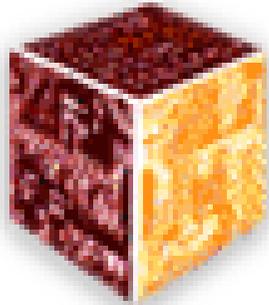


UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

Prof.ssa Luisa Gioia



Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)

“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*
(Ed. Wiley-Blackwell)

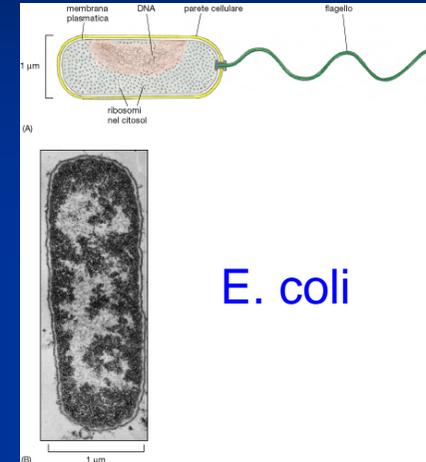
IL NUCLEO E LE SUE FUNZIONI

Solo le cellule eucariote sono dotate di un vero e proprio nucleo

PROCARIOTI

Batteri

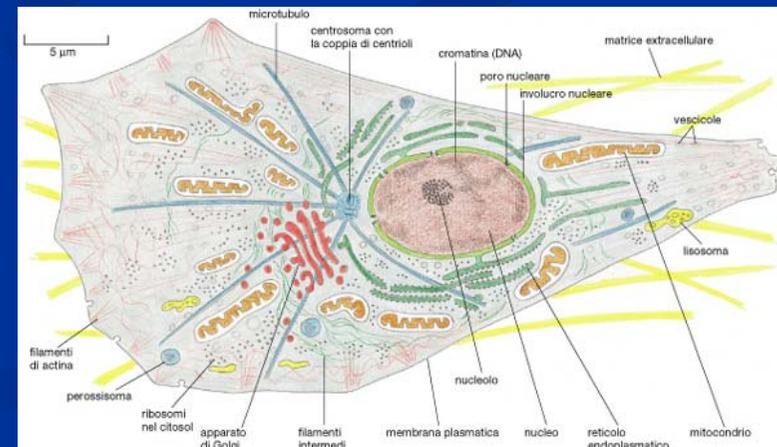
Vibrio cholerae



E. coli

EUCARIOTI

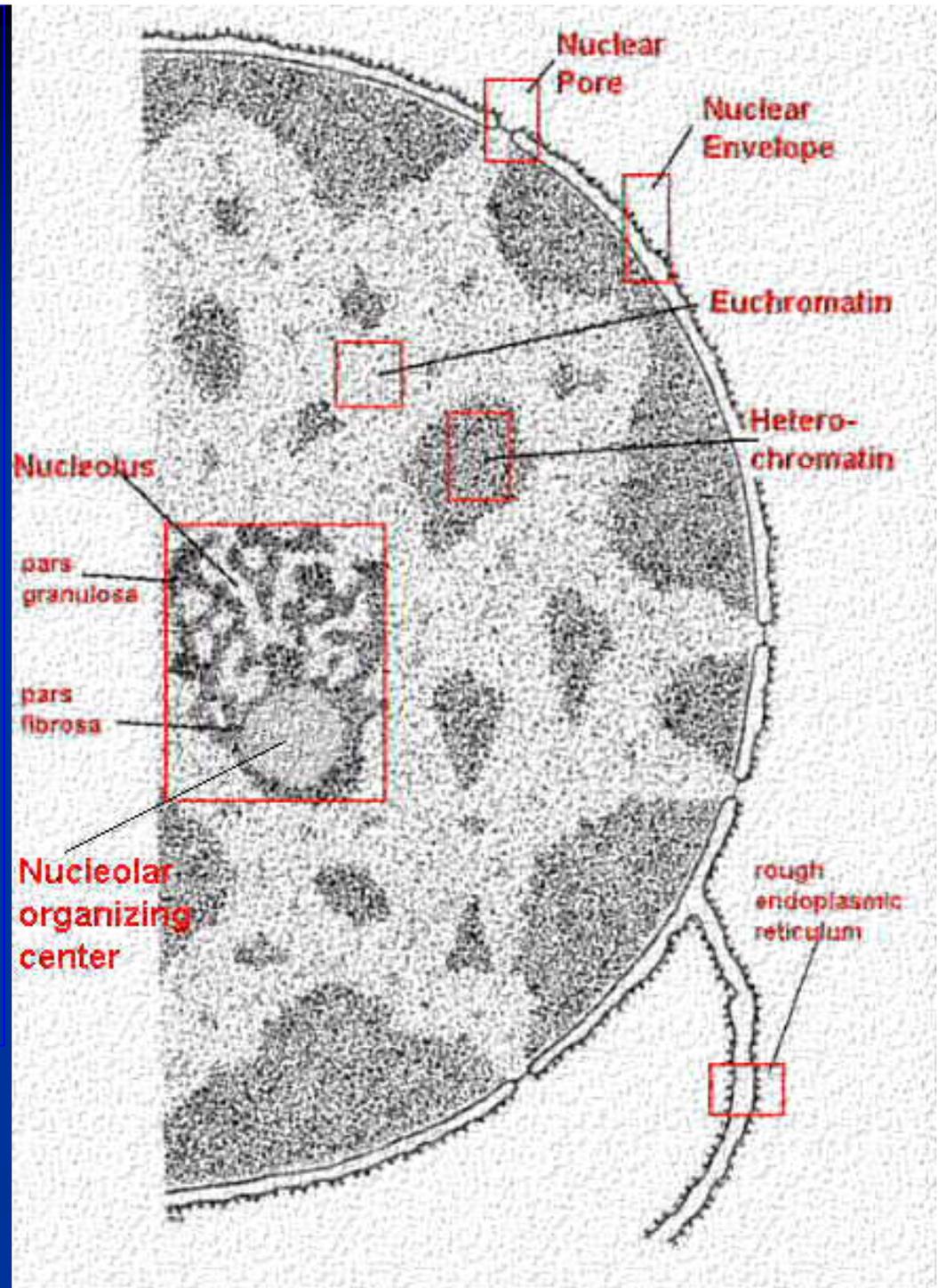
*Vegetali
Funghi/lieviti
Animali*



Cellula eucariotica animale

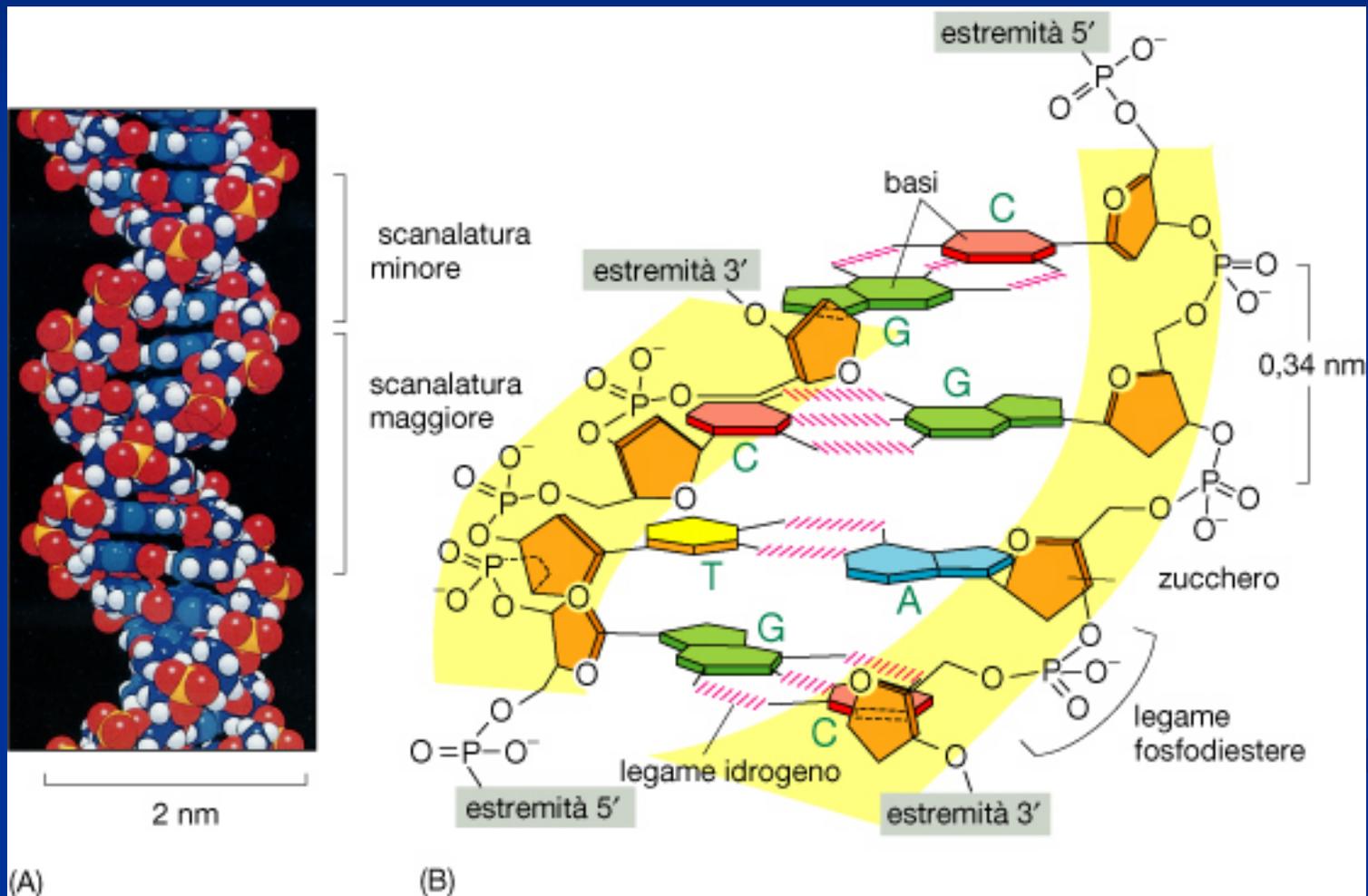
CELL NUCLEUS FUNCTIONS TO:

- Store genes on chromosomes
- Organize genes into chromosomes to allow cell division.
- Transport regulatory factors & gene products via nuclear pores
- Produce messages (Messenger Ribonucleic Acid or mRNA) that code for proteins
- Produce ribosomes in the nucleolus

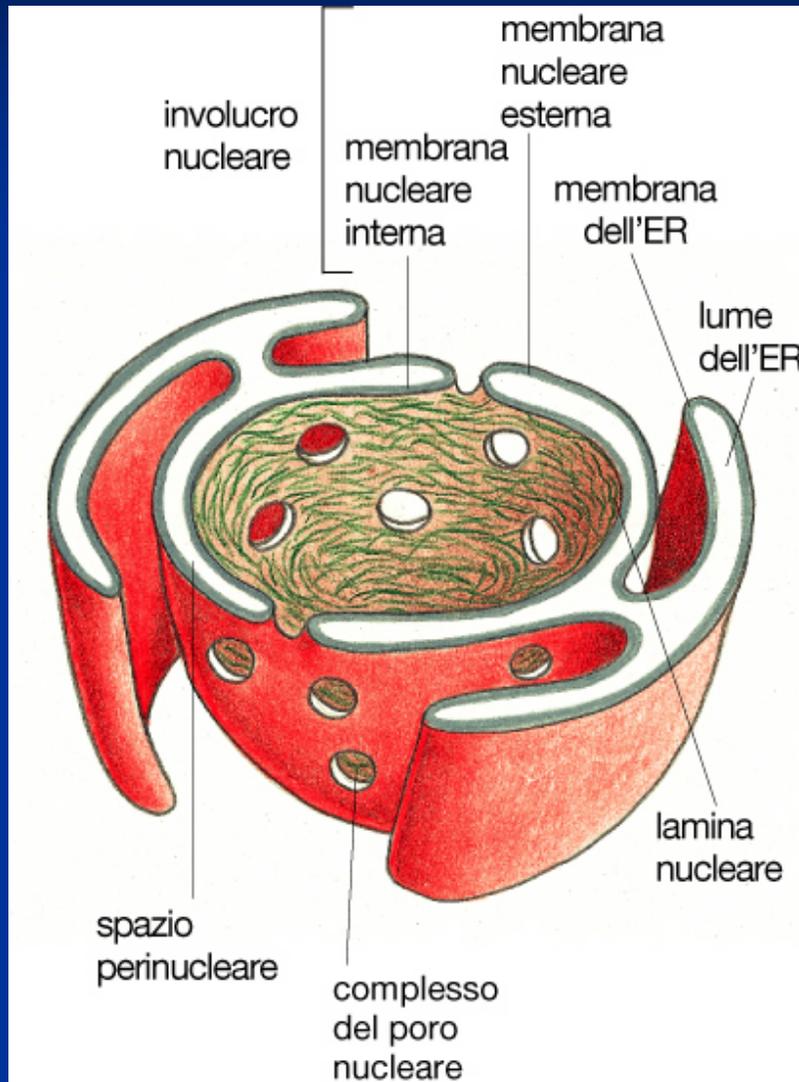


GENOMA ED ESPRESSIONE GENICA

L'informazione genetica è custodita all'interno del nucleo
nella molecola di DNA



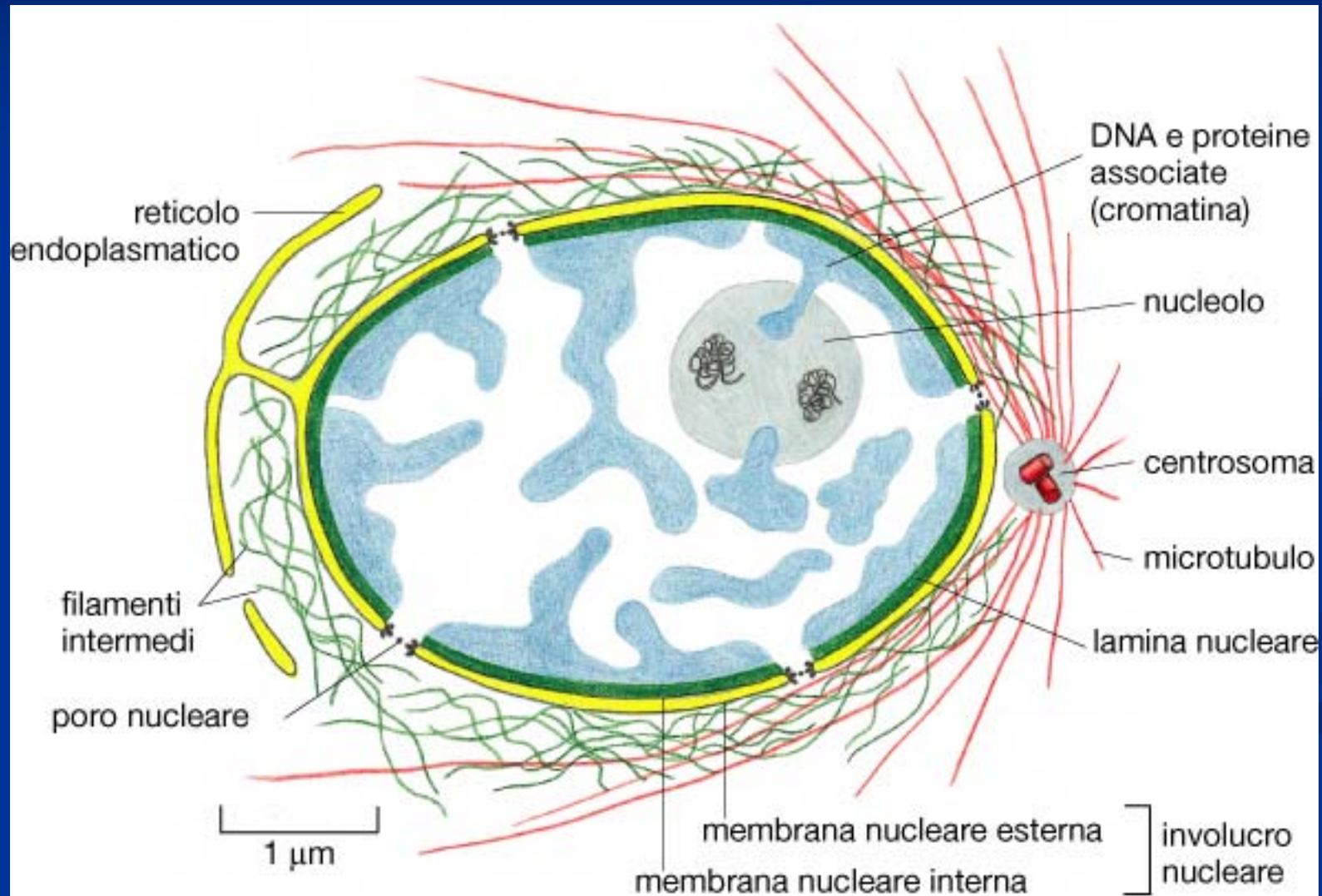
L'involucro nucleare



- **involucro a doppia membrana**
- **penetrato da complessi dei pori nucleari**
- **è in continuità con ER**

