, le staminali mesenchimatiche fenotipizzano con estrema sensibilità all'elasticità della ECM. Su matrici soffici, simili a quelle del cervello, le mesenchimatiche si differenziano in *neuronal-like*, simili come forma, RNAi, marker citoscheletrici e livelli dei tf. Matrici più rigide sono miogeniche e molto rigide sono osteogeniche. Elasticità e rigidità dipendono innanzitutto dalla concentrazione relativa di elastina e collagene.

I componenti della matrice vengono secreti per esocitosi dopo esser stati prodotti all'interno della cellula e possono venire modificati in sede extracellulare, dove si aggregano ai componenti già presenti.

Nel 2016, Huleihel et al. hanno riportato la presenza di DNA, RNA e nanovesicole a livello della matrice. Le **MBVs** (**Matrix Bound nanoVesicles**) hanno forma e taglia di esosomi, contengono proteine, lipidi, DNA, miRNA. I *bioscaffold* di ECM sono utilizzati in molte applicazioni di chirurgia, ingegneria tissutale e medicina rigenerativa e sono associati ad un positivo rimodellamento costruttivo comprendente angiogenesi, reclutamento di staminali e modulazione del fenotipo dei macrofagi per prevenire l'infiammazione. I meccanismi che mediano questi processi sono in buona parte sconosciuti, ma le MBVs sembrano giocare un certo ruolo. Le vescicole extracellulari (EVs, le prime identificate prodotte dalle piastrine) erano già state identificate nei fluidi biologici, come potenti veicoli di comunicazione intercellulare portanti RNA, proteine (citochine, chemochine, ...), enzimi e lipidi. Le MBVs possono essere separate dalla matrice solo dopo trattamento enzimatico della stessa, come accade per il rilascio dettato dalla degradazione dei *bioscaffold* impiantati per applicazioni cliniche. La digestione enzimatica dei *bioscaffold* rilascia dsDNA, ssDNA e RNA. L'RNA è stato detectato con un metodo interessante: si sono esposte le matrici a proteasi, pepsina o collagenasi, poi a DNasi oppure a RNasi ed i prodotti sono stati analizzati con una corsa su agarosio: la DNasi lascia intatta solo una banda corrispondente a 25-200 bp, che è l'unica rimossa dalla RNasi, dimostrando la presenza di piccoli RNA di tali dimensioni. Se i campioni di matrice non venivano prima esposti a trattamento per degradare la componente proteica, i piccoli RNA non venivano estratti efficientemente. Queste piccole molecole di RNA sono state ritrovate in tutti i tipi di ECM testati. I risultati mostrano che una parte degli acidi nucleici viene incorporata dalla matrice e protetta da essa, a differenza della parte di acidi nucleici liberata dalla decellularizzazione, che è invece accessibile dalle nucleasi. I ricercatori hanno ipotizzato che questi acidi nucleici protetti potessero essere impacchettati in vescicole. Queste vescicole sono state identificate grazie alla TEM, sono state separate dalla matrice trattata enzimaticamente ed analizzate abbastanza dettagliatamente; sono rotonde e somigliano per dimensioni ad esosomi, ma portano proteine cargo diverse. Le MBVs isolate contengono RNA che, retrotrascritto ed analizzato, risulta corrispondere a sequenze per miRNA. Tra 33 e 240 miRNAs per

campione, di cui 22 condivisi da tutte le matrici diverse. Questi miRNA hanno ruoli in pathway connessi allo sviluppo, alla crescita ed alla proliferazione cellulare, a sopravvivenza/morte, movimento e ciclo cellulare. Inoltre, alcuni hanno un ruolo nel connettivo per sviluppo e funzionalità. Le MBVs sembra abbiano un ruolo anche nell'estensione dei neuriti (assoni/dendriti) di cellule del neuroblastoma.

È stato notato che la ECM aiuta la ricrescita e la guarigione dei tessuti. I meccanismi del rimodellamento costruttivo sono poco conosciuti, ma sembra che le MBVs abbiano un ruolo di primo piano. La matrice ostacola un'inflammatione eccessiva dettata dal sistema immunitario e facilita le cellule circostanti nel riparare il tessuto invece di formarne uno cicatriziale. Per le applicazioni mediche si ricorre spesso alla ECM della vescica di maiale, facilmente accessibile, usata allo stato corrente per trattare ad esempio le ulcere.

La medicina rigenerativa punta a stimolare processi propri del corpo perché possano guarire danni tissutali prima irreparabili. In alternativa, si punta a crescere organi in laboratorio o ospiti animali chimerici, dai quali effettuare il trapianto al paziente.

L'invasione del torrente ematico da parte di un cancro passa per la degradazione della matrice extracellulare. I passaggi che conducono alla metastatizzazione sono i seguenti: espansione e selezione clonale, crescita, espansione, neoangiogenesi, formazione di subcloni metastatici, adesione alla matrice e sua invasione, intravasazione, interazione con le cellule linfoidi, embolo tumorale con piastrine, adesione alla membrana basale, stravasazione, deposito metastatico, neoangiogenesi, crescita.

