

Le proprietà elettive della cellula: regolazione espressione genica e differenziamento **divisione cellulare**

Cdl Tecnici di Lab. Biomedico Aa.
2011-12 Prof.ssa Flavia Frabetti

Ciclo di divisione cellulare o “Ciclo cellulare”

ciclo riproduttivo della cellula cioè
la **sequenza ordinata di eventi** per cui una cellula
duplica il suo contenuto e si divide

Nel ciclo prima della divisione fisica nelle cellule figlie si ha:

1. **duplicazione del DNA**
2. raddoppiamento della massa cell. e duplicazione degli organuli

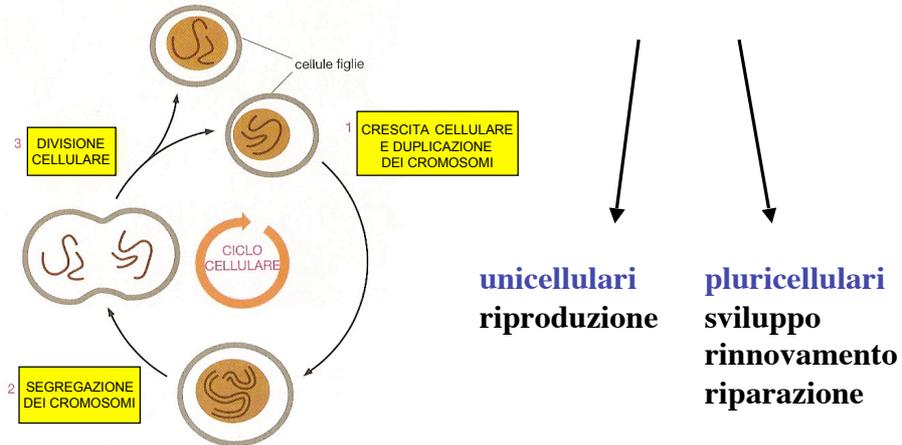


passaggi **coordinati**
nel tempo e nello spazio

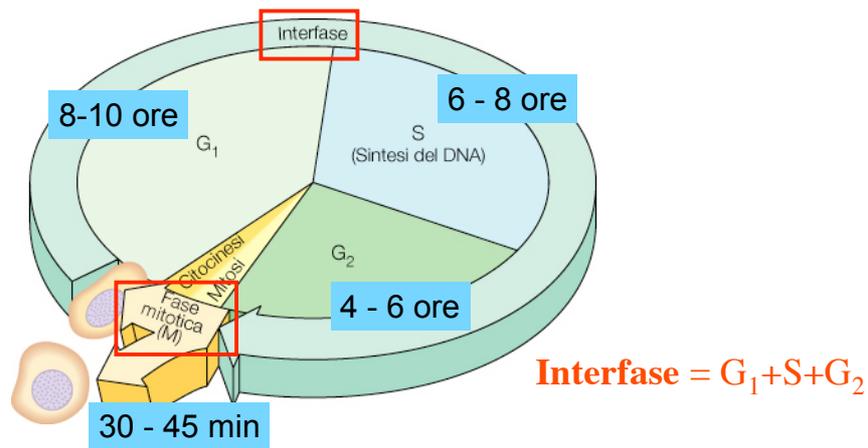


Il ciclo cell. deve essere controllato da precisi meccanismi

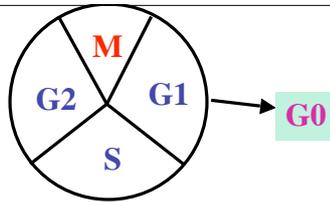
ACCRESIMENTO E DIVISIONE



Descrizione del ciclo di divisione cellulare



Mitosi (M) è il processo di **divisione nucleare** che termina con la **citocinesi o citodieresi** ovvero la divisione del citoplasma

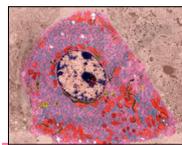


Dalla fase G_1 , le cellule che non hanno ancora duplicato il DNA, possono entrare in una **fase di stasi cellulare detta di quiescenza** identificabile con G_0 : l'arresto del ciclo può essere temporaneo o definitivo



cellule perenni

con perdita definitiva della capacità riproduttiva



cellule stabili

sospendono la loro attività riproduttiva, ma mantengono tale capacità all'occorrenza

≠

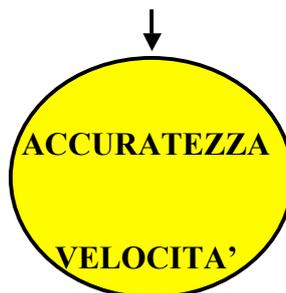


cellule labili

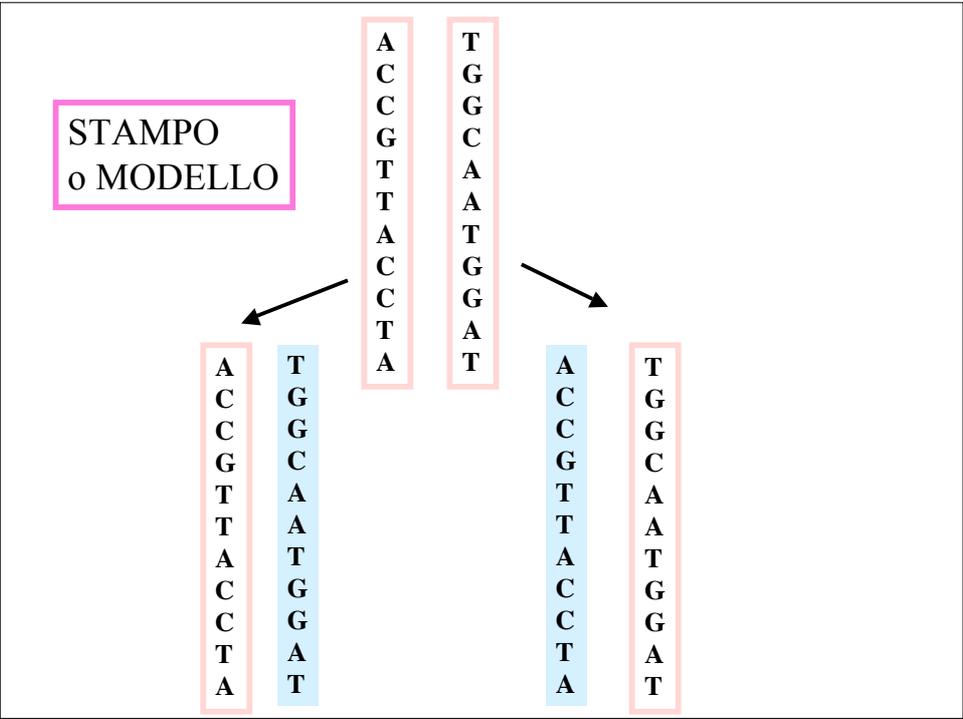
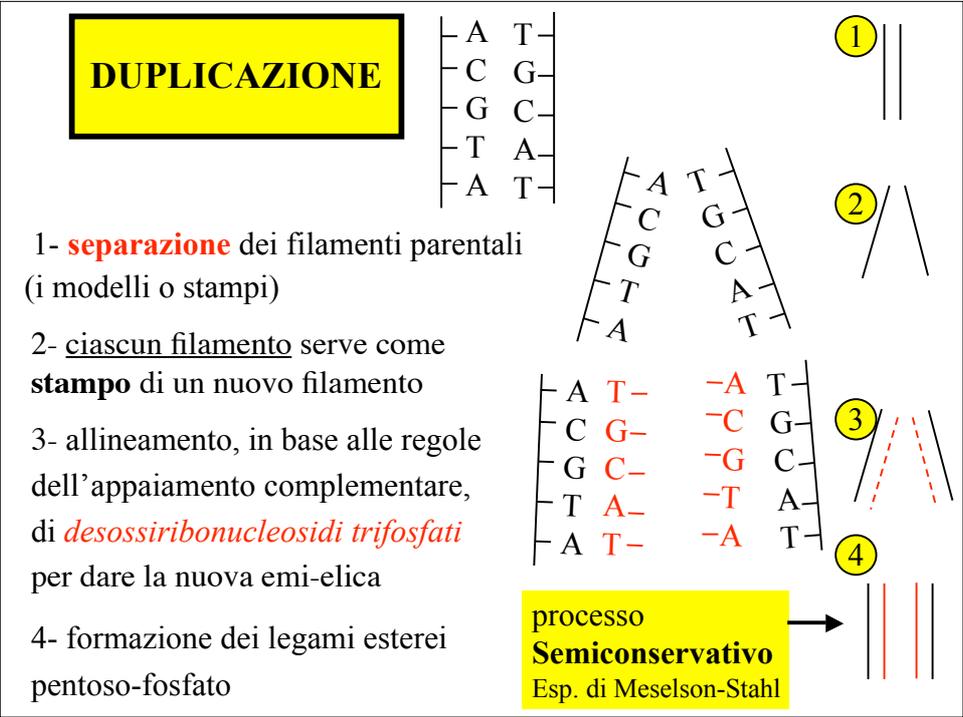
sottoposte a usura e continuamente si dividono

Fase S: sintesi DNA

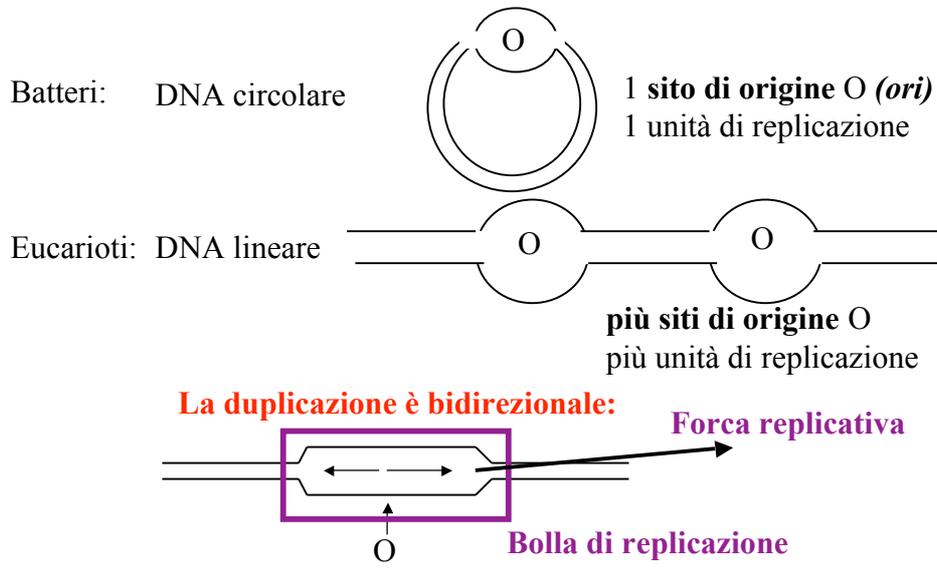
Replicazione del DNA o duplicazione del DNA, meccanismo fondamentale per mantenere invariato il patrimonio informativo ed indispensabile premesse di ogni processo di **divisione cellulare**.