*Non sono mostrati in figura i **ribosomi** normalmente attaccati alla superficie citosolica della membrana del ER e alla membrana nucleare*

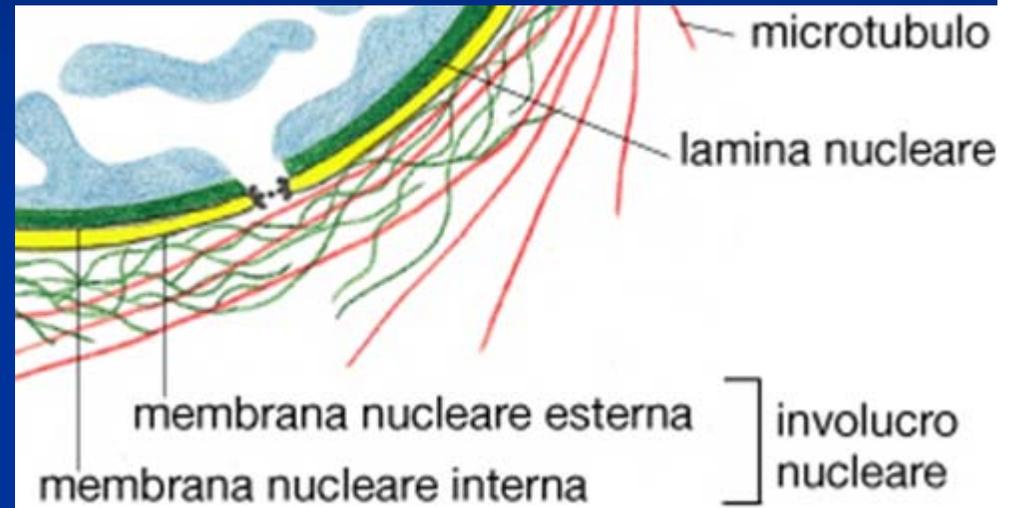
Nel nucleo in interfase la cromatina può essere presente in 2 forme: **EUCROMATINA** (forma attiva nella trascrizione)
ETEROCROMATINA (forma condensata che non trascrive)



NUCLEAR LAMINA

- Consists of **intermediate filaments**, (30-100 nm thick) that are polymers of lamin ranging from 60-75 kD

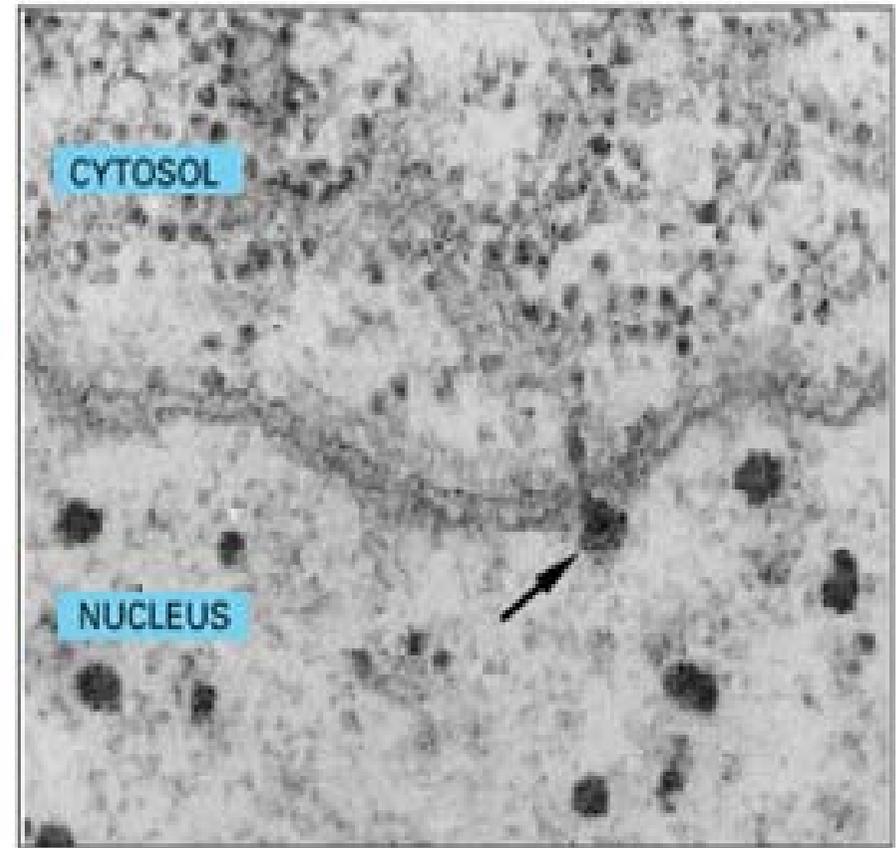
- **A-type lamins** are inside, next to nucleoplasm
- **B-type lamins** are near the nuclear membrane (inner).



- Lamin may bind to integral proteins inside the inner membrane.
- **The lamins may be involved in the functional organization of the nucleus.**

TRASPORTO NUCLEO-CITOPLASMA

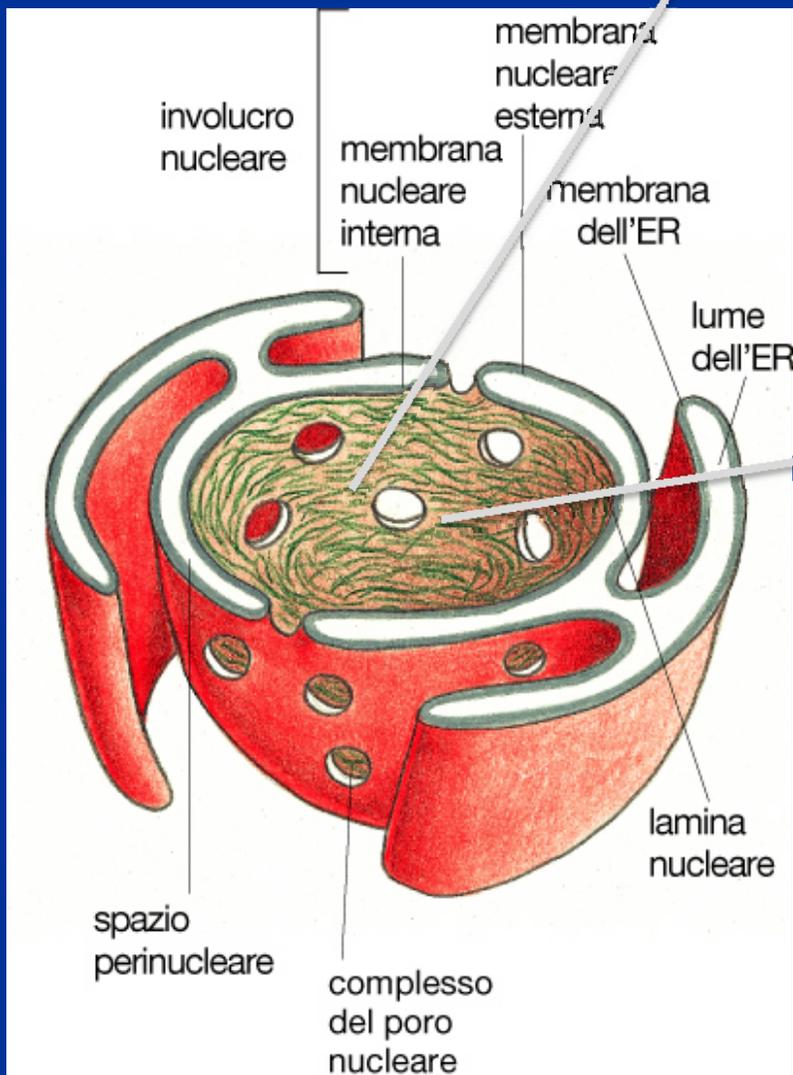
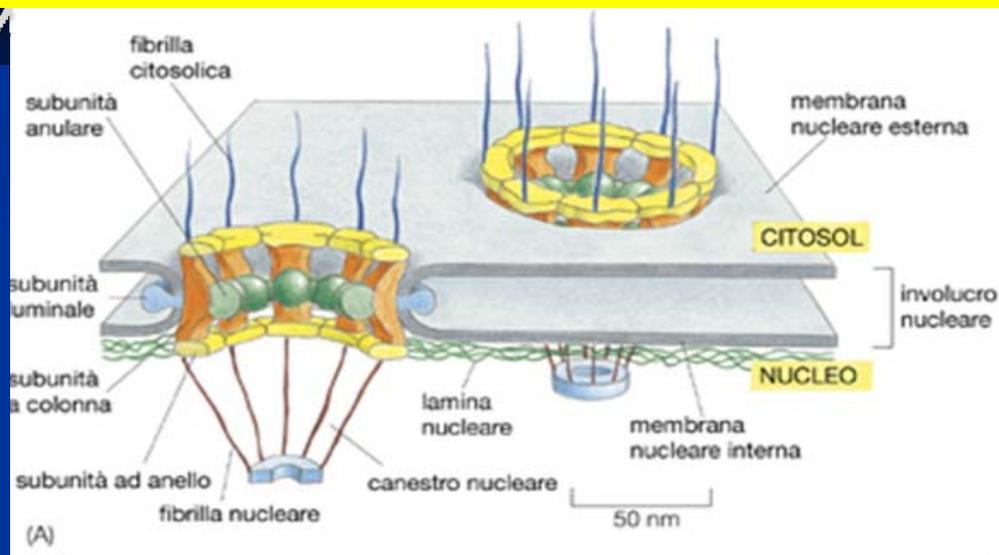
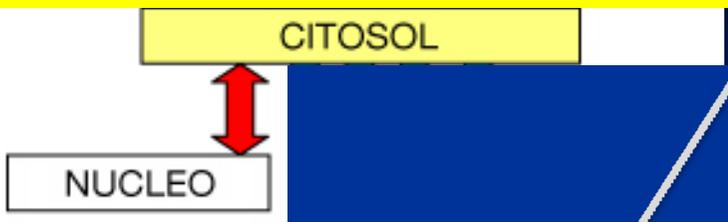
Lo scambio di molte sostanze tra nucleo e citoplasma avviene mediante i **COMPLESSI DEI PORI NUCLEARI (NPC)**



(B)

200 nm

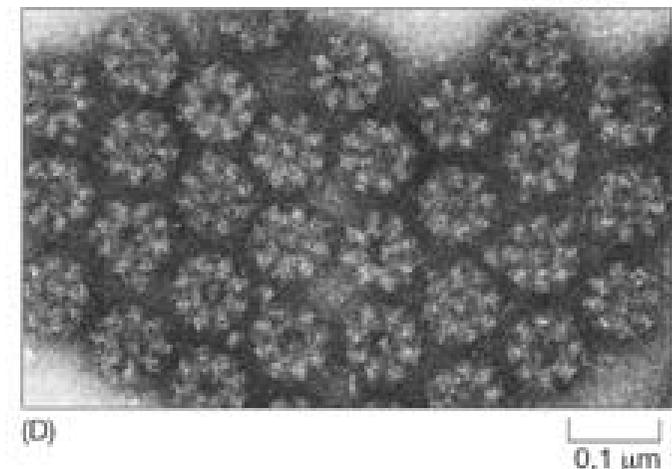
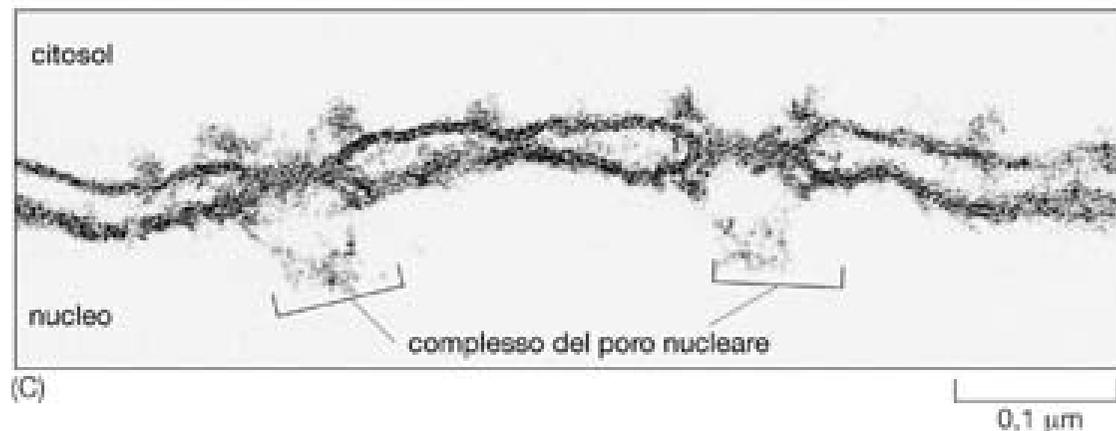
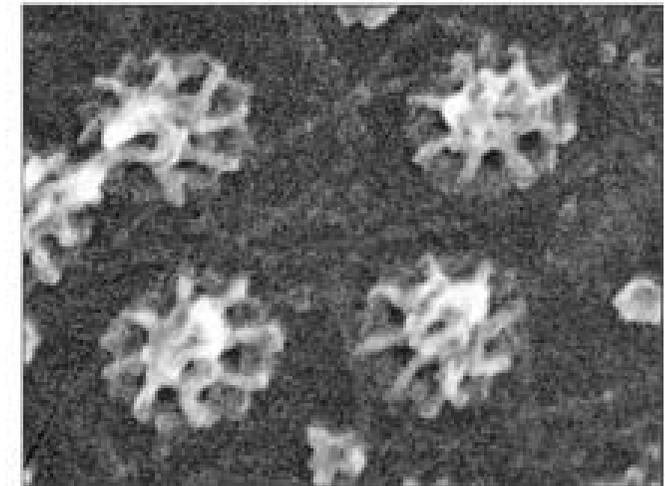
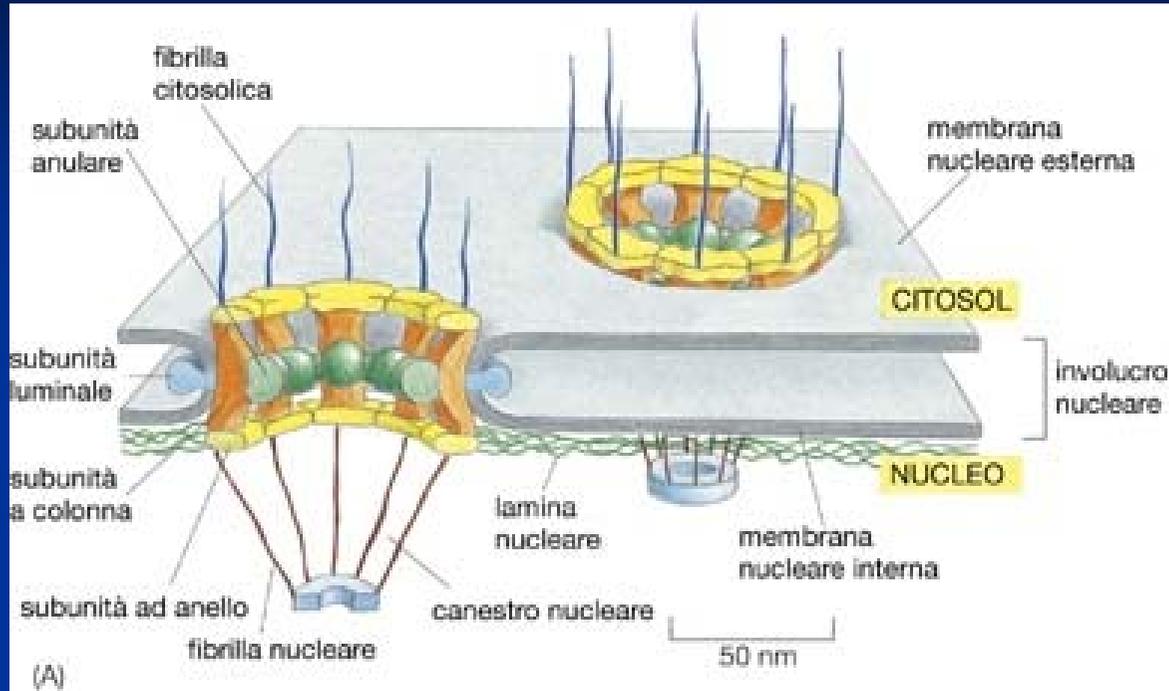
Trasporto nucleo↔citoplasma



