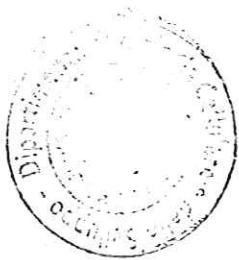


TATA 3

SCOTT F. GILBERT

BIOLOGIA DELLO SVILUPPO

*seconda edizione italiana
condotta sulla quarta americana*



0002226
GILBERT
BIOLOGIA DELLO
SVILUPPO
EDIZIONE SECONDA
ZANICHELLI

AQ 10025303
5 IV 16
15/02/05

DIP 3828
EX/IV - 165

ZANICHELLI

mana. Le larve precoci non solo si formano prima, ma possiedono anche dimensioni estremamente ridotte e non vanno incontro a metamorfosi. Esse sono in pratica mandibole capaci di movimento. Queste larve non si riproducono, e muoiono prima che le larve normali si siano formate. Mentre sono in vita, tuttavia, esse si diffondono nell'embrione dell'ospite, uccidendo le larve parassite di altri individui (di specie differenti e di altri cloni della stessa specie). In altre parole, le larve precoci sono forme predatrici che eliminano i possibili concorrenti (Cruz, 1981, 1986b; Grbic *et al.*, 1992).

Quando le larve precoci (e le loro prede) muoiono, le larve normali emergono dalla loro prima muta, e iniziano a nutrirsi voracemente degli organi larvali dell'ospite. In quaranta giorni, la progenie parassita ha finito di mangiare i muscoli dell'ospite, i corpi grassi, le gonadi, le ghiandole della seta, l'intestino, la catena gangliare e l'emolinfa, e l'ospite è ridotto a poco più di un involucro di cuticola contenente circa settanta larve di vespa allo stadio di pupa. Dopo altri cinque o sei giorni, i giovani adulti fanno un foro nel tegumento dell'ospite e, come in una scena del film *Alien*, si aprono una via per uscire dal

corpo dell'ospite. Questi adulti, quindi, si accoppiano (spesso sul corpo del loro ospite morto), trovano un nuovo ospite in cui depositare un uovo, e muoiono poco dopo.

Questo ciclo vitale turbò Charles Darwin e fece sì che egli ponesse in discussione l'esistenza di una divinità benigna e onniscente. Nel 1860 egli scrisse al biologo americano Asa Gray: "Non riesco a convincermi che un Dio benevolo e onnipotente abbia volutamente creato gli *Incunonidi* con l'espressa volontà di nutrirli con i corpi viventi di larve di farfalle...". Tuttavia, oltre alla loro utilità nel fornire inquietanti rivelazioni sull'ordine naturale del mondo e sul significato dell'"individualità", l'esistenza delle vespe parassite potrebbe avere importanti ricadute economiche. *Macrocentrus grandii* è una vespa con poliembrionia, parassita della piralide del mais, un lepidottero europeo.

La capacità di un insetto di formarsi da un embrione a segmentazione oloblastica dovrebbe anche consentire di apprezzare meglio la plasticità della natura e sconsigliare generalizzazioni avventate all'intero subphylum di organismi.

I MECCANISMI DELLA SEGMENTAZIONE

La regolazione della divisione cellulare

94 Nel ciclo cellulare delle cellule somatiche si distinguono funzionalmente 4 stadi (Figura 5.40A). Dopo la mitosi (M), c'è un intervallo di prereplicazione (G_1), dopo il quale avviene la sintesi del DNA (S). Dopo il periodo di sintesi, c'è un intervallo premitotico (G_2) che è seguito dalla successiva mitosi. La progressione di queste fasi è regolata da fattori di crescita, che saranno descritti più avanti. Durante le prime segmentazioni, tuttavia, nei blastomeri la divisione cellulare può avvenire in modo molto più semplice. Nei blastomeri iniziali di riccio di mare manca la fase G_1 , e il DNA si replica durante l'ultima parte (la telofase) della precedente mitosi (Hinegardner *et al.*, 1964). I nuclei di *Xenopus* e *Drosophila* durante le prime divisioni di segmentazione hanno eliminato sia la fase G_1 che la fase G_2 . (Negli embrioni di *Xenopus* queste fasi vengono incluse nel ciclo cellulare dopo la dodicesima divisione di segmentazione. In *Drosophila*, G_2 compare durante il quattordicesimo ciclo e G_1 durante il diciassettesimo.) Per le prime 12 divisioni le cellule di *Xenopus* si dividono in modo sincrono secondo un ciclo cellulare bifasico: da S a M e da M a S (Figura 5.40B; Laskey *et al.*, 1977; Newport e Kirschner, 1982a).