Sistema multi-enzimatico



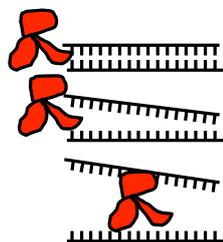
Inizio ed andamento della duplicazione



Alcuni problemi e le relative soluzioni:

Separazione delle catene parentali problemi e soluzioni

1) **La doppia elica è una struttura stabile:** per denaturalarla sono necessarie alte temperature (90°C); intervengono degli enzimi, le ELICASI



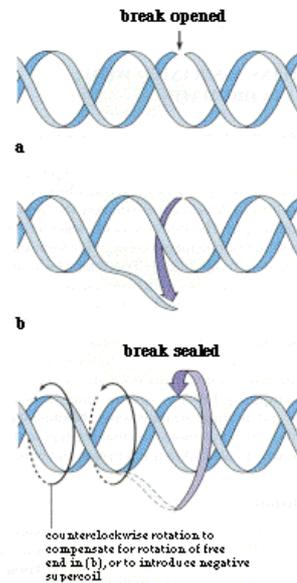
Separa l'elica con dispendio di ATP

2) **Mantenere le catene parentali in conformazione estesa.**
DBP= *DNA binding protein*, si legano a DNA a singolo filamento



3) Durante la duplicazione si possono avere **superavvolgimenti della struttura** in grado di danneggiarla.

Le **topoisomerasi** operano **tagli momentanei** utili ad “allentare” le tensioni.



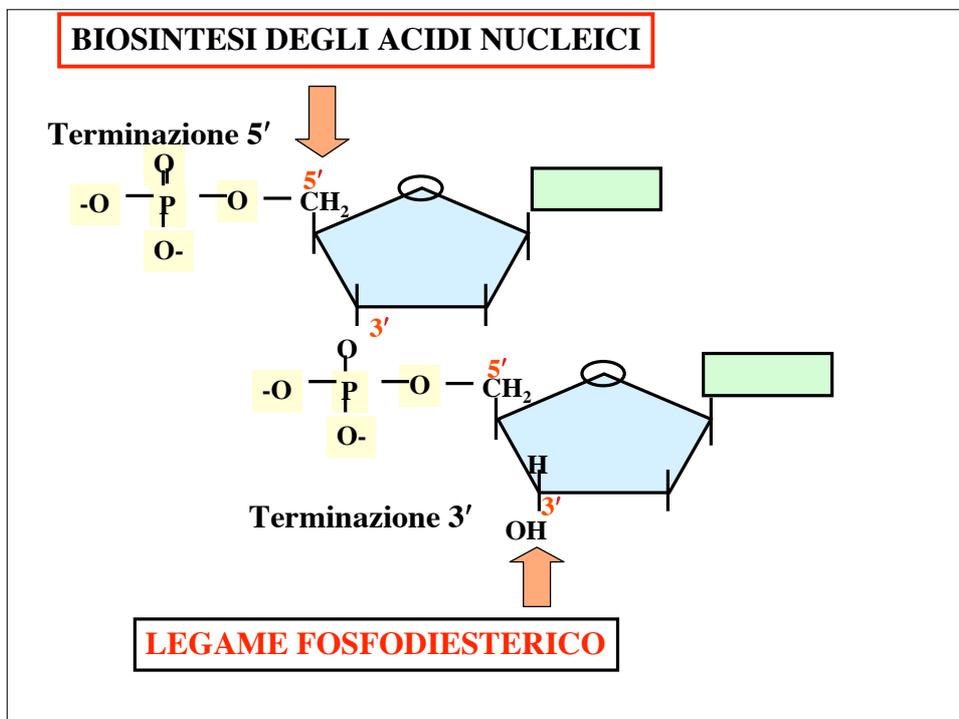
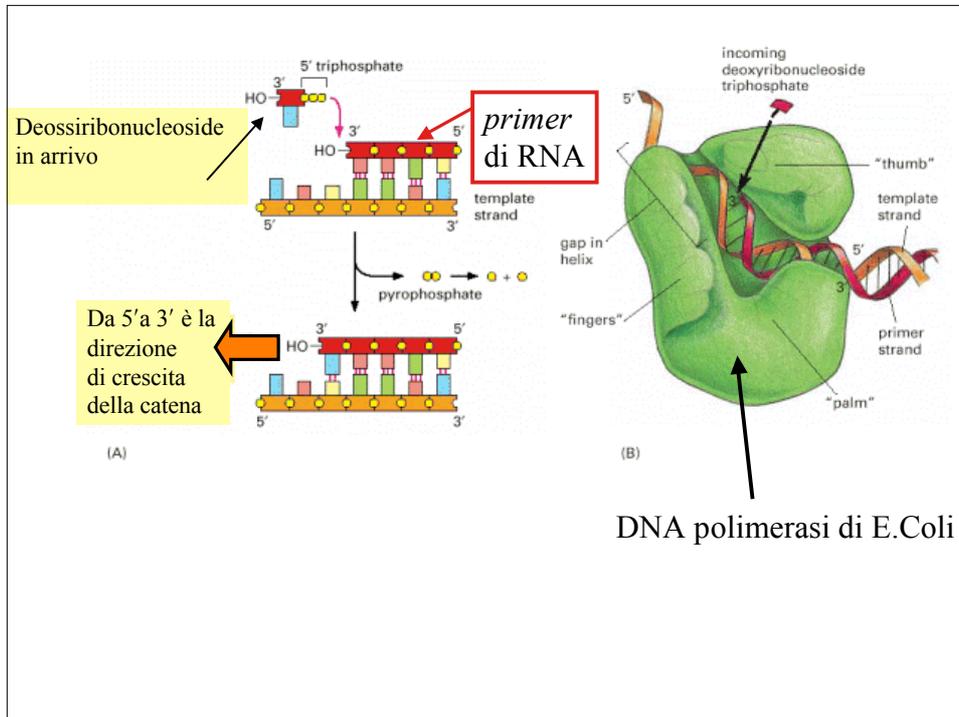
Sintesi delle catene figlie

Complesso multi-enzimatico:
DNA polimerasi
primasi
ligasi

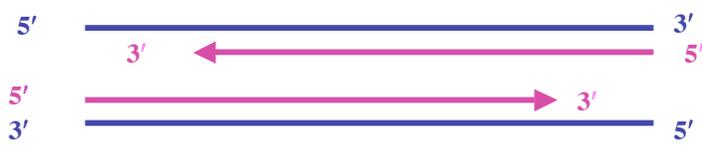
DNA polimerasi è un enzima esigente, ha bisogno di:

- 1- un **MODELLO** o STAMPO
- 2- un **innesco o primer** = piccolo RNA, complementare allo stampo, che fornisce il 3'OH a cui attaccare il nuovo nucleotide, costruito dalla *primasi o RNA-polimerasi*
- 3- **desossiribonucleosidi tri-fosfati**

La catena che sintetizza ha direzione obbligatoria da 5' → a 3'



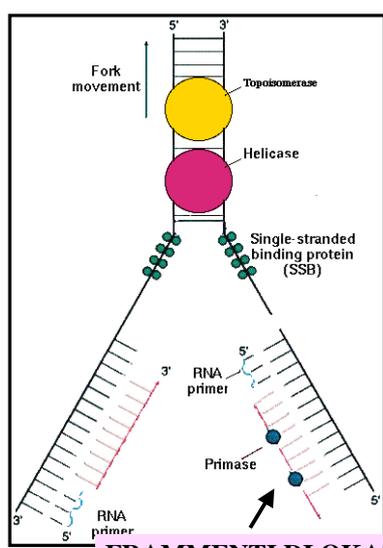
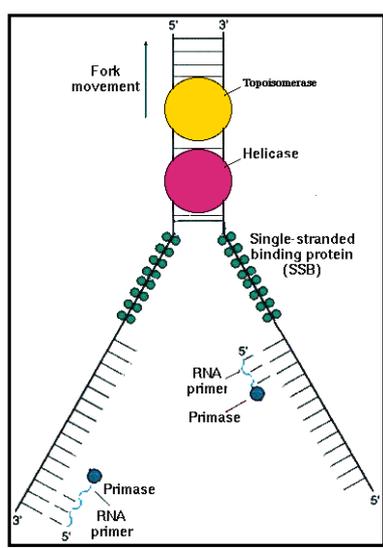
DIREZIONE DI REPLICAZIONE