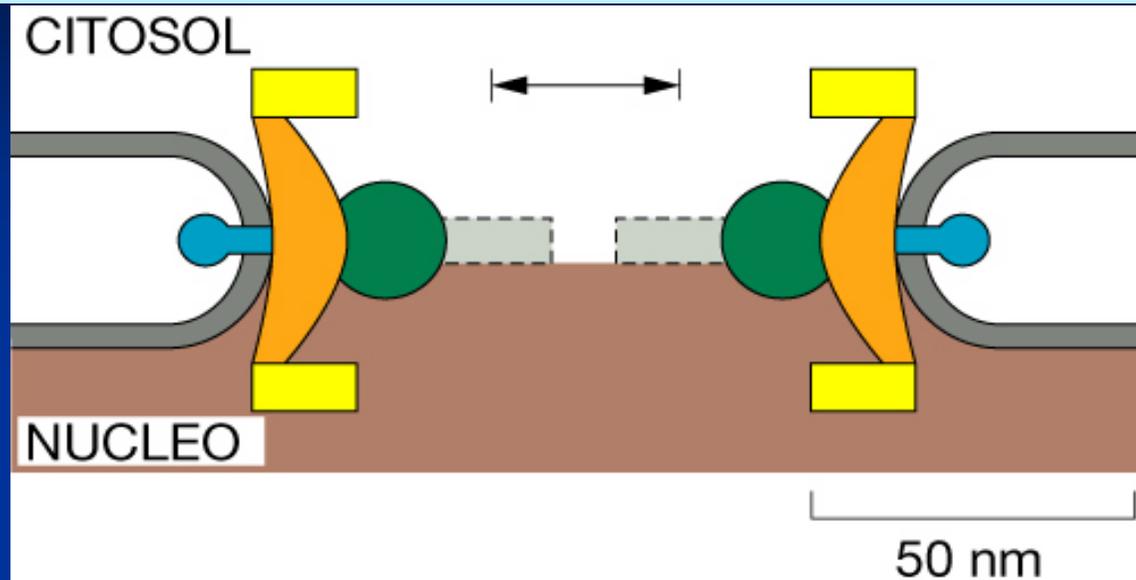
trasporto
bidirezionale

Disposizione dei complessi dei PORI NUCLEARI nell'involucro nucleare

nucleoporine disposte con simmetria ottagonale



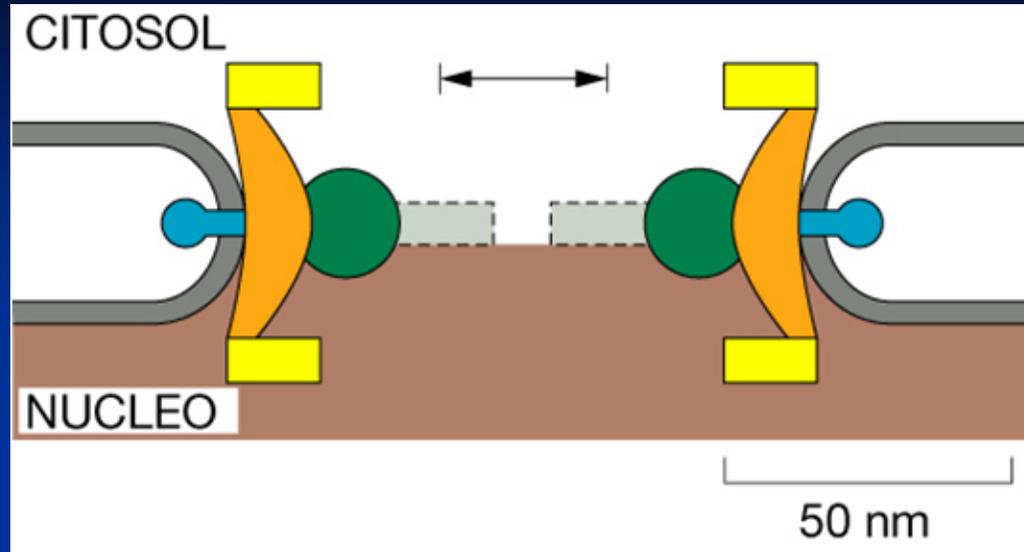
Il canale acquoso per la **DIFFUSIONE LIBERA** (occupa solo una piccola frazione del volume totale del NPC) è un canale cilindrico pieno di H_2O avente **diametro di circa 9nm** e lungo **15nm**



dimensioni delle
proteine che entrano
nel nucleo per
diffusione libera

Attraversano il canale
passivamente
piccole molecole
idrosolubili (< di 5000 Da):
*esse diffondono così
rapidamente che
l'involucro nucleare può
considerarsi liberamente
permeabile ad esse*

How does the nuclear pore complex work to transport material in and out of the nucleus?



Diffusion

Molecules of:

5,000 MW are **freely diffusable**

17,000 MW-- take 2 min to establish equilibrium

44,000 MW-- take 30 min to establish equilibrium

60,000 MW-- cannot move in by diffusion

ACTIVE TRANSPORT

This form of transport is assumed when **molecules larger than the pore diameter (10 nm)** get into the nucleus.

Studies with gold markers show that the pore can actually dilate up to 26 nm when it gets the **APPROPRIATE SIGNAL**.

⇒ *What is the signal?*

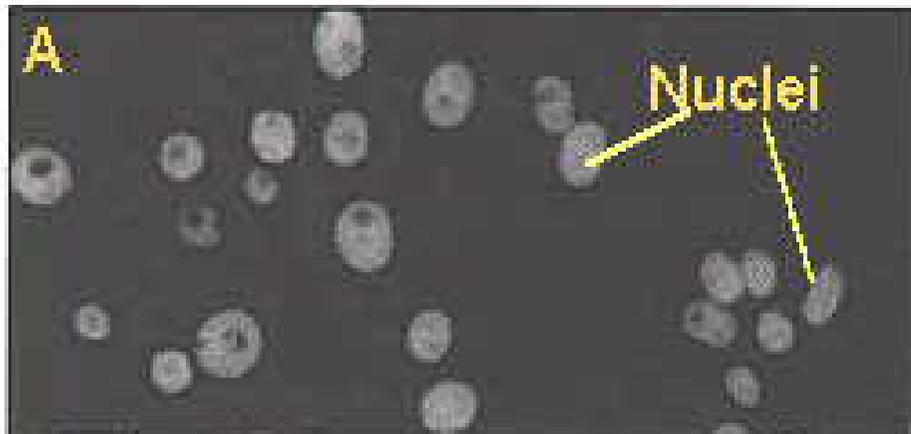
The signal is in the **peptide sequences**. These are recognition sequences rich in lysine, arginine, and proline.



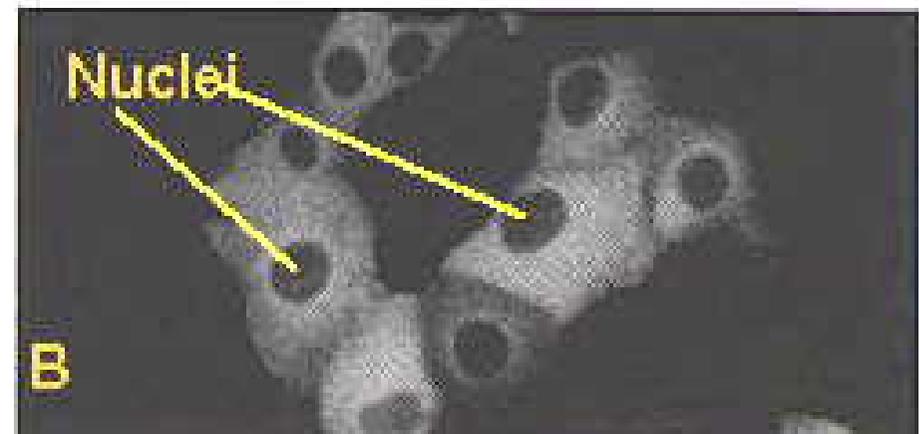
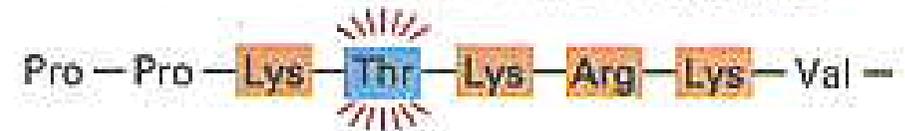
Segnali di localizzazione nucleare (NLS) dirigono le proteine nucleari nel nucleo

What tests can be used to prove a particular signal?

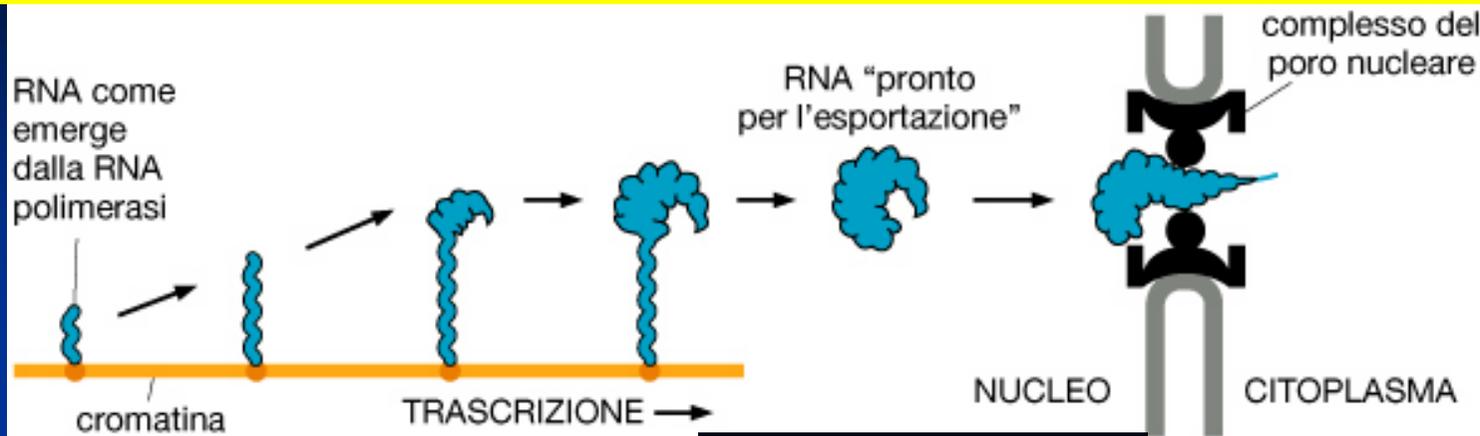
(A) LOCALIZATION OF T-ANTIGEN CONTAINING WILD-TYPE NUCLEAR IMPORT SIGNAL



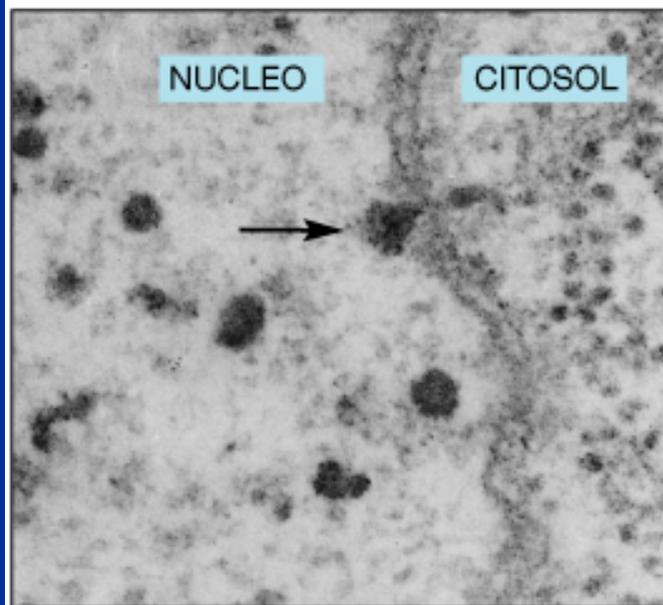
(B) LOCALIZATION OF T-ANTIGEN CONTAINING A MUTATED NUCLEAR IMPORT SIGNAL



Trasporto attivo: esportazione di una grossa molecola di mRNA attraverso il NPC



(A)



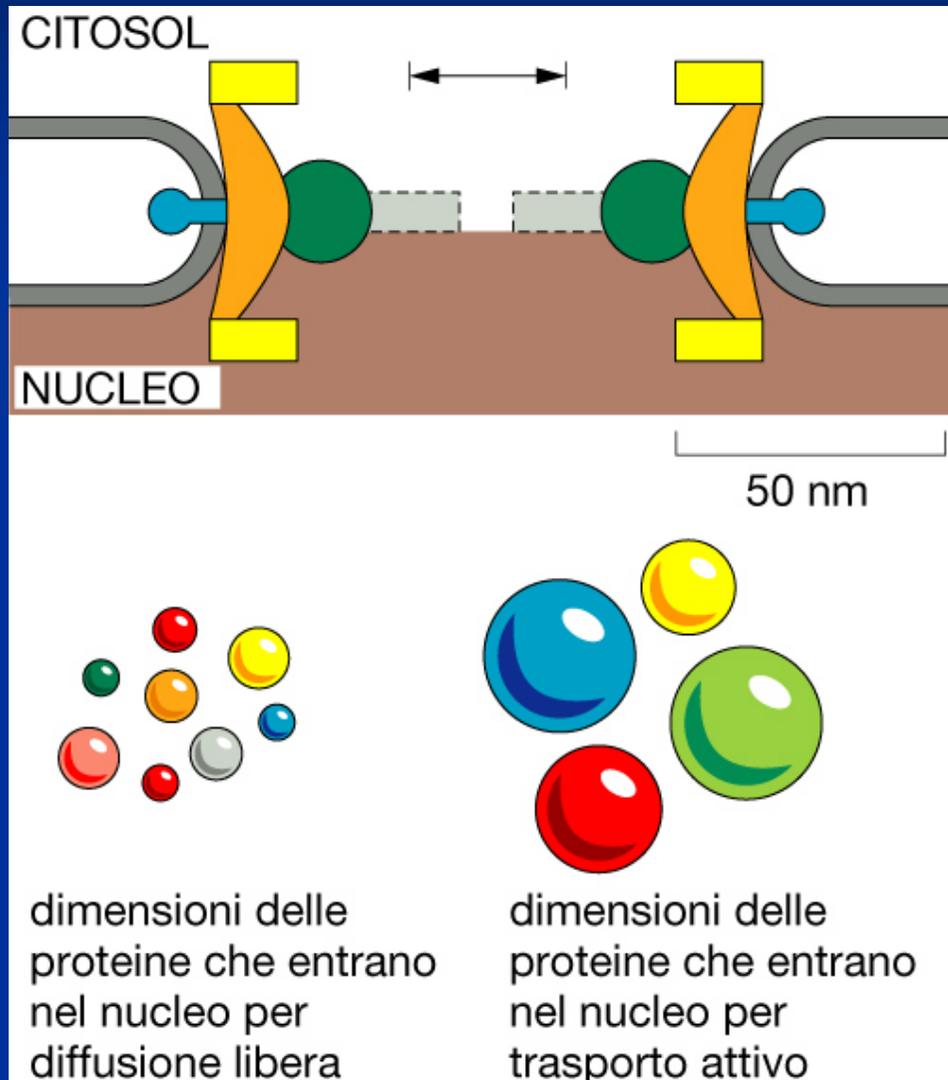
(B)