Si sta pensando a numerose applicazioni sulle matrici extracellulari per *drug delivery* (con ialuronato), ingegneria e riparazione tissutale, colture in vitro 3D.

Le **metalloproteasi** sono proteasi zinco dipendenti che possono tagliare differenti componenti proteiche, specialmente quelle della ECM. Più di 21 membri condividono peculiarità morfofunzionali e svolgono un ruolo in processi patologici e fisiologici, come embriogenesi, cicatrizzazione, infiammazione, artrite, cancro. Le metalloproteasi sono regolate a vari livelli. Una regolazione è trascrizionale, con bassi livelli di mRNA in condizioni standard e molto aumentati in caso di rimodellamento tissutale, cancro, cicatrizzazione o infiammazione. A livello posttraduzionale, l'attivazione dipende da tagli proteolitici, con rilascio del dominio propeptidico, operati da altre metalloproteine o proteasi a serina. L'attività delle proteasi è finemente controllata e le stesse sono inibite da inibitori tissutali delle metalloproteasi e da α_2 -macroglobulina.

Biomateriali per l'applicazione clinica sono le recenti *Synthetic Extra Cellular Matrix (sECM)*, matrici sintetiche su cui si possono sviluppare colture 3D di cellule in vivo ed in vitro. Ialuronato, epaina e condroitinsolfato sono stati modificati covalentemente con l'aggiunta di gruppi tiolici reattivi che possono formare *crosslink*, in una varietà di modalità, producendo innovativi gel sECM. Una forma, consistente semplicemente in molecole di acido ialuronico modificato *crosslinkate*, promuove la guarigione senza cicatrizzazione, in modelli. Un tipo di sECM con derivati di eparina *crosslinkati* mima l'eparansolfato e permette il rilascio controllato di fattori di crescita, promuove l'angiogenesi ed il riparo delle ferite.

Di recente, un campo di ricerca interessante è quello delle **reti perineuronali (PNNs)**. Sono specializzate ECM responsabili della stabilizzazione sinaptica nel cervello adulto. Si trovano attorno ai corpi cellulari ed ai neuriti prossimali di certi neuroni del SNC, hanno un ruolo nella terminazione del periodo critico e la loro digestione con condroitinasi ABC in modelli ripristina la plasticità sinaptica nel cervello adulto, con buone promesse per la rigenerazione di aree cerebrali morte (es. ictus). Le PNNs sono cariche negativamente e sono composte di proteoglicani del condroitinsolfato. Le PNNs si rinvengono innanzitutto nella corteccia, nell'ippocampo, nel talamo, nel tronco e nel midollo spinale. Sono molto rappresentate nell'area motoria ed in quella sensoriale primaria, poco nella corteccia limbica. Sembra che spesso siano connesse ad interneuroni inibitori (GABAergici) e si pensa che siano responsabili del mantenimento dell'equilibrio eccitazione/inibizione nell'adulto. Le PNNs hanno un ruolo nella neuroprotezione. Le proteine di superficie, inclusi i recettori per NT, sono molto mobili nella membrana grazie alla diffusione laterale. Rapidi movimenti dei recettori AMPA sono coinvolti nella modulazione della trasmissione sinaptica. Quando un recettore è usato, è incapace di operare efficientemente per un certo periodo di tempo e diffonde lateralmente, venendo scambiato con uno naive. Questo incrementa la fedeltà sinaptica durante la

stimolazione rapida e ripetuta. Le PNNs compartimentalizzano la superficie neuronale ed agiscono come barriere contro la diffusione degli AMPARs, limitando lo scambio sinaptico e la plasticità. Un'ipotesi sulle PNNs le considera sistemi di buffer per cationi: avendo carica fortemente negativa, possono servire da scambiatrici di cationi, prevenendo la libera diffusione di Na^+ e K^+ , mantenendoli in loco. I neuroni circondati da PNNs, infatti, spesso a picco: piccola resistenza della membrana, alto potenziale di riposo, breve durata sia del potenziale che del periodo refrattario, alta frequenza di scarica, amplitudine dei potenziali abbastanza costante. In patologie come epilessia, Alzheimer ed ictus le PNNs risultano modificate e danneggiate. Interessante il ruolo delle PNNs nel condizionamento operativo da paura: nella fase postnatale la cessazione dello stimolo da paura porta alla cancellazione della risposta da paura associata allo stimolo neutro, mentre in età adulta questo non avviene; in modelli murini adulti, la degradazione delle PNNs nell'amigdala con ChABC rende suscettibili di cancellazione i ricordi associati alla paura se acquisiti dopo il trattamento (ripristinante la condizione infantile). Le memorie acquisite prima, invece, non vengono cancellate (ormai la connessione sinaptica si è creata).