I fattori che regolano questo ciclo bifasico si trovano nel citoplasma. I normali oociti di *Xenopus* in maturazione si arrestano alla prima profase meiotica; sono incapaci di dividersi. Se vengono trapiantati in questi oociti i nuclei di cellule in attiva divisione, anche questi ultimi smettono di dividersi. Quando gli oociti normali vengono stimolati dal progesterone, essi riprendono la loro divisione meiotica e si arrestano alla metafase della seconda divisione

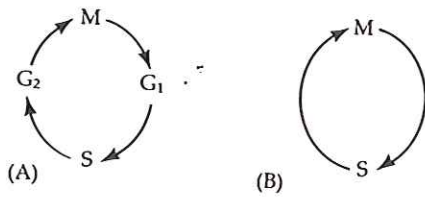


Figura 5.40

Cicli cellulari di cellule somatiche e di blastomeri nelle prime fasi della segmentazione. (A) Ciclo cellulare tipico di una cellula somatica. La mitosi (M) è seguita da un periodo di "interfase". Quest'ultimo periodo è suddiviso nelle fasi G_1 , S (sintesi) e G_2 . (B) Ciclo cellulare più semplice, bifasico, di un blastomero di anfibio nelle prime fasi della segmentazione, composto dalle sole fasi S e M.

meiotica. Anche i nuclei di cellule che non si dividono (quali i neuroni) iniziano a dividersi e si arrestano alla metafase della seconda divisione se vengono posti nel citoplasma di un oocita trattato con progesterone (Gurdon, 1968). Il citoplasma degli oociti stimolati con progesterone va ancora incontro a periodiche contrazioni corticali (caratteristiche della divisione), anche in assenza di nuclei o di centrioli. Se frammenti di DNA clonato vengono iniettati in tali embrioni enucleati, la loro replicazione passa sotto il controllo di questi cicli (Hara *et al.*, 1980; Harland e Laskey, 1980; Karsenti *et al.*, 1984). Quindi la capacità di divisione cellulare è regolata dal citoplasma.

I fattori promoventi la maturazione

95 Sono stati identificati alcuni dei fattori che regolano la sintesi di DNA e la divisione cellulare. Il fattore indotto dal progesterone, che consente ai nuclei degli oociti di riprendere le loro divisioni, è una proteina fosforilata formata da due subunità chiamata **fattore promovente la maturazione** (MPF, *Maturation Promoting Factor*, talvolta chiamato *fattore promovente la mitosi*, conservando comunque la stessa sigla). MPF fu individuato per la prima volta come il più importante fattore responsabile della ripresa delle divisioni cellulari della meiosi nelle uova ovulate di rana (Smith e Ecker, 1969; Masui e Markert, 1971). Questo stesso fattore continua ad agire anche dopo la fecondazione, controllando il ciclo bifasico delle prime divisioni di segmentazione dei blastomeri di *Xenopus*. Gerhart e collaboratori (1984) hanno dimostrato che l'attività di MPF va incontro a fluttuazioni cicliche nelle cellule in mitosi. L'attività di MPF durante le prime divisioni dei blastomeri di rana è più alta nella fase M e irrilevante nella fase S. Durante la fase S MPF si trova in forma inattiva. Queste fluttuazioni cicliche sono presenti anche nei blastomeri enucleati. Newport e Kirschner (1984) dimostrarono che la replicazione del DNA (S) e la mitosi (M) erano controllate solamente dall'aumento e dalla diminuzione dell'attività di MPF, anche in assenza di sintesi proteica. Le cellule in divisione possono essere bloccate nella fase S incubandole con inibitori della sintesi proteica. Quando MPF viene iniettato in queste cellule, esse passano in fase M. Il loro involucro nucleare si rompe e la loro cromatina si addensa in cromosomi. Dopo un'ora, MPF viene degradato e i cromosomi ritornano in fase S.

Scheda 5.5

Il controllo molecolare dello sviluppo: MPF e la sua regolazione

La subunità piccola di MPF: la chinasi *cdc2*

MPF possiede una subunità grande ed una subunità piccola. La subunità piccola di MPF è una proteina chinasi che, una volta attivata, può fosforilare molte proteine. Perciò MPF funziona aggiungendo gruppi fosfato a specifiche proteine. Uno dei suoi bersagli è l'istone H1, che è legato al DNA. La fosforilazione di questa proteina

potrebbe avviare la condensazione dei cromosomi. Un altro bersaglio è l'involucro nucleare. Entro 15 minuti dall'aggiunta di MPF, le tre principali proteine dell'involucro nucleare (le laminine) diventano iperfosforilate, e nei successivi 15 minuti l'involucro si depolimerizza e si frammenta (Miyake-Lye e Kirschner, 1985; Arion *et al.*, 1988). La subunità dell'MPF chinasi purificata si è rivelata capace di fosforilare le proteine dell'involucro nuclea-

re e di causare la loro depolimerizzazione *in vitro* (Peter *et al.*, 1990; Ward e Kirschner, 1990). Un terzo bersaglio sembra essere la RNA polimerasi (Cisek e Corden, 1989), e la fosforilazione della RNA polimerasi potrebbe essere responsabile dell'inibizione della trascrizione che si osserva durante la mitosi. Un quarto bersaglio della chinasi sembra sia la subunità regolativa della miosina citoplasmatica. Quando questa proteina viene fosforilata diventa inattiva ed è incapace di funzionare come ATPasi per guidare i filamenti di actina coinvolti nella divisione cellulare (Satterwhite *et al.*, 1992). L'inibizione della miosina citoplasmatica durante le prime fasi della mitosi può evitare che la cellula si separi fino a quando i cromosomi non si sono ripartiti.

La subunità piccola di MPF si è ben conservata nel corso dell'evoluzione, ed è in pratica identica a una fosfo-proteina, p34, che induce la mitosi, sintetizzata dal gene *cdc2* del lievito (Dunphy *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1988). Il gene umano che codifica la proteina corrispondente alla subunità piccola di MPF di *Xenopus* può essere inserito nel genoma del lievito e causare la divisione cellulare in lieviti mutanti privi di *cdc2* (Lee e Nurse, 1987). La proteina p34 esiste in forma fosforilata e in forma non fosforilata. La forma attiva sembra sia fosforilata sulla treonina-161 (T-161) e non fosforilata sulla tirosina-15 (Y-15). Entrambe queste condizioni sembrano importanti per l'attività chinasi (Gould e Nurse, 1989; Solomon, 1993).