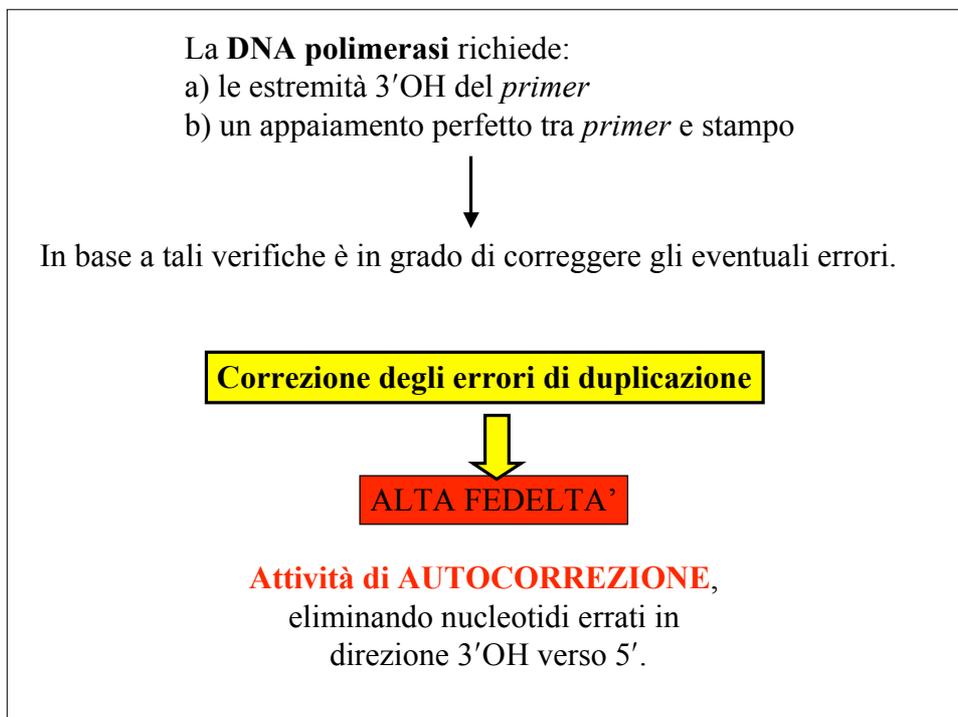
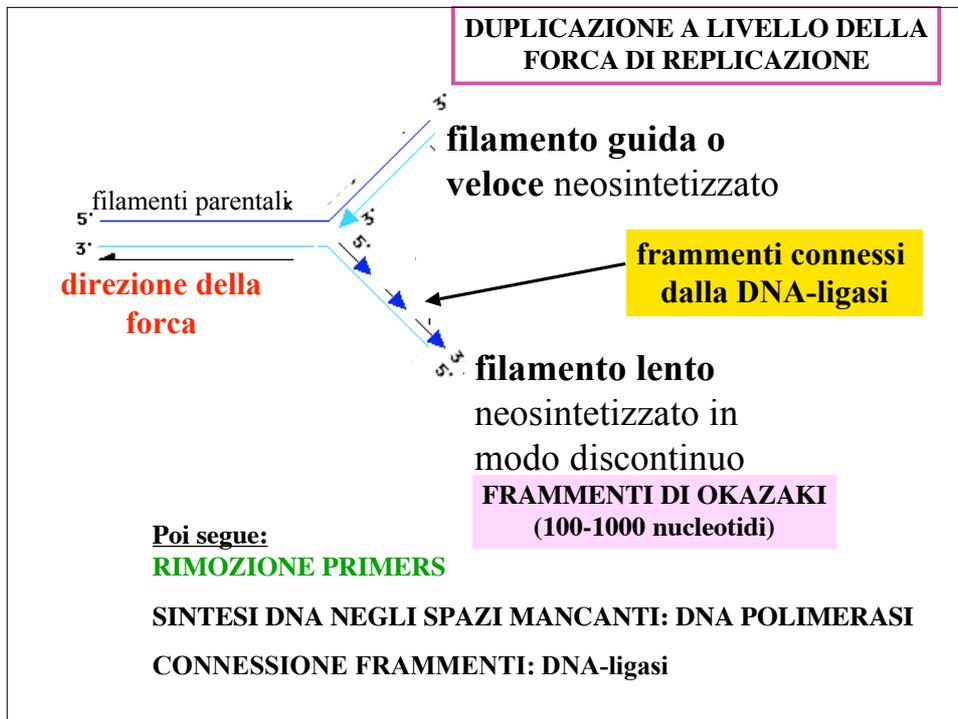
LA DNA POLIMERASI NECESSITA DI UN PRIMER



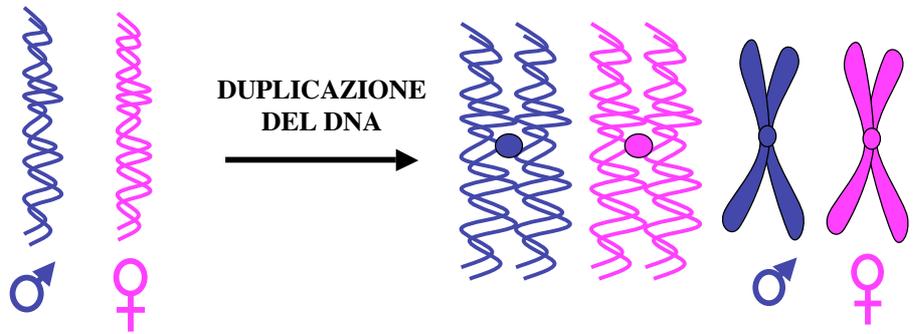
Funzioni catalitiche della DNA polimerasi



**FRAMMENTI DI OKAZAKI
(100-1000 nucleotidi)**



Cosa sono i cromosomi? Molecole di DNA!



cromosomi

Dimensioni medie:

- 2nm diametro
- 8 cm lunghezza

cromosomi dicromatidici

Li vediamo solo quando:

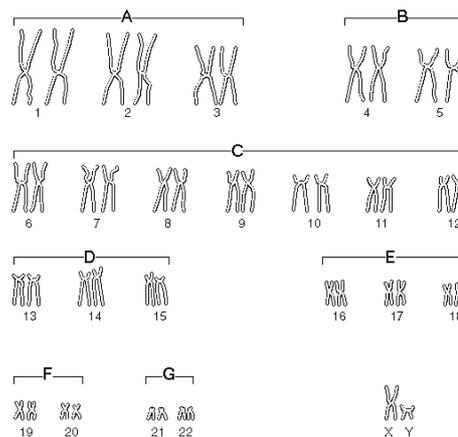
- 1 μm di diametro
- alcuni μm di lunghezza

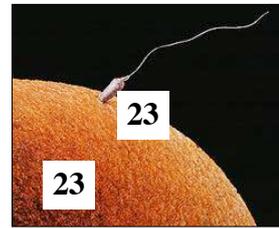
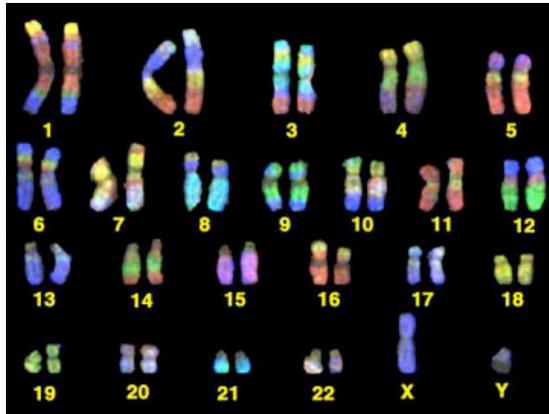
CARIOTIPO

Corredo cromosomico di un individuo o della specie a cui appartiene; viene realizzato bloccando i cromosomi durante la fase M

**ESSERE UMANO:
23 COPPIE DI CROMOSOMI = 46**

**22 AUTOSOMICI x 2 = 44
2 SESSUALI (XX o XY)**





**CORREDO CROMOSOMICO
DIPLOIDE**
CON DUE SERIE DI
CIASCUN CROMOSOMA
2n

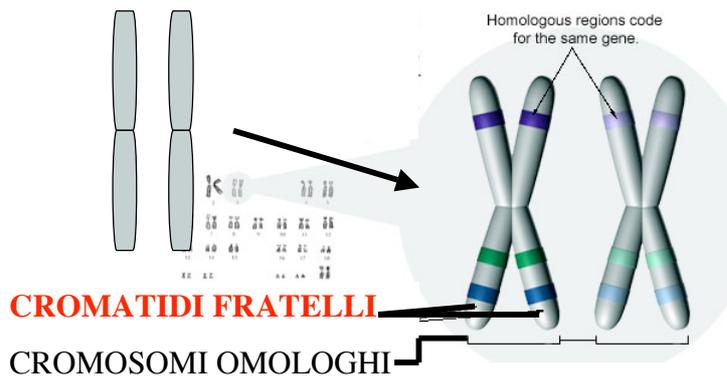
Con eccezione delle cell. germinali, le cellule umane hanno **due copie di ognuno dei cromosomi: una di origine materna ed una di origine paterna**

→ **23 coppie di cromosomi**
→ **46 cromosomi**

→ **Corredo cromosomico
DIPLOIDE**



Dopo la fase S, ogni cromosoma sarà costituito di 2 **CROMATIDI** “fratelli” che sono repliche esatte, frutto della duplicazione del DNA.

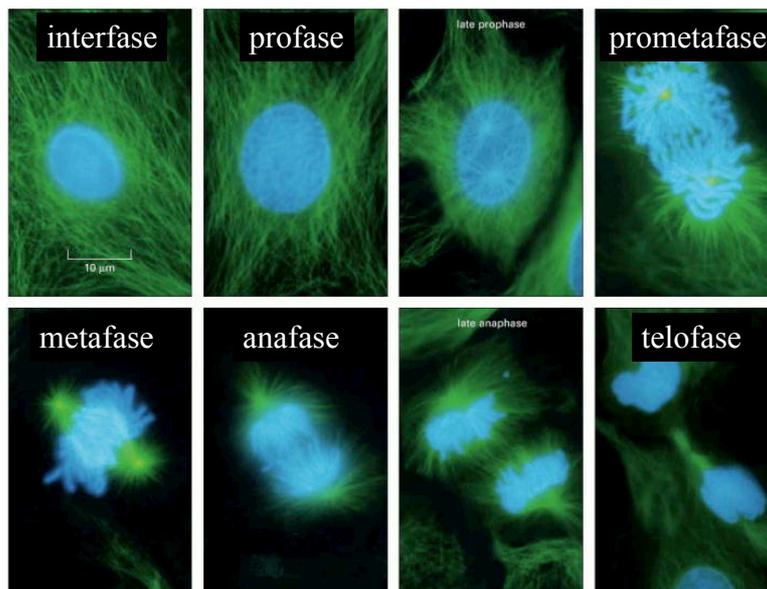


I cromosomi di una coppia (uno di origine **materna** ed una di origine **paterna**) si definiscono **OMOLOGHI**, poiché contengono le medesime informazioni (geni) nello stesso punto (*locus*), ma possono essere differenti versioni per la stessa informazione

Quale processo permette di mantenere il corretto numero cromosomico?