***Force loading explains spatial sensing of ligands by cells* (Articolo di Roger Oria et al.).** Le cellule possono percepire la densità e la distribuzione delle molecole della ECM per mezzo di integrine o complessi di membrana di adesione contenenti integrine. Questo percepire lo spazio guida la cellula in contesti standard e patologici. Studi su cellule su superfici rigide di vetro hanno mostrato che la percezione spaziale della ECM avviene a livello di nanometri, con il clustering di integrine e la formazione di adesioni focali che vengono alterati quando i singoli legami integrina-ligando distano più di qualche decina di nanometri. È stato suggerito che un adattatore proteico che crea crosslink, della taglia di qualche decina di nanometri, potrebbe connettere le integrine con la componente actinica del citoscheletro, agendo da righe molecolare che detecta la distanza tra ligandi nello spazio. Gli studiosi hanno sviluppato gel la cui rigidità e distribuzione dei ligandi sulla scala nanometrica sono manipolabili. Aumentando la distanza fra ligandi promuove la crescita di adesioni focali su substrati di bassa rigidità, ma porta al collasso delle adesioni su substrati più rigidi. Inoltre, disordinando la distribuzione del ligando incrementa drasticamente la crescita delle adesioni, ma riduce la soglia di rigidità a cui le adesioni collassano. Crescita e collasso delle adesioni focali sono rispecchiati, rispettivamente, dal livello nucleare o citosolico del regolatore trascrizionale YAP. Un modello computazionale spiega i risultati. Le prese molecolari sono i legami ECM-integrina. Se sovraccaricate, esse rispondono recutando più integrine, fino ad un valore massimo. Questo genera più prese, ridistribuendo la forza complessiva tra di esse e riducendo il carico per presa. Ad alta rigidità e se sono presenti ampi spazi fra molecole di ligando, il massimo reclutamento viene raggiunto, prevenendo ulteriore redistribuzione della forza e portando al collasso dell'adesione. Misure delle forze di trazione cellulari e della velocità di flusso dell'actina supportano il modello.

Lezione XVIII

La **segnalazione** tra cellule può essere indiretta mediante **secreti chimici** (legge chi possiede i recettori in grado di capire il messaggio chimico; recettori diversi per lo stesso ligando esplicano risposte diverse), diretta mediante molecole associate alla membrana plasmatica (**dipendente da contatto**, segnale per entrambe le parti), segnalazione diretta attraverso **giunzioni comunicanti** (sviluppo embrionale, cellule epiteliali, cancro: ma passano anche chemioterapici, quindi l'overespressione potrebbe essere d'aiuto). Ogni ligando ha un suo recettore sulla cellula bersaglio. Un segnale idrofilo ha un recettore in membrana, un segnale idrofobico ha un recettore intracellulare. La chiave della trasduzione è il cambiamento conformazionale del recettore. Recettori comuni sono accoppiati a proteine G, recettori tirosinchinasici, recettori associati a canali ionici. La segnalazione è autocrina, paracrina, endocrina, neuroendocrina o sinaptica. La trasduzione è seguita da amplificazione e risposta. Il *pathway* autocrino viene usato per rafforzare meccanismi: feedback positivi, ad esempio per la proliferazione: la cellula si produce un segnale che la induce a mantenersi in uno stato proliferativo. I segnali in genere sono catalogabili come "sopravvivi", "dividiti" (mitogeni), "differenziati" (morfogeni), "muori" (pro-apoptotici). Questi *paths* di segnalazione hanno un ruolo nello scolpire i neuroni dopo la fase critica: un numero grande di neuroni viene scolpito, quelli che hanno connessioni numerose sopravvivono, mentre si perdono per apoptosi quelli rimasti tagliati fuori dalla rete: segnale di sopravvivenza se un neurone connette, di morte apoptotica per i neuroni che non connettono. I segnali ricevuti dalla cellula vengono sempre integrati e la risposta ne è il frutto.

I segnali possono attivare *pathway* che alterano il comportamento di una proteina e quindi del macchinario citoplasmatico (risposta rapida, secondi/minuti, le componenti sono già pronte, eg rilascio vescicole sinaptiche) e *pathway* a risposta lenta, che culminano nell'alterazione dei tassi d'espressione genica e quindi della sintesi proteica. In entrambi i casi, il comportamento della cellula risulta modificato. Un recettore attivato attiva a sua volta proteine di segnalazione, che attivano quelle bersaglio (enzimi metabolici, proteine regolatorie di geni, associate al citoscheletro). Un singolo ligando può attivare diverse risposte nella cellula ricevente, in funzione di recettori strutturalmente e funzionalmente diversi. Ad esempio, per quanto concerne l'acetilcolina, essa diminuisce ritmo e forza di contrazione delle cellule del muscolo cardiaco, mentre stimola la contrazione del muscolo scheletrico; agisce anche sulle ghiandole salivari, stimolando la secrezione (esocitosi regolata). L'acetilcolina è anche mediatore di un'altra via segnalatoria importante: la terminazione nervosa libera sulle cellule dell'endotelio ed essa attiva la NO sintasi. L'ossido di azoto prodotto diffonde rapidamente attraverso le membrane ed agisce sul muscolo liscio, attaccandosi alla guanilico ciclasi, che converte GTP in cGMP, rilassando rapidamente la cellula muscolare liscia.