La subunità grande di MPF: la ciclina

Come viene regolato, allora, MPF? Dal momento che la segmentazione in *Xenopus* sembra regolata da una proteina simile a quella che regola la divisione cellulare del lievito, si è pensato che ogni fattore che regolasse la proteina del lievito avesse un elemento corrispondente nell'embrione animale. Uno dei più importanti regolatori della proteina MPF-simile del lievito è il prodotto del gene *cdc13*, una proteina di 56 kDa chiamata p56^{cdc13}. Questo gene è stato clonato e la sua sequenza si è rivelata molto simile a quella delle cicline B, proteine presenti in molti animali (Goebel e Byers, 1988; Solomon *et al.*, 1988). Le cicline B di cellule allo stadio di segmentazione mostrano una fluttuazione periodica, accumulandosi durante la fase S e venendo degradate durante la mitosi (Evans *et al.*, 1983; Swenson *et al.*, 1986). Le cicline sono spesso codificate dagli mRNA immagazzinati nel citoplasma dell'ocita, e quando la loro traduzione in proteine viene inibita selettivamente, la cellula non può entrare in mitosi (Minshull *et al.*, 1989). La ciclina B si combina con la chinasi *cdc2* di MPF per creare il complesso MPF. La ciclina permette alla subunità della chinasi *cdc2* di essere fosforilata sui residui di treonina-14 (T-14), di tirosina-15 (Y-15) e di treonina-161 (Figura 5.41). La fosforilazione di T-161 è necessaria per l'attività di MPF, ma la

fosforilazione nelle posizioni T-14 e Y-15 la inibisce. Perciò, quando vengono fosforilate in queste posizioni, le chinasi rimangono inattive, ma potenzialmente funzionali. Una scorta di molecole MPF potenzialmente funzionali (pre-MPF) si accumula durante l'ultima parte del periodo S.

La fosfatasi *cdc25*: l'iniziatore della mitosi

La mitosi inizia con la rapida defosforilazione in posizione 15 di tutte le chinasi MPF. Ciò si realizza grazie alla fosfatasi *cdc25* (Edgar e O'Farrell, 1989; Gautier *et al.*, 1991; Jessup e Beach, 1992; Lee *et al.*, 1992). In questo modo il graduale accumulo di MPF viene convertito nel brusco aumento di attività chinasi che dà inizio alla mitosi. Questa fosfatasi (che è stata trovata in numerosi organismi) è regolata essa stessa in relazione allo sviluppo. In *Drosophila* la fosfatasi *cdc25* (il prodotto del gene *string*) viene sintetizzata inizialmente, durante i primi 13 cicli cellulari, dall'mRNA immagazzinato nell'ocita. Tuttavia, durante il successivo ciclo cellulare, l'mRNA *string* materno viene degradato. A questo punto, se i nuclei non sintetizzassero un loro mRNA *string*, le cellule non potrebbero più dividersi. Edgar e O'Farrell (1989) hanno dimostrato che le cellule che si dividono stanno sintetizzando la loro fosfatasi *cdc25*, mentre quelle cellule che non sono in grado di arrivare al ciclo di divisione non lo fanno (Figura 5.42). La degradazione e la necessità di risintetizzare questa proteina spiegherebbero il passaggio dal controllo citoplasmatico della divisione cellulare a quello nucleare, osservato nel quattordicesimo ciclo.

In *Drosophila* nel corso dello sviluppo si verifica una maturazione della regolazione dell'attività della chinasi MPF (Figura 5.41; Edgar *et al.*, 1993). All'ovulazione i complessi pre-MPF immagazzinati nell'uovo vengono defosforilati in T-14 e in Y-15 dalla proteina *string* (*cdc25*) appena trascritta. Durante i primi sette cicli nucleari l'MPF attivo si mantiene molto abbondante e il nucleo si divide in base alla velocità consentita dagli enzimi necessari alla sintesi del DNA. Durante le divisioni di segmentazione, dall'ottavo al tredicesimo ciclo, la ciclina inizia ad essere degradata durante la metafase, portando a periodiche oscillazioni dell'attività chinasi di MPF. La sintesi di ciclina a partire dall'mRNA immagazzinato nell'ocita diventa la tappa limitante per la mitosi. La degradazione della proteina *string* dell'ocita fa sì che il ciclo cellulare si arresti all'interfase del quattordicesimo ciclo e si accumulino grandi quantità di pre-MPF. Le mitosi della quattordicesima, quindicesima e sedicesima divisione si realizzano soltanto se il pre-MPF viene defosforilato in posizione T-14 e Y-15 dalla proteina *string*. Questa proteina viene codificata in seguito alla sua trascrizione nucleare, che avviene alla fine di ogni fase G₂.

