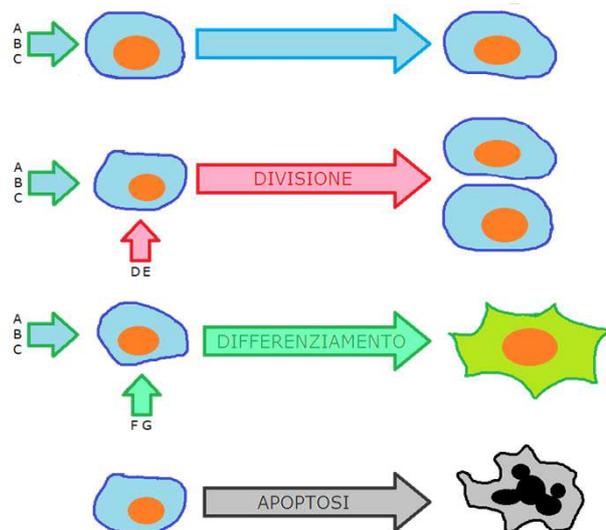
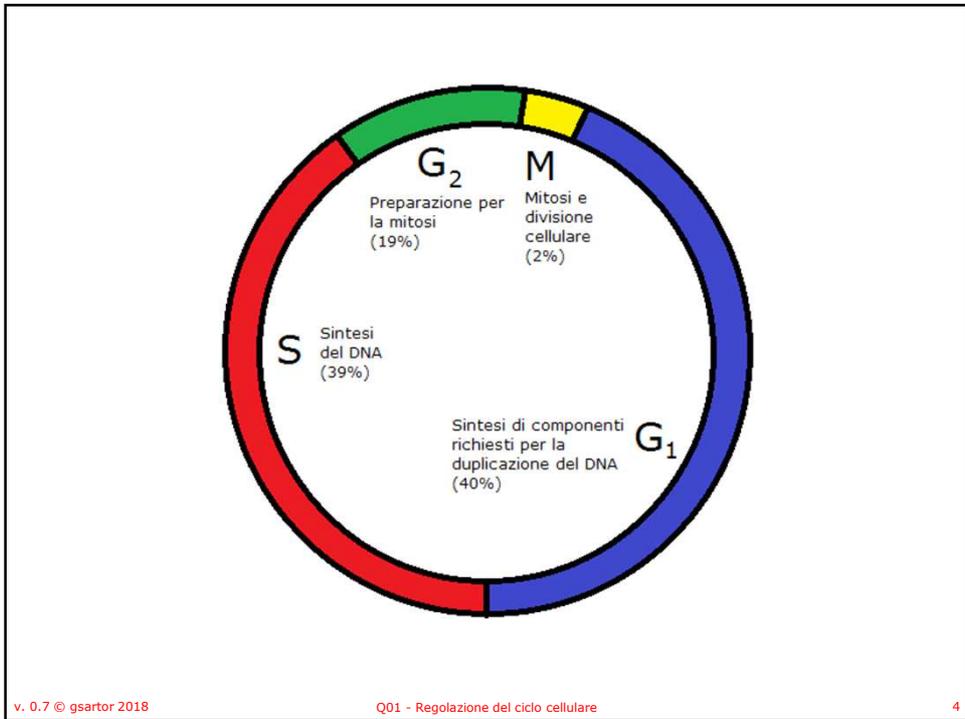
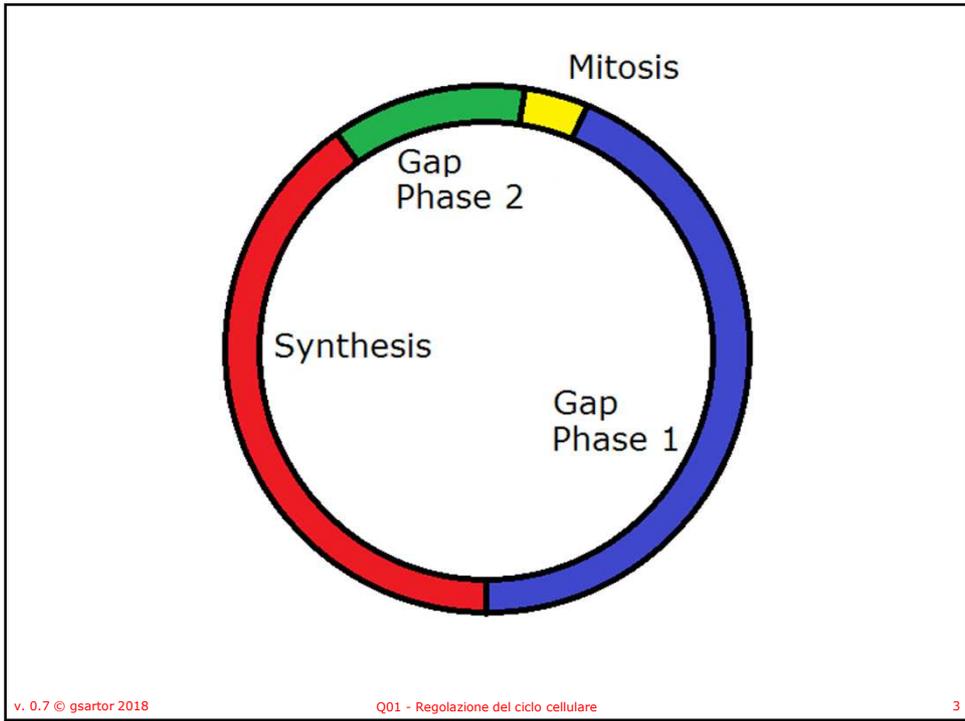
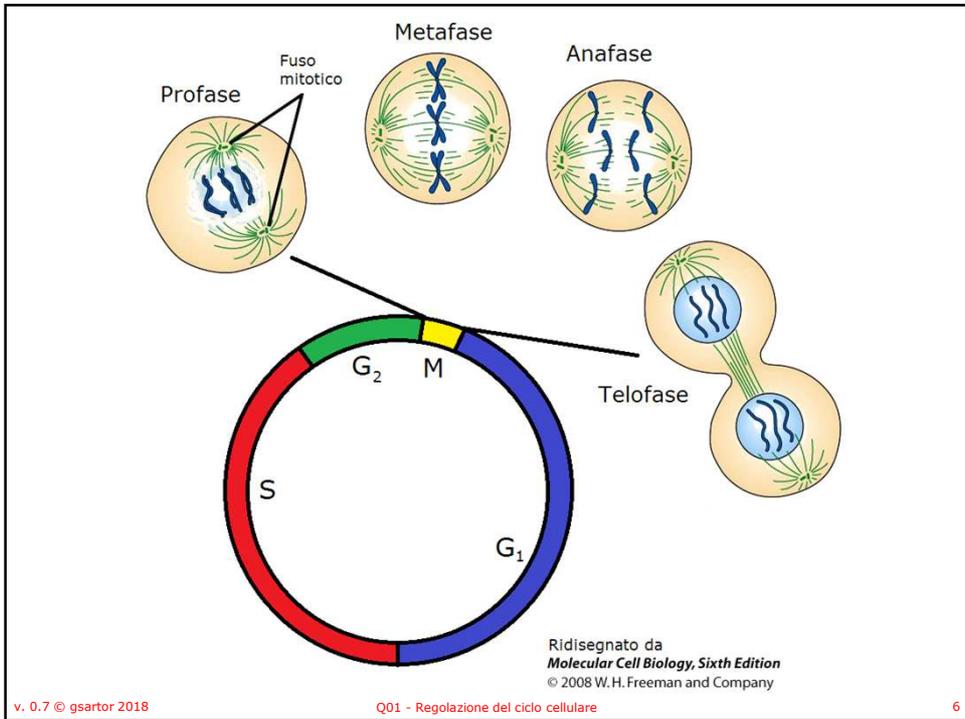
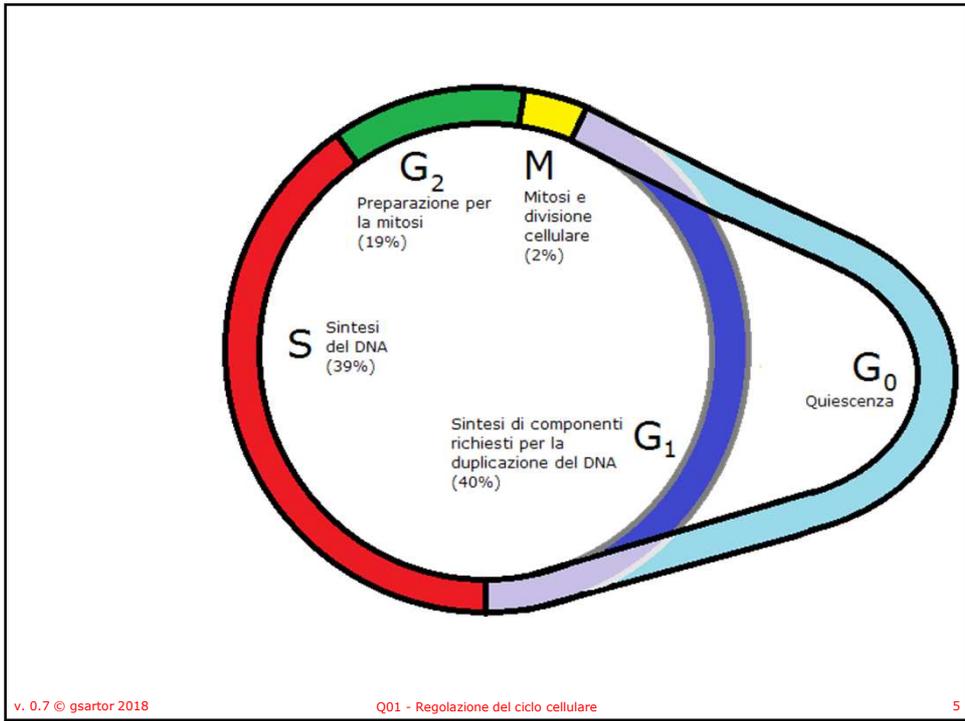


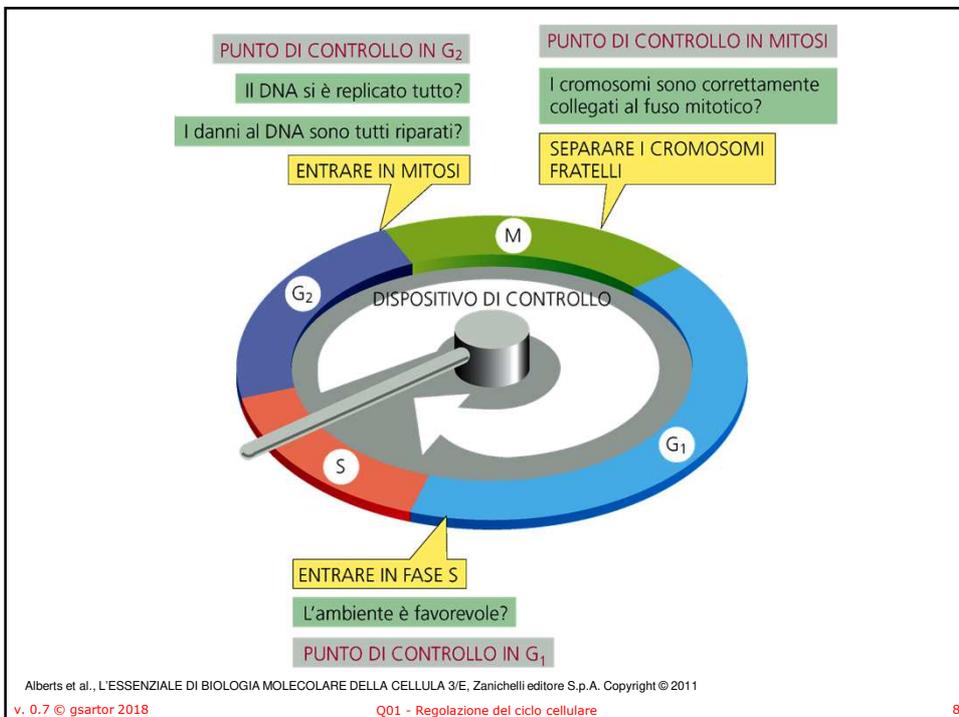
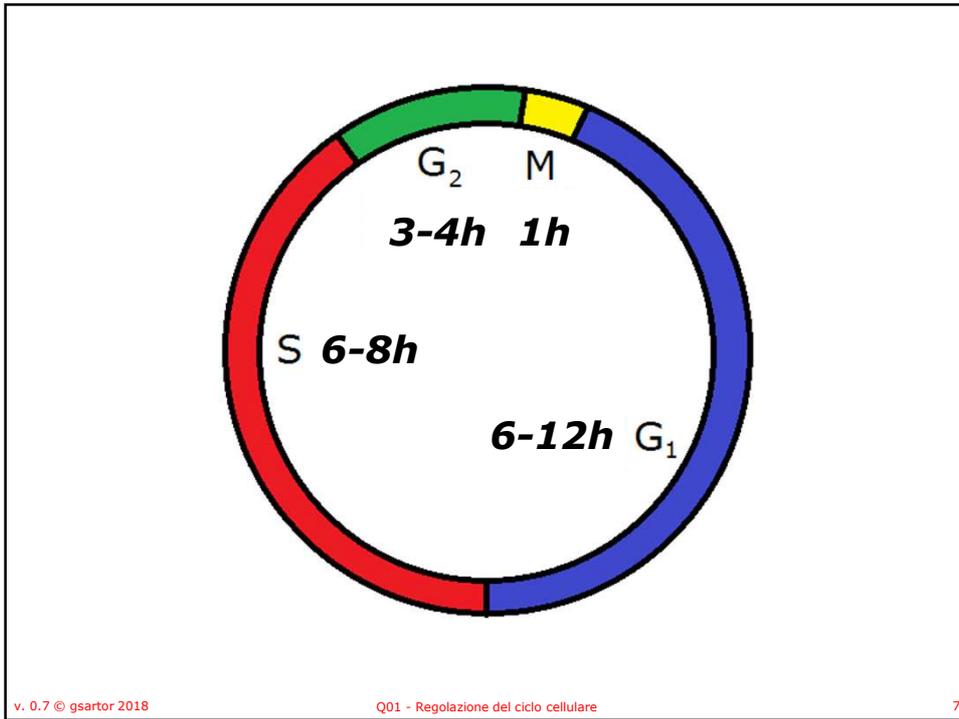


Quattro comportamenti di una cellula in risposta all'ambiente

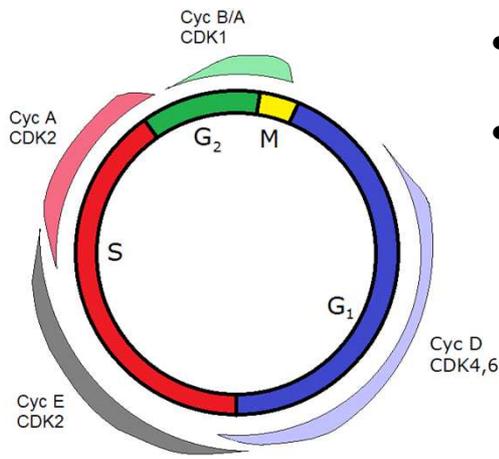








Controllo



- È un processo finemente regolato
- È guidato da 2 classi di molecole: le cicline e le Cyclin-dependent kinases (CDK) (serina-treonina kinasi) che fosforilano altre proteine.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