Recettori a sette passi transmembrana hanno sette alfa eliche in membrana e sono spesso associati a proteine G. Tra le vie segnalatorie importanti, si ricorda quella dell'IP₃/DAG, culminante nell'attivazione della PKC per opera congiunta di DAG e Ca²⁺, questo rilasciato dal RE grazie a IP₃. I recettori tirosinchinasici, invece, subiscono dimerizzazione recettore-mediata. Il dimero attivo va incontro ad autofosforilazione reciproca (trans-autofosforilazione), cui segue l'attivazione. I recettori si accoppiano quando ciascuno dei due ha legato il ligando. In altri casi, la dimerizzazione pre trans-autofosforilazione può essere ligando-mediata (il legando lega entrambi contestualmente e li fa dimerizzare). Le tirosine fosforilate attivate richiamano le proteine della catena trasduttoria.

Le **MAP-chinasi** (*Mitogen Activated Proteins*) fosforilano fattori di trascrizione per geni correlati con il ciclo cellulare ed il differenziamento. Alcune sono punti di controllo, attivate da una grande varietà di segnali, ed hanno un ruolo centrale nella modificazione del fenotipo cellulare. Le MAP chinasi agiscono nel nucleo o fosforilano intermedi che agiscono nel nucleo.

Gravi sono le **alterazioni patologiche delle vie di trasduzione** (es. recettori costantemente attivi).

Lezione XIX

Tecniche di coltura in vitro. Espansione in statico: piastre petri, well plates, flasche, altro o espansione in dinamico. ()

Lo sviluppo di farmaci prevede varie fasi. Prendiamo 10.000 molecole analizzate con test preliminari di citotossicità. Meno di 250 molecole superano il test. Queste entrano in fase preclinica e vengono testate su modelli animali; meno di 5 molecole superano i test e vanno in fase di trial clinico. Il trial clinico consta di tre sottofasi: I su 20-100 volontari sani, II su 100-500 pazienti per analisi di sicurezza e dosaggio, III su 1.000-10.000 pazienti per testare efficacia ed effetti collaterali. A tutto questo si spera possa sopravvivere una molecola, che dev'essere approvata. Se lo è, segue una fase IV di studio di circa un paio d'anni. Lo sviluppo di un farmaco si stima che costi 12 anni ed un miliardo di euro.

I primi test sono svolti su colture cellulari. Un problema è il fatto che i test in vitro sono poco traslabili: una molecola che non dà problemi alla singola cellula in vitro ne può arrecare al sistema complesso che è l'individuo, in vivo. Si lavora molto in vitro per ridurre i test sugli animali. Si sta investendo per migliorare i test sulle colture cellulari, ad esempio con la cocoltura, la coltura 3D, bioreattori e sistemi sofisticati che rendono il saggio in vitro sempre più prossimo alle condizioni in vivo, fisiologico.

Interessante lo **sviluppo del farmaco intelligente**. Oggi si punta ad utilizzare farmaci già noti e testati per finalità ulteriori rispetto a quelle già in uso. Il progetto **Connectivity Map** ha analizzato 5400 farmaci con un software volto a valutare la possibile correlazione tra struttura (considerati vari parametri, come PM, forma, globulare o no, idrofobicità locale ecc.) e profilo trascrizionale funzionale indotto. Si è visto che non esiste una tale correlazione. Il progetto ha svolto varie analisi comparative, relazionando i farmaci fra loro, ad esempio con la somiglianza strutturale sulle ascisse e la somiglianza trascrizionale sulle ordinate. Una stessa linea cellulare è stata sottoposta ad una coppia di farmaci per valutare la TV (*Transcriptional*

Variability) fra di essi, valutando il profilo trascrizionale indotto. Molecole diverse per struttura chimica e *mode of action* possono avere un ruolo ultimo simile se interferiscono sullo stesso *pathway*. Il disegno della struttura di un farmaco può essere comparato con quelli già usati per vederne la posizione nel grafico prima citato e prevederne l'area di attività funzionale.