Mitosi

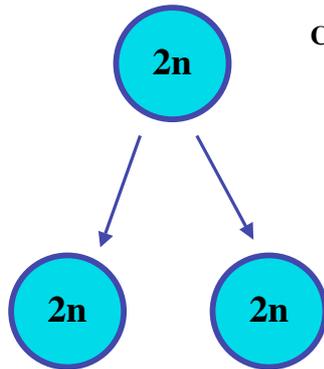
Il **citologo** ed il **biologo** osservano eventi e fenomenologia



Il **genetista** osservano il contenuto di cromosomi e DNA

MITOSI

DIVISIONE CELLULARE
CELLULE SOMATICHE

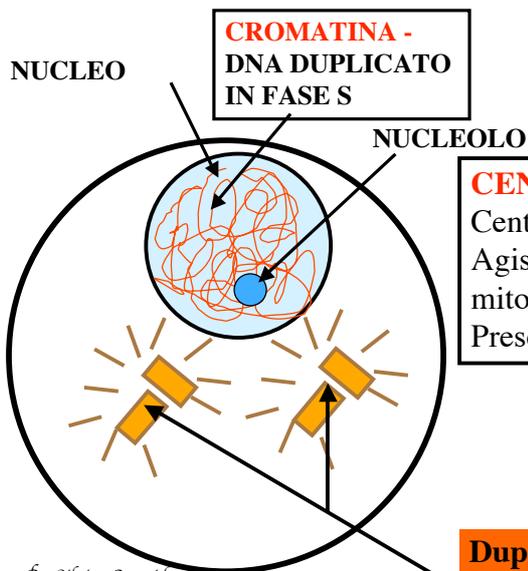


CORREDO CROMOSOMICO
DIPLOIDE

CORREDO CROMOSOMICO
DIPLOIDE

**DA 1 CELLULA SI OTTENGONO
2 CELLULE GENETICAMENTE
UGUALI TRA LORO
E ALLA CELLULA MADRE**

INTERFASE



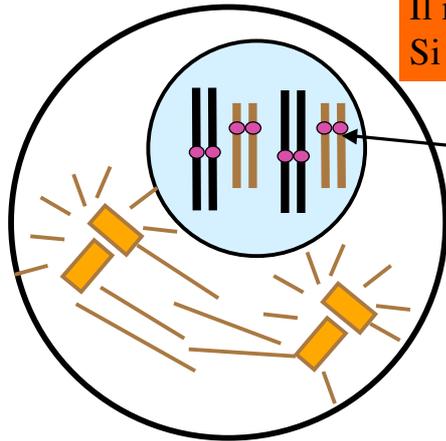
CENTROSOMA
Centro organizzatore dei microtubuli
Agisce da polo del fuso durante la mitosi.
Presenta una coppia di centrioli.

Duplicazione del DNA
Duplicazione dei CENTROSOMI

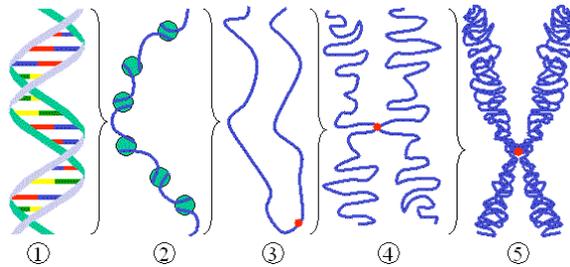
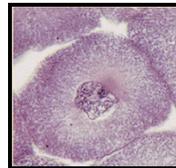
By Silvia Canaider

1- PROFASE CORREDO CROMOSOMICO DIPLOIDE
Esempio con due coppie di cr. omologhi

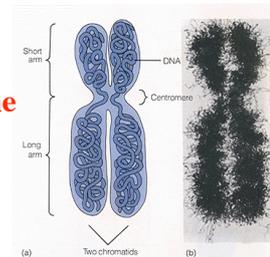
Condensazione dei cromosomi
Il nucleolo scompare
Si inizia a formare il fuso



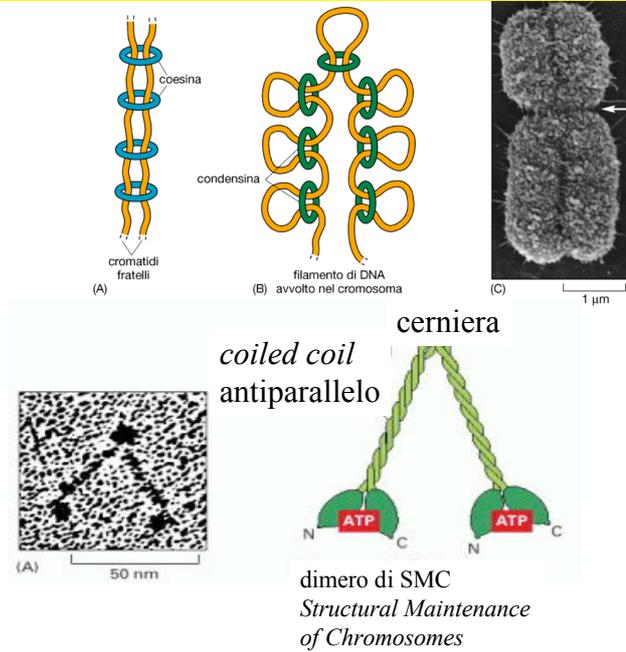
CROMOSOMI
DI-CROMATIDICI
(DNA DUPLICATO
IN FASE S)



- 1) DNA
- 2) nucleosomi(DNA + istoni)
- 3) interfase con centromeri
- 4) cromosoma in profase **dopo la replicazione**
- 5) cromosoma in metafase



I cromosomi devono essere configurati in modo opportuno

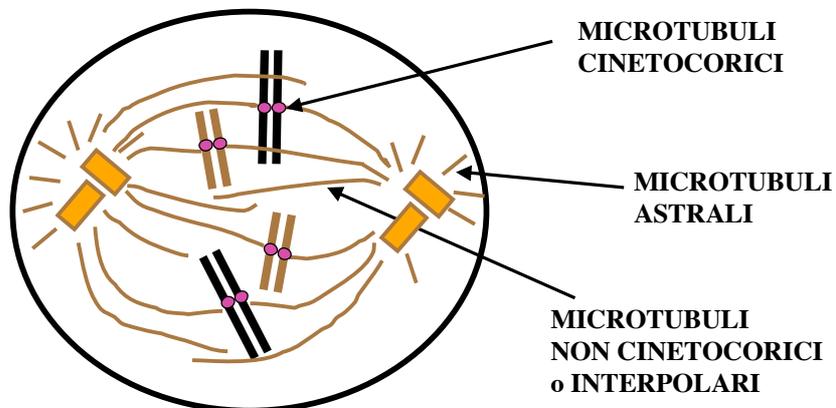
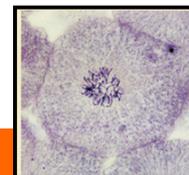


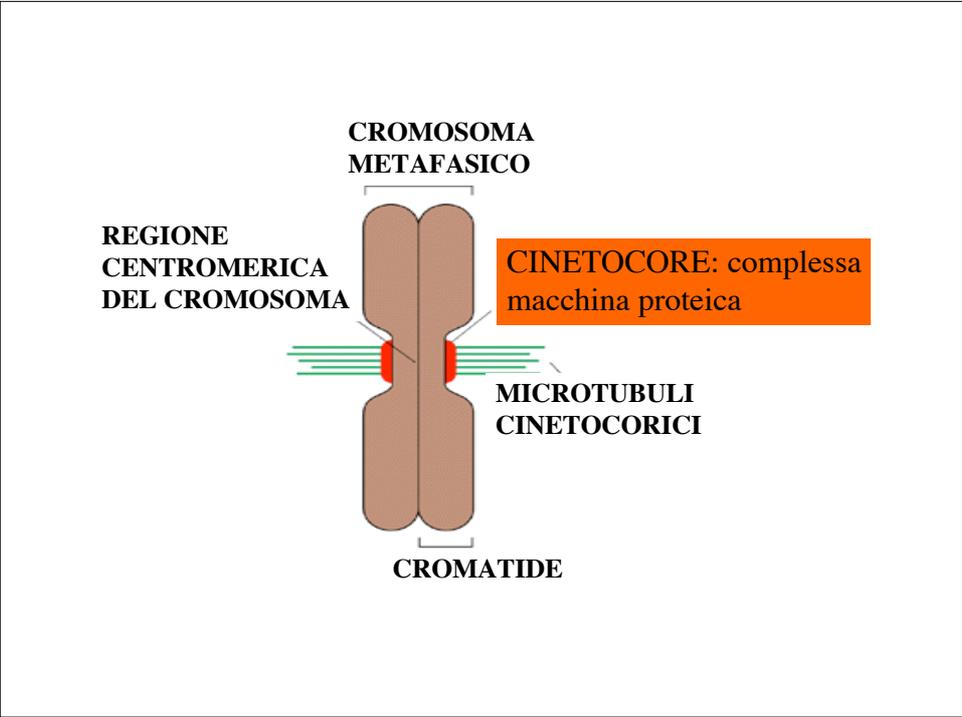
2- PROMETAFASE

Demolizione involucro nucleare

Attacco dei cromosomi al fuso: "ricerca e cattura"

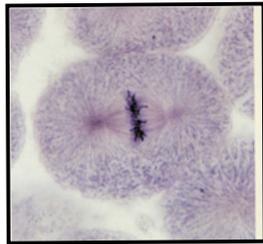
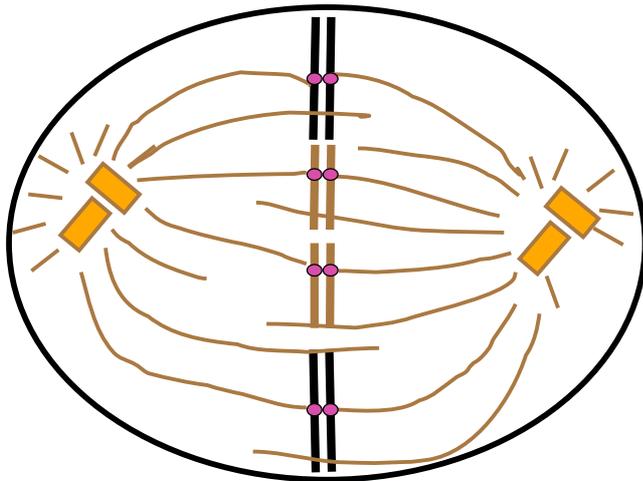
Il fuso si organizza in 3 principali tipi di microtubuli