200 nm

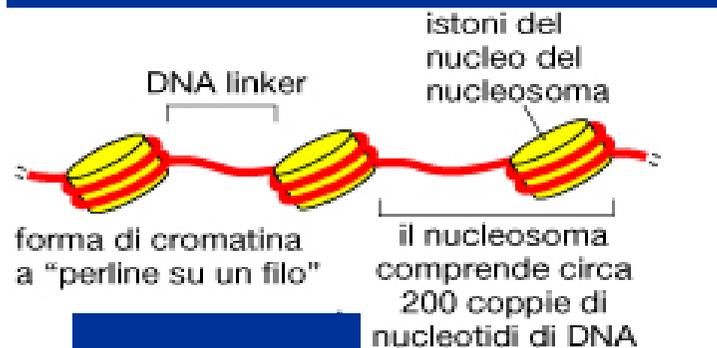
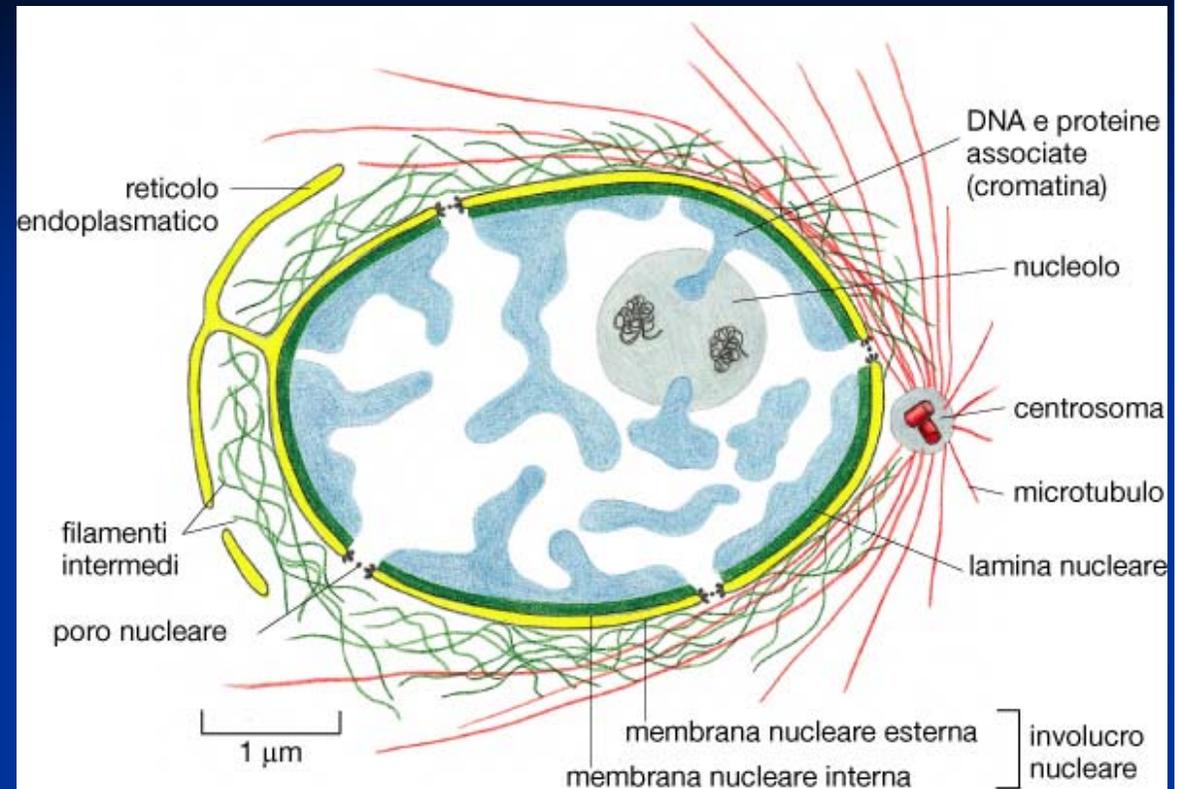
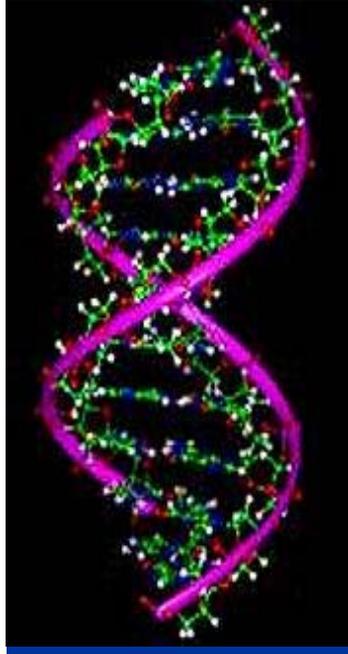
dopo la trascrizione
l'RNAm subisce una
fase di "maturazione"
e successivamente
viene esportato nel
citosol

QUESTE E MOLTE ALTRE PROTEINE E MOLECOLE DI RNA SI LEGANO A **RECETTORI PROTEICI SPECIFICI** CHE LE TRAGHETTANO **ATTIVAMENTE** ATTRAVERSO I NPC

diametro di circa 9 nm

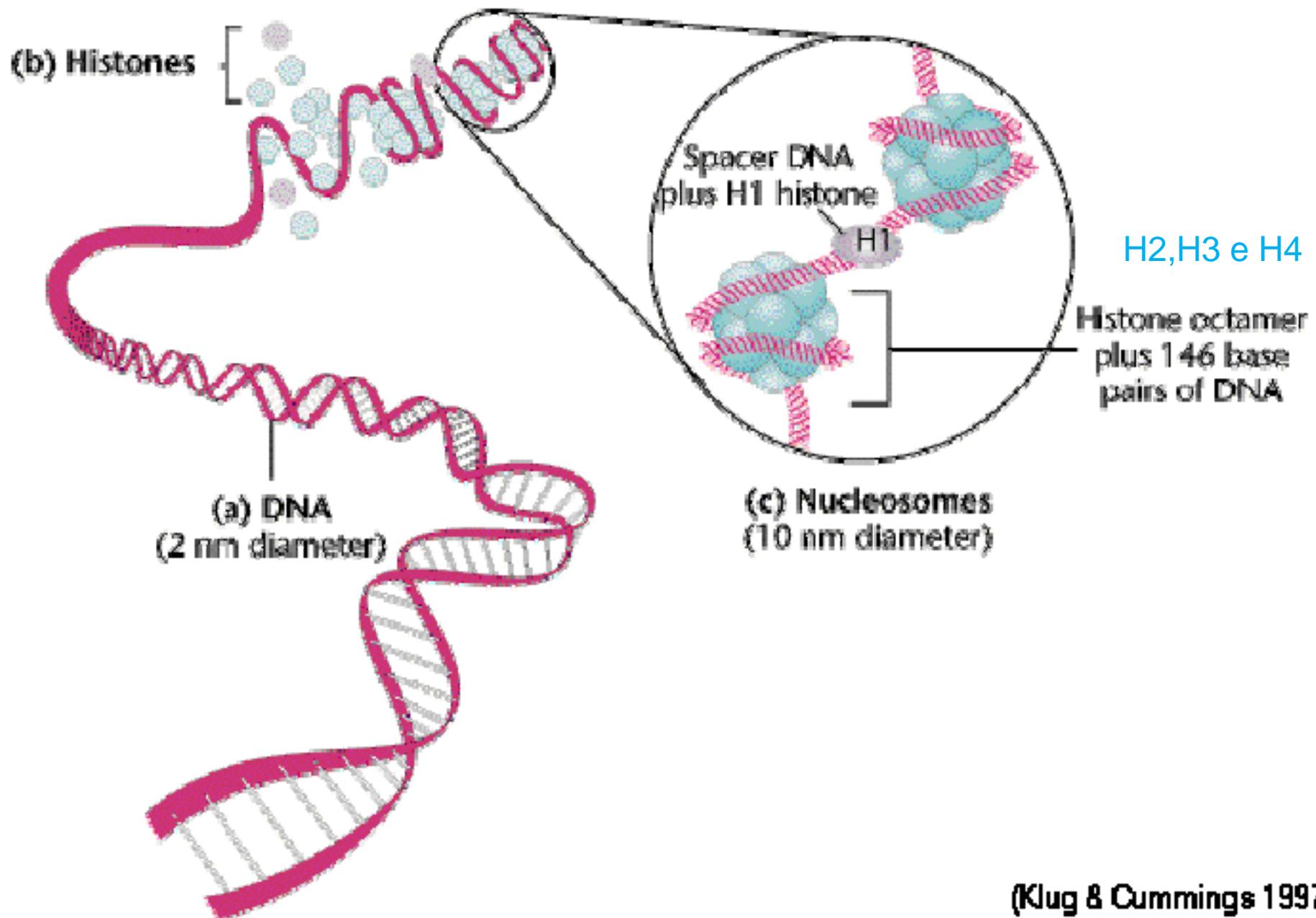


nucleo

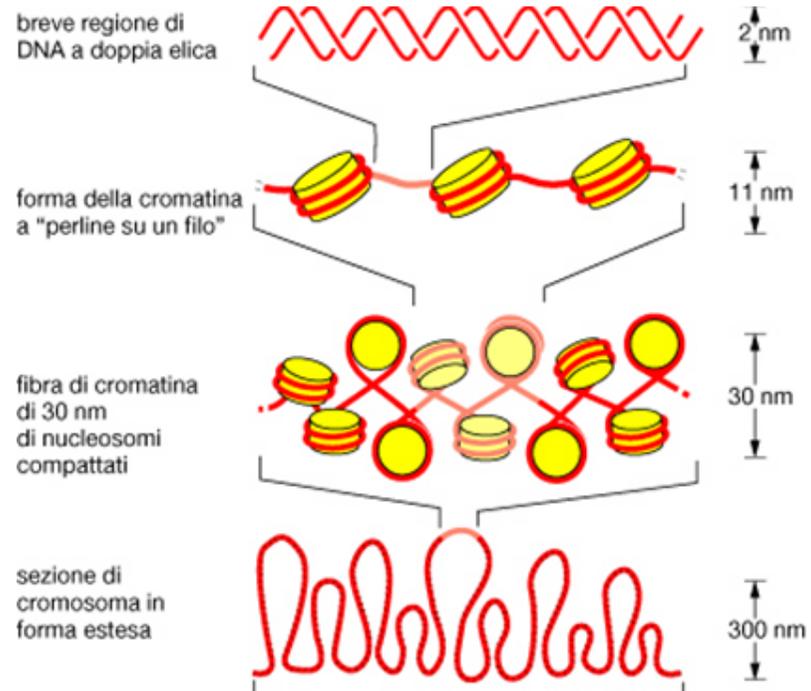


Nelle cellule eucariote il
DNA è associato a proteine dette ISTONI a formare la
cromatina

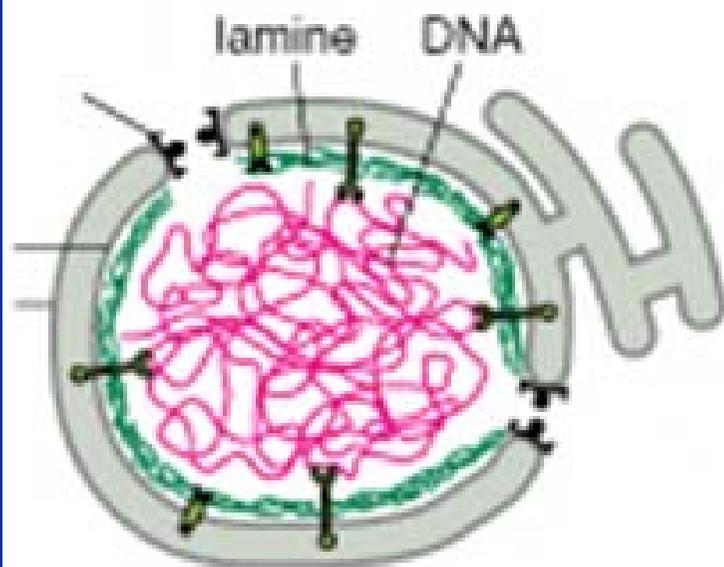
LA FORMAZIONE DEI NUCLEOSOMI COSTITUISCE IL PRIMO LIVELLO DI COMPATTAZIONE DEL DNA



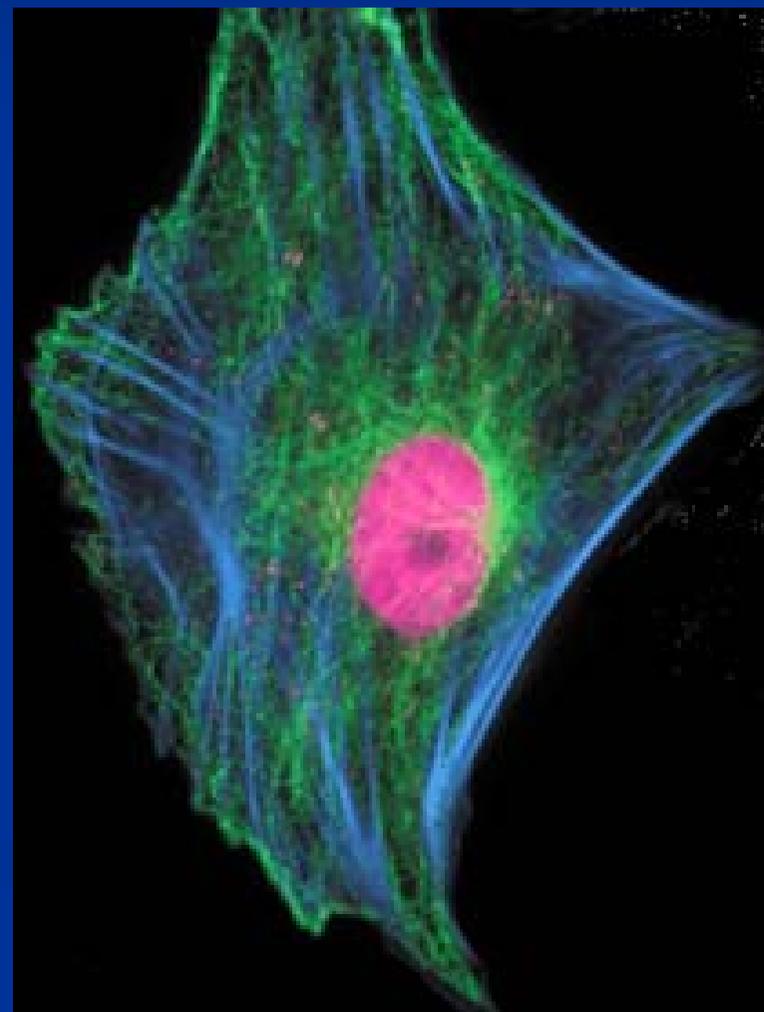
(Klug & Cummings 1997)