Riporto alcune note sulle colture cellulari tratte dagli appunti dello stage presso il laboratorio di Alessandro Zenobi dell'Università di Milano. La 5-aza agisce così: 1- passivo: Blocca le de-novo-metiltransferasi, facendo sì che dopo la divisione le figlie non presentino il quadro epigenetico delle parentali 2- attivo: Agisce sui gruppi metile facendoli ossidare a OH e poi ad altre robe a dare un addotto strambo e demetilando nel complesso ciò che è già metilato (azione in misura minore). Cellule di una stessa popolazione e tipo presentano anche una variabilità dimensionale notevole. Le **marble**: Palline con silicone o teflon che strutturano un medium con cellule in modo che le cellule si organizzino come in vivo, dunque in strutture 3D. Il *medium* può essere cambiato bucando le palline, mettendole a galleggiare, ri-rollandole, così continuano a vivere e le si osservano più a lungo. *Scaffold* per produrre organizzazioni spazialmente definite di cellule. Perché la 5-aza come demetilante proprio lei? Perché è già approvata come farmaco in terapia rigenerativa, quindi sperando di applicare i nuovi risultati in terapia si usa già qualcosa che si sa essere opportuno e non dannoso. Per la scelta di concentrazioni, tempo ecc si è fatta una serie di prove. Hoechst: Colora in vivo, intercalandosi alla doppia elica di DNA delle sole cellule vive, mettendone in risalto il nucleo. Invece, DAPI e altri coloranti si intercalano indistintamente a DNA di cellule vive e non. Elettroforesi: Per caricare il campione stai anche abbastanza superficiale e sclicca fino al primo step e non al secondo (eviti le bolle!). Il gel sciogli bene bene l'agarosio, deve essere uniformissima. Gestisci i tempi. Copri per bene l'agarosio con TAE, deve essere completamente bagnato, mai secco. Acido citrico: Acido tricarbossilico. Citrato: Sale dell'acido. Quindi è basico perché può accettare ioni H⁺. In fondo all'elettroforesi devo vedere una bandina, che corrisponde ai *primer* in eccesso non legati (gli altri sono integrati). Non deve esserci la strisciata (legame abbastanza aspecifico).

Caratterizzazione delle colture cellulari. Una coltura primaria pesca le cellule da un tessuto, essa può essere pura o mista, queste cellule già differenziate sopravvivono in vitro per pochi giorni, non si dividono: si possono effettuare dei test ma non mantenerle. Una linea cellulare, invece, consiste in un unico tipo cellulare adattato alla vita di coltura (monoclonale). Sono selezionate, possono provenire da una coltura primaria. Una linea cellulare continua o stabile è in grado di sopravvivere oltre il limite di Hayfick. Le cellule sono trasformate, immortalizzate, o tumorali: sono resistenti all'apoptosi ed alla senescenza replicativa, quindi le risposte che danno non sempre sono traslabili alle cellule del corpo sane. Un ibridoma deriva invece dalla fusione di due tipi cellulari.

Pro delle colture cellulari:

- Riduzione dell'uso di animali da sperimentazione;
- In linea cellulare, le cellule sono omogenee: una risposta omogenea è quantificabile;
- Possibilità di controllare l'ambiente extracellulare;
- Saggiare le cellule senza interferenze presenti *in vivo*;
- Disponibili, economiche;
- Esperimenti altamente riproducibili;
- È possibile analizzare i meccanismi molecolari.

Contro delle colture cellulari:

- Ambiente artificiale, sistemi semplificati;
- Comportamento "anomalo" (es. immortalizzate/tumorali), quindi modelli scarsamente predittivi: andare bene in vitro non implica che così sia *in vivo*, perché, ad esempio, le cellule sono esposte a sostanze diverse. Difficoltà nel correlare le concentrazioni *in vitro* ed *in vivo*;
- Le sostanze inoculate possono interagire con il terreno di coltura.

Nelle colture in lab, la maggior parte delle cellule si divide solo quando si trova a contatto con una superficie solida (dipendenza da contatto). ()

Esistono vari **metodi di trasferimento del materiale genetico:**

- Biologici: adenovirus ricombinanti, virus adenoassociati, retrovirus, lentivirus. Trasduzione virale.
- Chimici (Trasfezione): liposomi cationici (hanno cariche positive che legano il DNA, carico negativamente; non avendo proteine di membrana tipo SNAREs fanno fatica ad interagire con la membrana bersaglio: bassa efficienza), **complessi di polilisina** (costruito legando-polilisina-DNA da introdurre, legato reversibilmente affinché venga rilasciato all'interno. La polilisina ha infatti carica positiva, il DNA negativa. I geni inseriti non si integrano affatto nel cromosoma dell'ospite, inoltre, nel torrente ematico buona parte del DNA viene persa e le cellule bersaglio, ad esempio epatociti, ricevono solo una piccola quota di DNA e molta polilisina scaricata. Riceve chi lega il legando a cui abbiamo appiccicato il costrutto).
- Fisici: elettroporazione, nucleofezione, microiniezione.

I **lentivirus** hanno *peplos* (pericapside fosfolipidico), con due molecole di RNA monocatenario a polarità positiva. Causano patologie croniche, a decorso lento e mortali, ad esempio l'AIDS. Si usano per portare geni da integrare nelle cellule da ingegnerizzare, anche per terapie geniche, o per importare piccoli RNA implicati in RNAi in esperimenti di inibizione di geni. *"The transgene sequence is flanked by long terminal repeat (LTR) sequences, which facilitate integration of the transfer plasmid sequences into the host genome. Typically it is the sequences between and including the LTRs that is integrated into the host genome upon viral transduction. Many lentiviral transfer plasmids are based on the HIV-1 virus. For safety reasons, transfer plasmids are all replication incompetent and may contain an additional deletion in the 3'LTR, rendering the virus "self-inactivating" (SIN) after integration (Addgene).* Il sito d'integrazione del gene non è random, ma segue una distribuzione di probabilità che è tipica del determinato retrovirus. Essa sembra dipendere da accessibilità della cromatina, effetti sul ciclo cellulare e *tethering proteins* (associate al *trafficking* vescicolare).