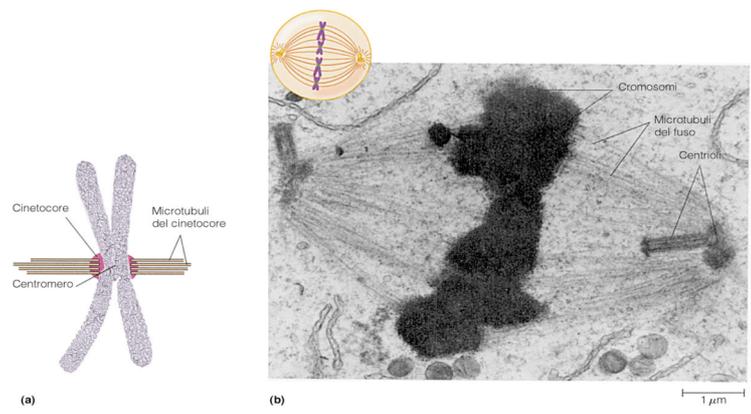




3- METAFASE

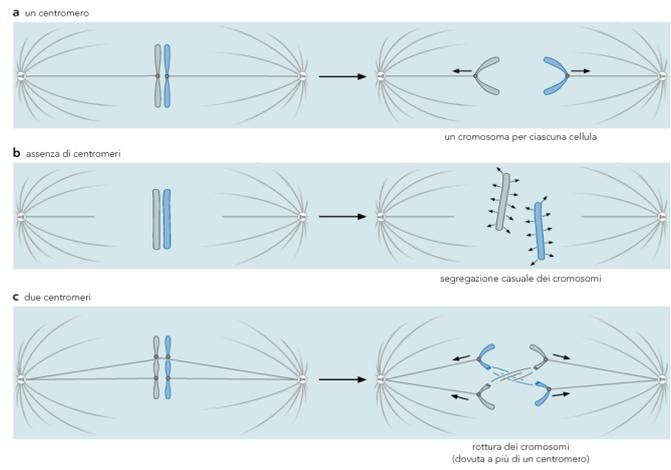
La fase complessivamente **più lunga** della mitosi
 I microtubuli cinetocorici dispongono i cromosomi
 in **piastra equatoriale**, mantenendoli in tensione





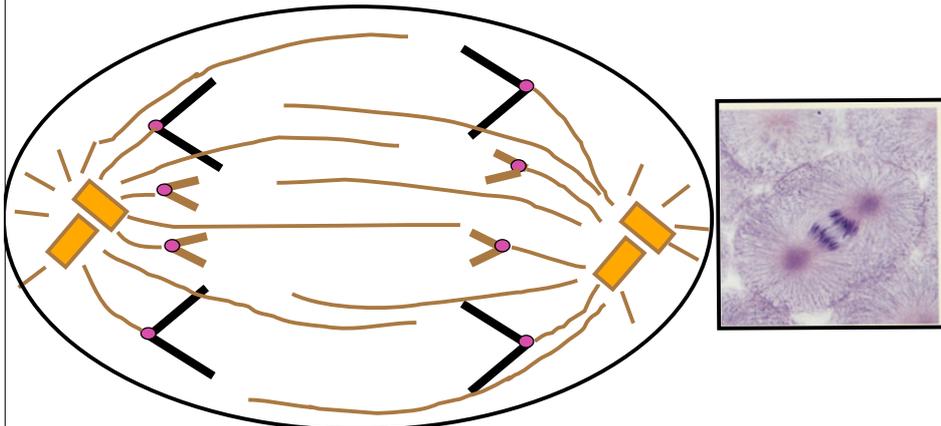
La fase successiva e la separazione dei cromatidi non avviene fino a che tutti i cinetocori non siano legati

L'assenza o la presenza di più di un centromero porta alla PERDITA o alla ROTTURA del cromosoma



4-ANAFASE

I cromatidi fratelli si separano e diventano veri e propri **cromosomi monocromatidici**
Vengono tirati ai poli opposti dalla dinamica dei microtubuli

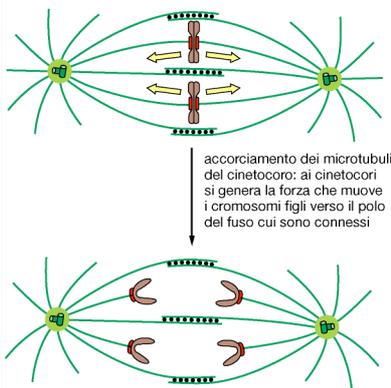


Azione congiunta dei microtubuli cinetocorici e non cinetocorici

ANAFASE A

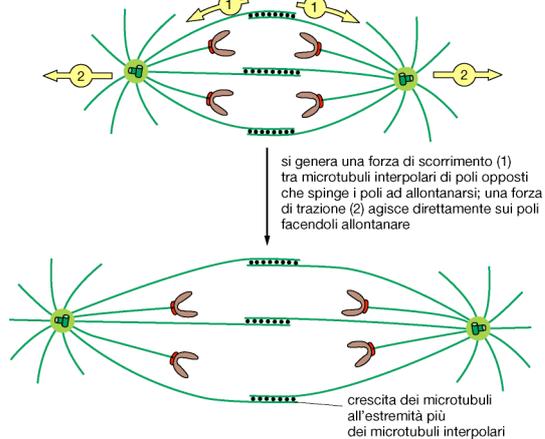
Processi sovrapposti ed indipendenti dei microtub. cinetocorici e non

ANAFASE A I CROMOSOMI VENGONO TIRATI VERSO I POLI



ANAFASE B

ANAFASE B I POLI SONO SIA SPINTI SIA TIRATI IN MODO DA ALLONTANARSI TRA LORO



I ruoli svolti dalle PROTEINE MOTRICI

Le **proteine motrici** utilizzano energia ricavata da ATP per modificare la propria conformazione ed esercitare una **FORZA** che sortisca nel movimento delle strutture annesse o la depolimerizzazione dei MT

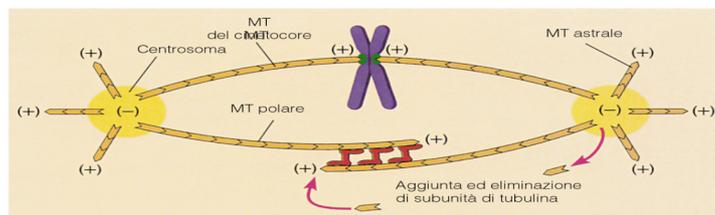
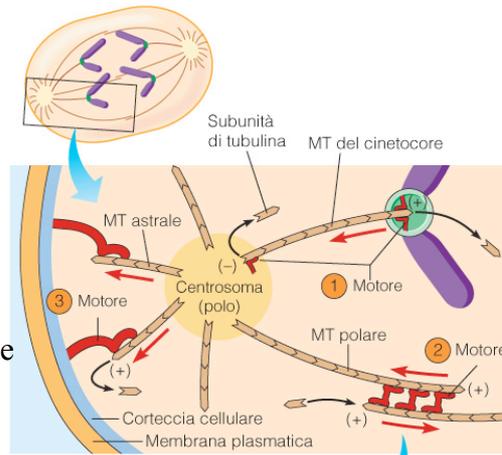
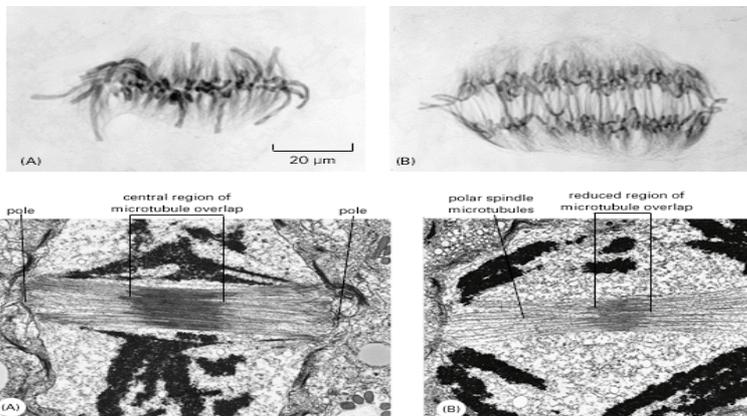
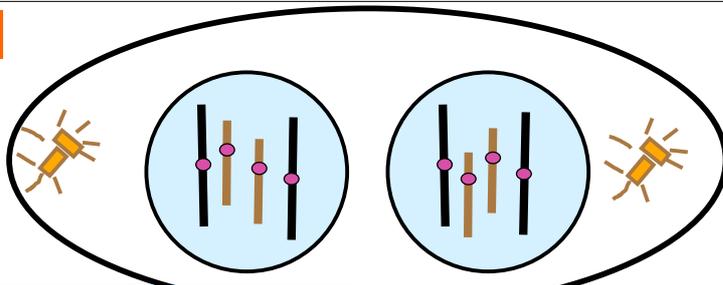
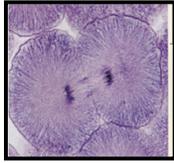


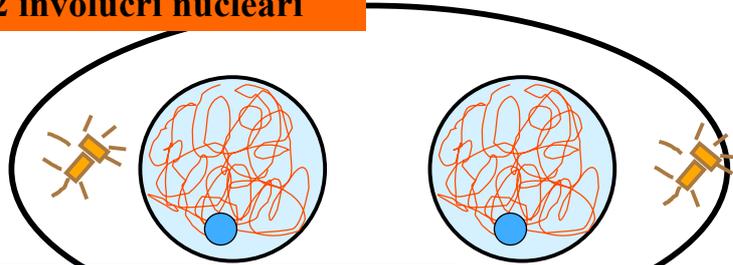
Figura 17-24



5-TELOFASE



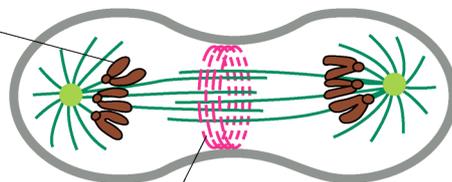
Si disassembla il fuso mitotico
Si formano i 2 involucri nucleari



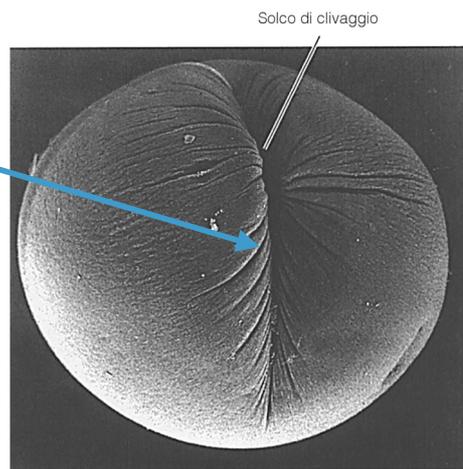
I cromosomi si decondensano (cromatina)
Ricompaiono i nucleoli