© 88-08- 8988

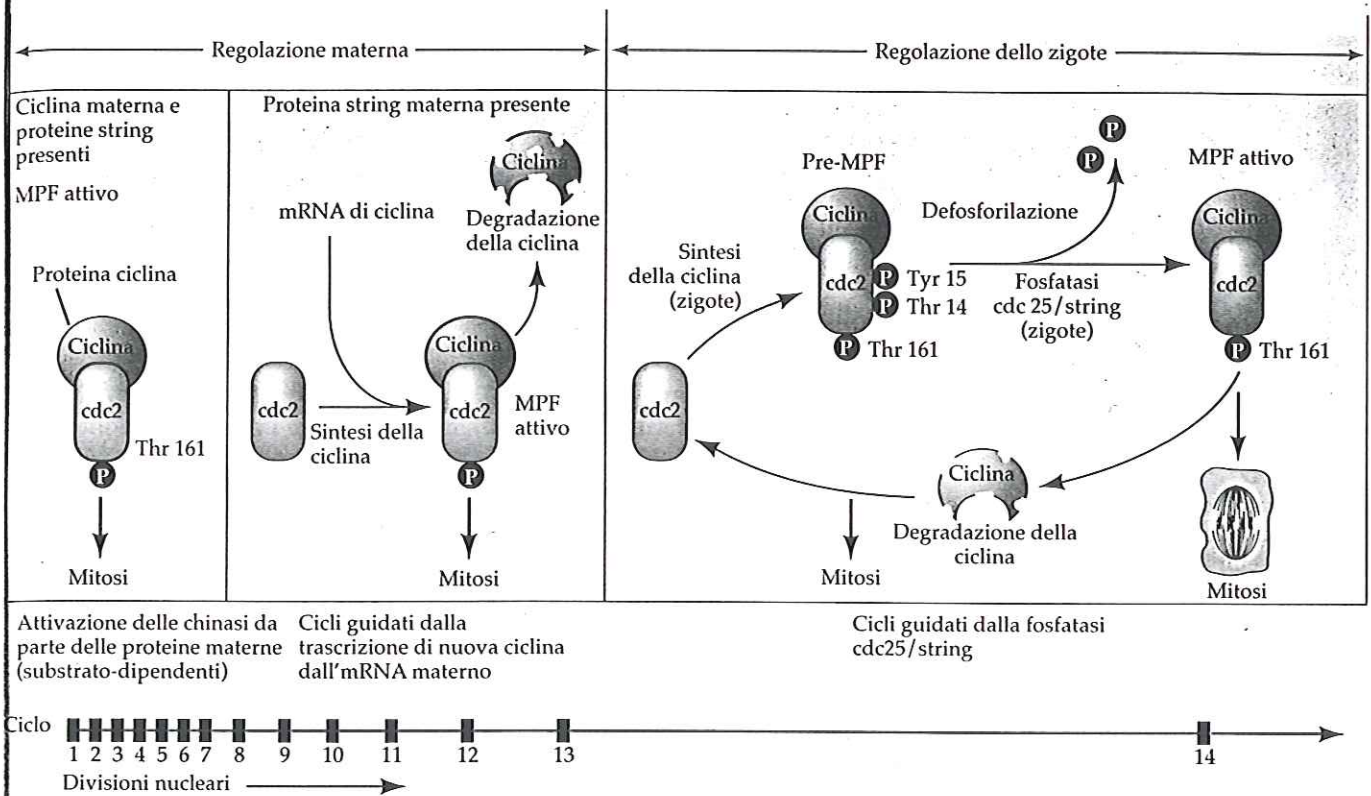


Figura 5.41

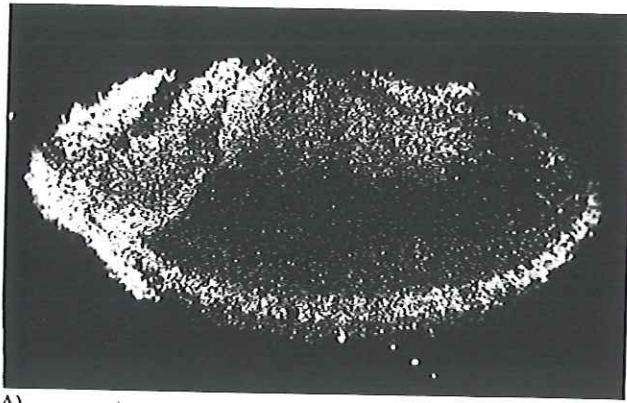
La regolazione del ciclo cellulare in *Drosophila* durante l'embriogenesi. La ciclina e la proteina cdc25 (string) sono entrambe abbondanti prima della fecondazione. Perciò, durante i primi sette cicli cellulari, l'attività della chinasi MPF è costante e le divisioni procedono alla velocità massima consentita dalla funzione enzimatica e dalla disponibilità di substrati. Una volta che la ciclina è stata degradata, la sua sintesi (dall'mRNA immagazzinato nel citoplasma) diventa la tappa limitante a partire dall'ottavo ciclo. Dal quattordicesimo ciclo, l'mRNA materno per la ciclina viene degradato e deve essere sintetizzato a partire dai geni dei nuclei embrionali. Inoltre, la degradazione della proteina string richiede una nuova sintesi da parte del nucleo. Il pre-MPF si accumula, ma non viene attivato finché la fosfatasi string non defosforila i residui T-14 e Y-15 della chinasi cdc2. I meccanismi che mettono in relazione l'attività di MPF con il completamento della sintesi del DNA e l'inizio della citocinesi sono attualmente in fase di studio. (Da Edgar *et al.*, 1994.)

La mitosi è passata dal controllo citoplasmatico al controllo nucleare.