9

Mitotic cyclin-CDKs

Cyclin A-CDK1
Cyclin B-CDK1

S-phase cyclin-CDK
Cyclin A-CDK2

Mid-G₁ cyclin-CDKs
Cyclin D-CDK4
Cyclin D-CDK6

Late-G₁ cyclin-CDK
Cyclin E-CDK2

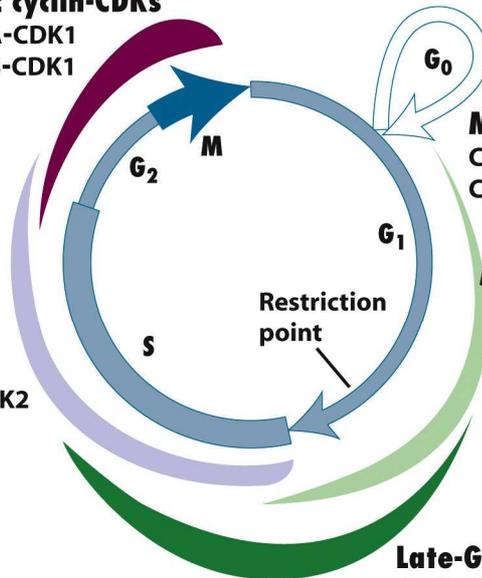


Figure 20-32
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

10

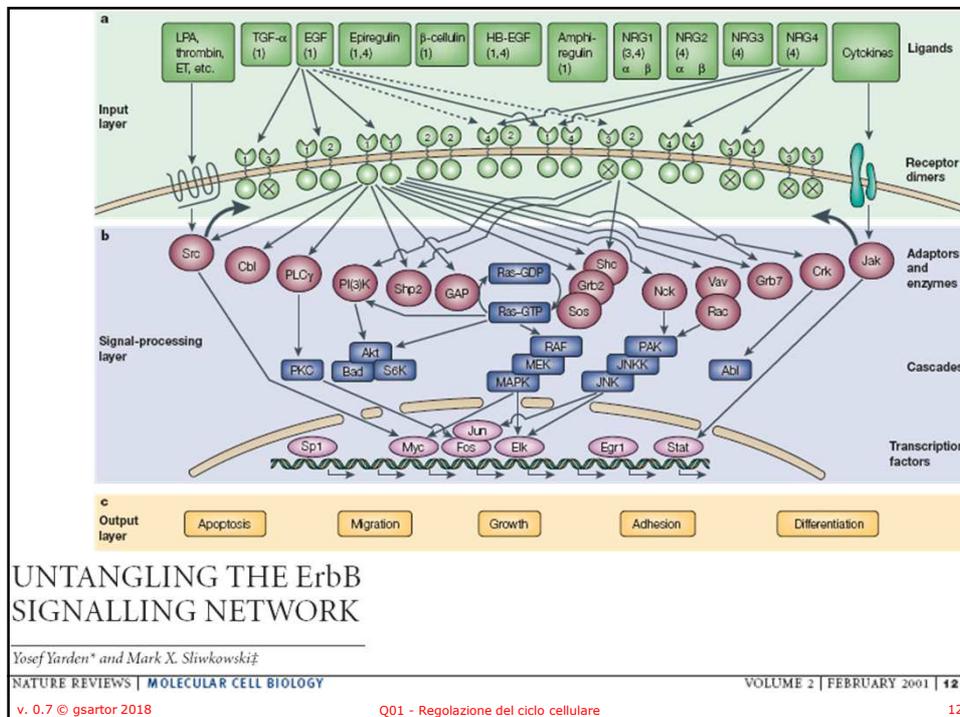
Regolazione

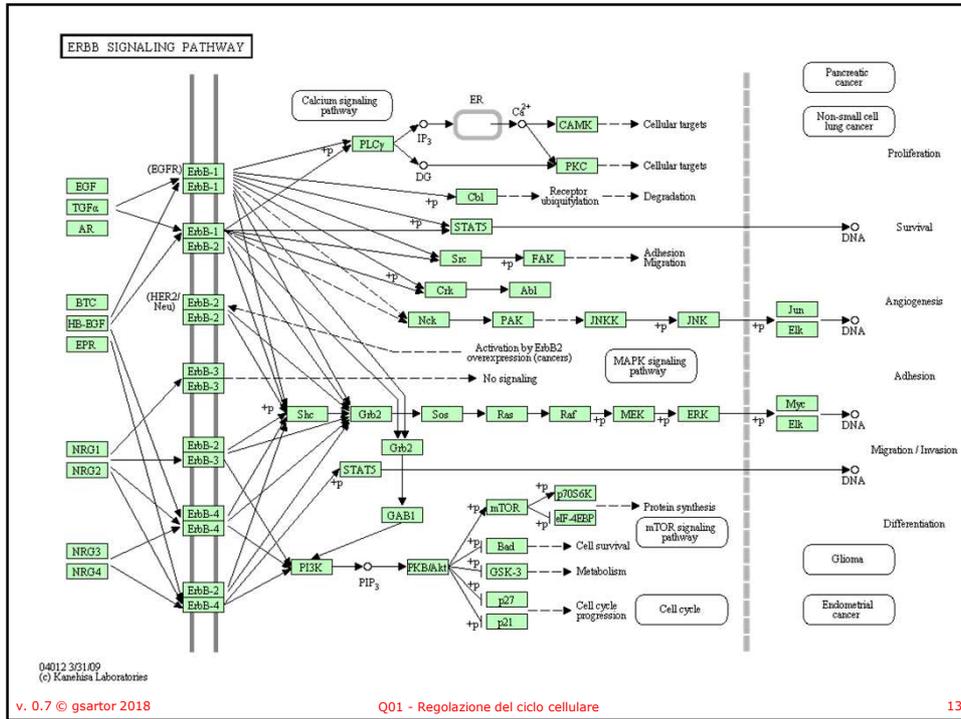
- Il processo si è evoluto negli organismi cellulari più complessi, una sola CDK (CDK1) dei lieviti, che deriva la sua specificità dal legame con diverse Cicline, è stata rimpiazzata da una famiglia di molecole fase-specifiche comprendente circa 20 CDK;
- Attraverso il legame CDK-Cicline si ha un controllo del ciclo cellulare attraverso diverse combinazioni, in cui le Cicline conferiscono la specificità del substrato e le CDK la funzione enzimatica necessaria per l'attivazione dei complessi;
- Il livello delle Cicline varia nelle fasi del ciclo cellulare mentre quello delle CDK rimane costante essendo la loro attività enzimatica ad essere accesa o spenta dal legame con le Cicline stesse;
- Il sistema CDK-Cicline fa da ponte tra il segnale mediato dai recettori di superficie a monte e i fattori trascrizionali a valle.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

11





Ciclina e CDK

TABLE 20-1 Selected Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)

ORGANISM / PROTEIN	NAME
S. POMBE	
CDK (one only)	Cdc2
Mitotic cyclin (one only)	Cdc13
S. CEREVISIAE	
CDK (one only)	Cdc28
Mid-G $_1$ cyclin	Cln3
Late-G $_1$ cyclins	Cln1, Cln2
Early S-phase cyclins	Clb5, Clb6
Late S-phase and early mitotic cyclins	Clb3, Clb4
Late mitotic cyclins	Clb1, Clb2

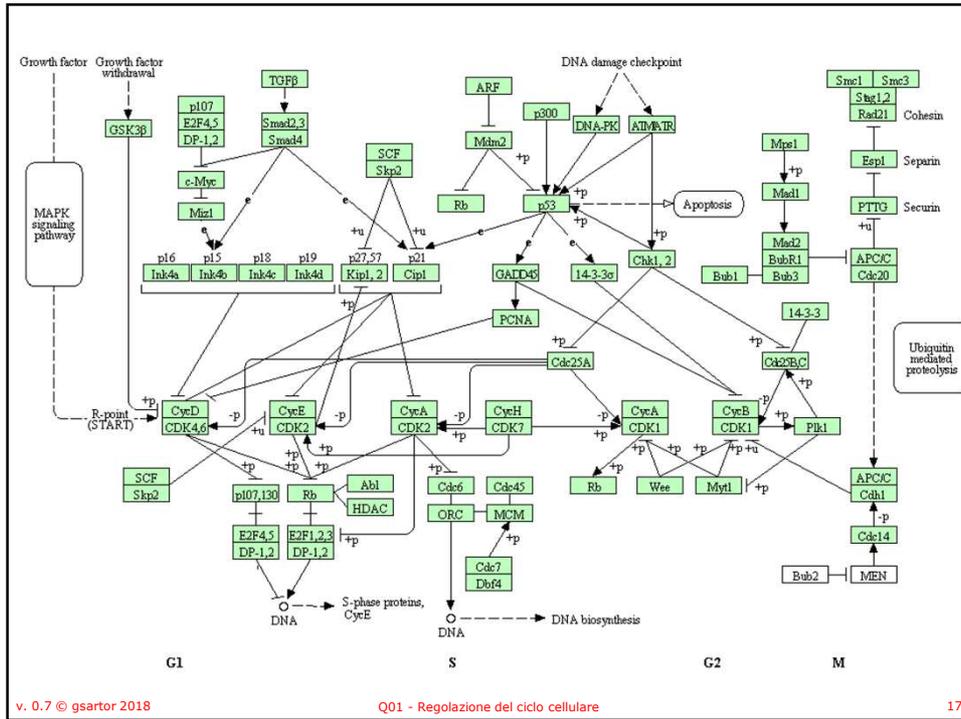
TABLE 20-1 Selected Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)

ORGANISM / PROTEIN	NAME
VERTEBRATES	
Mid-G $_1$ CDKs	CDK4, CDK6
Late-G $_1$ and S-phase CDK	CDK2
Mitotic CDKs	CDK1, CDK2
Mid-G $_1$ cyclins	D-type cyclins
Late-G $_1$ and S-phase cyclin	Cyclin E
S-phase and mitotic cyclin	Cyclin A
Mitotic cyclins	Cyclin A, Cyclin B

NOTE: Those cyclins and CDKs discussed in this chapter are listed and classified by the period in the cell cycle in which they function. A heterodimer composed of a mitotic cyclin and CDK is commonly referred to as a *mitosis-promoting factor (MPF)*.

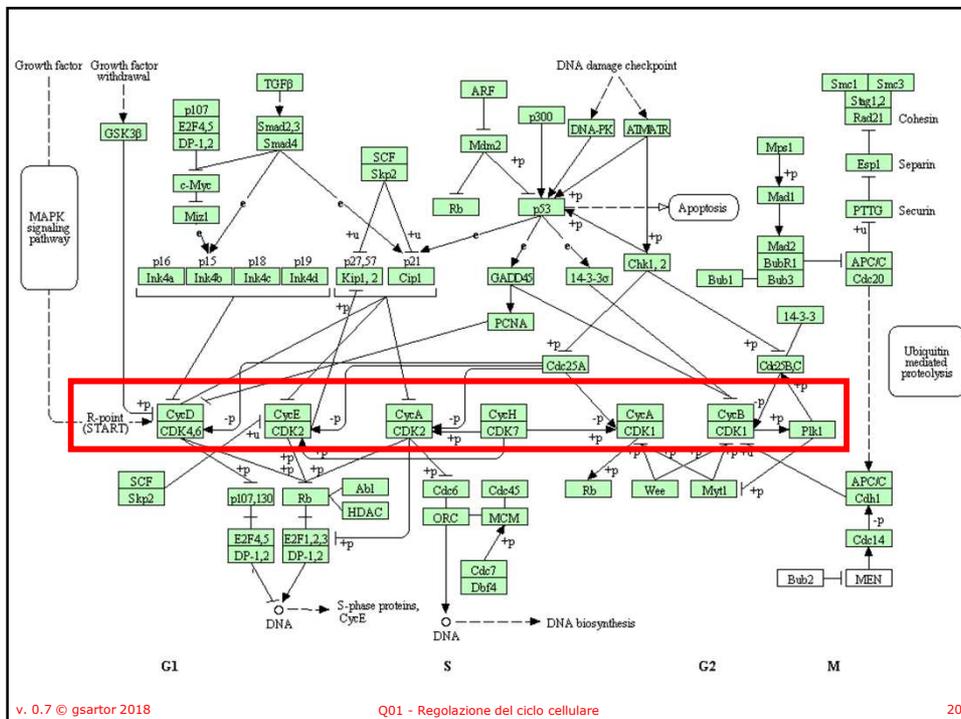
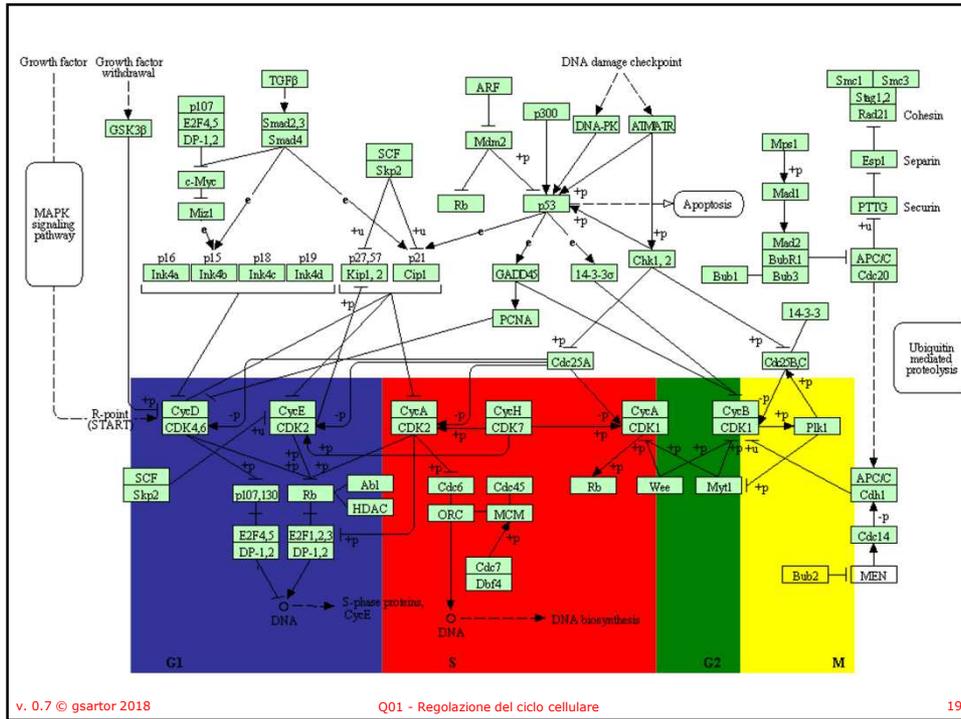
NOTE: Those cyclins and CDKs discussed in this chapter are listed and classified by the period in the cell cycle in which they function. A heterodimer composed of a mitotic cyclin and CDK is commonly referred to as a *mitosis-promoting factor (MPF)*.
Table 20-1 part 1
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Table 20-1 part 2
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

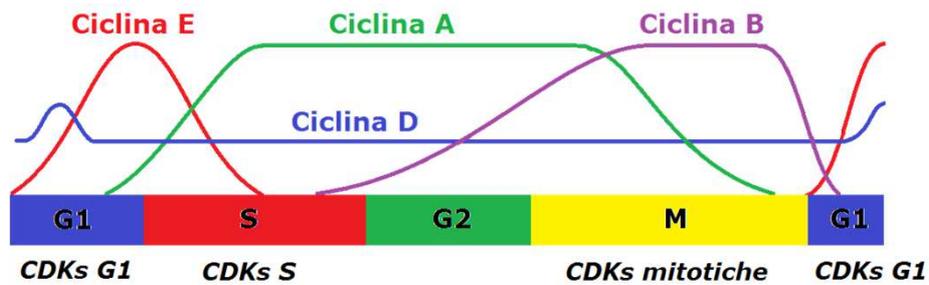


Ciclina e CDK

CDK	Ciclina	Funzione
CDC2 (CDK1)	Ciclina B	Fase M
CDK2	Ciclina E	Fase G1, partenze di Fase S
CDK2	Ciclina A	Progressione Fase S
CDK1	Ciclina A	Progressione Fase G2
CDK3	?	G1 (?)
CDK4	Ciclina D	Progressione Fase G1
CDK5	p35	Differenziazione Neuronale
CDK6	Ciclina D	Progressione Fase G1
CDK7 (MO15)	Ciclina H	CAK, trascrizione
CDK8	Ciclina C	Trascrizione
?	Ciclina F	Fase G2 o Fase S (?)
?	Ciclina G	?



Complessi CDK-Ciclina



v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

21

- In fase G1 precoce CDK4/6 sono attivate dalle Cicline D e iniziano la fosforilazione delle proteine del pRb;
- Ciò comporta il rilascio dei fattori di trascrizione E2F cui consegue l'attivazione e la trascrizione dei geni responsivi richiesti per la progressione del ciclo cellulare, incluse le Cicline E ed A.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

22

Retinoblastoma protein (pRb, RB, Rb o RB1)

- La proteina retinoblastoma è una "tumor suppressor protein".
- Una funzione di pRb consiste nell'inibire la progressione del ciclo cellulare fino a quando la cellula non sia pronta per la divisione
- Si lega ad enzimi che modellano la cromatina (metilasi, acetilasi e deacetilasi)
- pRb appartiene alla famiglia delle "pocket protein family" che consiste in proteine che possiedono una tasca per il legame ad altre proteine.

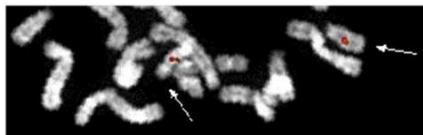
v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

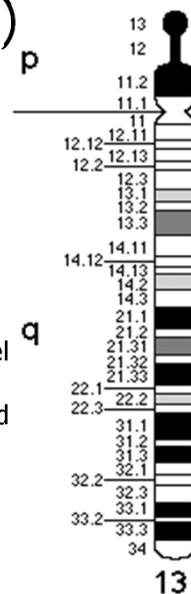
23

Retinoblastoma protein (pRb, RB, Rb o RB1)

- Nell'uomo la proteina è codificata dal gene RB1 nel cromosoma 13 (13q14.1-q14.2).



- Se entrambi gli alleli del gene sono mutati la proteina è inattivata e ciò porta allo sviluppo del retinoblastoma: le cellule della retina non sono rimosse o rimpiazzate e sono quindi soggette ad alti livelli di mutazioni da parte di UV.
- Sono documentati casi anche in alcuni tumori della pelle di pazienti in Nuova Zelanda dove la radiazione UV è significativamente maggiore.



v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

24

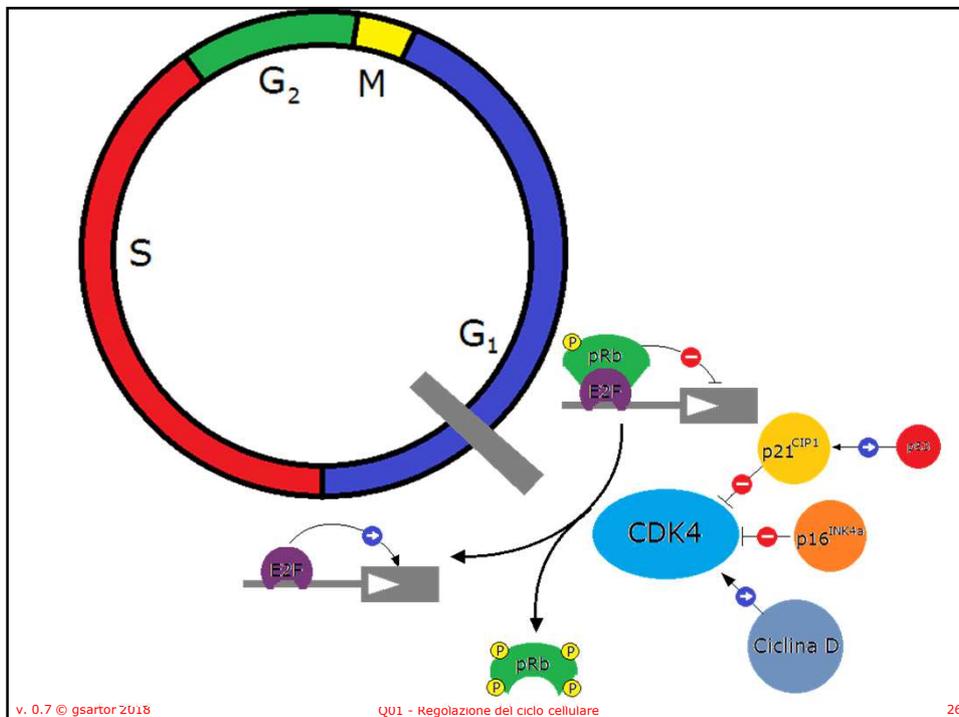
Retinoblastoma protein (pRb, RB o RB1)

- La funzione di pRb è quella di prevenire la progressione nel ciclo (da G1 a S) di cellule con DNA danneggiato;
- pRb lega ed inibisce i fattori di trascrizione della famiglia E2F composti di eterodimeri E2F e DP (dimerization partner);
- I complessi E2F-DP attivati spingono la cellula nella fase S mentre se sono inattivati da pRb la cellula rimane in fase G1;
- Il complesso pRb-E2F/DP è inoltre coinvolto nell'interazione dell'istone deacetilasi con la cromatina riducendo la trascrizione di promotori coinvolti nel passaggio in fase S riducendo ulteriormente la sintesi del DNA.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