CITOCHINESI

ANELLO CONTRATTILE
(ACTINA E MIOSINA)
che all'interno della cellula agisce
provocando un solco che andrà
a dividere le due cellule neoformate



filamenti actinici e miosinici
dell'anello contrattile



Regolazione del ciclo di divisione

Variabilità del ciclo cellulare

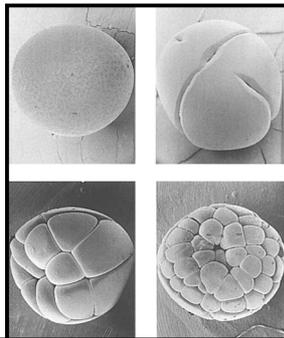
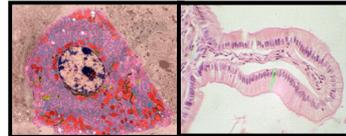
Differenze nel ciclo in base

alla fase del ciclo vitale,

al tipo cellulare

alla specie

durata inferiore ai 30 minuti

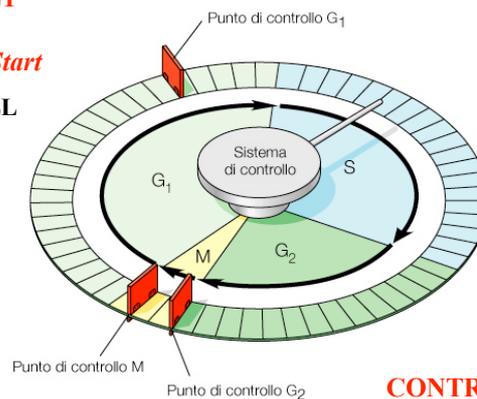


MECCANISMI DI REGOLAZIONE

PUNTI FONDAMENTALI DI CONTROLLO

CONTROLLO G₁
PUNTO DI
RESTRIZIONE o Start

GRANDEZZA CELL
AMBIENTE
DANNI AL DNA



CONTROLLO
METAFASE-ANAFASE

ATTACCO
DEI CROMOSOMI
AL FUSO

CONTROLLO G₂

DUPPLICAZIONE
DANNI AL DNA
AMBIENTE
GRANDEZZA CELL

Il controllo del ciclo di divisione avviene in 2 modi:

1- controllo intra-cellulare o endogeno:

il ciclo è regolato da **fattori proteici** che promuovono il passaggio sequenziale attraverso le varie fasi.

Il motore del ciclo è un sistema biochimico di chinasi dipendenti da cicline

2- controllo extra-cellulare o esogeno:

il ciclo è modulato da **fattori o segnali chimici esterni**, favorevoli o inibenti la divisione cellulare.

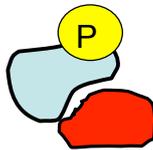
Sono questi **fattori mitogeni** a innescare il motore biochimico di cui sopra

MOTORE BIOCHIMICO che promuove la progressione attraverso il ciclo è dato da:

- fattori proteici
- che operano ciclicamente
- sono dimeri proteici: una **ciclina** e una **protein chinasi ciclina-dipendente (CdK)**

protein chinasi ciclina-dipendenti

enzimi che fosforilano proteine bersaglio (ATP)

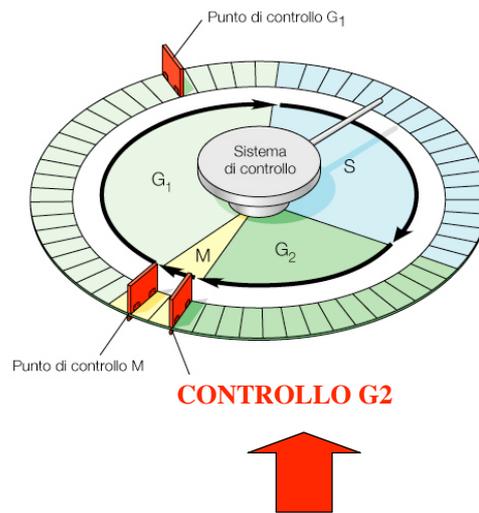


ciclina

componente di una famiglia di proteine che si lega alle CdK e ne modula il funzionamento.

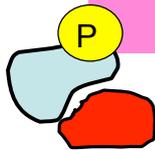
La concentrazione di queste "proteine attivatrici" oscilla con periodicità

Come si può spiegare tutto ciò a livello molecolare?

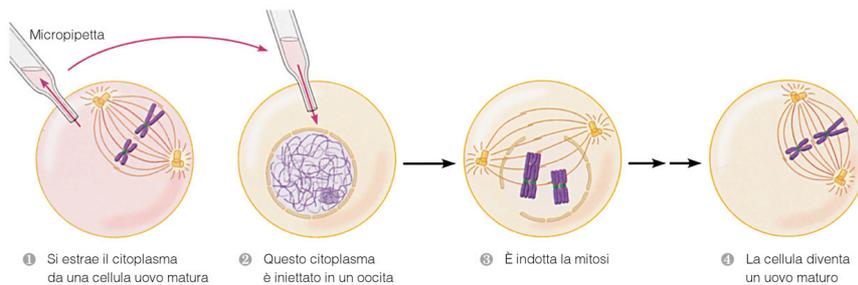


CdK - ciclina M (MPF)

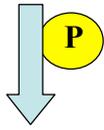
*M-phase promoting factor o
fattore che promuove la maturazione*



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

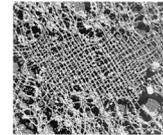


CdK - ciclina M (MPF)



LAMINE

disgregazione nucleare



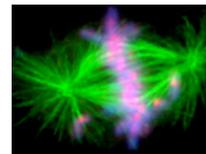
CONDENSINA

compattazione cromosomi

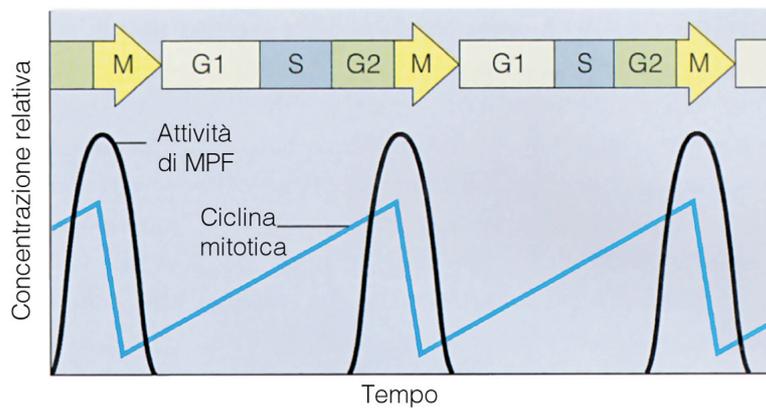


PROTEINE DEI MICROTUBULI

fuso mitotico

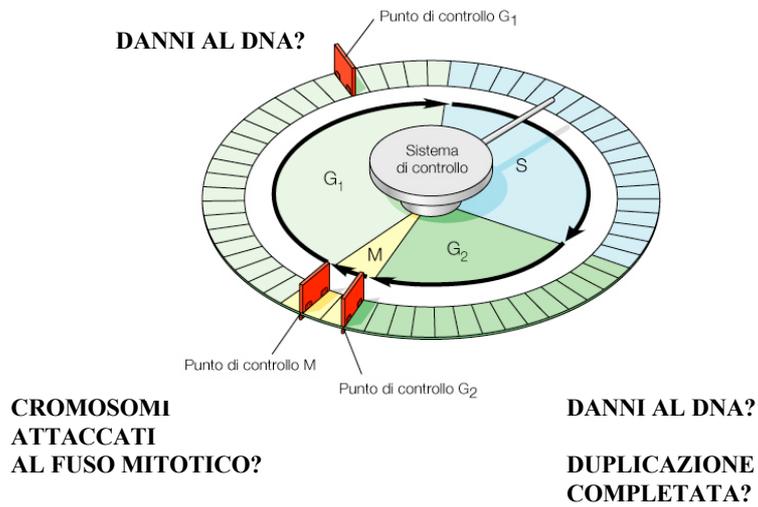


Attività MPF in relazione ai livelli di ciclina M

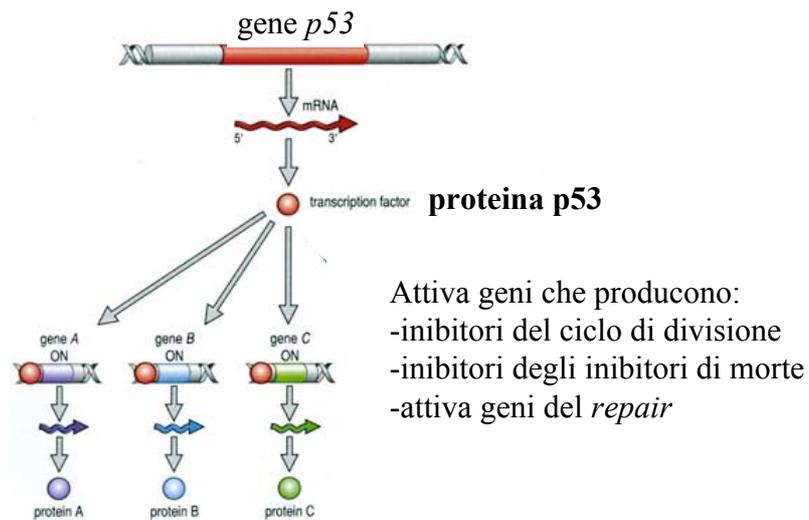


Accumulo graduale della ciclina M (linea azzurra) a partire dalla fase S e dunque accumulo di complessi M-Cdk.
Attivazione di MPF in tarda G2