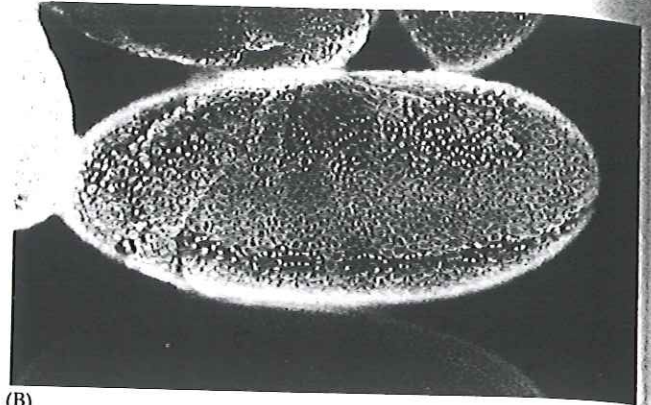
Il fattore citostatico

La sintesi e la degradazione di MPF determinano i cicli di divisione cellulare. Tuttavia, se si impedisce la degradazione della ciclina, l'MPF resta attivo e la cellula resta "congelata" in metafase (Murray *et al.*, 1989). Ciò è quello che apparentemente accade durante lo sviluppo dell'oocita di rana. L'oocita maturo di rana arresta la divisione cellulare producendo una proteina chiamata **fattore citostatico** (CSF), che mantiene gli oociti fermi alla metafase della seconda divisione meiotica (Figura 5.43). Questa proteina contiene i prodotti dei geni *c-mos* e *cdk-2* e sembrerebbe agire bloccando la degradazione della ciclina (si veda il Capitolo 22). Poiché la ciclina non viene

degradata, l'MPF resta attivo e l'oocita rimane in metafase. Il rilascio di ioni calcio durante la fecondazione attiva una proteasi che degrada in modo specifico il CSF (Watanabe *et al.*, 1991). Quando il CSF viene degradato, la ciclina può essere a sua volta degradata e la cellula può tornare in fase S. Perciò, uno degli effetti degli ioni calcio liberati alla fecondazione, è di promuovere la degradazione della ciclina e di permettere alla cellula di iniziare la replicazione del DNA. In seguito il ritmo della divisione cellulare viene controllato dall'attività di MPF, che è a sua volta dipendente dalle oscillazioni cicliche nella sintesi e nella degradazione della ciclina. Così come il termine della mitosi è segnato dagli ioni calcio, l'attivazione della proteina chinasi C alla fecondazione crea le condizioni proprie dell'interfase: la decondensazione della cromatina e la ricostruzione dell'involucro nucleare (Bement e Capco, 1991).

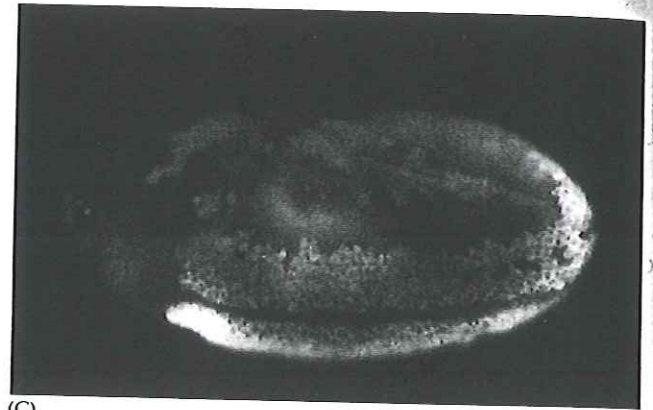


(A)



(B)

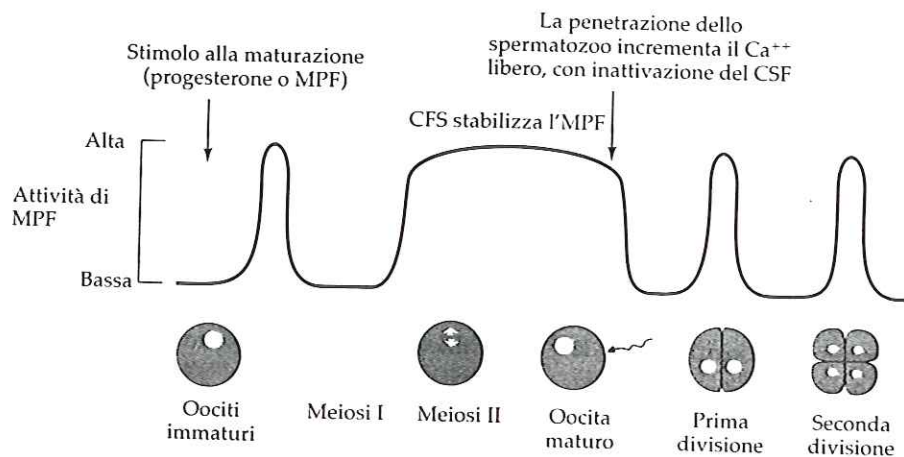
Figura 5.42
 Correlazione dell'espressione del gene *string* con la divisione cellulare negli embrioni di *Drosophila*. (A) In questo esempio, un embrione verso la fine della quattordicesima divisione è stato colorato con una sequenza nucleotidica radioattiva che riconosce specificamente e si lega all'mRNA *string*. (B) Un embrione leggermente più vecchio è stato colorato con anticorpi fluorescenti diretti contro la tubulina per mostrare i microtubuli dei fusi mitotici. Un confronto tra la fotografia a fluorescenza e l'autoradiografia ottenuta per il legame delle sonde radioattive, mostra che solo le cellule capaci di dividersi sintetizzano mRNA *string*. (C) Gli anticorpi contro la proteina ciclina A mostrano che essa viene degradata dopo la mitosi, e non è visibile nelle regioni contenenti la proteina *string*. (Da Edgar e O'Farrell, 1989, per gentile concessione di B. A. Edgar.)