25



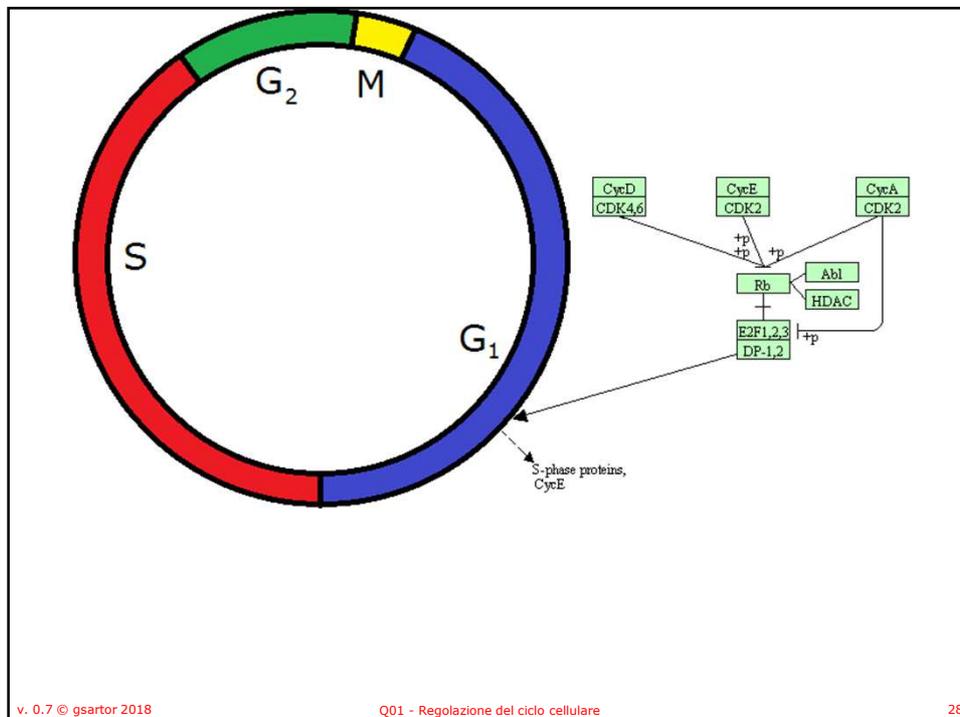
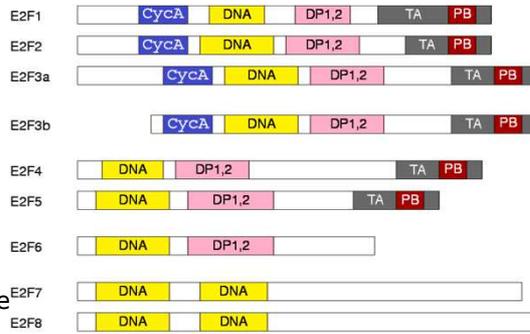
v. 0.7 © gsartor 2018

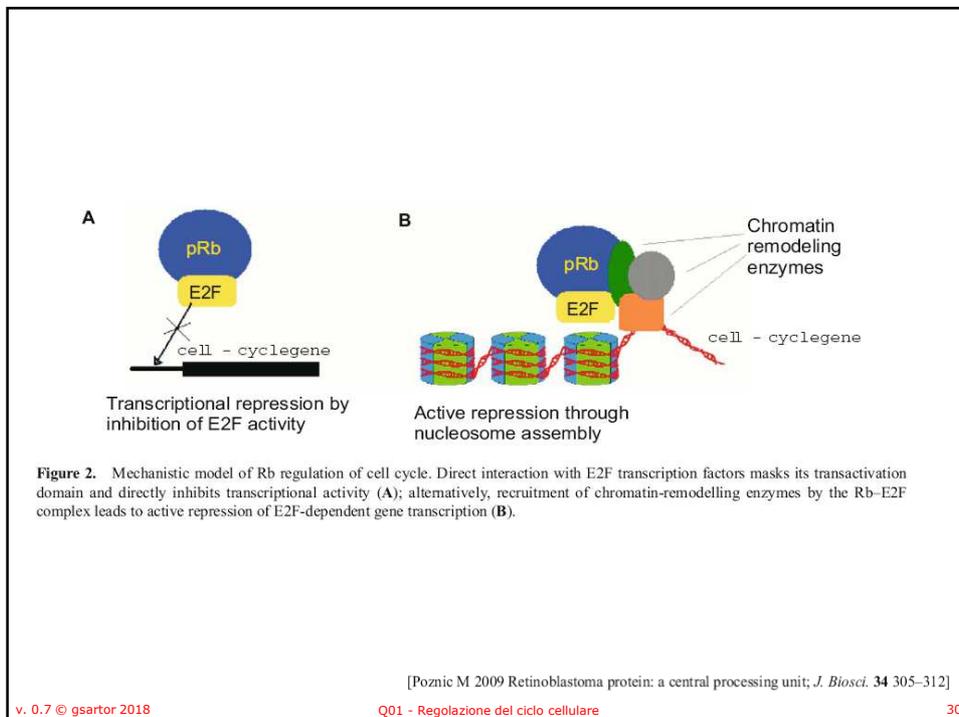
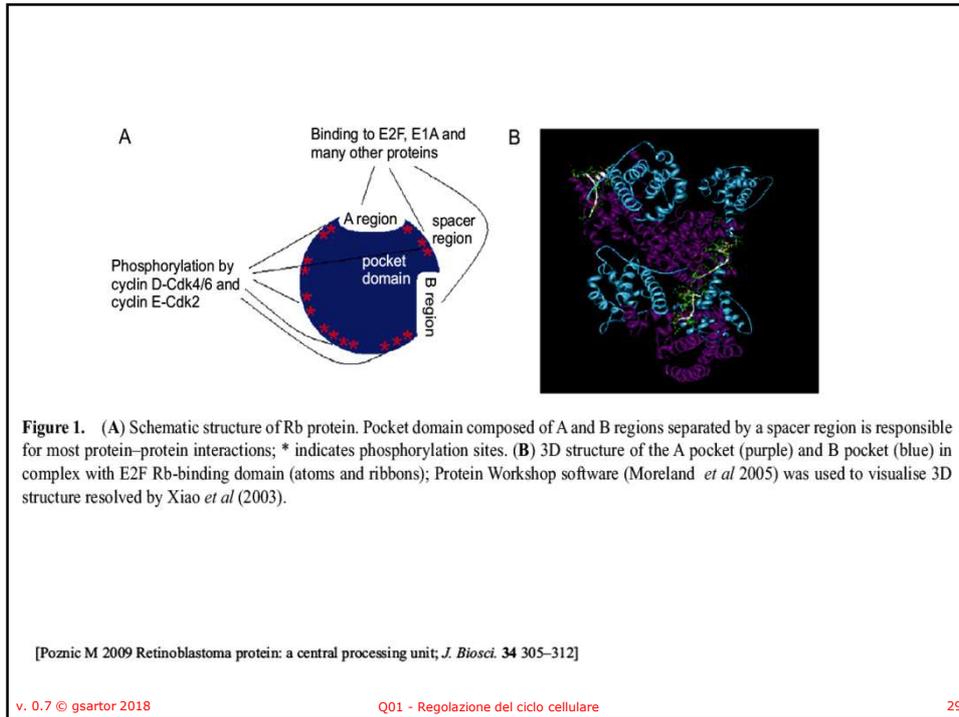
Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

26

E2F

- Fattori di trascrizione che legano la sequenza TTTCCCGC (o varianti)
 - **CycA**: dominio di legame della Ciclina A
 - **DNA**: dominio di legame al DNA
 - **DP1,2**: dominio di dimerizzazione con DP1 e DP2
 - **TA**: dominio di attivazione trascrizionale
 - **PB**: dominio di legame della pocket protein (pRb).





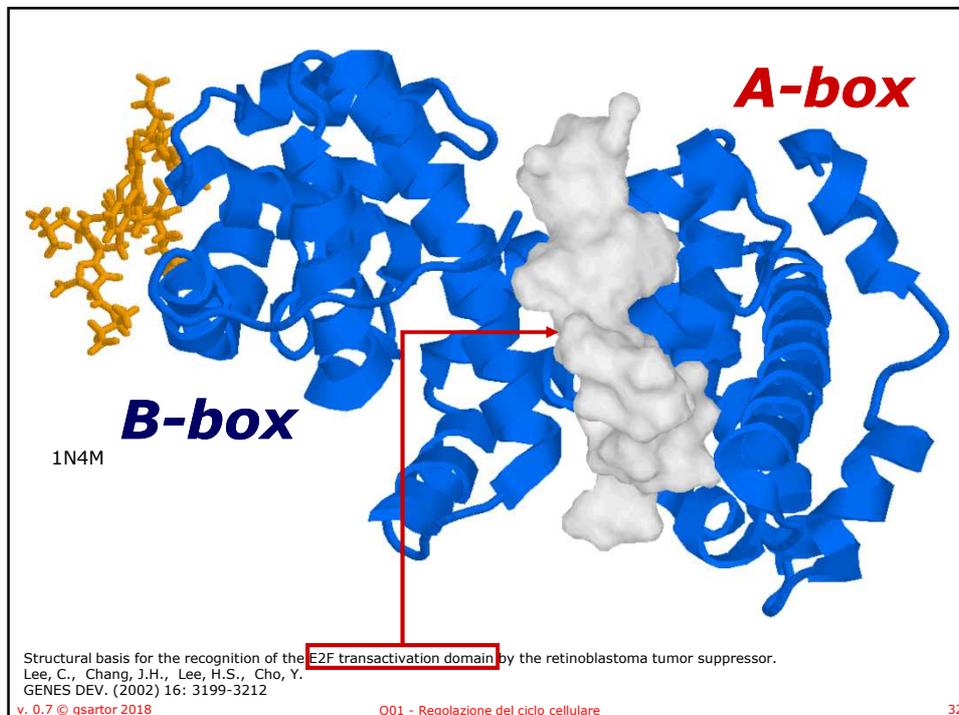
Funzionamento di pRb

- La proteina presenta un "pocket domain" composto di due regioni: A-box e B-box;
- Il cristallo del "pocket domain" di pRb complessato con il peptide di 18 AA del dominio di transattivazione di E2F-2 mostra che esso si lega nell'interfaccia altamente conservata tra A-box e B-box.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

31



v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

32

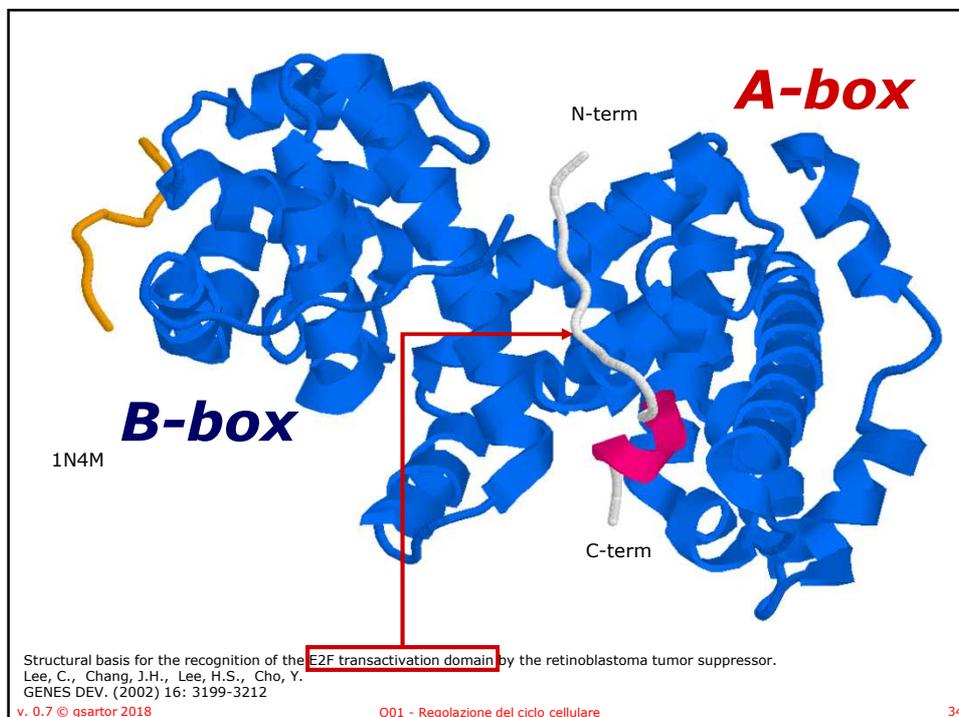
Funzionamento di pRb

- Il segmento N-terminale del peptide E2F-2 è in una struttura estesa simile a un β -strand che interagisce con le α -eliche del solco all'interfaccia A-B;
- Il segmento C-terminale del peptide contiene un'elica 3^{10} che si lega alle eliche di A-box
- La flessibilità della porzione mediana del peptide di transattivazione di E2F-2 (Gly) è essenziale per il legame di E2F al Rb pocket.
- Il legame di pRb al peptide di E2F-2 nasconde diversi residui conservati di E2F che sono cruciali per l'attivazione della trascrizione.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

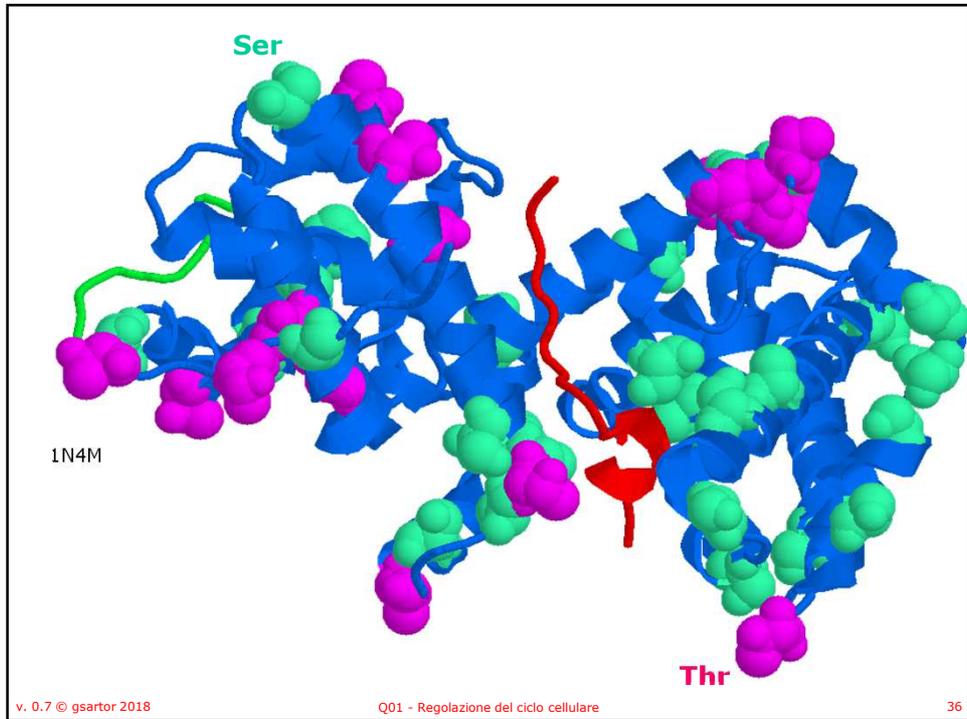
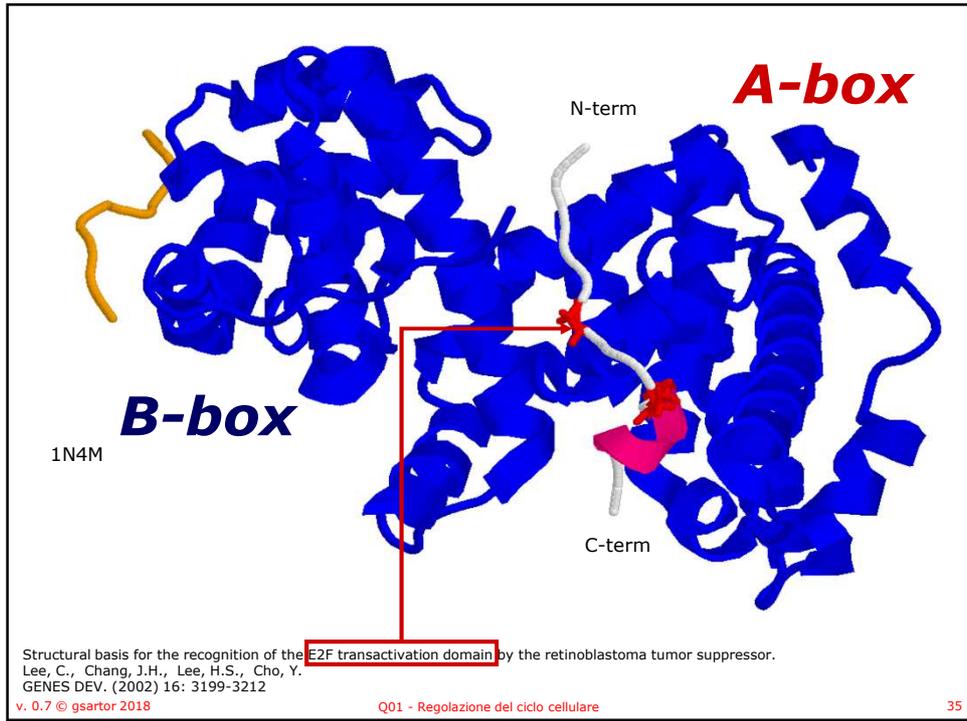
33