Gli **adenovirus** sono virus a dsDNA con capsidi proteici a simmetria icosaedrica, mancanti di involucro lipidico. I vettori virali sono bomber perché sparano il proprio DNA giusto nel nucleo. *"Adenovirus vectors are the most commonly employed vector for cancer gene therapy. They are also used for gene therapy and as vaccines to express foreign antigens. Adenovirus vectors can be replication-defective; certain essential viral genes are deleted and replaced by a cassette that expresses a foreign therapeutic gene. Such vectors are used for gene therapy, as vaccines, and for cancer therapy. Replication-competent (oncolytic) vectors are employed for cancer gene therapy. Oncolytic vectors are engineered to replicate preferentially in cancer cells and to destroy cancer cells through the natural process of lytic virus replication. Many clinical trials indicate that replication-defective and replication-competent adenovirus vectors are safe and have therapeutic activity."* (NCBI: Wold WS, Toth K)

La trasfezione può essere **transiente** (vettore con *gene reporter* per studi sull'espressione genica nelle 24h dopo la trasfezione, poi viene perso nelle divisioni o degradato. Se il DNA non viene integrato nelle cellule dell'ospite e non ha un'origine della replicazione per cellule animali. Molto efficiente.), o **stabile** (il gene dev'essere integrato nel genoma della cellula ospite oppure i vettori contengono repliconi; in genere, il *gene reporter* codifica per un enzima che conferisce alla cellula la capacità di crescere in un terreno selettivo – l'efficienza è scarsa e le cellule devono essere selezionate). La **nucleofezione** è una trasfezione-elettroporazione che combina impulsi elettrici e soluzioni saline, permettendo al DNA esogeno di penetrare direttamente nel nucleo, usata ad esempio su cellule NK.

La conta cellulare è un metodo economico e semplice, che utilizza un emocitometro, vetrino portaoggetti recante al centro una depressione. () Una volta riempito per capillarità il sottile spazio fra coprioggetto e camera, si possono contare le cellule (sferette più o meno rifrangenti, a seconda della regolazione del fuoco del microscopio). La distribuzione delle cellule può non essere perfettamente omogenea: è consigliabile contare le cellule in 4 quadrati e calcolare la media, riducendo il margine di errore in questo modo. In sintesi, il sistema per contare le cellule all'interno del reticolo della camera di Burker prevede: contare le cellule nei 4 quadrati grandi disposti a Y, ricordandosi di non considerare quelli all'interno delle tre righe di confine su due soli lati; calcolare la media; moltiplicare (es. $21 \text{ cells}/0.1 \text{ mm}^2$), moltiplicare per il fattore di scala (es. $10^4 \Rightarrow 2,1 * 10^5 \text{ cells/ml}$).

Saggi di citotossicità valutano l'effetto di un agente chimico o fisico (T, radiazione, onda elettromagnetica) o biologico (cellula immunitaria) in grado di indurre un danno e/o necrosi o apoptosi in una cellula. L'agente è detto citotossina.

L'apoptosi è un complesso insieme di azioni messe in atto dalla cellula per suicidarsi pacificamente; fra queste, le DNasi tagliano i *linker* fra un nucleosoma e l'altro (*apoptosis-induced DNA fragmentation*). La tecnica **Tunel** sfrutta questa caratteristica dell'apoptosi: una transferasi aggancia nucleotidi alle *ends* tagliate dalla DNasi. Questi nucleotidi sono marcati (in genere, fluorescenti o recanti un epitopo riconoscibile). Questa tecnica permette di identificare in una *slice* di tessuto quali e quante cellule sono in apoptosi, poiché il processo descritto può aver luogo nelle sole cellule in cui il DNA si sta frammentando.

Test di vitalità cellulare: saggio con il blu tripano, che viene assunto solo dalle cellule morte, permettendo di discriminarle dalle vive. È veloce ed economico, ma poco specifico, dato che non permette di risalire alla causa apoptotica o necrotica della morte della cellula.

Dosaggio MTT. È un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività di enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu-violaceo detectabile. L'enzima implicato è la succinato deidrogenasi (reduttasi), mitocondriale, attivo soltanto nelle cellule vive, che risultano quindi le sole visibili. La funzione della succinato reduttasi consiste nel tagliare l'anello di tetraziolo dell'MTT, giallo, con la formazione di formazano, blu.