(C)

Figura 5.43

Livelli del fattore promovente la maturazione (MPF) durante le prime fasi dello sviluppo di *Xenopus laevis*. Il normale segnale che attiva la maturazione è l'ormone progesterone, che stimola l'ovulazione degli oociti e l'inizio della meiosi. (Da Murray e Kirschner, 1989.)



TATA N. 3

da pag 58-61

N. 1190/2005

BIOLOGIA DELLO SVILUPPO

C8c

UNIVERSITA' DI ROMA LA SAPIENZA	
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA DELLE PFI E DELLO SVILUPPO - C/III, 00185	
NUMERARIO	4886
POSIZIONE	

Capitolo 3

Ovogenesi

L'ovogenesi è quell'insieme di processi che conducono alla formazione dei gameti femminili, le uova, chiamate anche 'uova vergini'. Essa si svolge negli ovari dove le cellule germinali sono associate a quelle somatiche, le cellule follicolari, con cui formano il *follicolo ovarico*. È stato dimostrato che in alcuni casi (drosofila, ascidie), le cellule follicolari contribuiscono a determinare la polarità dell'ovocita e conseguentemente anche la polarità dell'embrione. Nei Vertebrati le cellule follicolari hanno anche un'attività ormonale. Durante l'accrescimento dell'ovocita vengono sintetizzati RNA ed alcune proteine specifiche che si accumulano nel citoplasma. Molecole di natura e origine diverse possono similmente essere accumulate all'interno dell'ovocita dove vanno a costituire materiale di riserva. Alla fine dell'accrescimento si verifica il completamento della meiosi. Questo processo è spesso sotto controllo ormonale e termina con l'emissione dei globuli polari, che, in alcune specie, si completa subito dopo la fecondazione.

L'ovogenesi nei suoi aspetti morfologici sarà studiata soprattutto nei Mammiferi, mentre, per quanto riguarda gli aspetti biosintetici, sarà trattata sia negli Anfibi che nei Mammiferi.

Sarà descritta anche l'ovogenesi della drosofila dal momento che la sua conoscenza è necessaria per la comprensione dei meccanismi di espressione dei geni dello sviluppo.

3.1 SVILUPPO DEI GAMETI FEMMINILI E DEL FOLLICOLO OVARICO

3.1.1 Ovogoni

Durante lo sviluppo embrionale dei Vertebrati, le cellule germinali primordiali colonizzano gli abbozzi delle gonadi femminili che diventeranno poi ovari (Capitolo 17) e.

3.4 MATURAZIONE DELL'OVOCITA

Nei Vertebrati, l'ovocita primario, dopo aver terminato l'accrescimento, entra in una fase di quiescenza da cui esce a seguito di uno stimolo ormonale. L'inizio della maturazione si manifesta morfologicamente con la rottura della vescicola germinativa dovuta alla disgregazione dell'involucro nucleare.

3.4.1 Fasi che portano alla prima divisione meiotica e all'arresto in metafase della seconda divisione meiotica

Nei Vertebrati, la prima divisione meiotica termina all'ovulazione con l'emissione del primo globulo polare, quindi prima della fecondazione; nei Mammiferi, in particolare, all'ovulazione si ha la rottura del follicolo di Graaf, e la separazione dalla granulosa dell'ovocita, che viene ovulato ancora circondato dalle cellule della corona radiata. Al momento dell'ovulazione, vengono pertanto rimosse le inibizioni che la granulosa esercita sull'ovocita mediante giunzioni gap (vedere 3.3.1f). In particolare cessa il trasporto di cAMP dalla granulosa all'ovocita. Dal momento che livelli elevati di cAMP inibiscono la maturazione, la sua diminuzione e, di conseguenza, quella della proteina chinasi A, portano alla ripresa della prima divisione meiotica. Negli Anfibi, il nucleo dell'ovocita è vicino alla membrana plasmatica del polo animale, localizzato all'interno di una macchia priva di pigmento, la cosiddetta *macchia di maturazione* che si forma nello strato pigmentato dell'emisfero animale durante gli eventi che portano all'emissione del primo globulo polare dopo la rottura della vescicola germinativa. Il fuso meiotico che si viene a formare si orienta perpendicolarmente al di sotto della membrana plasmatica dell'ovocita. Alla fine della telofase, si formano due cellule molto diverse: l'ovocita II ed il primo globulo polare. I cromosomi dell'ovocita II si organizzano all'equatore del fuso mitotico per cui si raggiunge molto rapidamente la metafase della seconda divisione meiotica.

Il nucleoplasma diffonde nel citoplasma a seguito della rottura dell'involucro nucleare. È stato mostrato mediante immunocitochimica in ovociti di Anfibi che le diverse proteine contenute nella vescicola germinativa si distribuiscono nel citoplasma seguendo una topografia tipica per ciascuna di esse. Queste localizzazioni rimangono invariate durante la segmentazione ed è stato evidenziato un via vai di tali proteine tra nucleo e citoplasma fino allo stadio di blastula.

Al momento della maturazione i granuli corticali, formati dall'apparato di Golgi, si sistemano sotto la membrana plasmatica in stretta associazione con il citoscheletro corticale. I centrioli materni scompaiono prima della ripresa della meiosi.