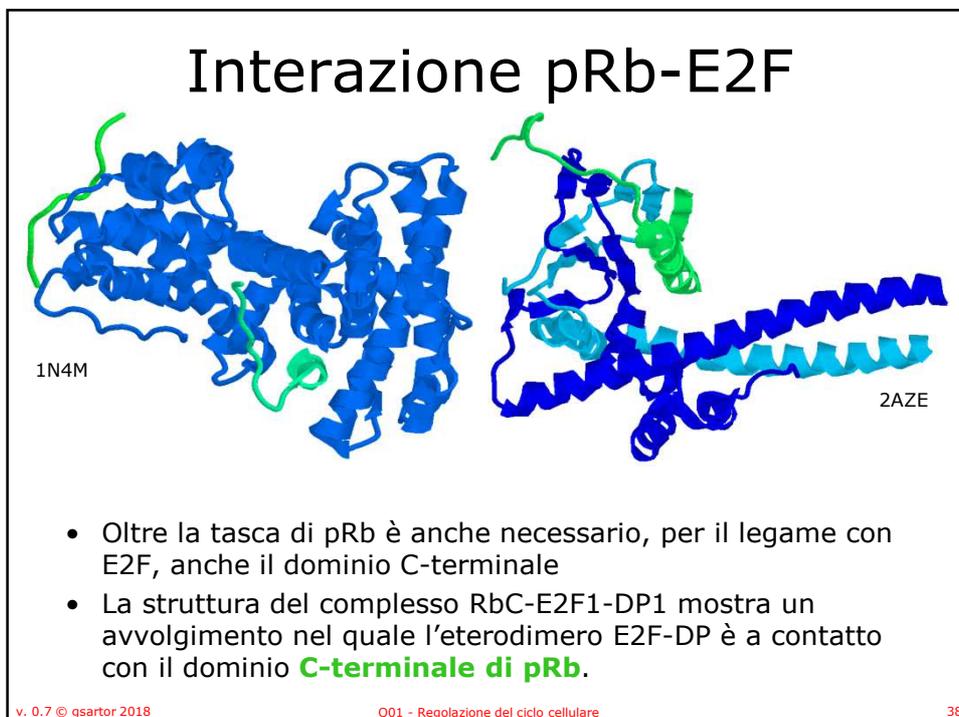
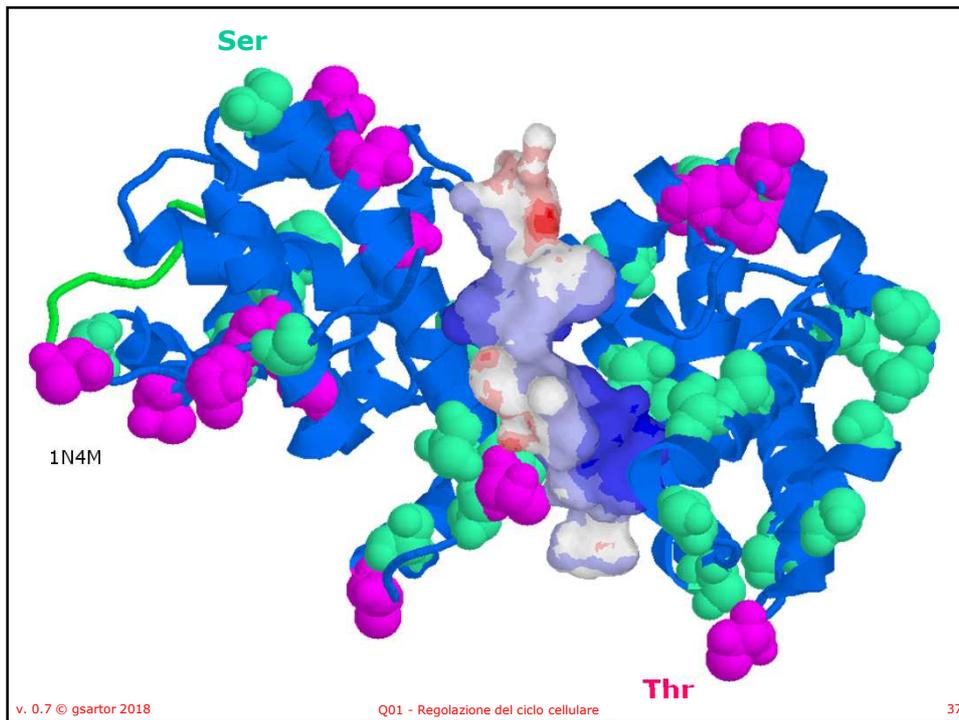


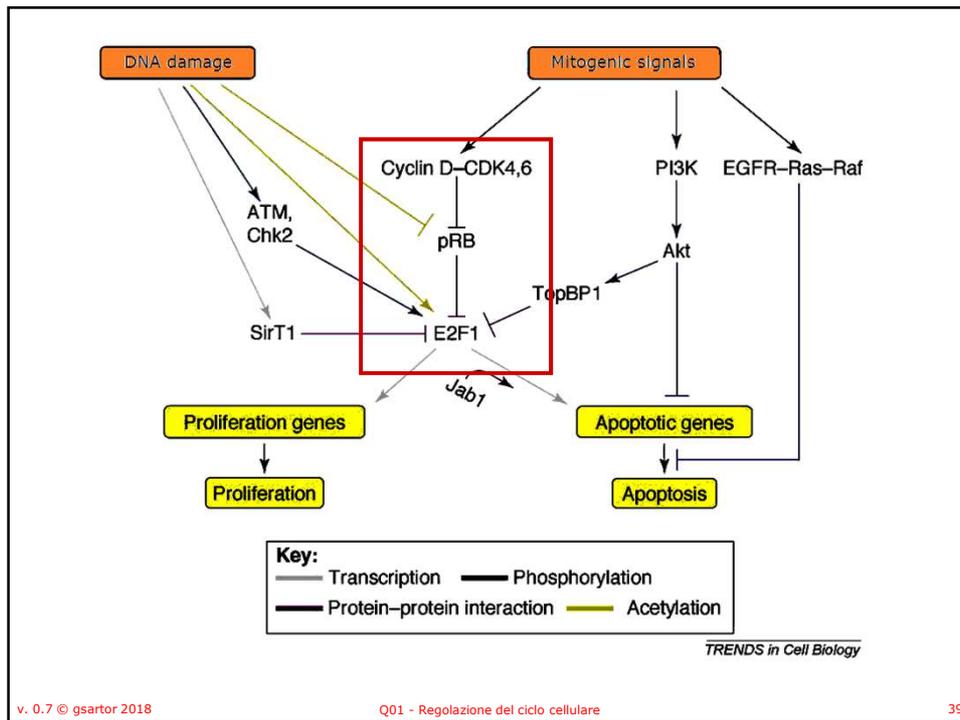
v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

34

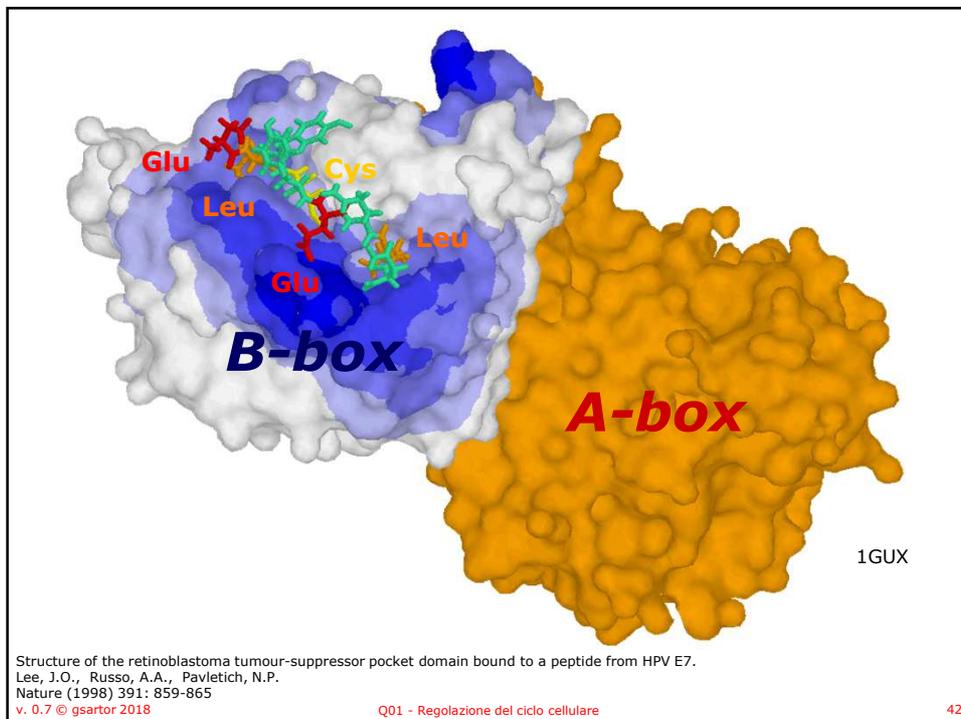
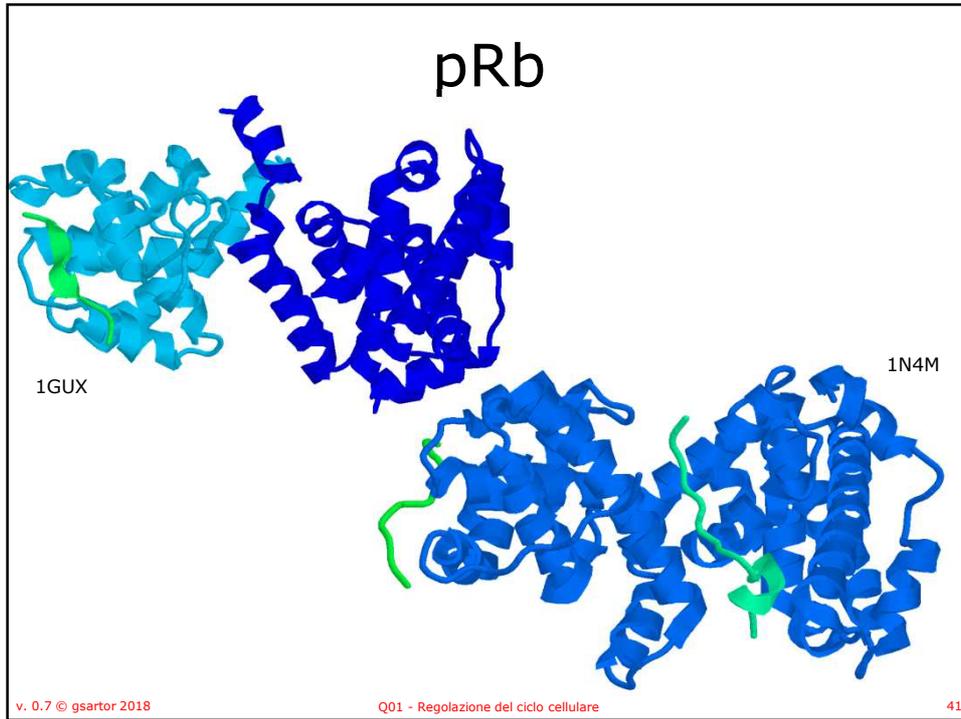


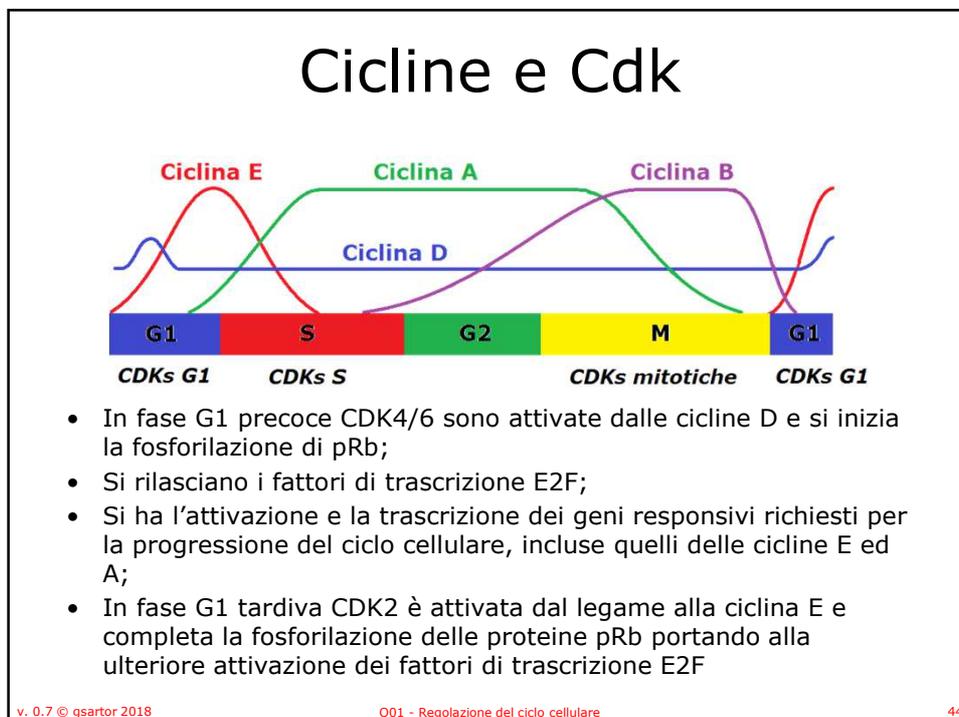
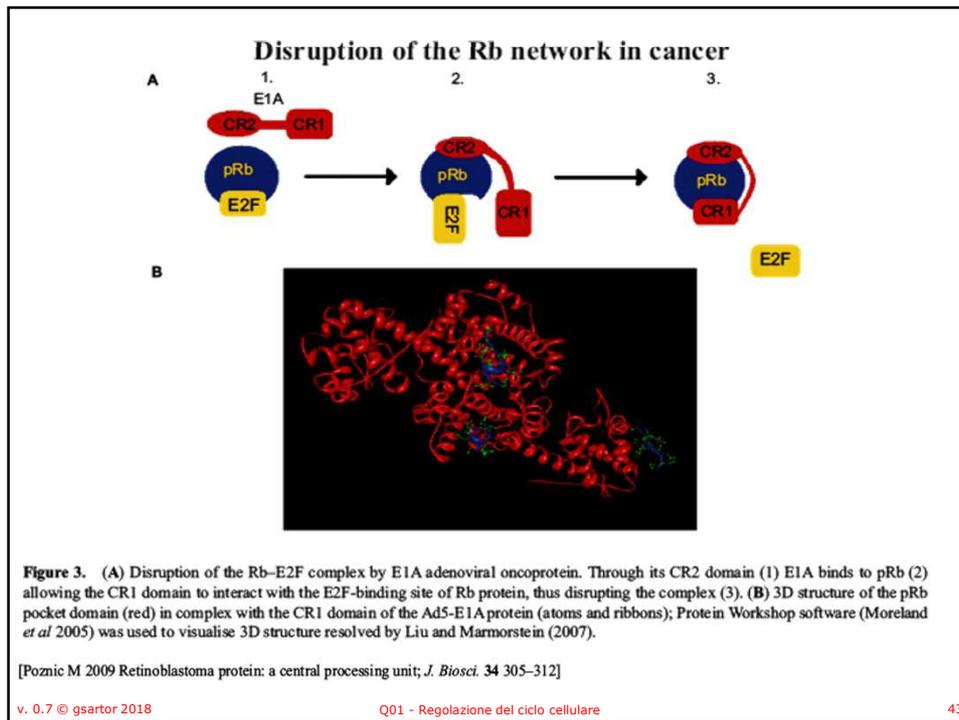




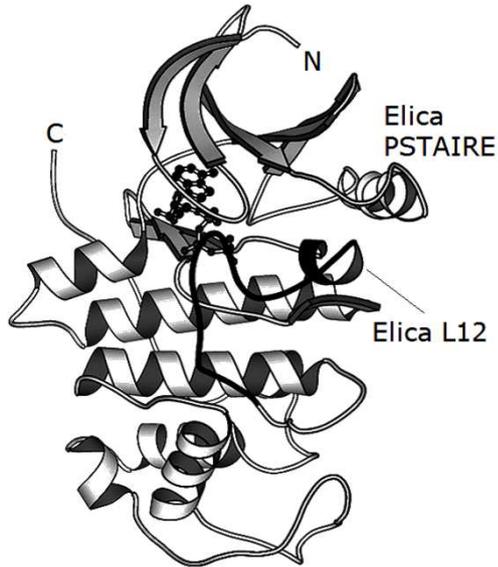
Funzionamento di pRb

- Molte proteine virali (*Papilloma virus*) e cellulari che inattivano pRb legando la regione B-box attraverso una sequenza LxCxE;
- La struttura del "pocket domain" di pRb, legato ad un nonapeptide che contiene il motivo LxCxE, (1GUX) dimostra che il peptide lega una sequenza altamente conservata che genera un solco in B-box;
- Il dominio A-box sembra essere anche necessario per la stabilizzazione di B-box.





Cdk2-Ciclina A



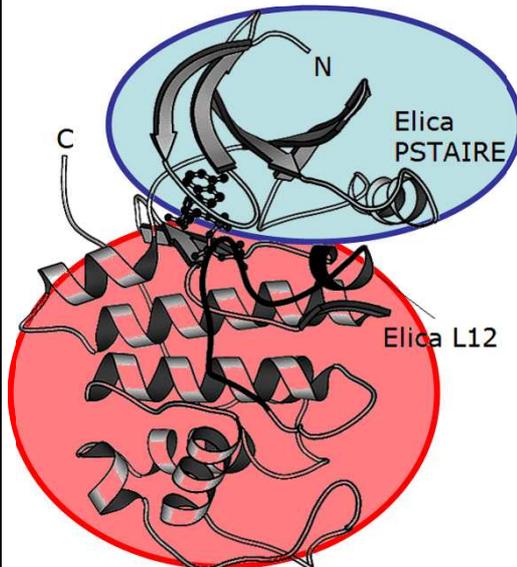
- La CDK2 possiede due domini:
 - Dominio **amminoternale**, costituito da una singola α -elica e da un foglietto β , a 5 filamenti. L' α -elica contiene una sequenza di sei residui (Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu), elica PSTAIRE.
 - uno più grande formato da **α -eliche**, possiede una regione flessibile (**T loop**) contenente un residuo di treonina, Thr160 fosforilato nella CDK attiva.
- L'ATP è legato in una fenditura tra i 2 domini.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

45

Cdk2-Ciclina A



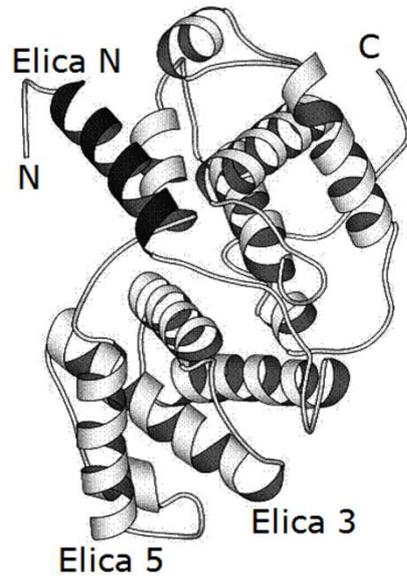
- La CDK2 possiede due domini:
 - Dominio **amminoternale**, costituito da una singola α -elica e da un foglietto β , a 5 filamenti. L' α -elica contiene una sequenza di sei residui (Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu), elica PSTAIRE.
 - uno più grande formato da **α -eliche**, possiede una regione flessibile (**T loop**) contenente un residuo di treonina, Thr160 fosforilato nella CDK attiva.
- L'ATP è legato in una fenditura tra i 2 domini.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