CHECK POINT - freni della progressione

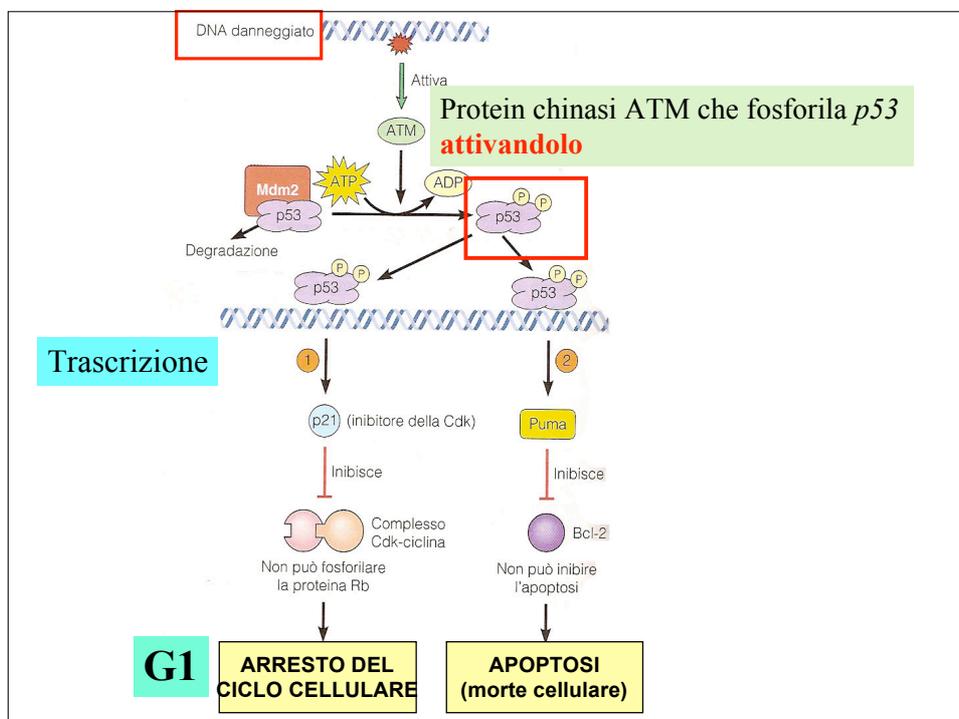


Danni al DNA - ruolo di p53



p53

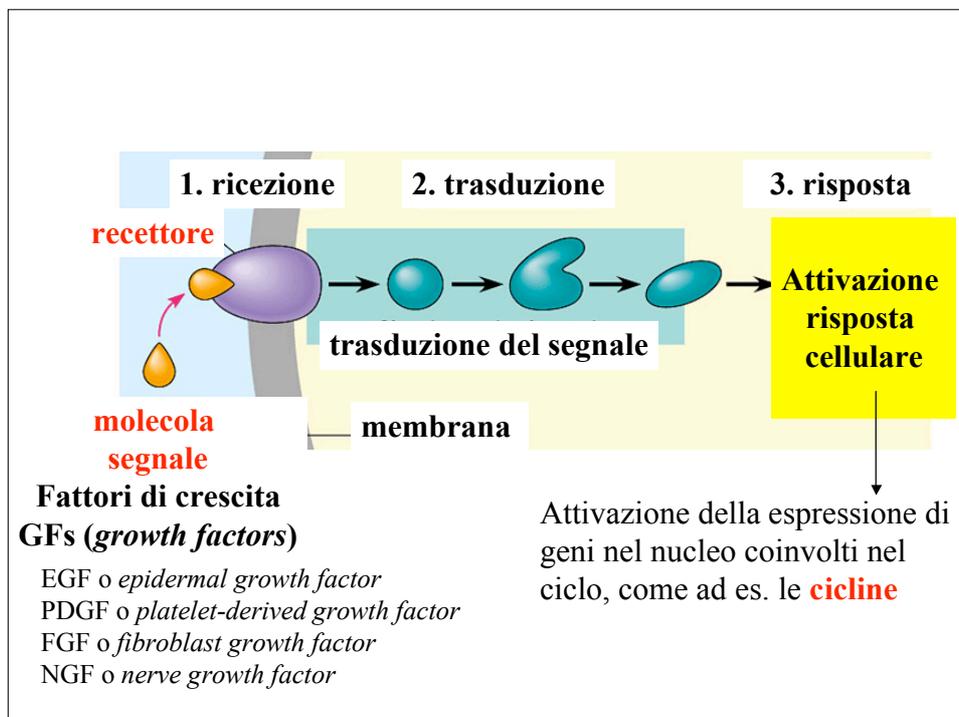
- **Fattore di trascrizione** che controlla diversi *pathway* genici cioè diversi percorsi metabolici biologicamente fondamentali.
- Di norma ha una localizzazione citoplasmatica e la sua attivazione attraverso fosforilazione, lo porta ad essere **traslocato attivamente nel nucleo** dove esplica la sua azione
- Il prodotto genico è *metastabile* in quanto, se non fosforilato, viene avviato al proteosoma e degradato
- Mutato nel 50% dei tumori (80% mutazioni puntiformi, 20% prodotto troncato). Le mutazioni possono causare diverse conseguenze



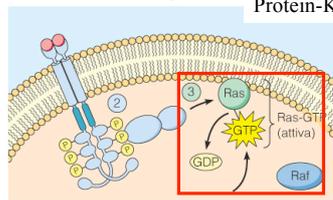
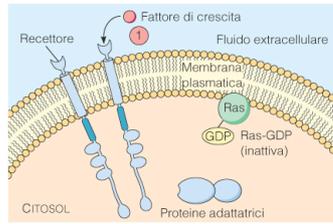
Il controllo del ciclo di divisione avviene in 2 modi:

1- controllo intra-cellulare o endogeno:
il ciclo è regolato da **fattori proteici** che promuovono il passaggio sequenziale attraverso le varie fasi.
Il motore del ciclo è un sistema biochimico di chinasi dipendenti da cicline

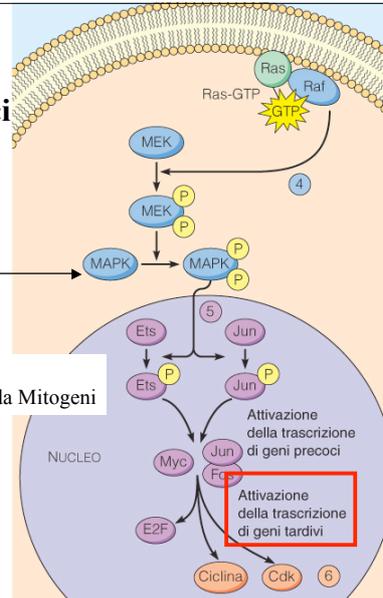
2- controllo extra-cellulare o esogeno:
il ciclo è modulato da **fattori o segnali chimici esterni**, favorenti o inibenti la divisione cellulare.
Sono questi **fattori mitogeni** a innescare il motore biochimico di cui sopra



Es. Segnalazione mediata da FATTORI DI CRESCITA come EGF attraverso R tirosin-chinasici

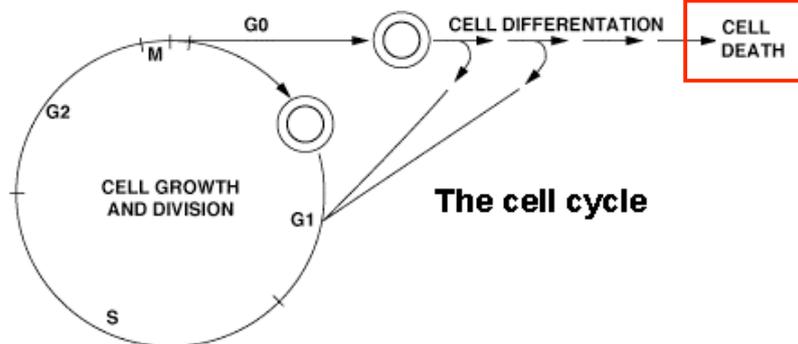


MAPK cioè Protein-Kinasi Attivate da Mitogeni



La cellula viene indotta a **modificare la espressione genica a livello trascrizionale** ed entra in ciclo sintetizzando i prodotti proteici utili per innescare il ciclo di divisione (G₁/S), es. le **ciclina**

La cellula da G₀ può differenziarsi o in taluni casi anche **morire** ed uscire definitivamente dal ciclo



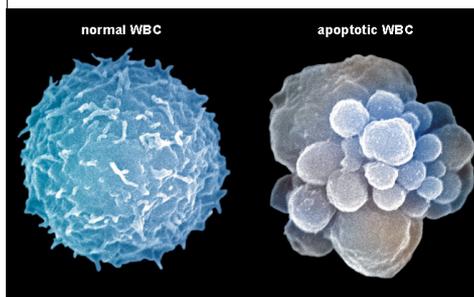
Le proprietà elettive della cellula:

regolazione espressione genica e differenziamento

divisione cellulare

comunicazione cellulare (*cenni*)

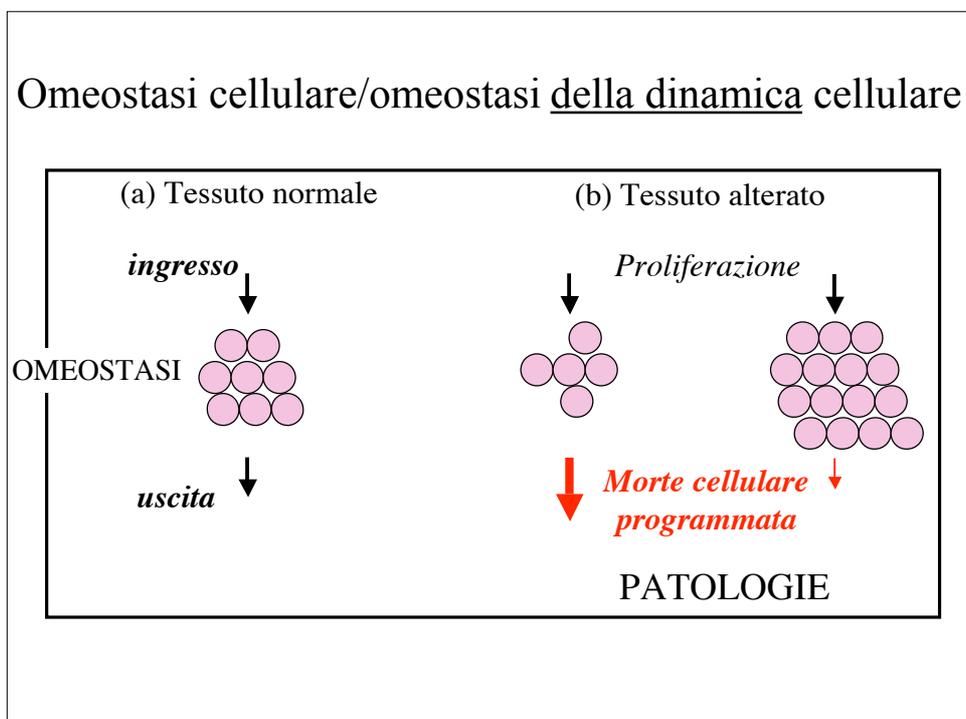
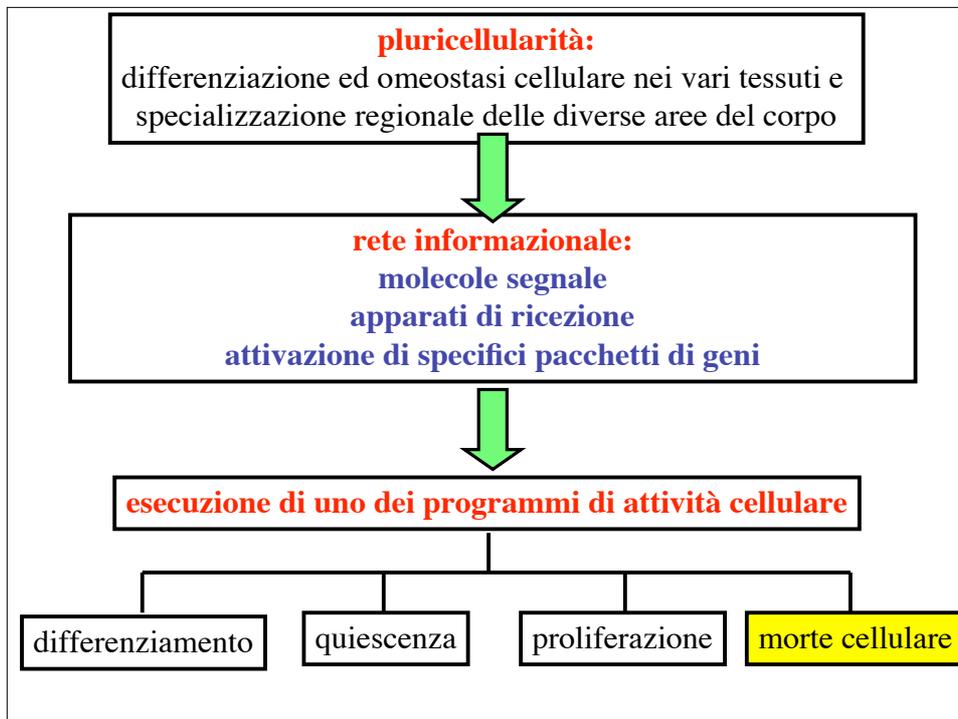
morte cellulare