Teratogenesi. Alterazioni dello sviluppo possono essere indotte, oltre che da mutazioni, da fattori ambientali. Nel 1962, Rachel Carson dimostrò che il DDT distrugge le uova di uccello, ostacolando la riproduzione di diverse specie. Il sedativo talidomide, se usato in gravidanza, può generare malformazioni in arti ed orecchie. Madri malate di rosolia hanno figli ciechi, sordi, o entrambi, alcuni anche con difetti cardiaci o ritardo mentale (epidemia USA 1964). L'esposizione della madre ad agenti tossici si ripercuote sul figlio. Nell'uomo, il periodo di massima suscettibilità ai teratogeni è tra 3 e 8 settimane di gestazione, con l'eccezione del SNC, che resta vulnerabilissimo per tutto lo sviluppo. Nella gran parte dei casi, prima avviene l'esposizione (da un certo x0 per i vari organi), peggiori sono le conseguenze. Agenti teratogeni sono:

- Farmaci e sostanze chimiche: alcol, acido retinoico, cortisone, antibiotici, eroina, piombo, mercurio, acido valproico (un antiepilettico e stabilizzante dell'umore);
- Agenti infettivi: rosolia, herpes, toxoplasmosi (causata dal *Toxoplasma gondii*, un protista parassita, di solito asintomatica nell'adulto, o correlata a stimoli similinfluenzali ma pericolosa per soggetti con sistema immunitario deboli), Zika (specie comune di ZIKV);
- Affezioni della madre: malattie autoimmuni, diabete, carenze alimentari, PKU
- Radiazioni ionizzanti; ipertermia;
- Sostanze chimiche presenti in natura, come **jervina e ciclopamina**, presenti in specie vegetali alpine dei pascoli, che inibiscono nel feto la sintesi di colesterolo ed ostacolano il *pathway* di Sonic. Feti di pecore che si sono cibati di tali piante presentavano ciclopia e disordini neurologici.
- **Fumo di sigaretta.** 20 sigarette al giorno inducono feti più piccoli, patologie come asma e SIDS; 4 al giorno nell'uomo riducono la quantità e la motilità degli spermatozoi.
- **Acido retinoico.** Usato da donne gravide per curare l'acne cistica, porta a malformazioni nel feto, come difetti o mancanza di orecchie, mancanza o ipoplasia della mandibola, palatoschisi (malformazione del palato, che si presenta come una fenditura più o meno estesa della parte anteriore del palato duro), anomalie a carico di arco aortico e SNC. La teratogenesi dell'acido retinoico dipende da un'alterata attivazione dei geni Hox.

In termini di frequenza, effetti e costi, il teratogeno più devastante è l'etanolo. Figli di alcolizzate (**Sindrome alcolica fetale**) hanno testa piccola, lievi anomalie craniofacciali, cervello molto più piccolo del normale, che presenta spesso alterazioni nella migrazione di neuroni e glia. Ritardo mentale. Sono stati condotti esperimenti su modelli animali. Nel topo, esposizioni a EtOH durante la gastrulazione provocano gli stessi danni osservati nell'uomo. I difetti craniofacciali derivano da un'alterazione della migrazione delle cellule delle creste neurali; nel cervello, EtOH induce l'apoptosi. Sembra che il *signaling* dell'acido retinoico sia inoltre almeno in parte inibito.

L'**acido valproico** agisce a livello di SNC, aumentando i livelli di GABA. Durante la gravidanza, può portare a spina bifida e difetti al SNC, associati ad autismo, ritardo nella crescita, difetti craniofacciali. Tra i

possibili meccanismi: riduce l'assorbimento di acido folico, aumenta lo stress ossidativo, inibisce la deacetilasi istonica, che regola la trascrizione mediante compattazione della cromatina.

Il NT **serotonina** ha due recettori, uno transmembrana a sette passi, uno canale. L'antidepressivo *Prozac* (inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina) può, come altri, interferire. In età adulta, la serotonina è implicata nel comportamento di alimentazione, nel sonno, nell'umore, nella memoria, nel circolatorio, nel respiratorio. Nello sviluppo, ha un ruolo un gastrulazione, simmetria bilaterale, sviluppo del SNC, sviluppo del cuore e sviluppo craniofacciale. Nell'embriogenesi, il recettore serotoninergico 2B è necessario per lo sviluppo corretto del cuore; il *signaling* del recettore 5-HT_{2B}, invece, in *Xenopus* è necessario per la morfogenesi craniofacciale.

La **microencefalia da virus ZIKV** riduce il cervello dei neonati. Il virus a singolo filamento di RNA ha più ceppi, è stato inizialmente isolato dal M. rhesus e può essere trasmesso sessualmente o tramite zanzara. Il Brasile è stato recentemente colpito. ZIKV non ha effetti sugli adulti, ma nei neonati attacca le staminali neurali: in coltura, ZIKV entra preferenzialmente nelle neurali in proliferazione, inducendo l'apoptosi, neurali corrispondenti ai neuroni destinati a dividersi un gran numero di volte ed originare la massa del cervello, che così viene a mancare. ZIKV agisce anche sulle cellule gliali radiali, che sono cellule bipolari che spaziano lo spessore della corteccia e sono staminali uni- o multipotenti, progenitrici di neuroni, astrociti ed oligodendrociti. Fungono anche da scaffold per i neuroni nascenti che si muovono.