46

Cdk2-Ciclina A



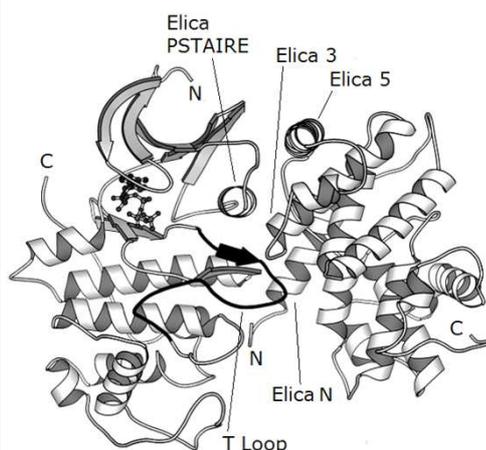
- Il frammento della ciclina A (173-432) è costituito da due domini, caratterizzati dalla presenza di α -eliche, questo frammento è in grado di attivare la CDK2.
- Il primo dominio possiede una sequenza *box* fortemente conservata in tutte le cicline.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

47

Cdk2-Ciclina A



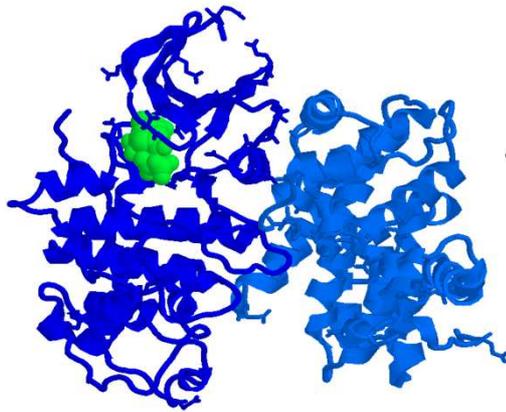
- Nel complesso ciclina A-CDK2, la sequenza della ciclina interagisce con la CDK2, principalmente con l'elica PSTAIRE ed il loop T;
- La struttura della ciclina A all'interno del complesso non subisce modificazioni rispetto alla molecola isolata, mentre la struttura dell'CDK2 è soggetta a cambiamenti conformazionali rilevanti. L'intero dominio N-terminale presenta un'orientamento diverso rispetto al C-terminale.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

48

Cdk2-Ciclina A



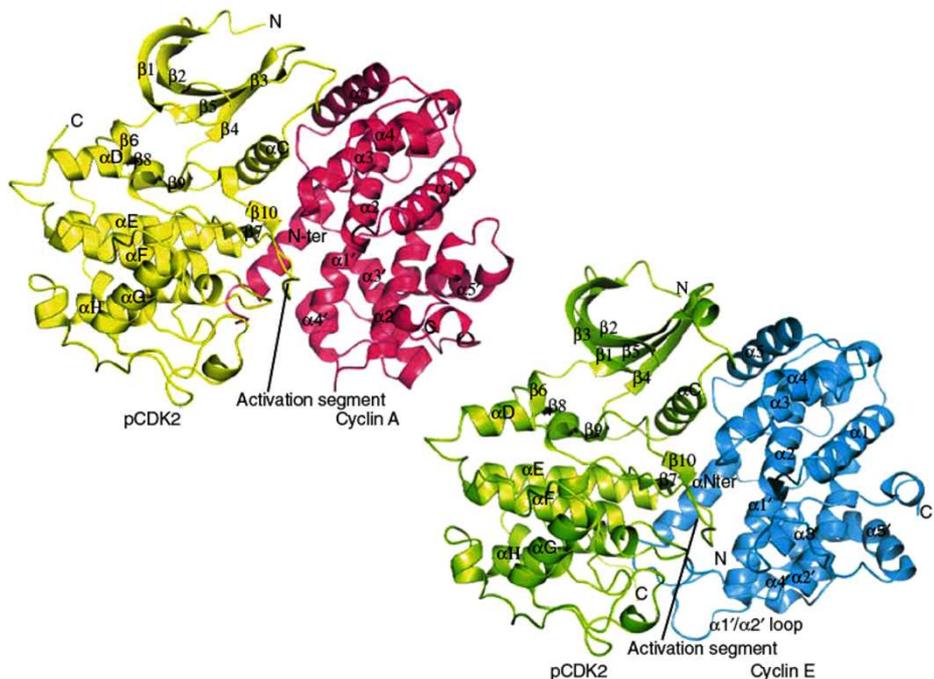
1FIN

- Nel complesso ciclina A-Cdk2, la sequenza della ciclina interagisce con la Cdk2, principalmente con l'elica PSTAIRE ed il loop T;
- La struttura della ciclina A all'interno del complesso non subisce modificazioni rispetto alla molecola isolata, mentre la struttura dell Cdk2 e' soggetta a cambiamenti conformazionali rilevanti. L'intero dominio N-terminale presenta un'orientamento diverso rispetto al C-terminale.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

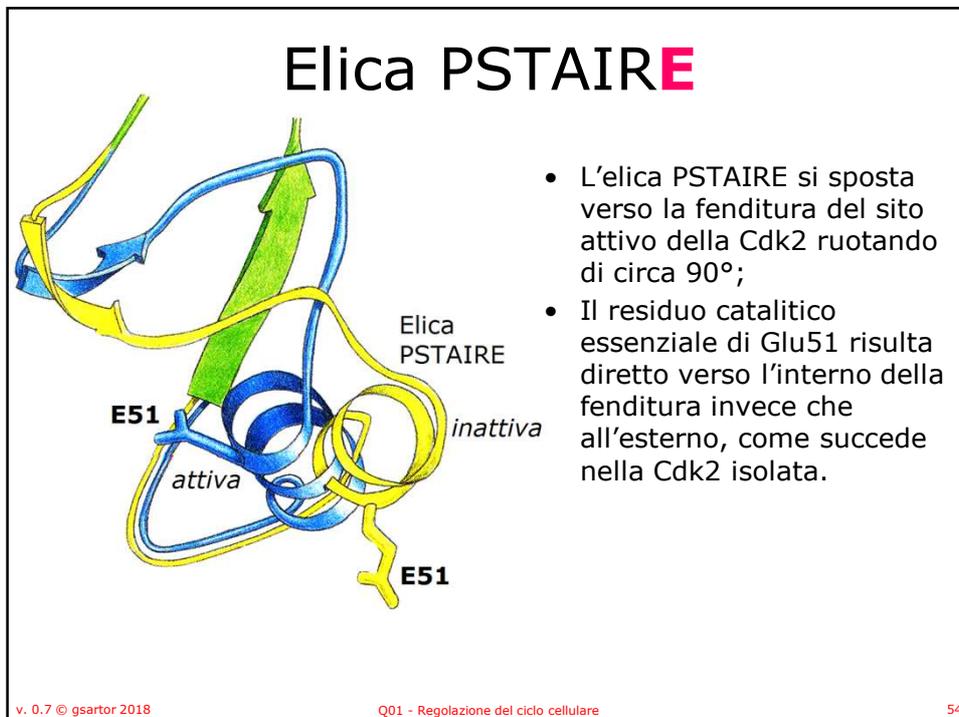
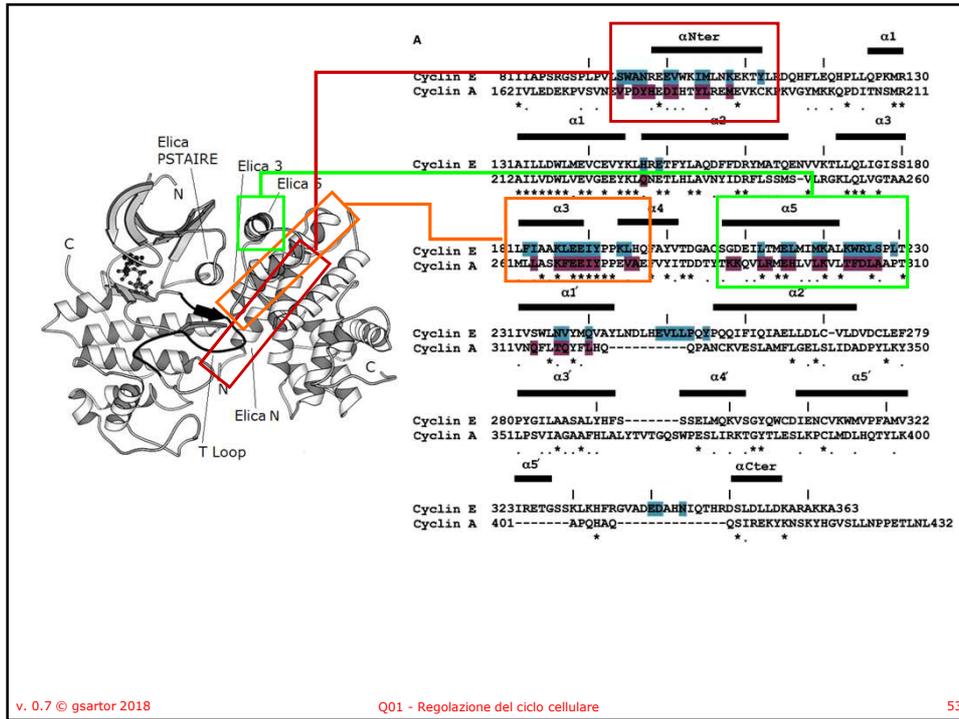
49

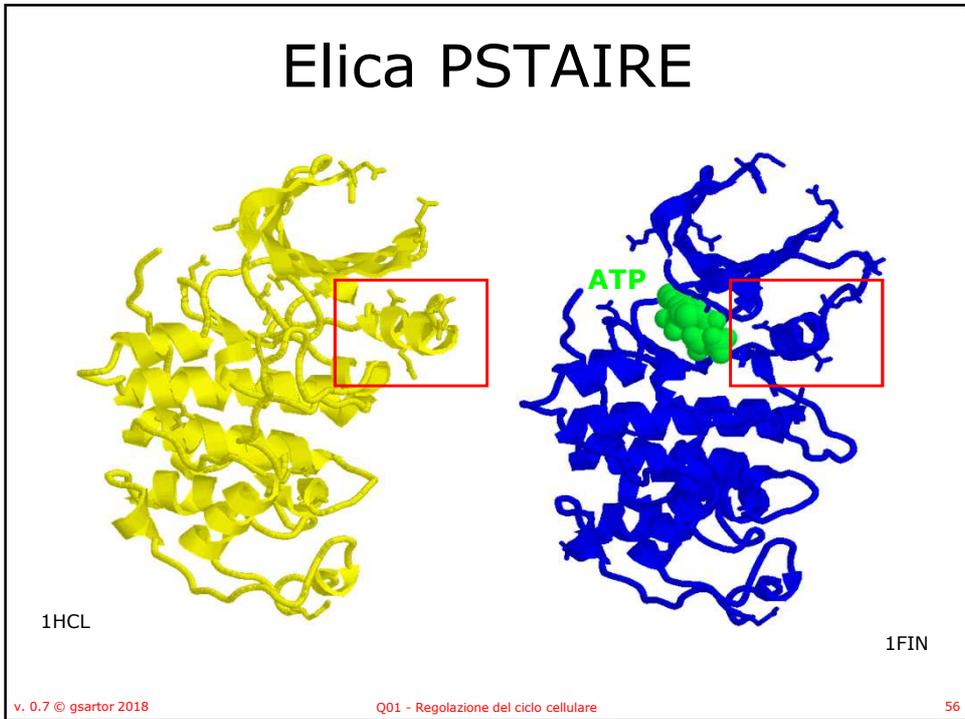
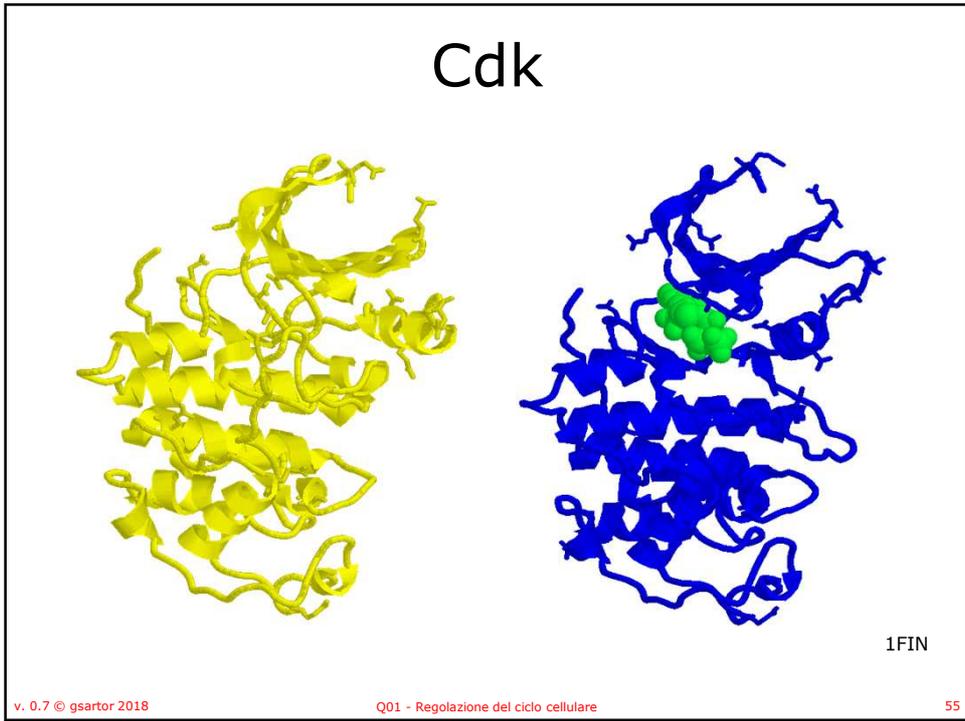


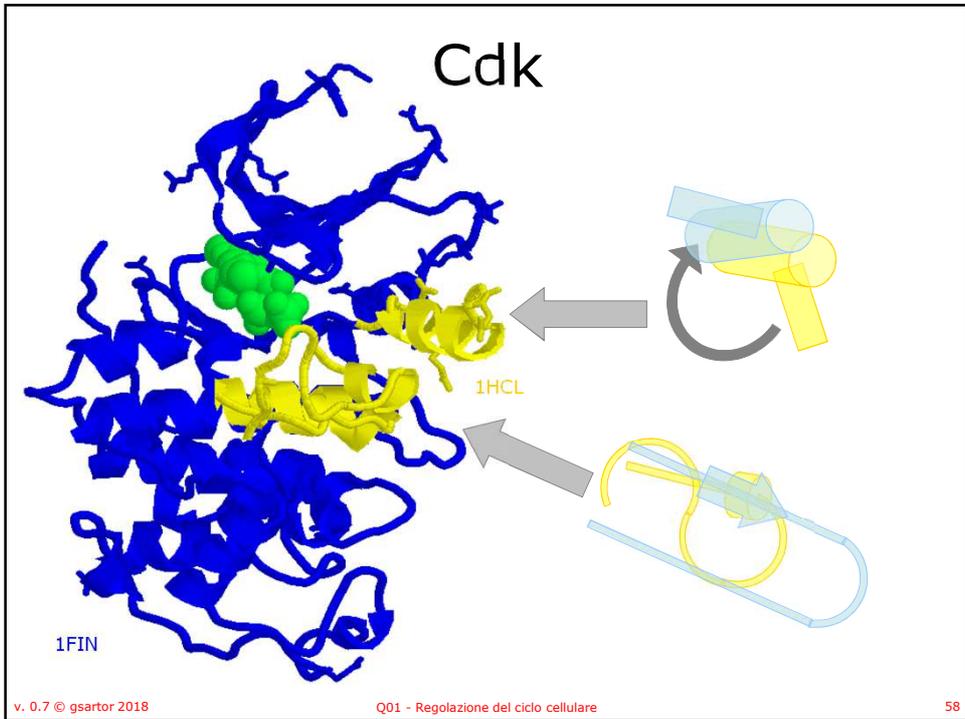
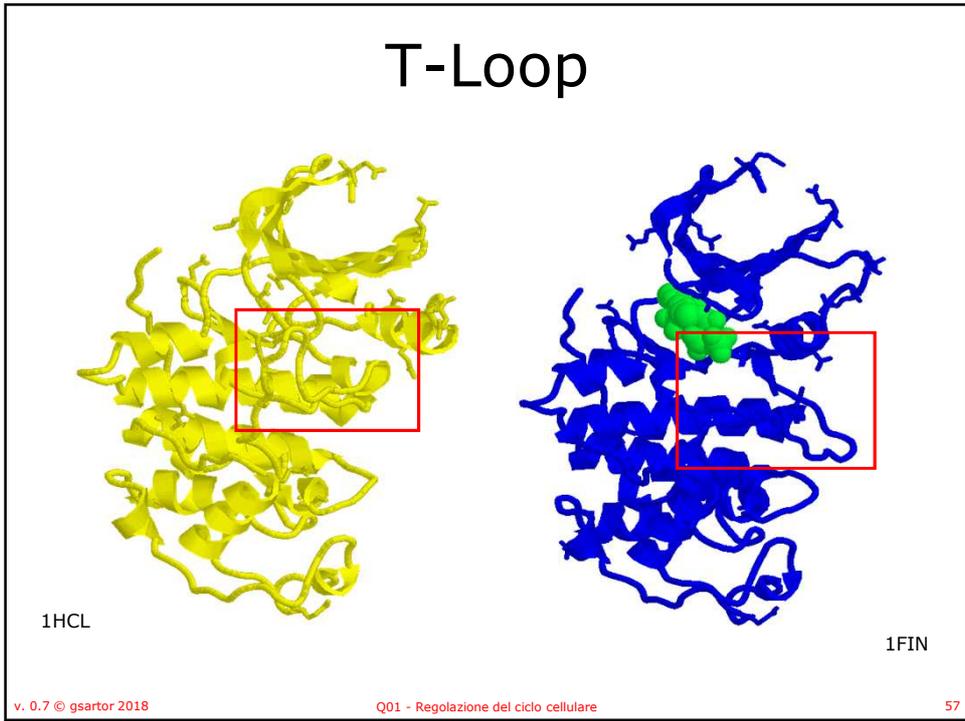
v. 0.7 © gsartor 2018