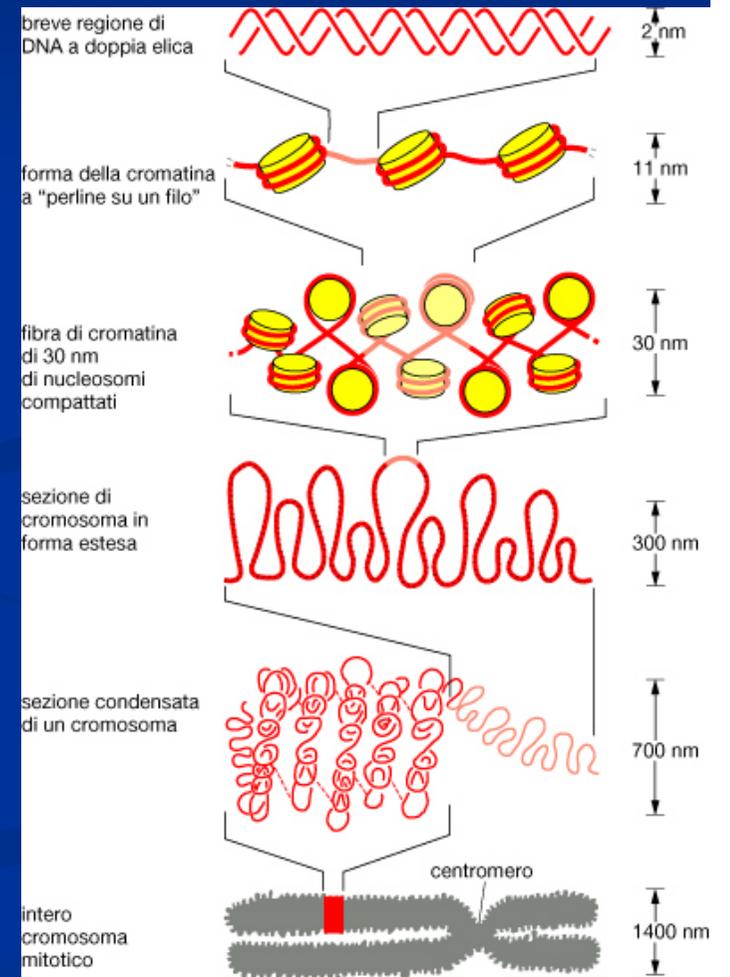
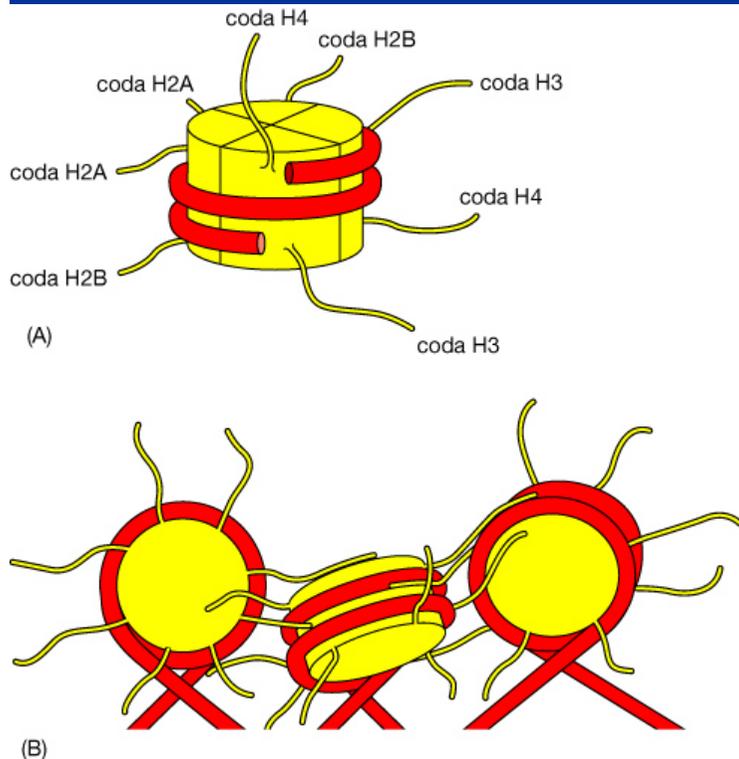
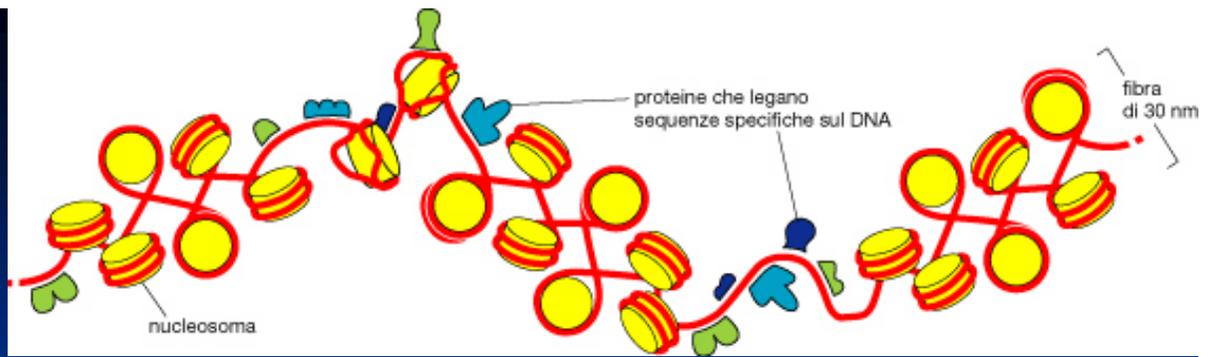
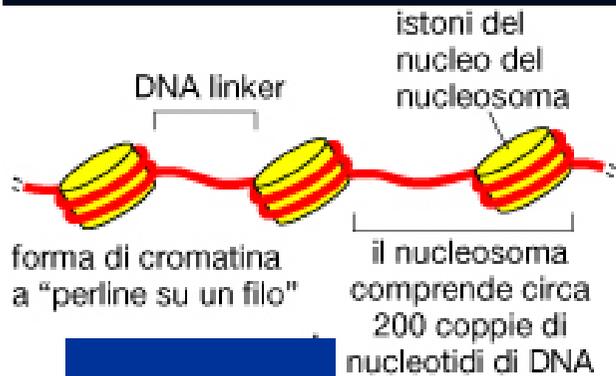


Durante l'interfase nella cellula è sempre ben visibile il nucleo contenente la **cromatina**



NUCLEO INTERFASICO



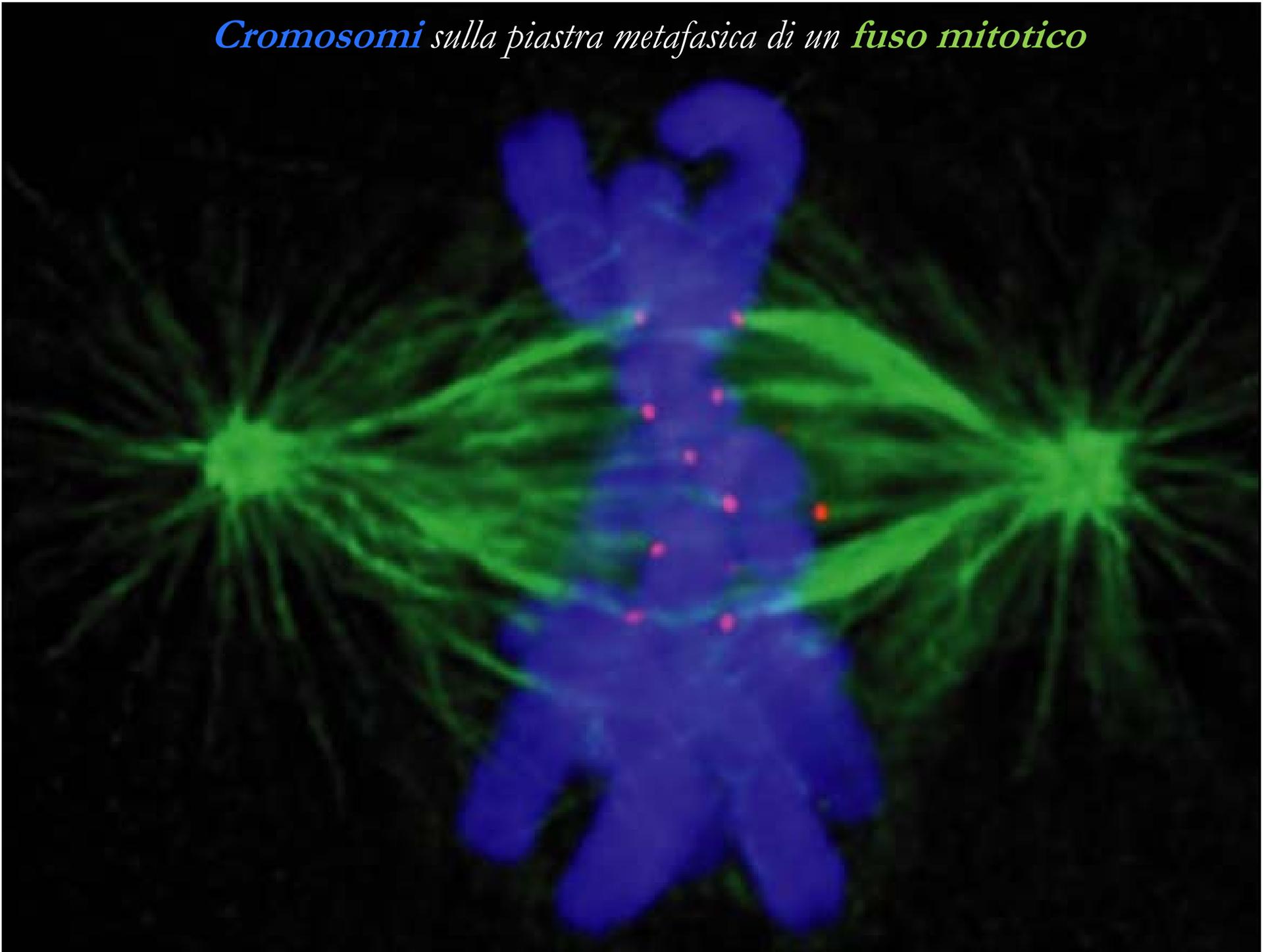


Durante la fase M la cromatina raggiunge il suo max livello di condensazione

cromosoma

RISULTATO NETTO: CIASCUNA MOLECOLA DI DNA È STATA COMPATTATA IN UN CROMOSOMA MITOTICO CHE È 10 000 VOLTE PIÙ CORTO DELLA SUA LUNGHEZZA ESTESA

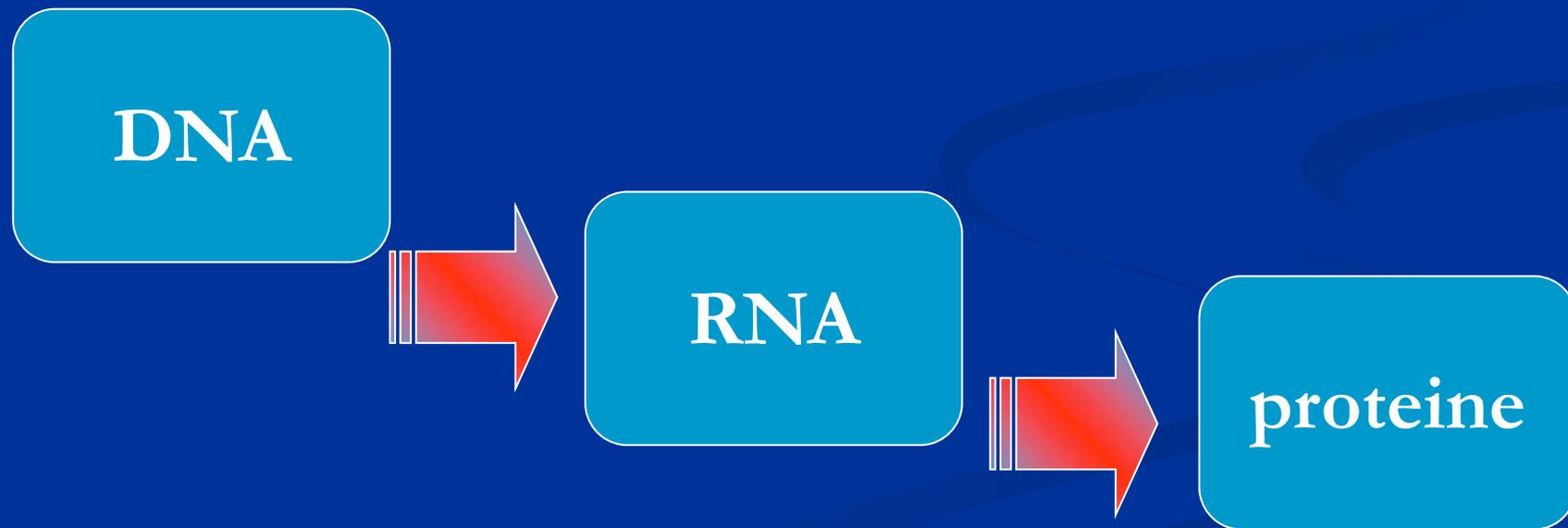
Cromosomi sulla piastra metafasica di un fuso mitotico



Numero di coppie cromosomiche presenti in varie specie di piante ed animali

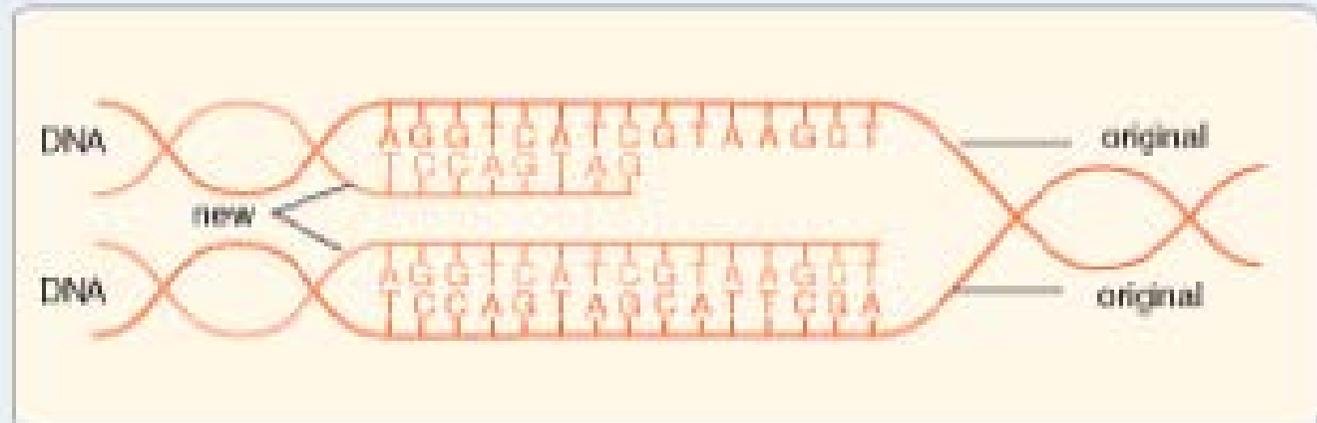
Nome Volgare	Numero di coppie di cromosomi	Nome Volgare	Numero di coppie di cromosomi
Zanzara	3	Frumento	21
Mosca	6	Uomo	23
Cipolla	8	Patata	24
Rospo	11	Vacca	30
Rana	13	Asino	31
Gatto	19	Cavallo	32
Topo	20	Cane	39
Scimmia rhesus	21	Pollo	39