Apoptosi

Morte cellulare *programmata*

Kerr, JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). "Apoptosis: a *basic biological phenomenon* with wide-ranging implications in tissue kinetics". *British Journal of Cancer* (26): 239-257.



Meccanismi di morte cellulare

NECROSI

- evento accidentale
- passivamente subito dalle cellule
- interessa gruppi di cellule
- dovuto a un trauma, veleno, anossia ecc.

APOPTOSI

- evento programmato
- attivamente realizzato dalle cellule
- interessa singole cellule
- realizzato di norma in condizioni fisiologiche

APOPTOSI



Quando si verifica l'**apoptosi**

- Sviluppo embrionale/fetale e metamorfosi
- Normale turn-over tissutale
- Ontogenesi e omeostasi del sistema immunitario e di quello nervoso

- Atrofia ormone-dipendente
- Deprivazione di fattori di crescita
- Perdita del contatto cellula-cellula e cellula-substrato

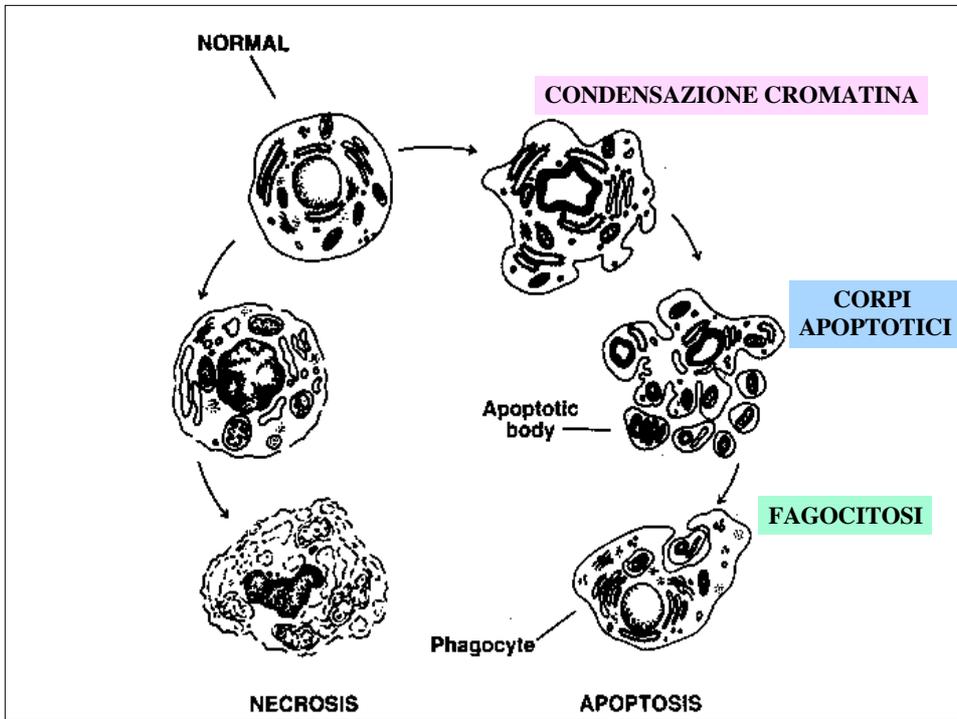
- Tossine, farmaci
- Radiazioni
- Infezioni virali

“PROGRAMMA APOPTOTICO”

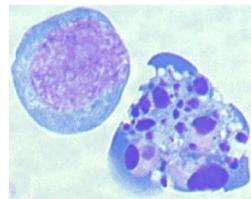
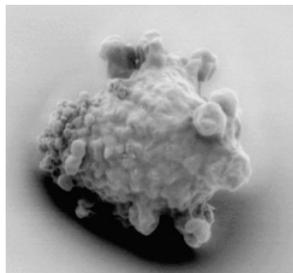
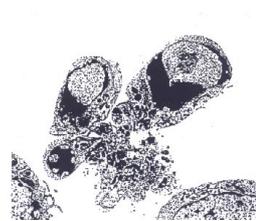
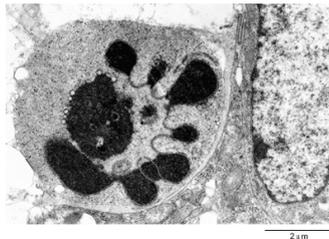
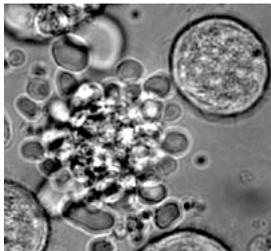
VIENE PORTATO AVANTI ATTIVAMENTE
CON **DISPENDIO DI ENERGIA**

RICHIEDE L'AZIONE DEI
PRODOTTI SPECIFICI DI ALCUNI GENI

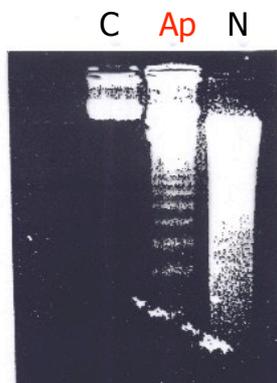
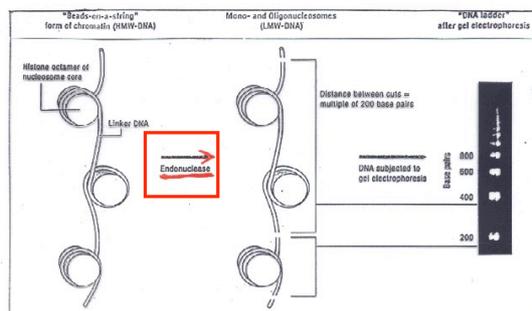
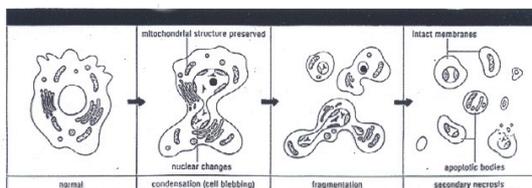
REALIZZATO DA **GENI CONSERVATI**
NEL CORSO DELL'EVOLUZIONE



Analisi morfologica della APOPTOSI

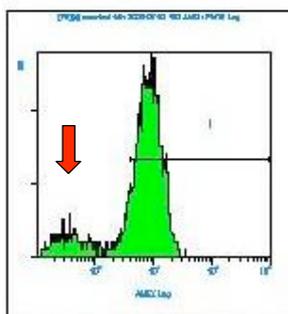


Apoptosi- altri metodi di analisi



Analisi del *ladder* apoptotico attraverso gel elettroforesi

Apoptosi- altri metodi di analisi



La **citometria a flusso o citofluorimetria** è una metodica che permette di analizzare **molteplici parametri** in cellule che sono state precedentemente "*marcate*" con **sonde o molecole fluorescenti**. In questo caso con un colorante fluorescente per il DNA, si stima il contenuto cellulare di DNA e si evidenzia un picco **ipodiploide**.

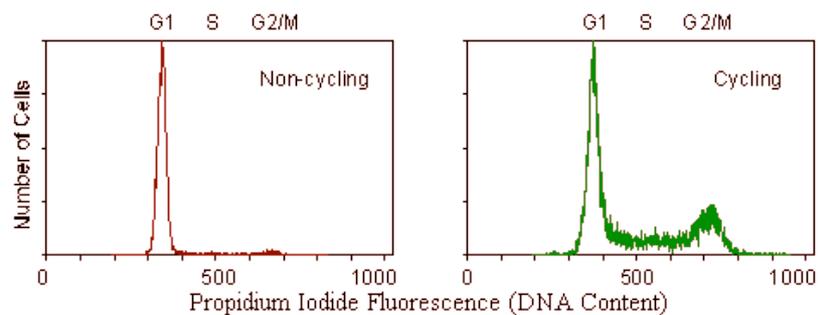
Analisi citofluorimetrica del **contenuto di DNA** o di marker molecolari utili

I **citofluorimetri** sono dotati di **sorgenti luminose (laser o lampade)**, che eccitano tali molecole fluorescenti: la luce emessa viene raccolta da un fotomoltiplicatore che amplifica il segnale luminoso e lo trasforma in segnale elettronico visualizzabile tramite un personal computer.



Il **citofluorimetro** permette di ottenere informazioni riguardo alla **dimensione delle cellule e alla loro complessità interna**. Inoltre, con specifiche sonde, si può analizzare: espressione e quantificazione di antigeni superficiali o intracellulari, valutare il contenuto di DNA.

PROFILO DEL CONTENUTO DI DNA DI CELLULE IN CITOFUORIMETRIA



APOPTOSI