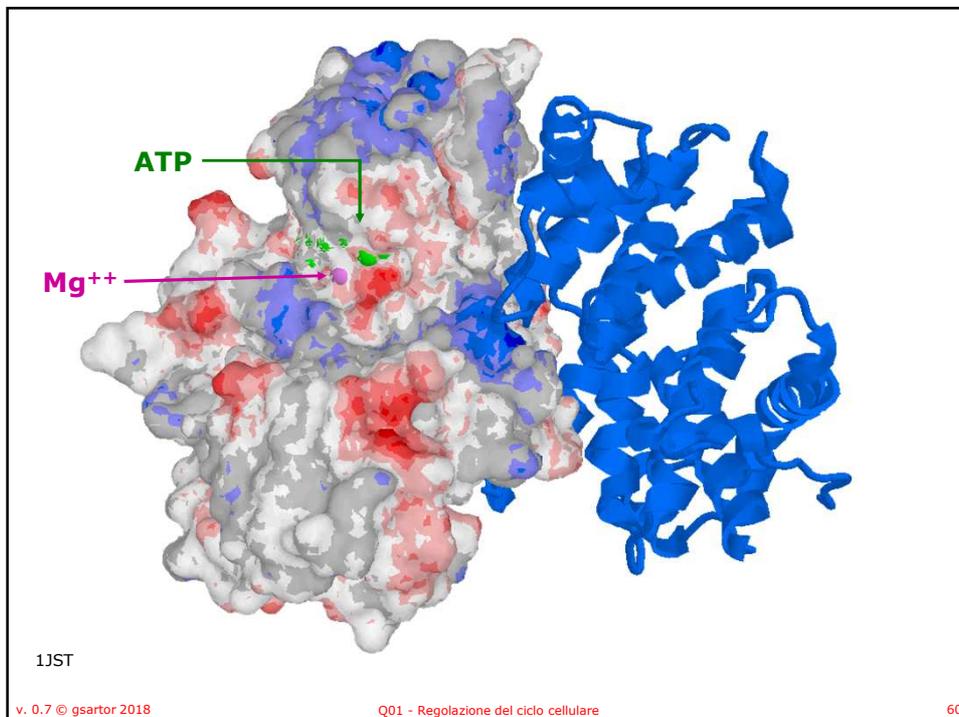
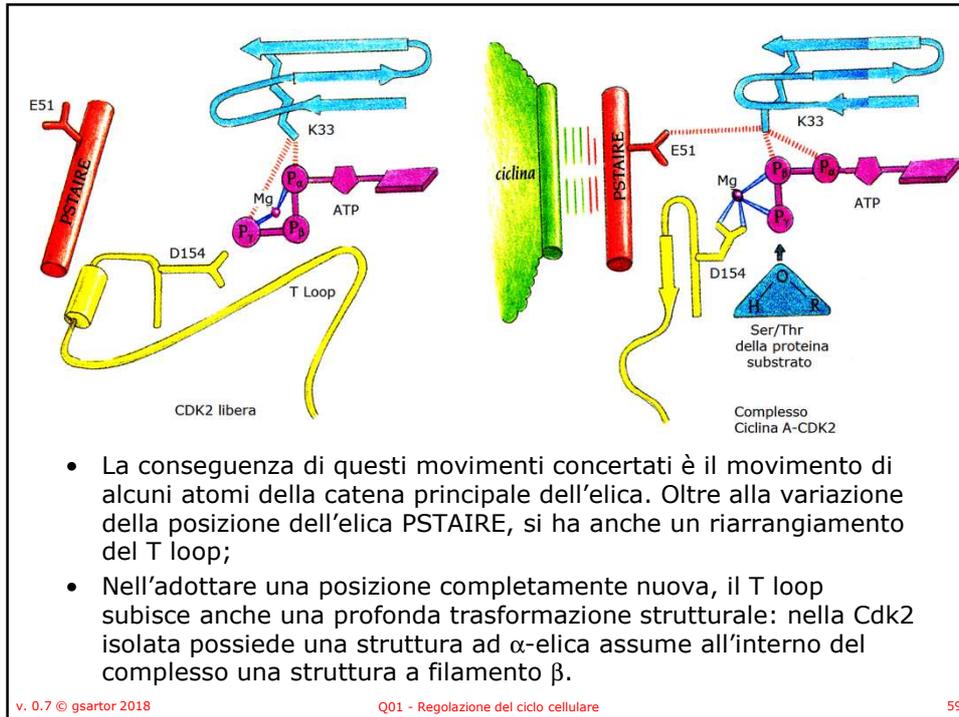
Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

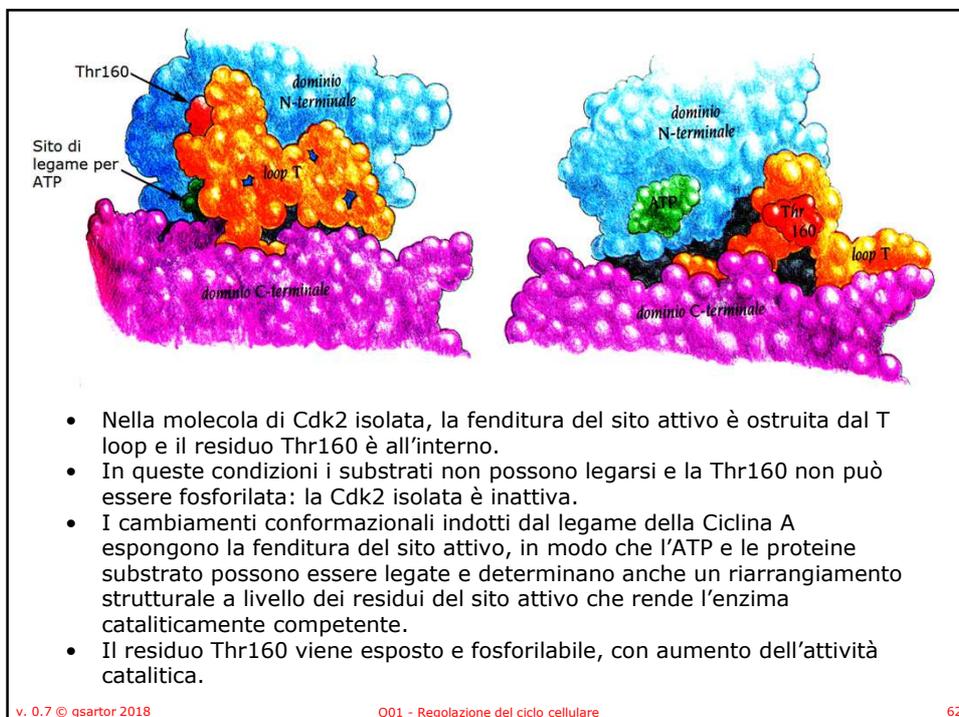
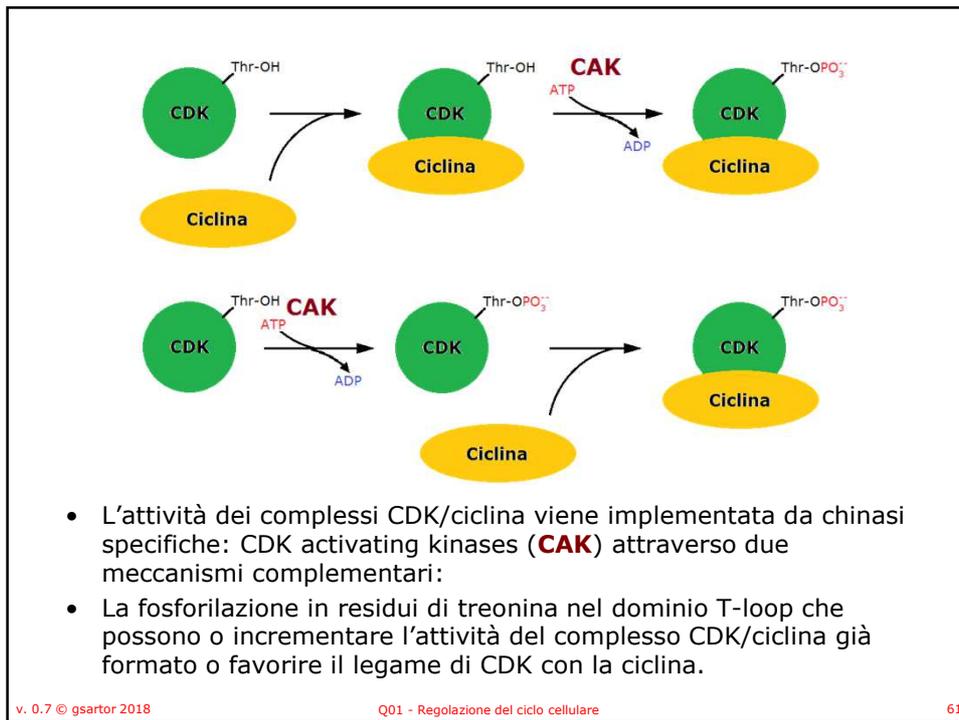
50

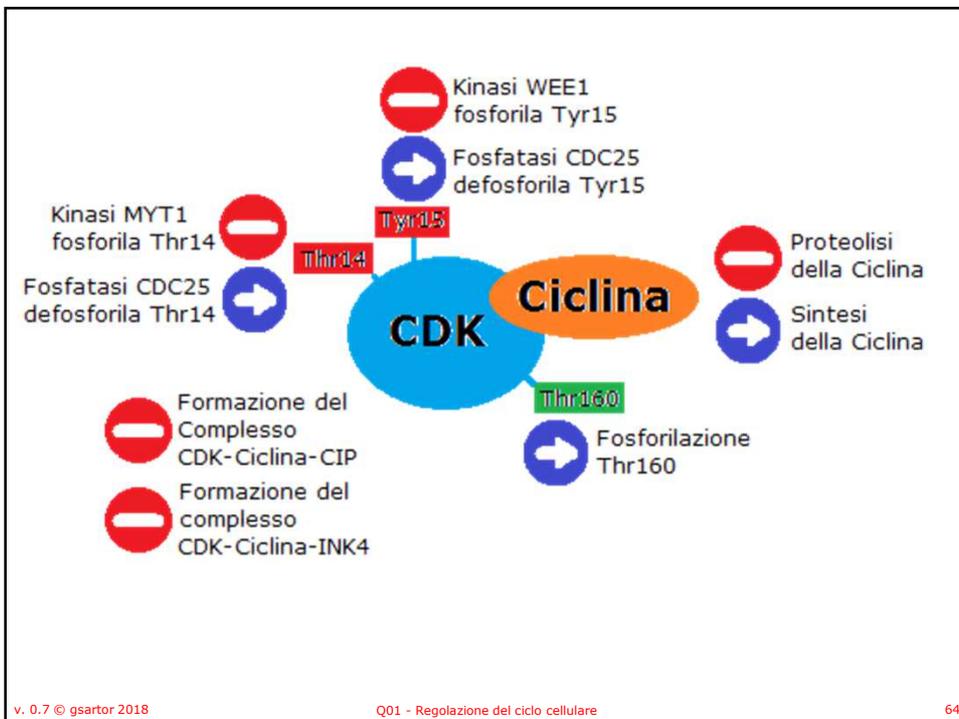
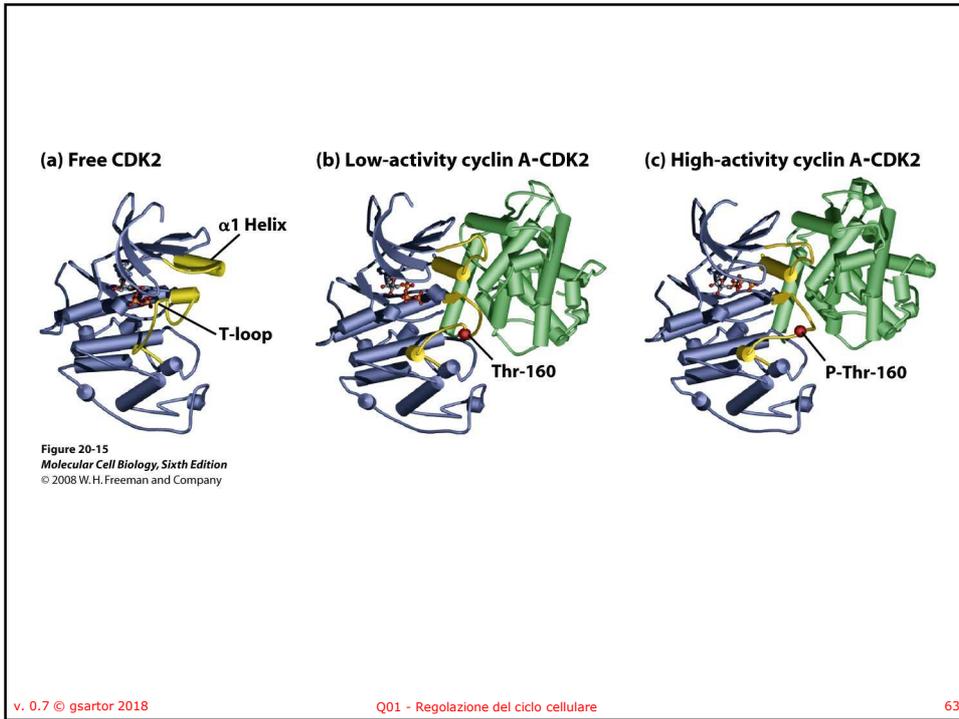










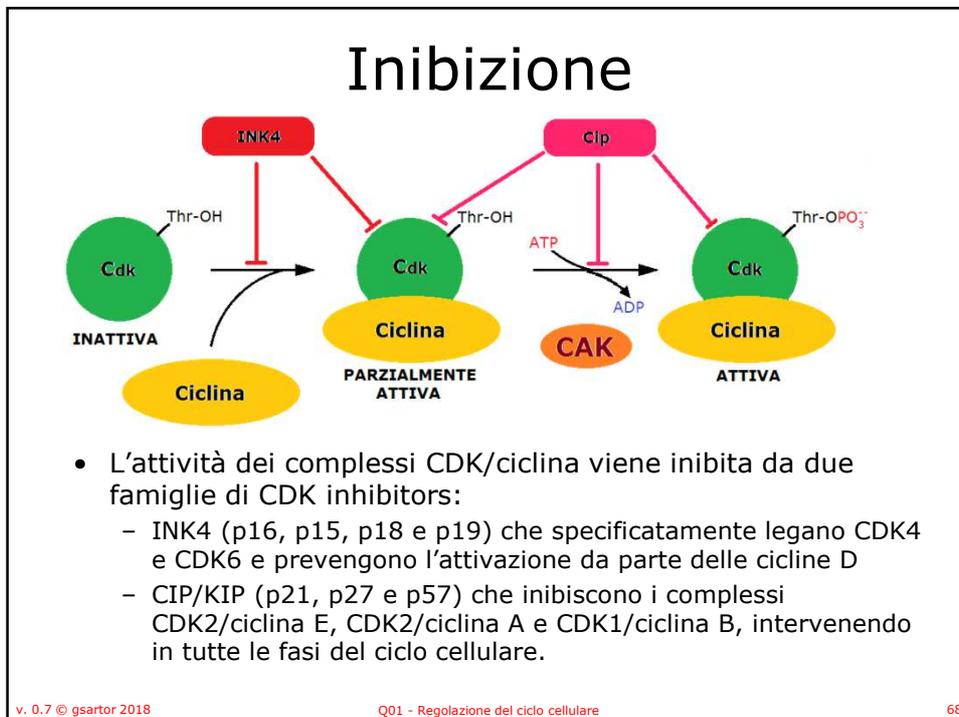
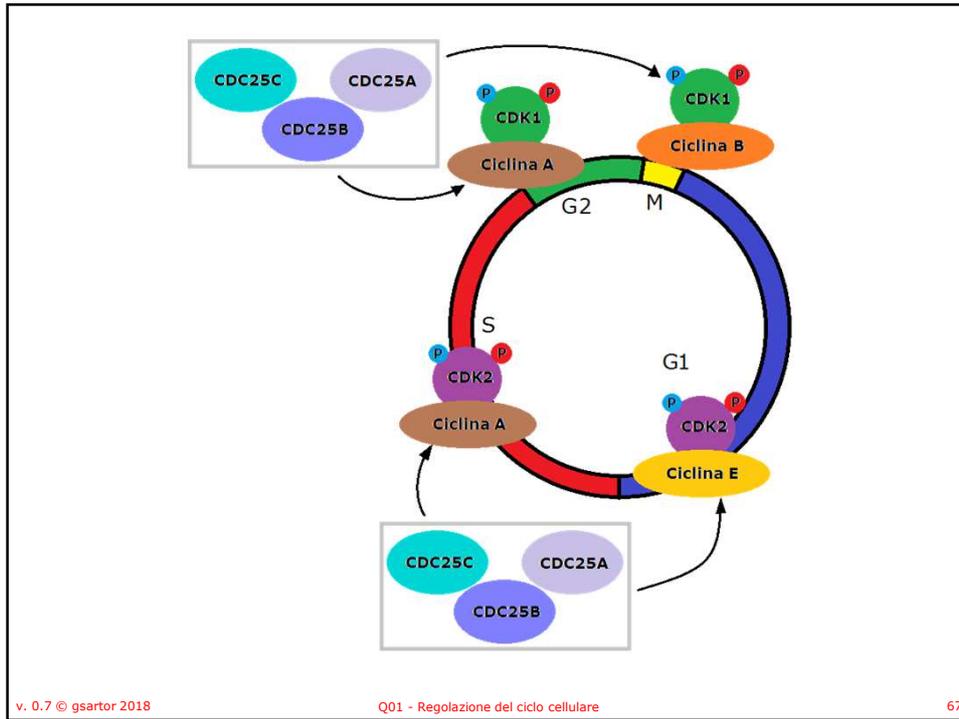


• L'attività kinasica di CDK può essere:

- **repressa** da due chinasi WEE1 e MYT1 che fosforilano due residui di CDK1 (Thr14 e Tyr15) nel dominio di legame con l'ATP che funzionano, quindi, di inibitori o
- **indotta** da una classe di fosfatasi CDC25 che defosforila tali residui, riattivando il complesso.

v. 0.7 © gsartor 2018 Q01 - Regolazione del ciclo cellulare 65

v. 0.7 © gsartor 2018 Q01 - Regolazione del ciclo cellulare 66



INK4

- I quattro membri della famiglia genica INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}) inibiscono Cdk4 e Cdk6 e partecipano alla regolazione della transizione G1→S;
- La perdita della funzione del gene INK4, in particolare di p16^{INK4a}, è presente in molti tumori umani;
- Meno frequenti sono i difetti associati a p19^{INK4d} (osteosarcoma).

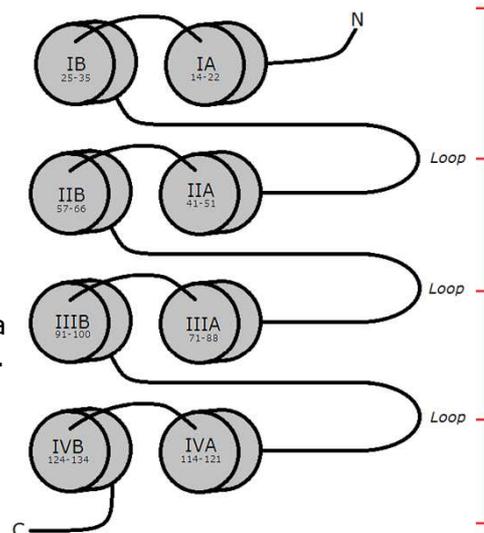
v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

71

INK4

- P16^{INK4a} è un inibitore specifico per la Cdk4/6, appartiene a una famiglia includendo p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}
- p16 e p19 sono costituite, rispettivamente, da 4 o 5 motivi ad **anchirina**
- Il motivo strutturale è costituito da residui di circa 30 aa, ha una struttura a L con due α -eliche antiparallele, che formano il gambo e la struttura β a forcina che forma la base.