Flusso dell'informazione genetica

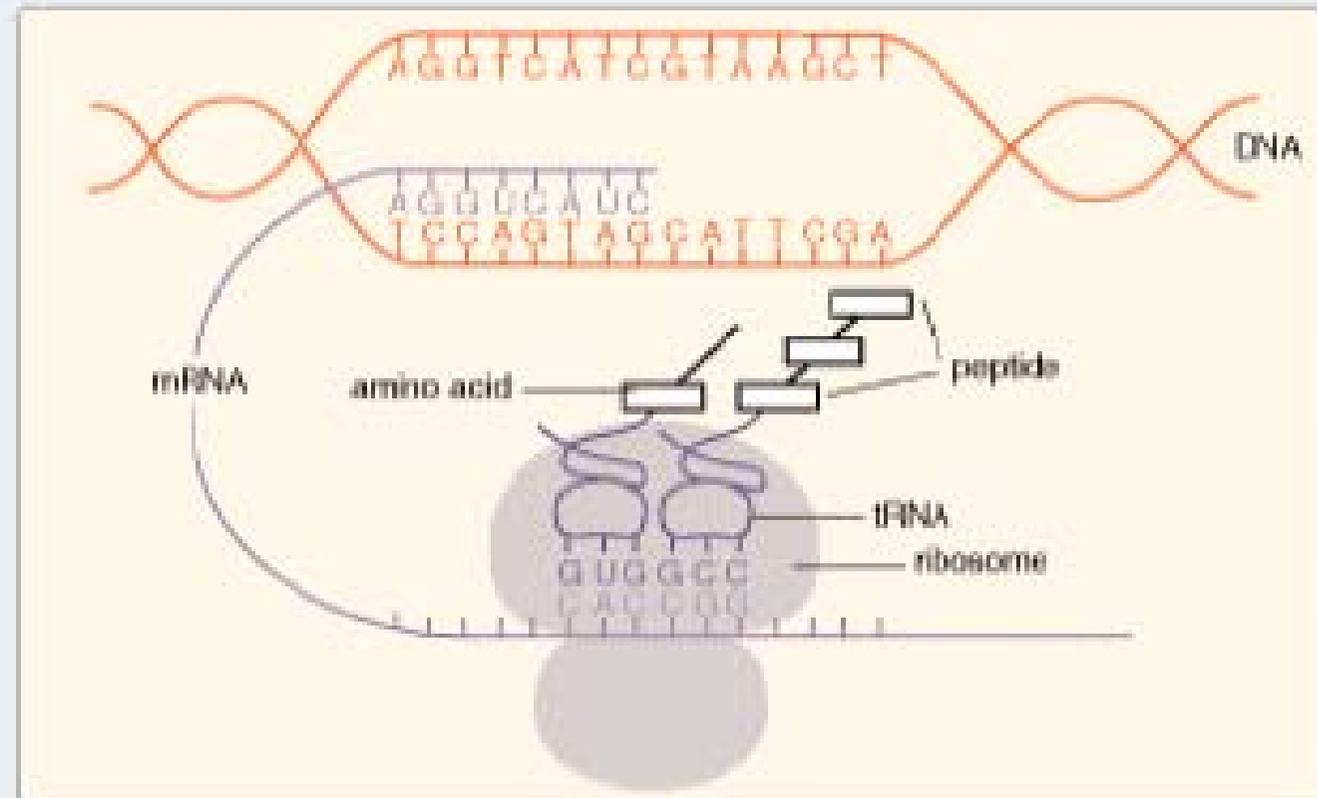


Flusso informazione genetica: DNA ► RNA ► proteina

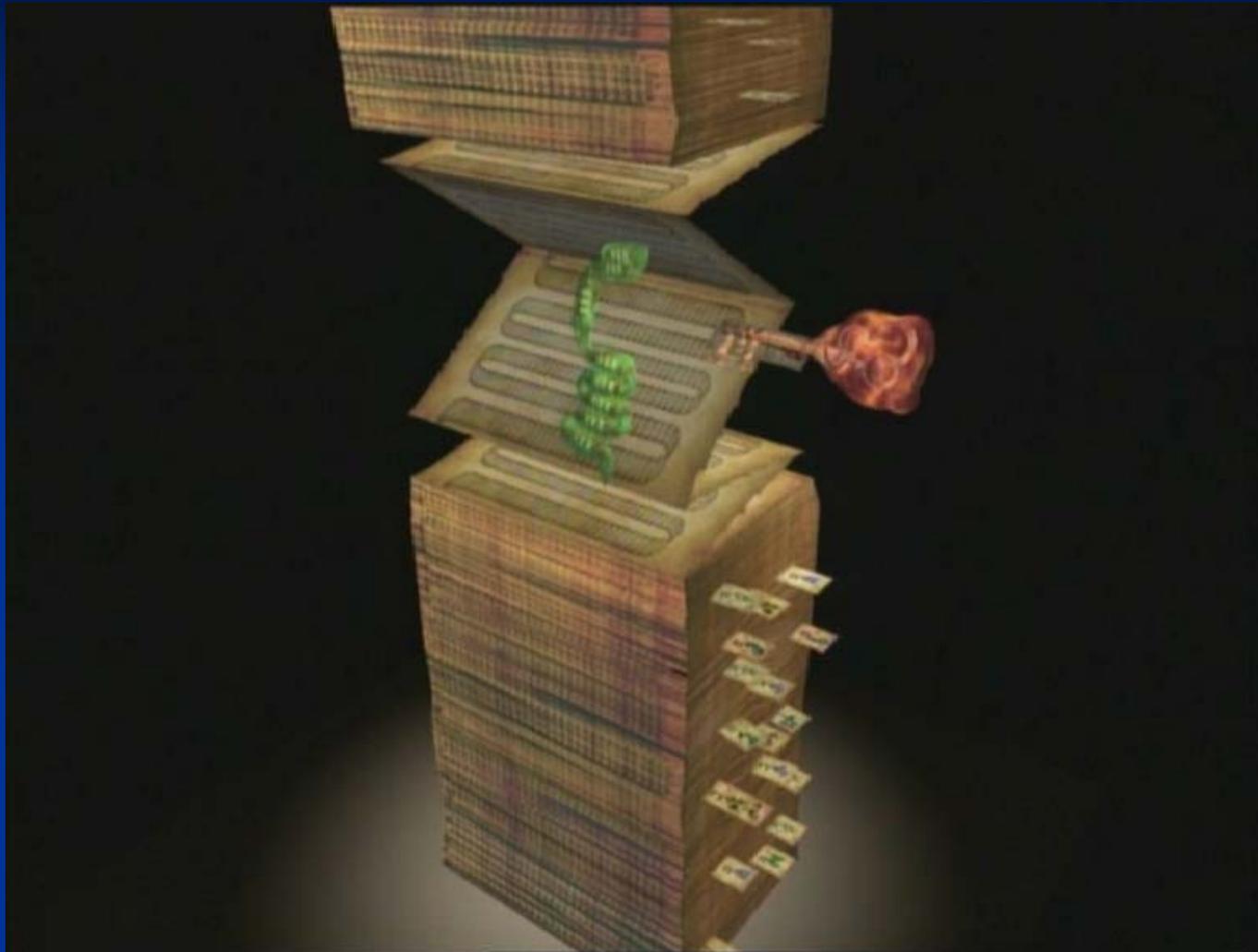
**REPLICAZIONE
del DNA**



**TRASCRIZIONE
DNA ► mRNA**



**TRADUZIONE
mRNA ► proteina**



GENOMA e ESPRESSIONE GENICA

- ❖ **Tipologie cellulari diverse di un organismo contengono lo stesso DNA**
- ❖ **Una cellula generalmente esprime solo una parte del suo genoma** (tipi cellulari diversi esprimono serie diverse di geni)
- ❖ **L'espressione dei geni può essere regolata a diversi livelli**
- ❖ **L'espressione dei geni può cambiare in risposta a segnali esterni alla cellula**

L'espressione dei geni può essere regolata a diversi livelli

CONTROLLO TRASCRIZIONALE: la cellula controlla quando e quante volte un gene è trascritto in mRNA

Controllo delle modificazione dell'mRNA: la cellula può controllare lo splicing e altre modificazioni dell'RNA

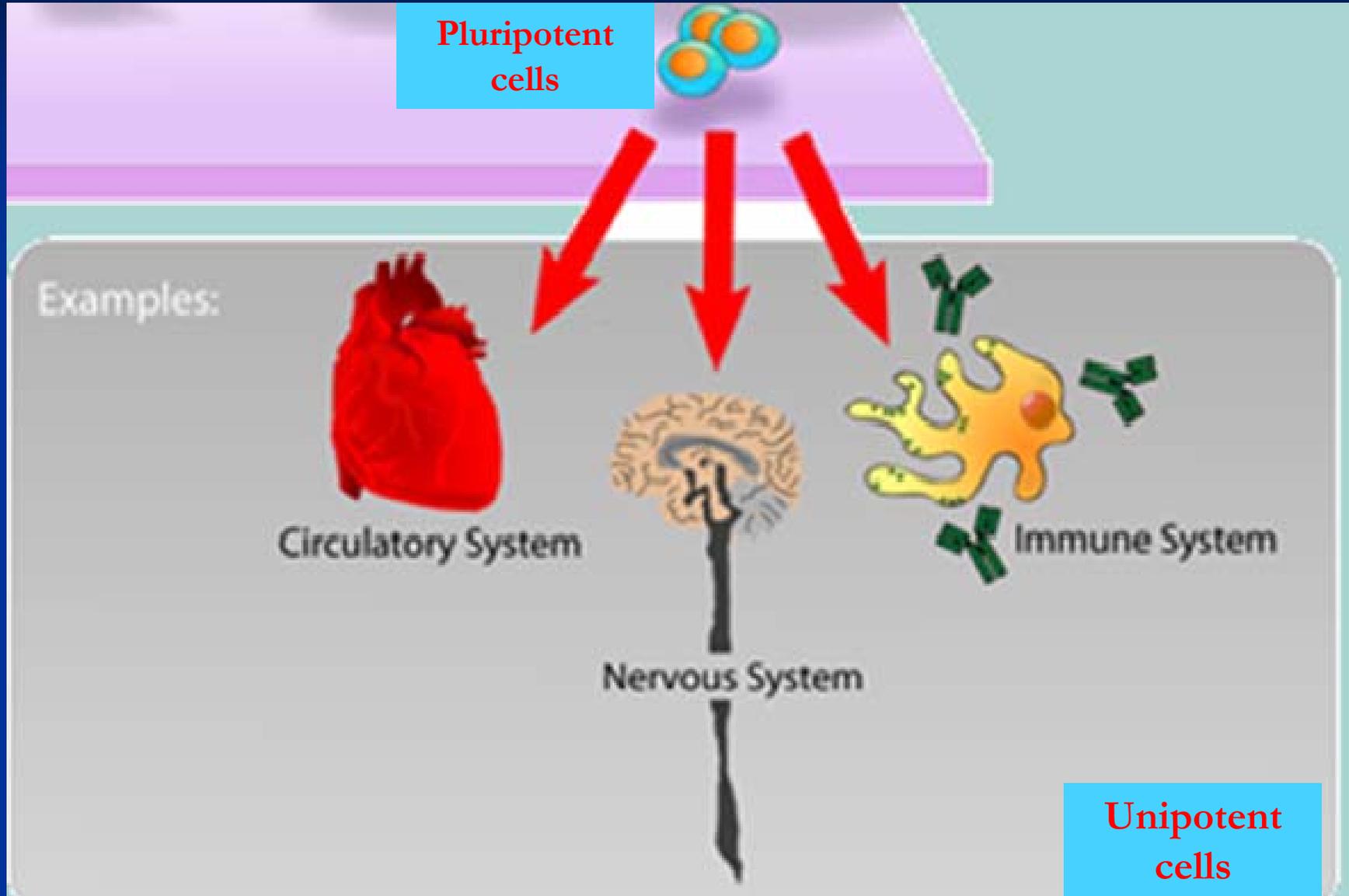
Controllo del trasporto e della localizzazione dell'RNA: la cellula può scegliere quali mRNA maturi nel nucleo devono essere esportati nel citosol e decidere dove localizzarli nel citosol

Controllo traduzionale: la cellula può scegliere quali mRNA devono essere tradotti in proteine dai ribosomi

Controllo della degradazione dell'mRNA: la cellula può destabilizzare in modo selettivo alcune molecole di mRNA presenti nel citosol

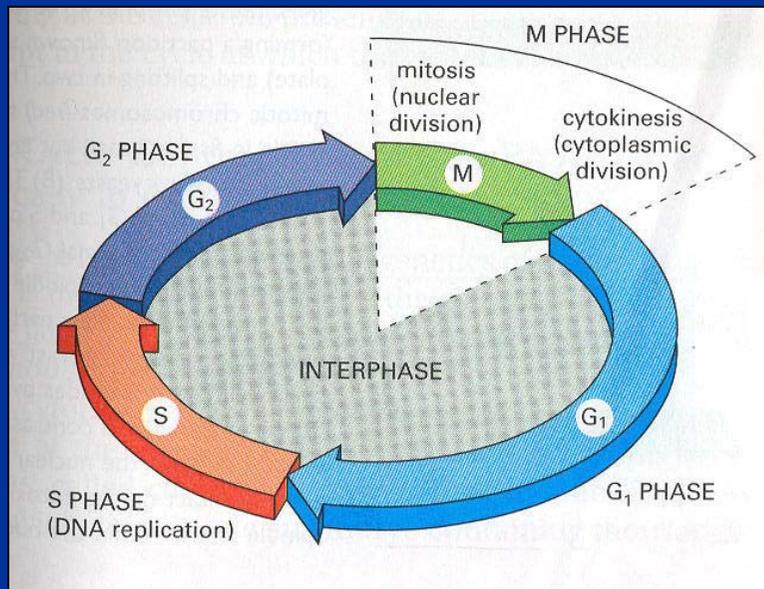
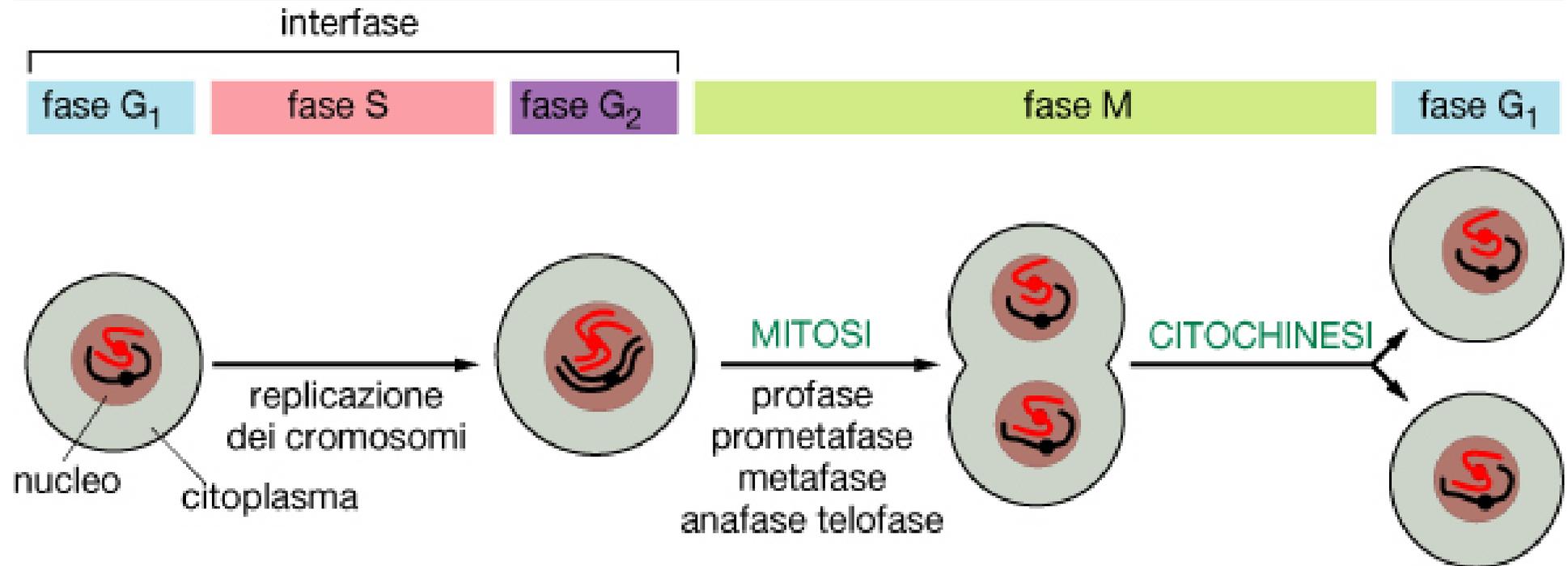
Controllo della attività delle proteine: la cellula può attivare, inattivare, degradare o compartimentalizzare in modo selettivo le proteine dopo la loro traduzione

Differenziamento



IL CICLO CELLULARE

CICLO CELLULARE



La sequenza del ciclo cellulare nelle cellule eucariote è: da **G₁** a **S** a **G₂** a **M** a **citodieresi**

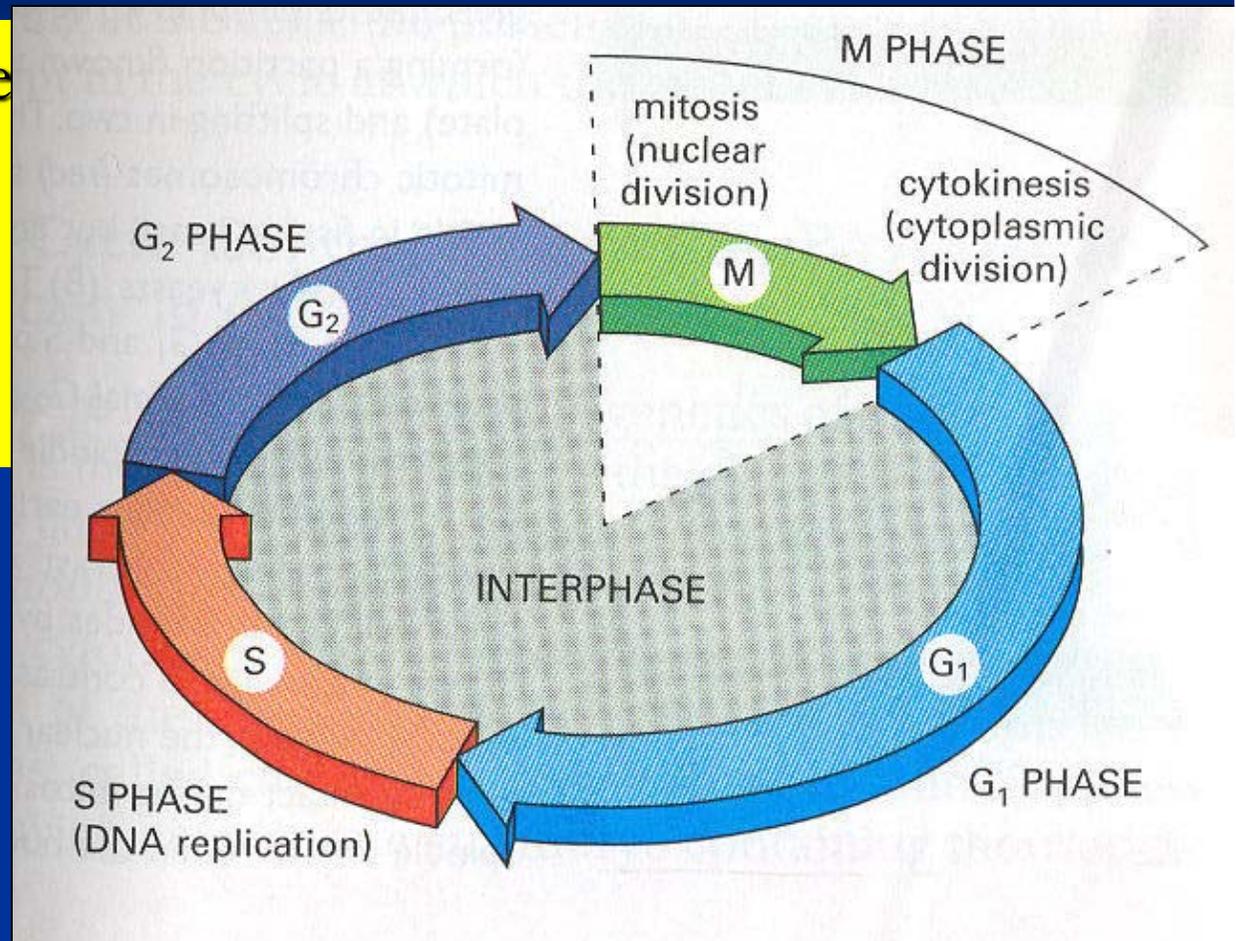
Controllo del ciclo cellulare

- Esistono molecole che controllano e guidano il ciclo cellulare

Cyclin-dependent protein kinases (CDKs)