Negli Invertebrati, la maturazione è provocata da altri fattori. Nel riccio di mare, il rilascio degli ovociti nell'acqua di mare fa scattare le due divisioni meiotiche, mentre nei Nematodi è la penetrazione dello spermatozoo a far iniziare la meiosi.

3.4.2 Il meccanismo della maturazione (Fig. 3.12)

È stato mostrato che nella maturazione intervengono in successione due fattori: il fattore che promuove la maturazione (MPF che sta per *Maturation Promoting Factor*) ed il fattore citostatico (CSF, *Cytostatic Factor*). Negli Anfibi, la maturazione viene

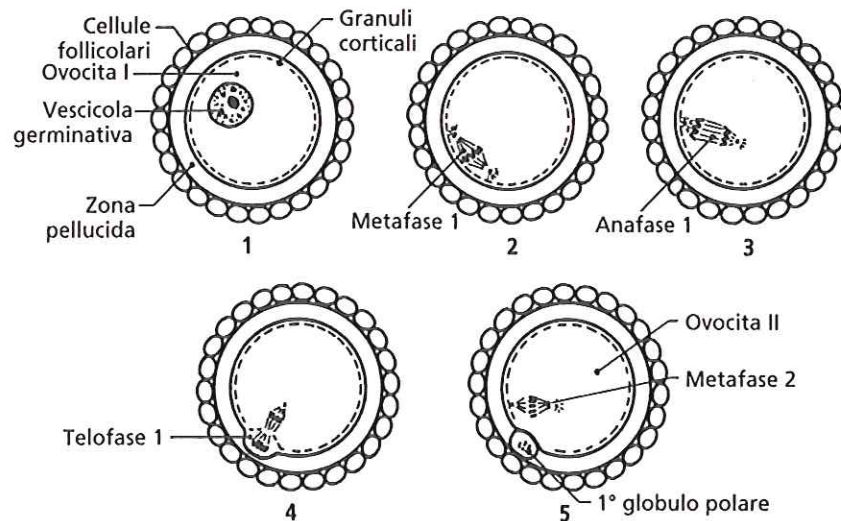


Fig. 3.12 Maturazione e ripresa della meiosi nell'ovocita di Mammifero prima dell'ovulazione. Da 1 a 4: rappresentazione schematica della prima divisione meiotica, con la rotazione del fuso all'anafase, che permette la formazione di due cellule figlie di dimensioni ineguali, l'ovocita II ed il primo globulo polare (5).

indotta dal progesterone che interviene indirettamente nella formazione e nell'attivazione di questi due fattori.

a) Il fattore che promuove la maturazione (MPF)

È stato descritto per la prima volta negli ovociti di Anfibi. È presente in tutte le cellule degli Eucarioti ed interviene nella transizione G2/M della meiosi e della mitosi. Esso corrisponde ad un complesso proteico in cui sono associate una *ciclina*, la *ciclina B*, sintetizzata prima della ripresa della divisione cellulare da corrispondente mRNA materno, ed una *protein-chinasi ciclina-dipendente*, la proteina p34, detta anche *chinasi cdc2* o *cdk1*.

Per rendere attivo l'MPF sono necessarie diverse fosforilazioni/defosforilazioni a livello della chinasi cdc2. Queste sono scatenate da una fosfoproteina di 39kDa, la proteina Mos detta anche pp39^{mos}, prodotta dal proto-oncogene *c-mos*. La proteina Mos è sintetizzata all'inizio della maturazione per effetto del progesterone, a partire da mRNA inattivo trascritto durante l'ovogenesi. L'MPF attivo dà origine ad una cascata di fosforilazione di proteine bersaglio che permettono la ripresa della meiosi nell'ovocita competente. Viene fosforilato l'istone H1, il che permette la condensazione dei cromosomi, nonché le lamine (proteine nucleari associate alla membrana nucleare interna), la cui fosforilazione provoca la disgregazione dell'involucro nucleare e la rottura della vescicola germinativa. L'MPF interviene anche nell'organizzazione del fuso meiotico/mitotico interagendo con le MAPs (*Microtubule Associated Proteins*).

L'attività dell'MPF scompare durante la transizione metafase-anafase, a seguito della distruzione della ciclina B e la prima divisione meiotica termina con l'emissione del primo globulo polare. Dopo tale fase, la ciclina viene sintetizzata di nuovo, permettendo così la formazione di nuovo MPF attivo e quindi la seconda divisione meiotica. Nei Vertebrati, la meiosi viene bloccata in metafase II ad opera del CSF.

3.5 L'OVOGENESI NELLA DROSOFLA

Alcuni meccanismi generali che presiedono allo sviluppo degli organismi incominciano ad essere compresi grazie alle conoscenze acquisite in drosofila e successivamente verificate in larga misura anche in altri Metazoi. Per questo motivo è indispensabile conoscere l'embriogenesi di questo insetto a partire dalle sue premesse, cioè dall'ovogenesi.

La drosofila è l'animale di cui si conosce meglio la genetica e in cui le anomalie strutturali sono riconducibili alla mutazione di precisi geni. È stato dimostrato che un certo numero di geni, che controllano la polarità della larva e dell'adulto, sono geni materni espressi negli ovociti nel cui citoplasma si trovano anche le proteine in grado di tradurli.