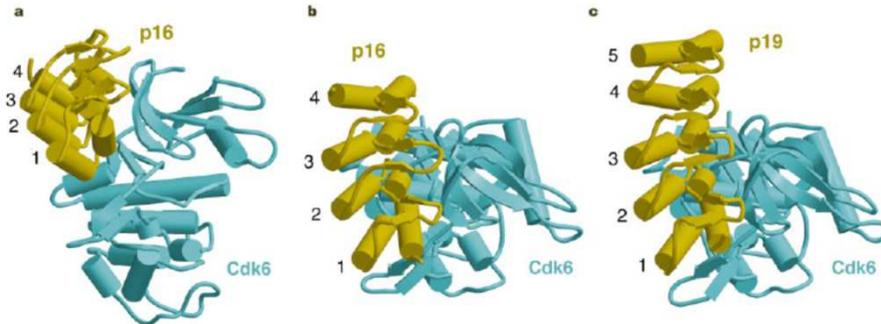


v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

72

Meccanismo



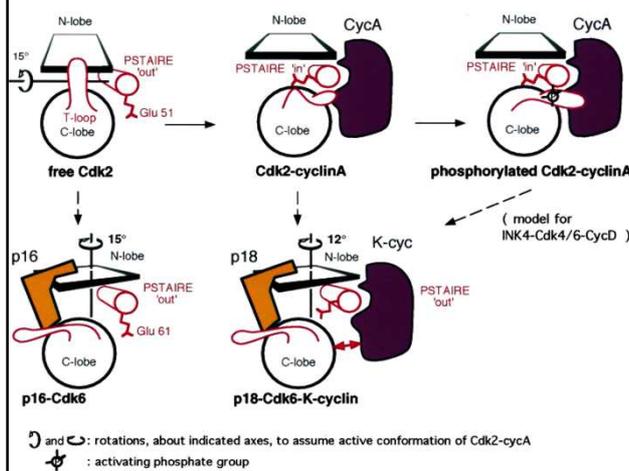
- p16 interagisce con la Cdk6 in un solco opposto a quello della ciclina, ma localizzato tra i 2 domini. La superficie concava della p16 lega la porzione N-terminale a foglietto β , mentre con i motivi ad anchirina interagisce con la parte C-terminale.
- Il legame e il riconoscimento sono mediati all'inizio da legami idrogeno con diversi residui che partecipano in questa interazione.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

75

Meccanismo



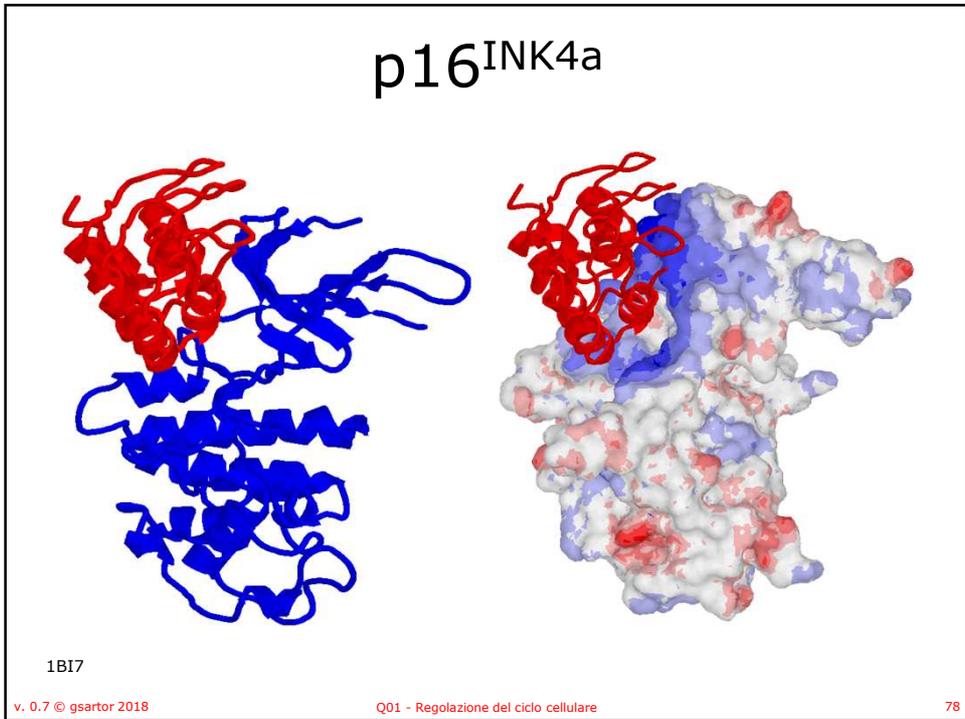
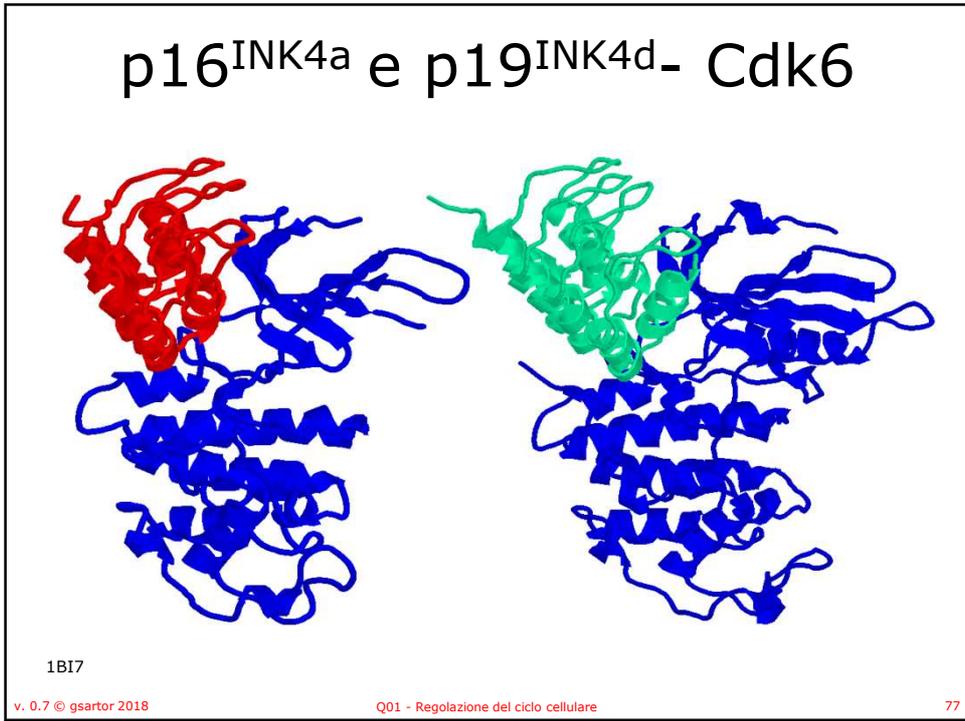
- p16 lega la Cdk6 e causa una modificazione conformazionale con conseguente inattivazione enzimatica. La p16 prende contatto con la Cdk6 in un solco tra le catene N-terminale e C-terminale alterando il sito di legame per la ciclina e bloccando la traslocazione dell'elica PSTAIRE nel solco catalitico.

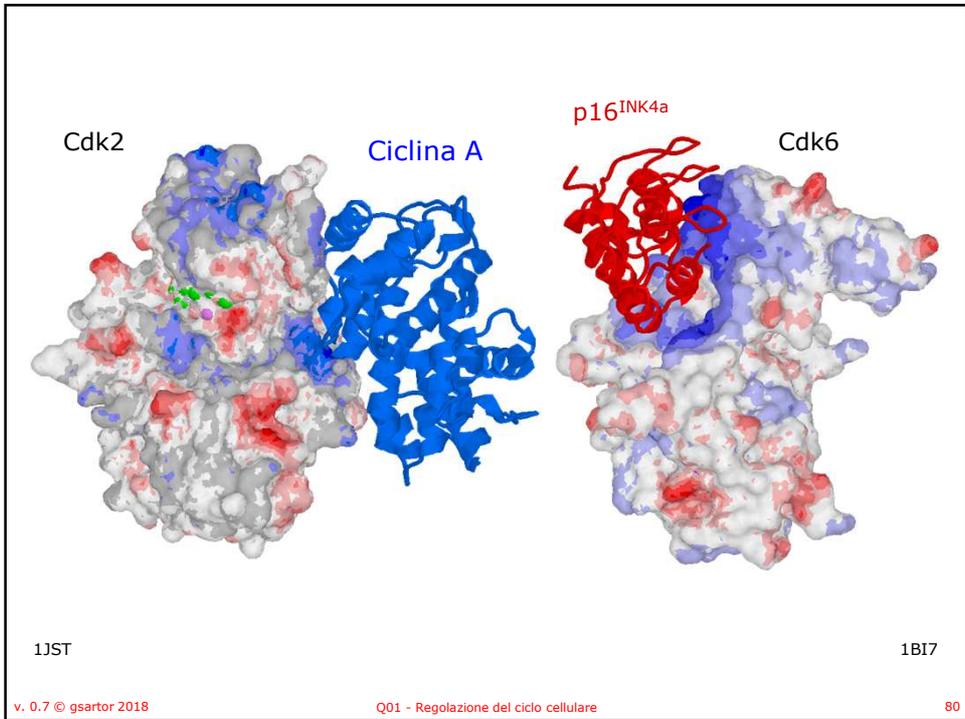
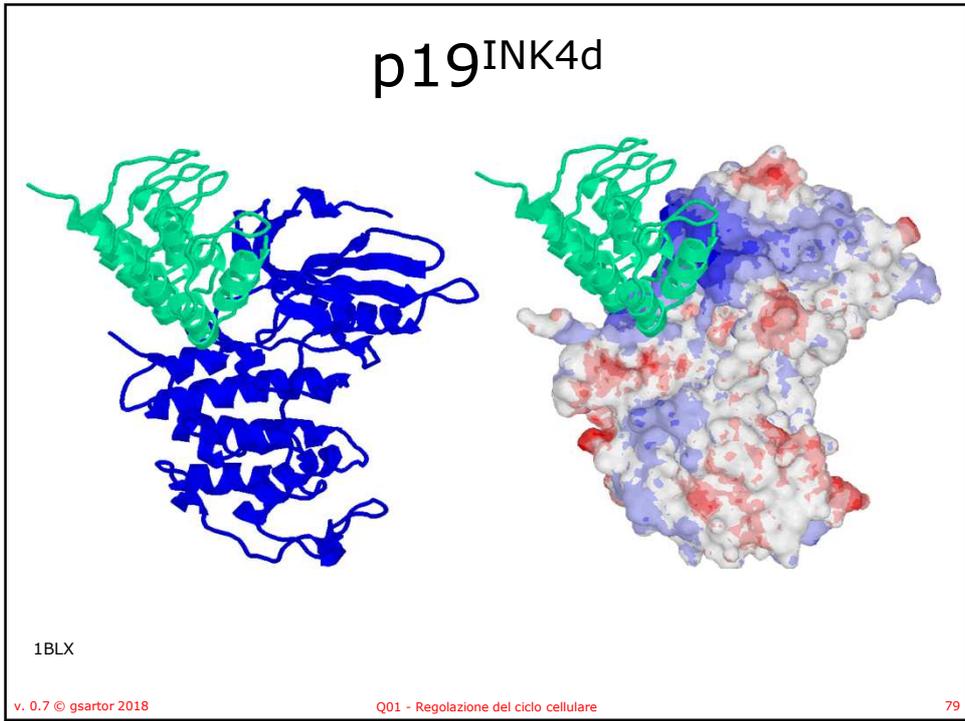
Genes Dev. 2000 December 15; 14(24): 3115-3125.

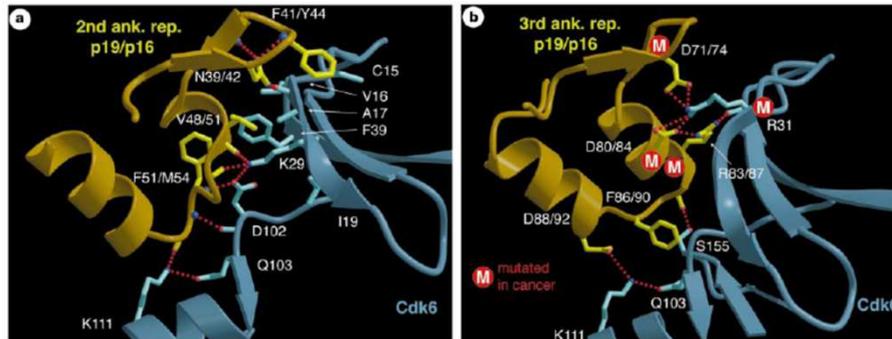
v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

76







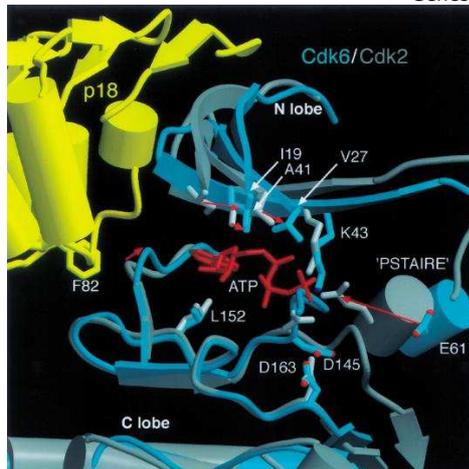
- Il networks di legami idrogeno sono conservati nel II e III motivo ad anchirina sia nella p16 che nella p19 e giocano un ruolo importante nel legame con la Cdk6.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

81

Genes Dev. 2000 December 15; 14(24): 3115-3125.

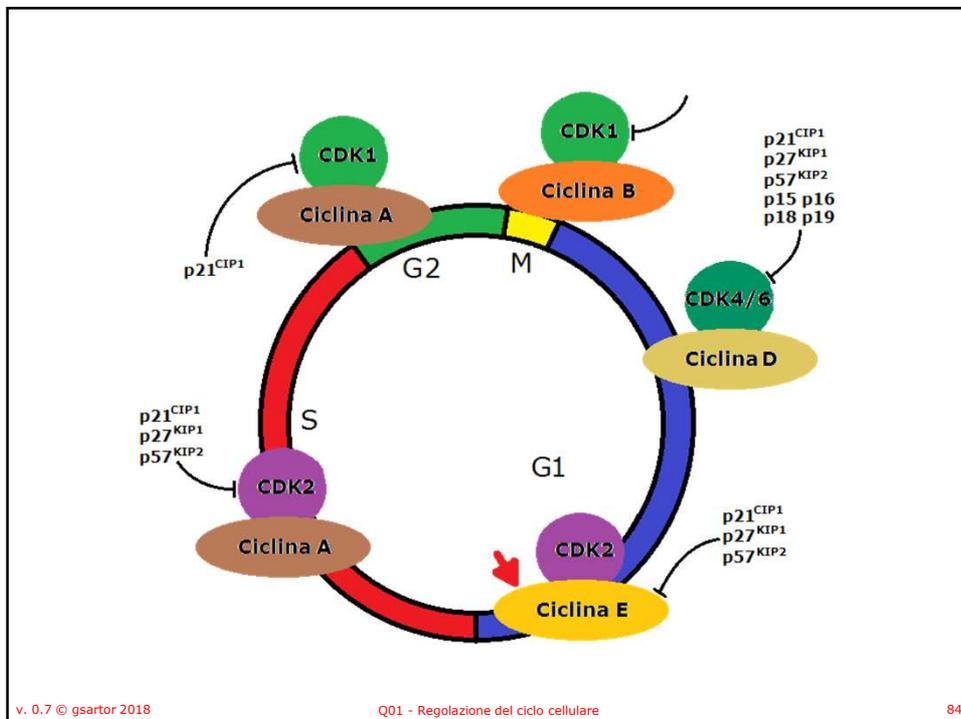
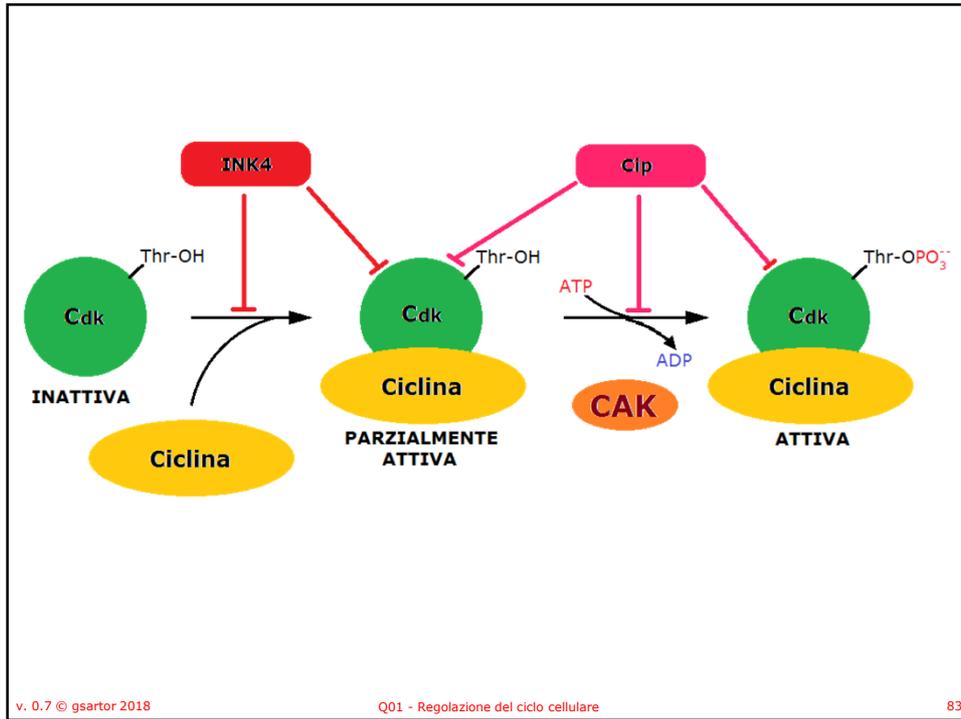


The ATP-binding site of p18-Cdk6-K-cyclin and Cdk2-cyclinA. Active site residues implicated in ATP binding and catalysis are displaced in the p18-Cdk6-K-cyclin complex relative to the active Cdk2-cyclinA conformation. Cdk2 and Cdk6 were superimposed on their C lobes. Cdk6 is shown in cyan, p18 in yellow, Cdk2 in gray. Movement of active site residues is indicated by red arrows. p18 displaces the N lobe relative to the C lobe, causing the hydrophobic residues (Ile 19, Val 27, Ala 41, Leu 152) that sandwich the adenine ring of ATP to move by up to 4.5 Å. The p18 inhibitor also distorts the edge of the active site via Phe 82, affecting hydrogen bonding interactions with the edge of the ATP ring. The related shift of the PSTAIR helix on the other side of the active site displaces an active site residue (Glu 61). The T loop of Cdk6 diverges from that of Cdk2 between Phe 164 and Val 181, and these residues are omitted for clarity.