È stata rilevata una **correlazione tra fumo della nonna materna ed autismo nel nipote**: sembra che il fumo danneggi in maniera particolare il mtDNA, trasmesso per matrilinea, e che questo danno abbia però effetti notevoli con un salto di generazione, perché la madre avrà un po' di mitocondri sani e un po' mutati, ma a sufficienza per un fenotipo wt, mentre suo figlio può stocasticamente ereditare in prevalenza copie mutate ed avere fenotipo mutato. Inoltre, il fumo della nonna potrebbe causare anomalie nell'apparato riproduttore della madre mentre essa è nel grembo, danni che si ripercuotono quando sarà incinta sul nascituro. Si pensa che una sorta di adattamento al fumo che occorre nella madre per via dello stress dettato dal fumo della nonna possa rendere il bambino più vulnerabile all'autismo. Una componente è per certo epigenetica, anche se i meccanismi sono poco chiari. Il fumo agisce sul pattern di metilazione.

Altre note

La senescenza cellulare. Le cellule si replicano per un numero definito di volte, detto limite di Hayflick, dopo del quale entrano in senescenza replicativa: i telomeri si sono accorciati troppo e perpetuare le divisioni può essere pericoloso (portando a cancro e malattie genetiche). Le cellule possono entrare in senescenza anche per altri motivi: danno al DNA via ROS, attivazione di oncogeni e fusione tra due cellule, indipendentemente dalla lunghezza dei telomeri. La senescenza cellulare rappresenta un nuovo stato funzionale della cellula. Con l'età, il numero di cellule senescenti aumenta notevolmente nei tessuti (da qui, il nome di senescenza cellulare). Le cellule senescenti mantengono un metabolismo attivo ed acquisiscono un fenotipo peculiare: secretoma pro-infiammatorio (**SASP**= *Senescence Associated Secretory Phenotype*: citochine, fattori di crescita, proteasi), upregolazione di ligandi immunitari, risposta pro-sopravvivenza, espressione genica promiscua (**pGE**) e sono positive al test per l'attività della β -galattosidasi senescenza-associata, *biomarker* per la senescenza cellulare. Il SASP è correlato con malattie legate all'età avanzata, come diabete II ed aterosclerosi. Le cellule senescenti sembra che ostacolano la soppressione tumorale. Esse hanno segmenti cromatinici alterati nel DNA, che rinforzano il profilo senescente. In alcune specie, la senescenza cellulare non è osservata (piante pluriennali, spugne, coralli, aragoste).

Cdc20 attiva l'*Anaphase Promoting Complex* (APC/C), un grande complesso di 11-13 subunità che inizia la separazione dei cromatidi e dirige così l'ingresso in anafase. Il complesso APC/C^{Cdc20} targetta la securina affinché venga distrutta, distruggendo infine la coesina e lasciando liberi i cromatidi fratelli di separarsi. Inoltre, il complesso avvia alla degradazione le cicline delle fasi S e M, inattivando le chinasi ciclina-dipendenti (Cdks) e consentendo alla cellula di uscire dalla mitosi. Una proteina strettamente correlata, **Cdh1** (*Cdc20 homologue 1*), gioca un ruolo complementare. Durante l'attività di APC/C^{Cdc20}, Cdh1 è fosforilata e non può legare APC/C. Dopo la metafase, ad ogni modo, le S/M-Cdks sono inattivate, come detto, e Cdh1 può esistere in forma non fosforilata, stato che lega APC/C, e consente al complesso di continuare a degradare le cicline S/M. APC/C^{Cdc20} non riconosce le cicline G1/S ed esse in G1 vengono

prodotte ed attivano Cdk's che fosforilano Cdh1, gradualmente ostacolando l'inibizione delle cicline S/M e consentendo la transizione graduale nel ciclo. Cdc20 ha un ruolo anche nel SAC (***Spindle Assembly Checkpoint***), che assicura l'allineamento coerente di tutti i cromosomi sulla piastra metafase.

Il *crossing over*. La ricombinazione meiotica è iniziata da DSBs, introdotti da agenti causanti danno al DNA o dalla proteina Spo11. Esonucleasi digeriscono le *ends* al 5', lasciando code a filamento singolo al 3' complementare. Ricombinasi coprono il ssDNA, formando filamenti nucleoproteici. Le ricombinasi catalizzano l'invasione del cromatidio fratello. Il 3' spaiato del DNA invadente funge da *primer* ed innesca la sintesi del DNA, causando spiazzamento della sequenza complementare, che successivamente si annila al ssDNA generato dall'altra end dell'iniziale DSB. Risulta una struttura a *cross-strand exchange*, o giunzione di Holliday. I tetraedri sono spinti dalle ricombinasi sulla struttura a quattro *strands*. Il processo di *repair* può condurre a crossover (CO) o non-crossover (NCO) delle regioni fiancheggianti.