3.5.1 Organizzazione dell'ovario e degli ovaroli

Gli ovari degli Insetti sono composti da ovaroli che sboccano in un ovidutto (Fig. 3.13). Ogni ovarolo è una sorta di tubulo che contiene degli ovogoni nella sua porzione apicale o *germario*. Nell'ovarolo sono allineati gli ovociti, il cui stato di accrescimento è tanto più avanzato quanto più essi si trovano vicini all'ovidutto. Gli ovociti sono circondati da cellule follicolari e, in alcuni tipi di ovari, sono collegati mediante ponti citoplasmatici a cellule nutrici che sono anch'esse cellule della linea germinale. La zona in cui si svolge l'accrescimento degli ovociti viene chiamata *vitellario*.

Nei Ditteri, come per esempio la drosofila, gli ovaroli sono detti *meroistici*, perché essi comprendono delle cellule nutrici, e *politrofici*, perché le cellule nutrici accompagnano l'ovocita nel vitellario nella sua discesa lungo l'ovarolo cioè durante tutto il suo accrescimento (Fig. 3.13B).

Il numero di cellule nutrici dipende dal numero di mitosi a cui è soggetto un ovogonio. In drosofila, 4 divisioni danno luogo ad un clone di 16 cellule legate tra di loro da ponti citoplasmatici, e di queste una sola si differenzia in ovocita I, le altre 15 in cellule nutrici. Le cellule che si differenziano come nutrici sono unite da 3 ponti citoplasmatici, la cellula che si differenzia come cellula uovo è invece collegata alle altre da 4 ponti.

Alcuni ovaroli meroistici hanno cellule nutrici che rimangono attaccate al germario. Tali ovari sono detti *meroistici telotrofici* o *acrotrfici* (per esempio Emitteri e numerosi Coleotteri).

Gli ovaroli senza cellule nutrici sono chiamati *panoistici* (per esempio Odonati e Ortoteri). In tali ovaroli, gli ovociti accumulano le riserve nutritive che originano dall'emolinfa, dopo essere stati o meno veicolate nelle cellule follicolari.

3.5.2 Sintesi di RNA

Gli ovociti di drosofila non hanno cromosomi a spazzola e non sintetizzano attivamente RNA. I nuclei duplicano il loro DNA e restano in profase meiotica. Gli RNA sono trascritti nelle cellule nutrici e trasportati nel citoplasma ovocitario mediante i ponti citoplasmatici.

b) Il fattore citostatico (CSF)

Il CSF è stato descritto in tutti i Vertebrati. Si ritiene che esso sia costituito da due proteine Mos e da una protein-chinasi ciclina-dipendente (cdk2).

Il CSF ha una forte attività protein-chinasica e la sua attività porta al blocco in metafase II probabilmente perché inibisce la degradazione della ciclina dell'MPF e quindi la transizione metafase/anafase.

Alla fecondazione il CSF è degradato a seguito di una liberazione intracellulare di Ca^{++} (vedere 4.3.1), da cui dipende anche l'attivazione della calmodulina. La cdk2 è inattivata da una protein-chinasi attivata dalla calmodulina, e Mos è degradata dalla calpaina II, enzima proteolitico, anch'esso Ca^{++} -dipendente. Viene così rimosso il blocco in metafase II e la seconda divisione meiotica può essere completata.

3.4.3 Ripresa delle sintesi alla maturazione

a) Ripresa della sintesi proteica

Durante la maturazione degli ovociti di Anfibi, la sintesi proteica è riattivata ed aumenta progressivamente, raggiungendo il suo picco nel momento in cui avviene l'emissione del primo globulo polare. Essa si mantiene a livelli elevati per molte ore. La sintesi proteica si verifica anche in ovociti enucleati sperimentalmente purché trattati con progesterone, mostrando così che essa non si attua a partire da messaggeri trascritti in questa fase. I messaggeri che codificano per queste proteine sono invece tra quelli immagazzinati nell'ovocita in accrescimento. È stato poi mostrato sperimentalmente, mediante trattamento con puromicina o cicloeximide, che la traduzione delle proteine è necessaria per ottenere la rottura della vescicola germinativa e quindi la ripresa della meiosi. Le proteine neosintetizzate, tra cui quelle dell'MPF e del CSF, penetrano nel nucleo ovocitario ed in condizioni sperimentali sono in grado di entrare anche nei nuclei di cellule somatiche precedentemente introdotti nell'ovocita in via di maturazione. Simili osservazioni sono state compiute in ovociti di topo.

Uno dei meccanismi mediante i quali si ottiene l'attivazione della traduzione degli mRNA alla maturazione sembra essere la poliadenilazione, in particolare l'aggiunta di una catena di poli(A) in 3', da 50 a 300 basi, che si verifica prima che avvenga l'inizio della traduzione. Negli Anfibi e nei Mammiferi, ad esempio, poco prima dell'espulsione del primo globulo polare avviene la poliadenilazione dell'mRNA della proteina Mos e dell'attivatore del plasminogeno.

b) Attivazione e blocco del meccanismo di duplicazione del DNA

La maturazione è accompagnata dall'attivazione di una DNA polimerasi citoplasmatica che penetra nel nucleo. Ciò è stato dimostrato iniettando, nel citoplasma ovocitario, nuclei provenienti da cellule somatiche. Questi nuclei dapprima aumentano di volume a causa dell'ingresso di proteine citoplasmatiche ovocitarie, successivamente duplicano il proprio DNA, come dimostrato da incorporazione di timidina 3H , ed infine entrano in metafase, stadio in cui vengono bloccati per la presenza nel citoplasma dell'ovocita del fattore CSF.