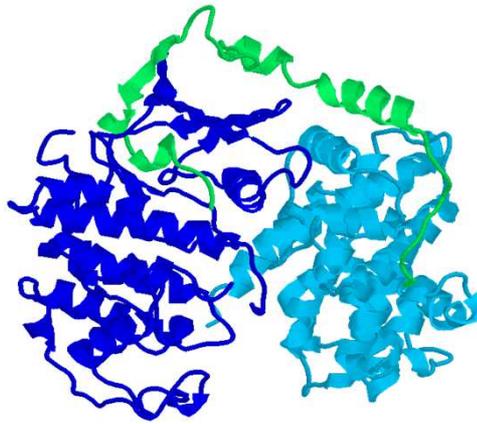
v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

82



CIP/KIP



1JSU

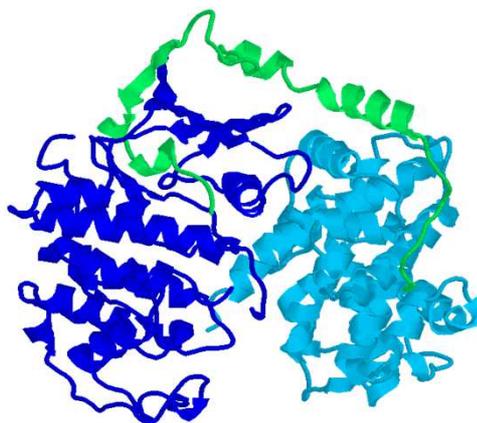
- CIP/KIP sono una famiglia di inibitori, in cui si riconoscono principalmente p21 e p27
- Si legano al complesso Cdk2-Ciclina A fosforilato interagendo sia con la Cdk2 che con la Ciclina A.

v. 0.7 © gsartor 2018

Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

85

CIP/KIP



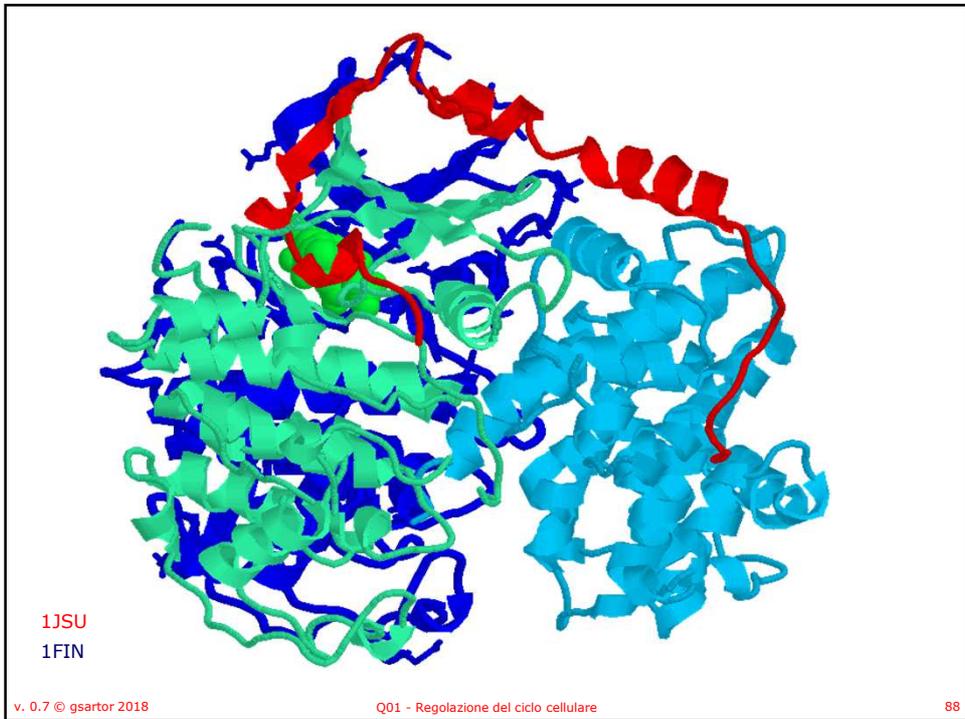
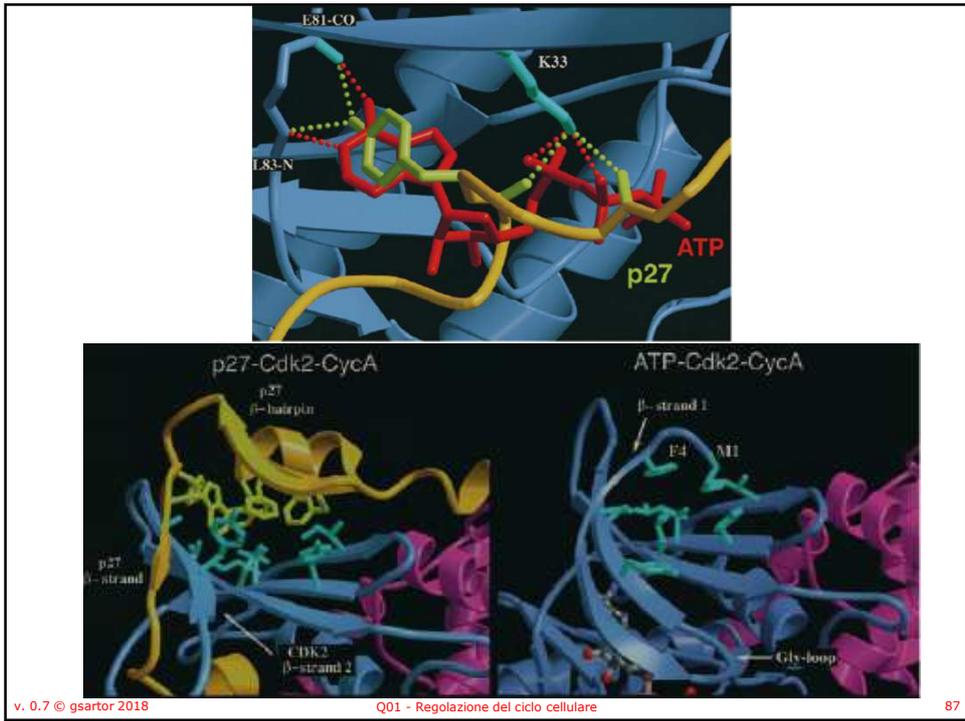
1JSU

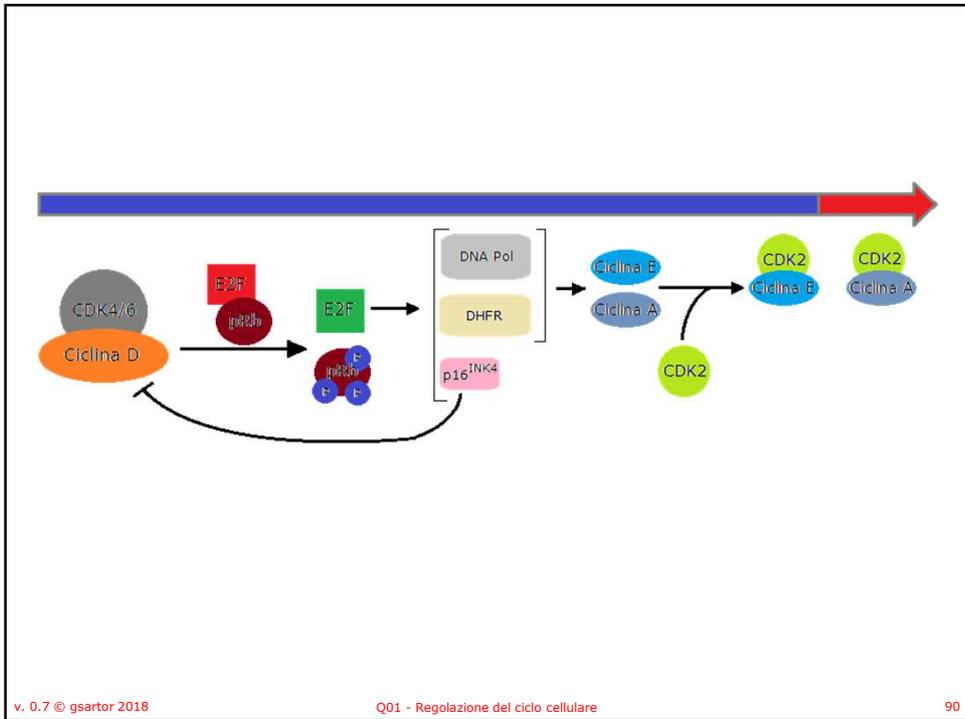
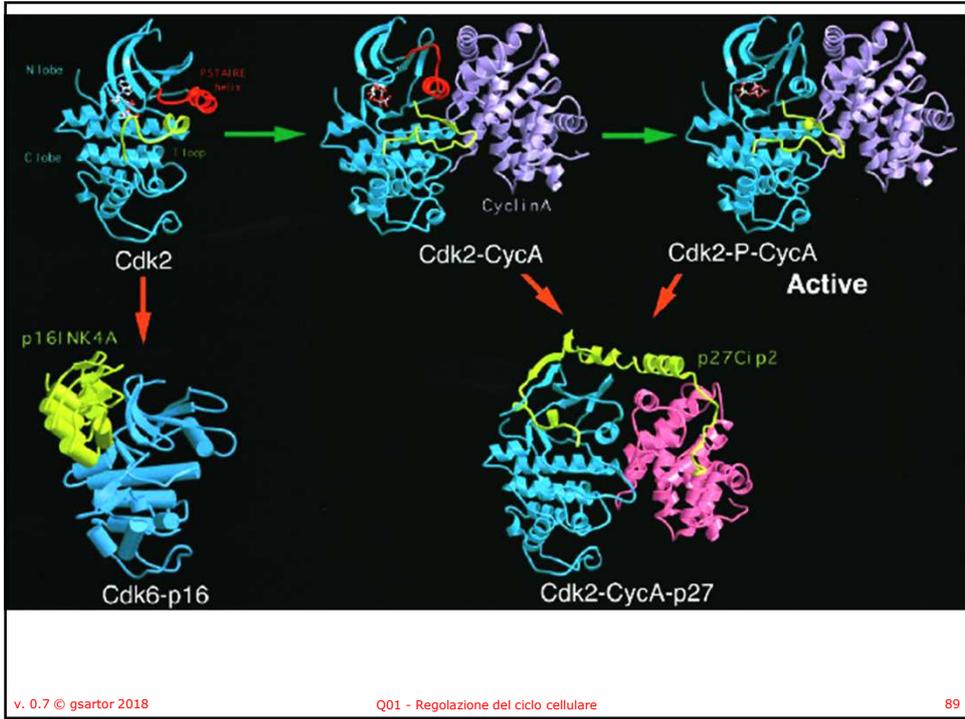
- p27^{KIP1} lega il complesso attraverso interazioni sia con la Ciclina A che con Cdk2.
- Si lega alla Ciclina A nel solco formato dai residui conservati
- Si lega a Cdk2 e riarrangia il dominio amino terminale
- Su Cdk2 si inserisce nel sito di legame dell'ATP.

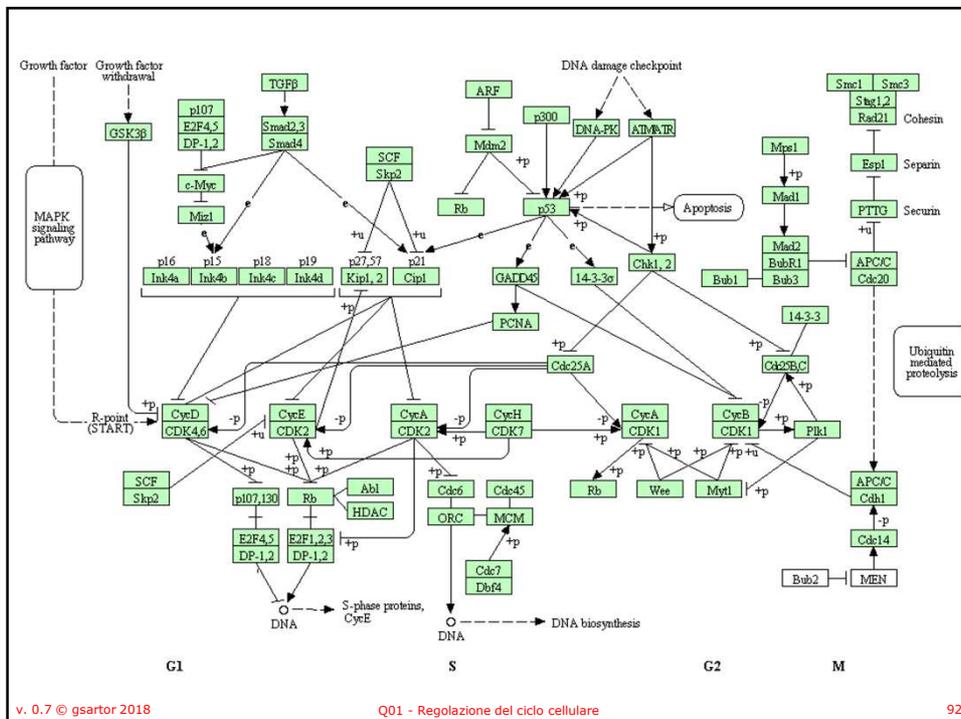
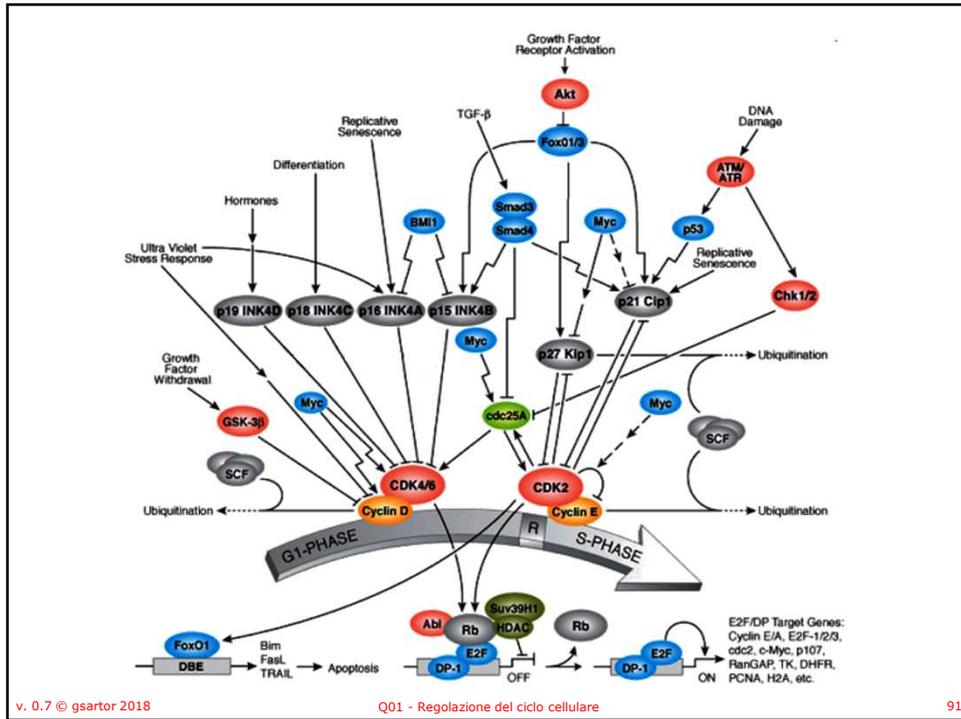
v. 0.7 © gsartor 2018

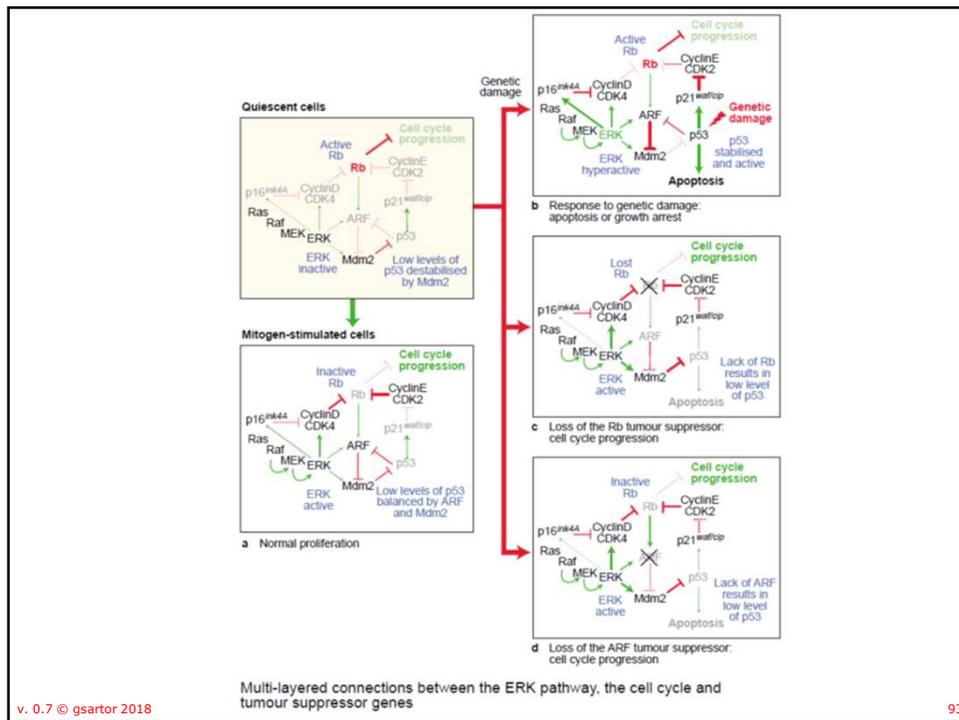
Q01 - Regolazione del ciclo cellulare

86









Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Alma Mater Studiorum

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it

18/10/2018 22:57:12