Activation of CDKs involves:

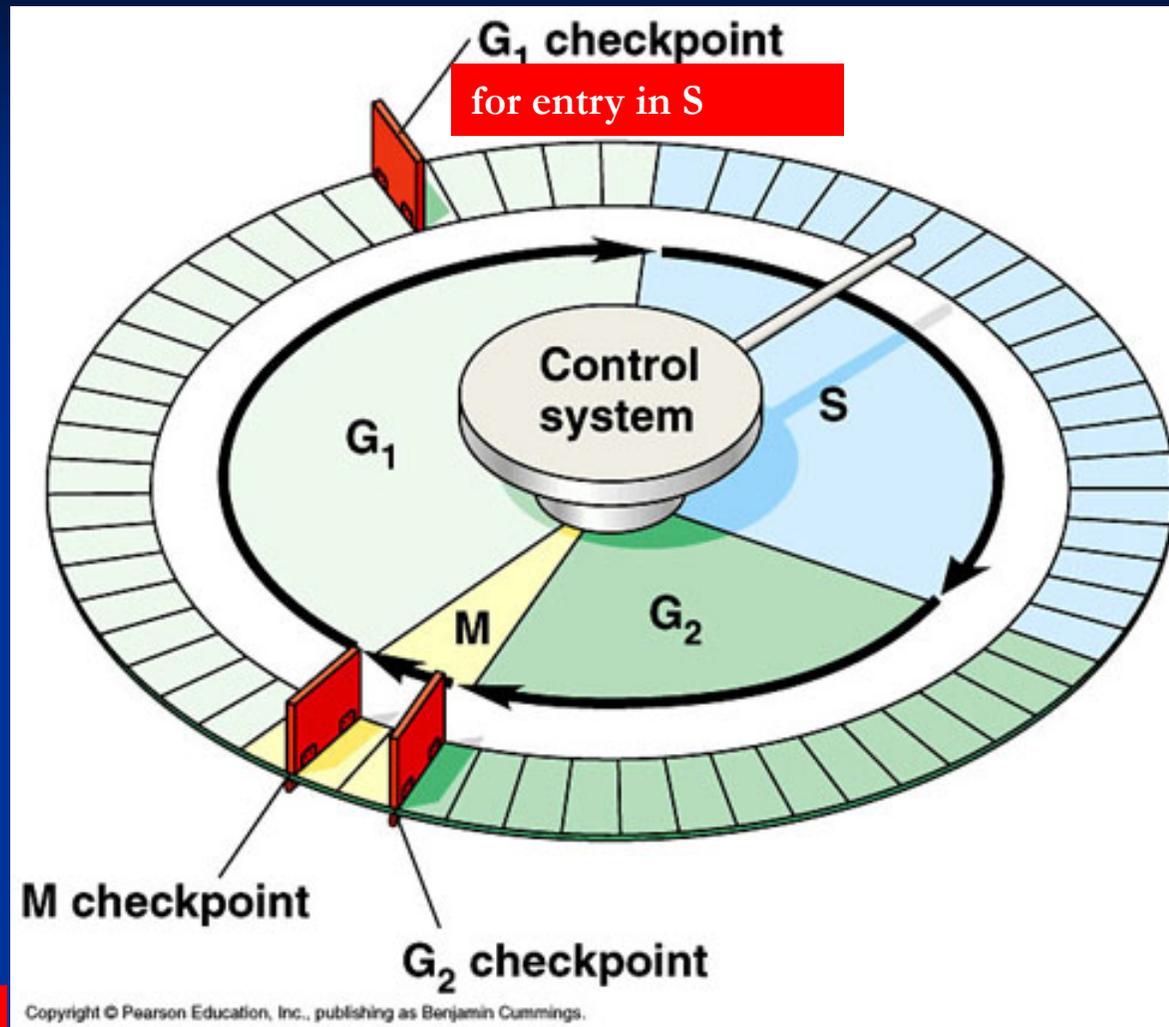
- protein binding
- dephosphorylation
- phosphorylation



Di solito la variabilità di lunghezza del ciclo cellulare dipende dal tempo che la cellula spende in G₁ o in G₀; le altre fasi sono di durata piuttosto costante

CHECKPOINTS: QUALITY CONTROL OF THE CELL CYCLE

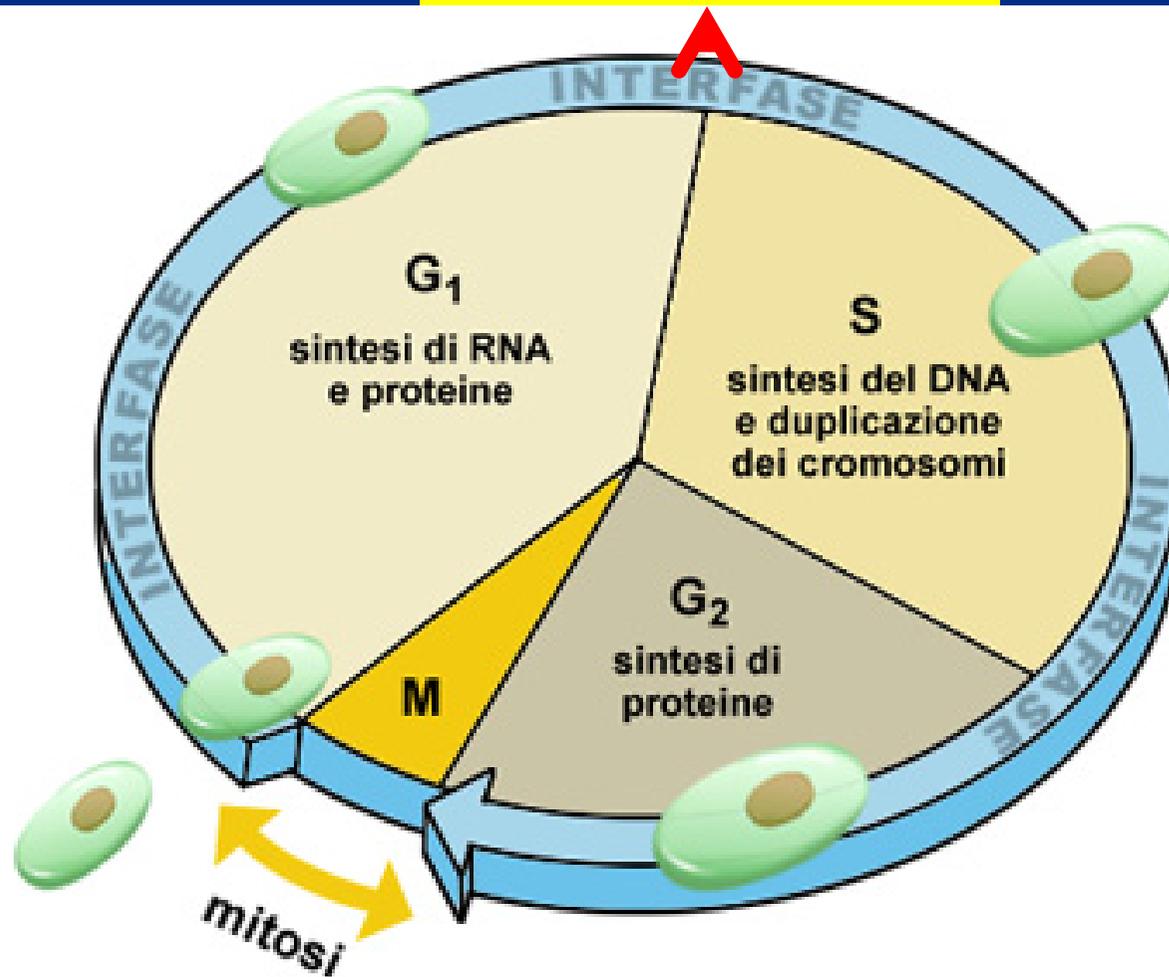
The *cell* has several systems for interrupting the *cell cycle* if something goes wrong



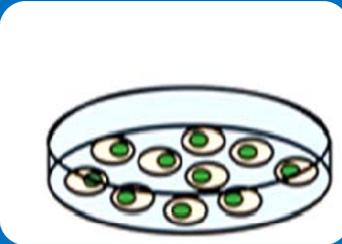
spindle checkpoints:
blocks entry into
anaphase

DNA damage checkpoints

Dopo la fase di G₁
alcune cellule
possono uscire dal
ciclo cellulare ed
entrare in G₀

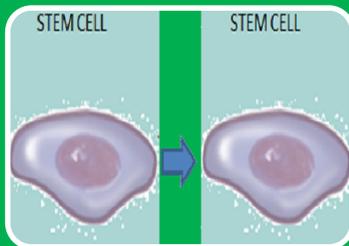


Esistono cellule capaci di replicarsi continuamente: **cellule staminali (STEM CELLS)**



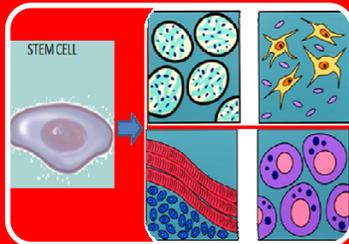
Cellule indifferenziate

- “immature”



Capacità di auto-rinnovamento

- possono replicarsi in modo illimitato

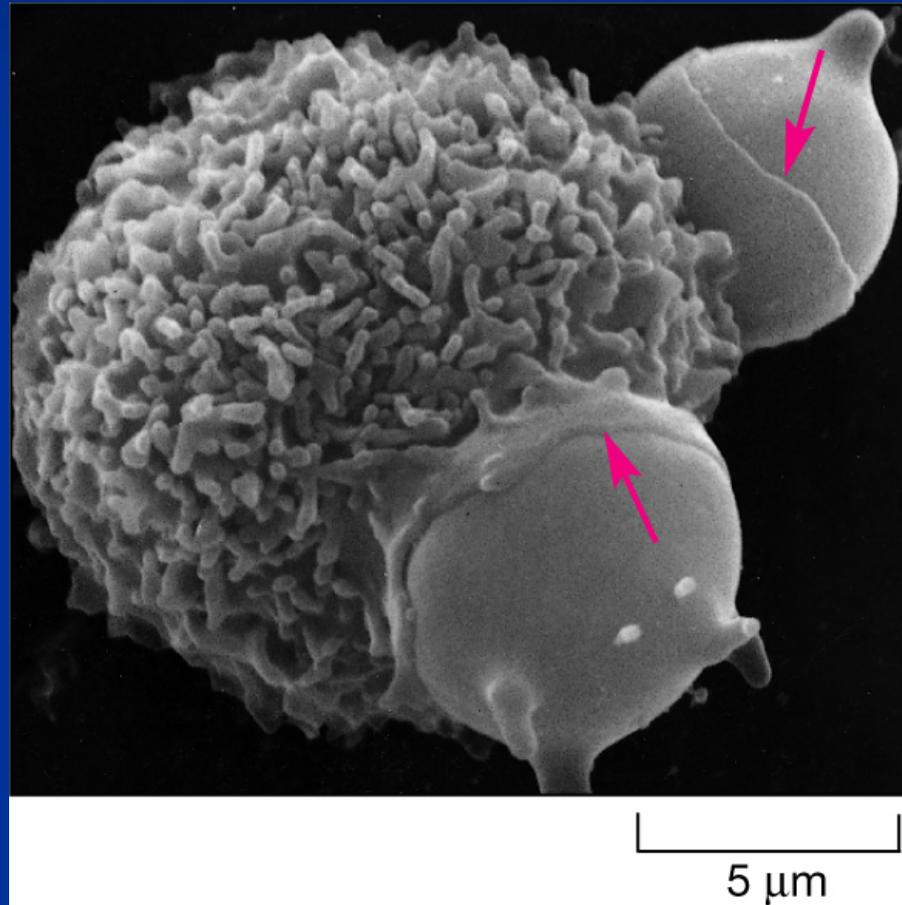


Capacità di generare cellule differenziate

- Possono generare tutte le cellule “mature” dell’organismo

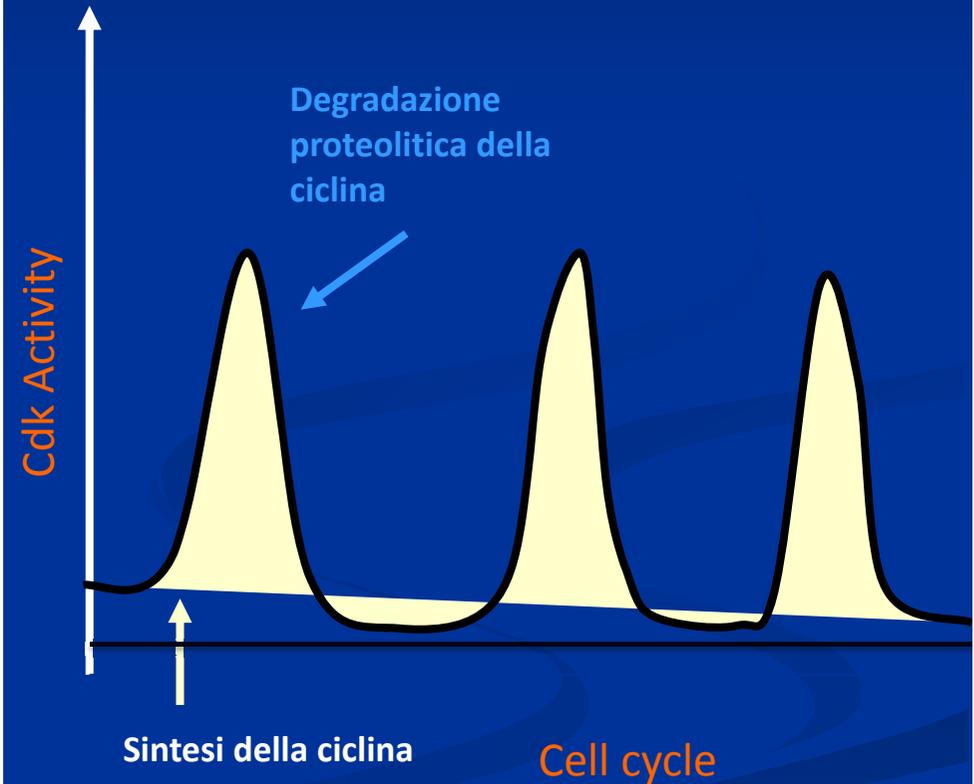
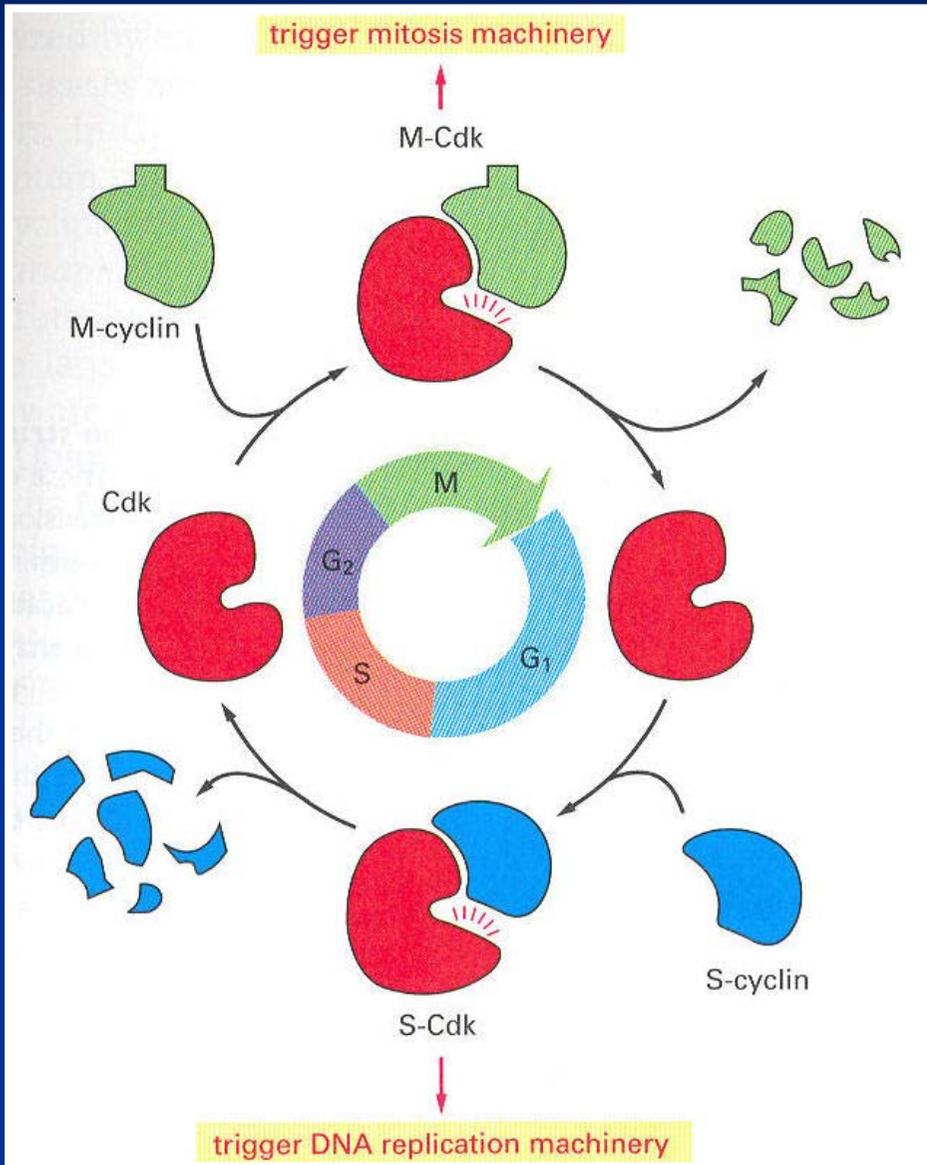
Le cellule possono andare incontro anche ad un processo di morte cellulare programmata:

APOPTOSI



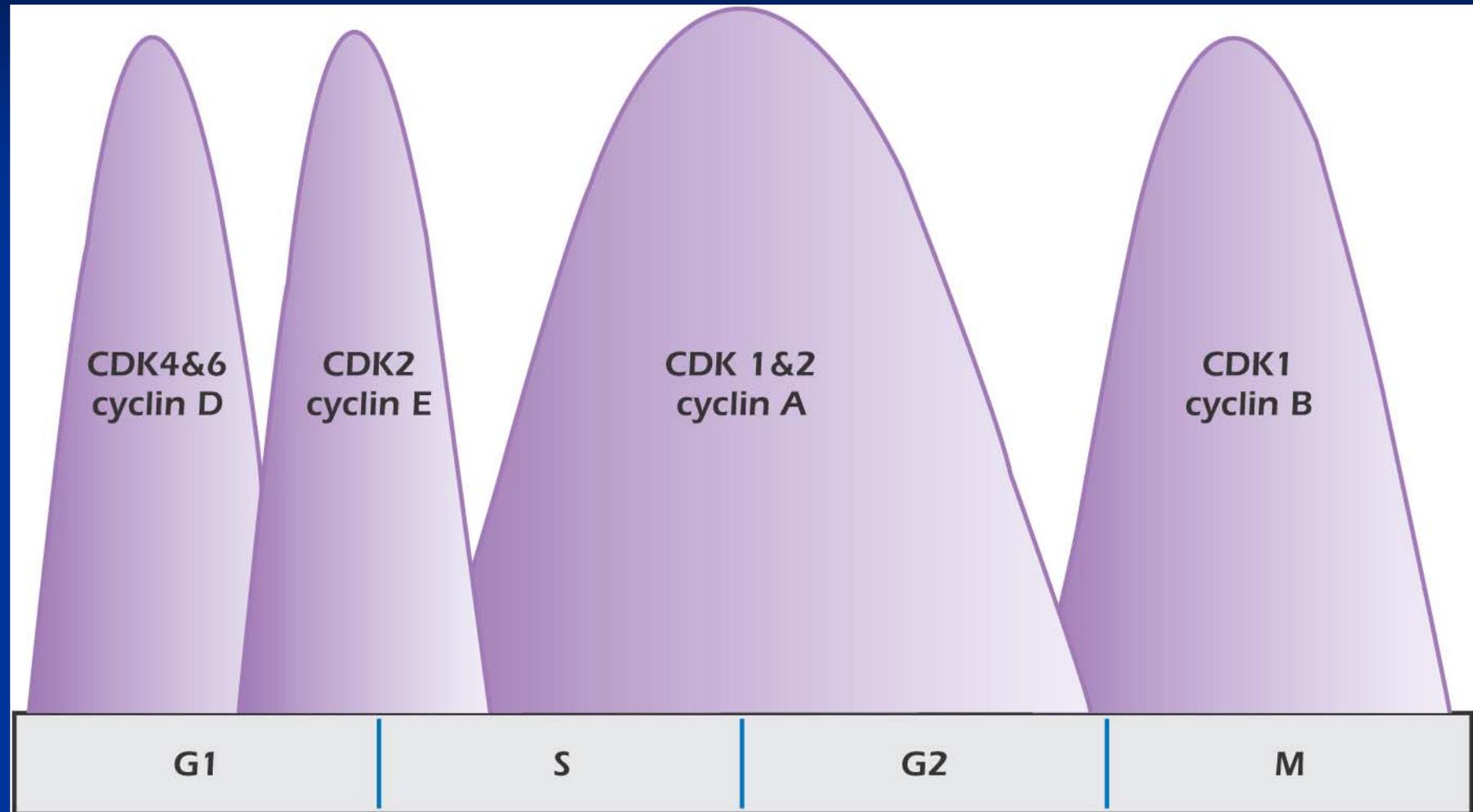
rimozione di cellule apoptotiche da parte di un macrofago

IL SISTEMA DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE richiede una ciclica attivazione di un complesso molecolare (Cdk + ciclina) e la sintesi e degradazione delle proteine regolatrici (ciclina)



Le CICLINE (proteine regolatrici) subiscono ciclicamente sintesi e degradazione

Le diverse cicline nelle cellule di Mammifero

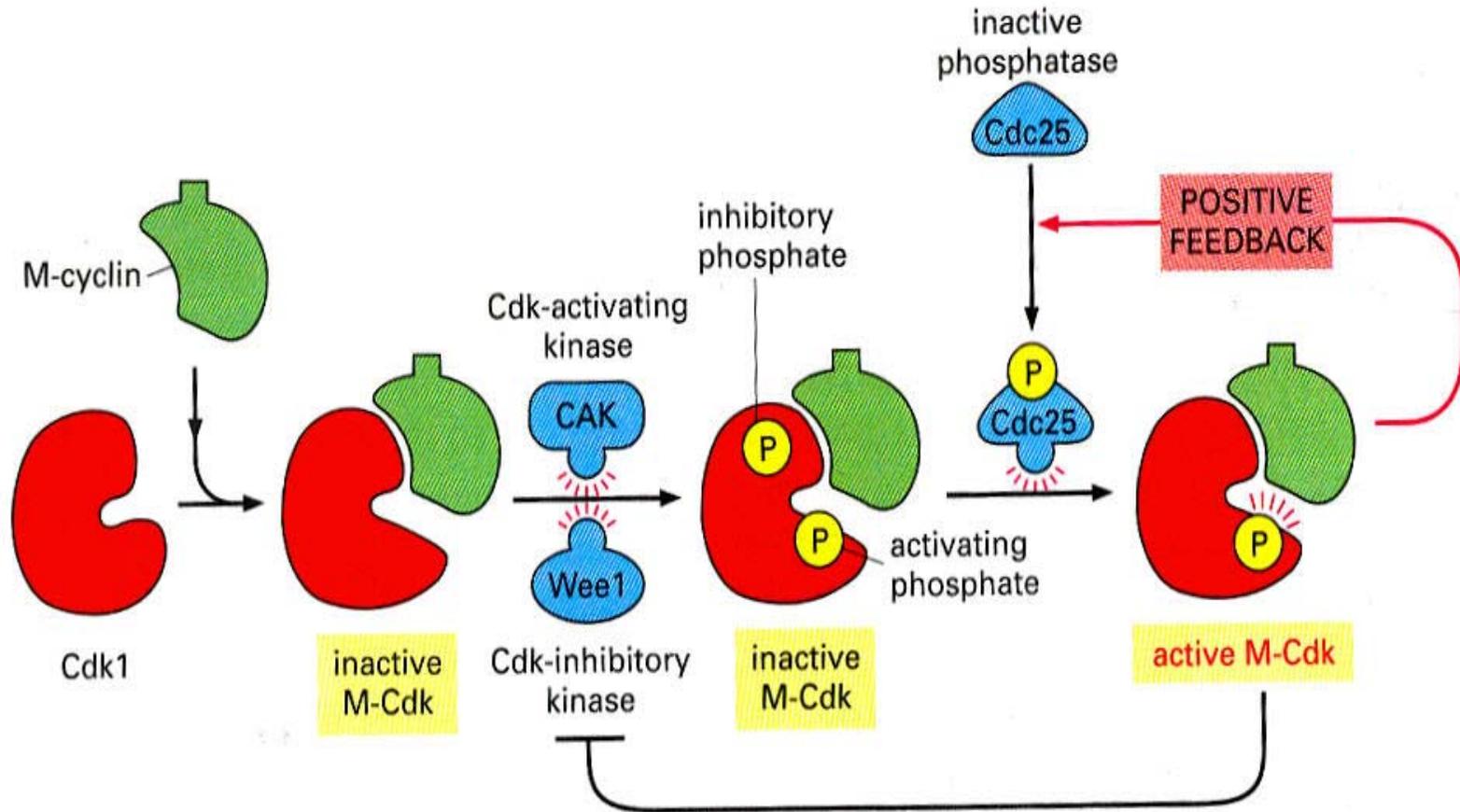


Cdk activities through the cell cycle

FASE M

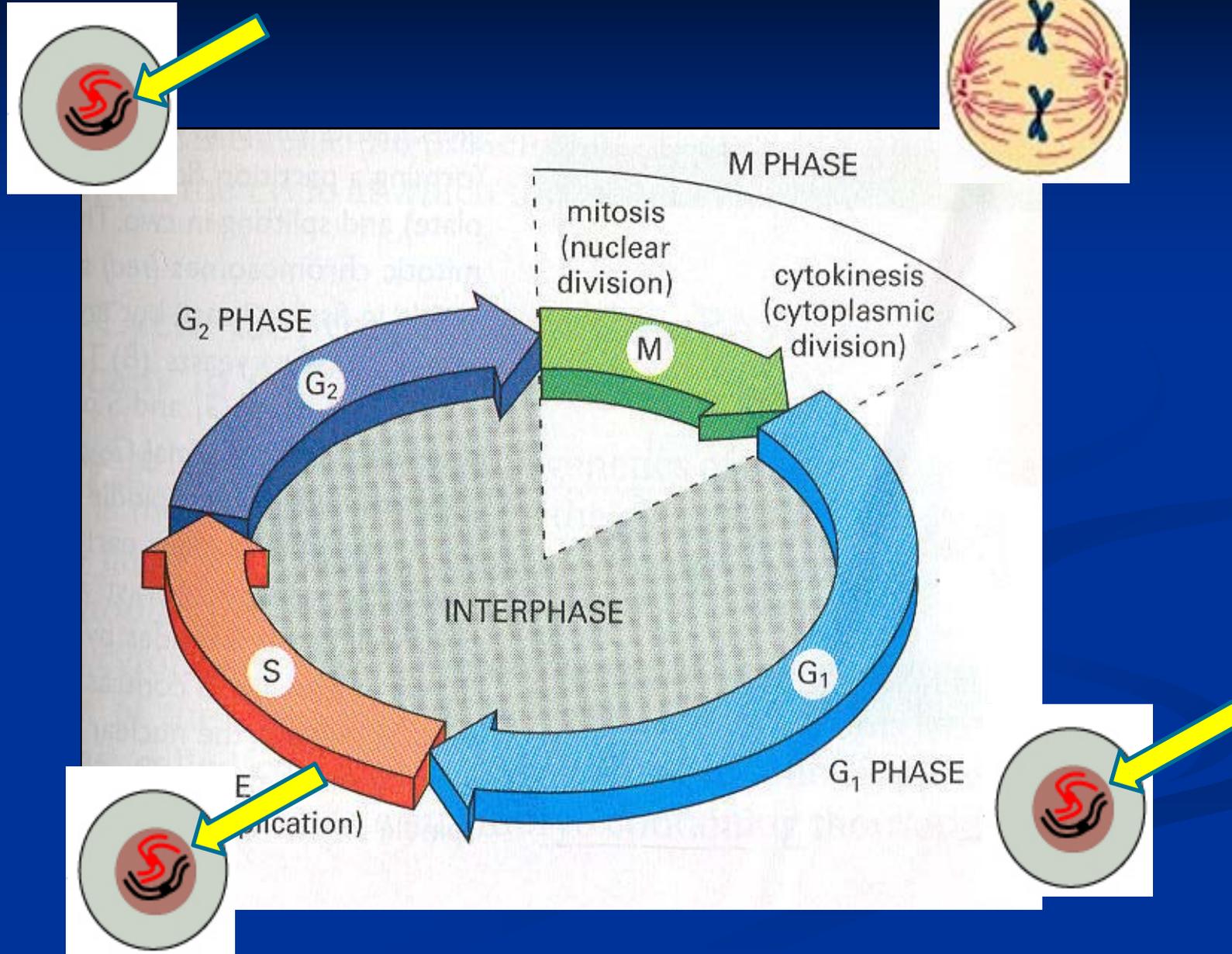
Subunità catalitica **CDK1**
Subunità regolatrice (**ciclina**)

← **MPF = Maturation Promoting Factor**



Il complesso molecolare attivato fosforila diverse proteine bersaglio determinando eventi cellulari specifici della fase M

CICLO CELLULARE

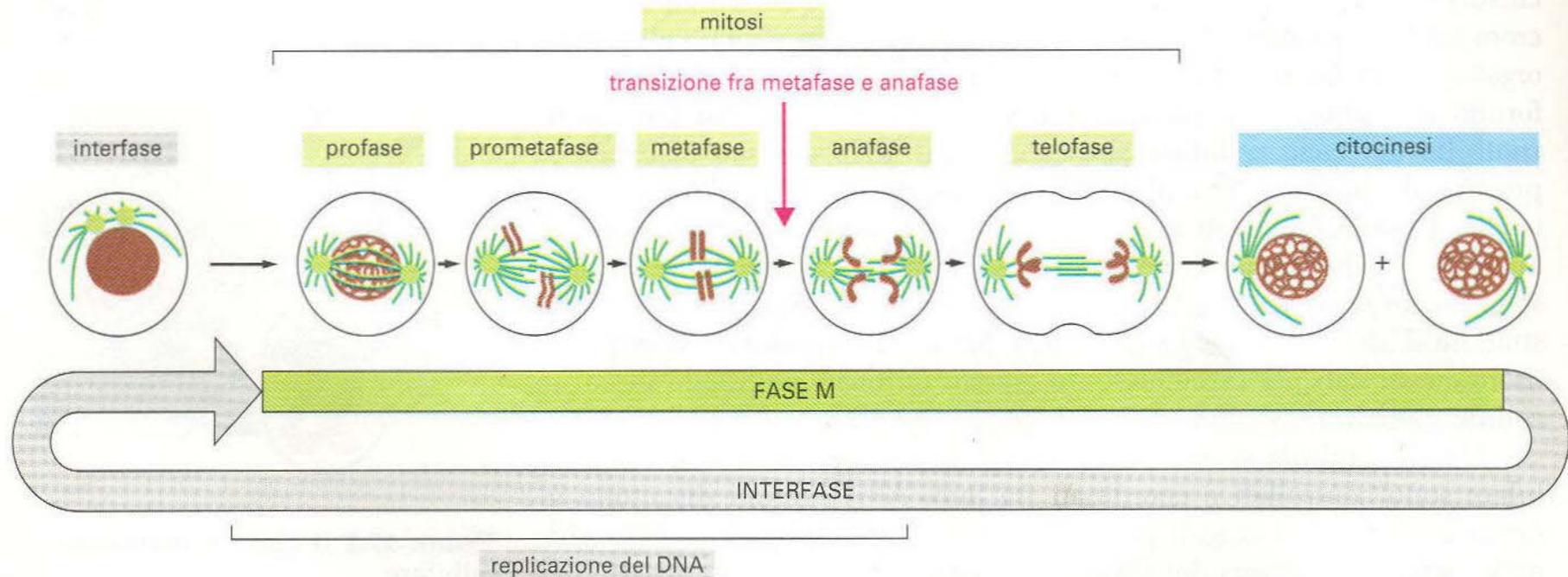


La fase M (MITOSI)

La divisione nucleare consiste di diversi stadi:

- **PROFASE** (prometafase)
- **METAFASE**
- **ANAFASE**
- **TELOFASE**

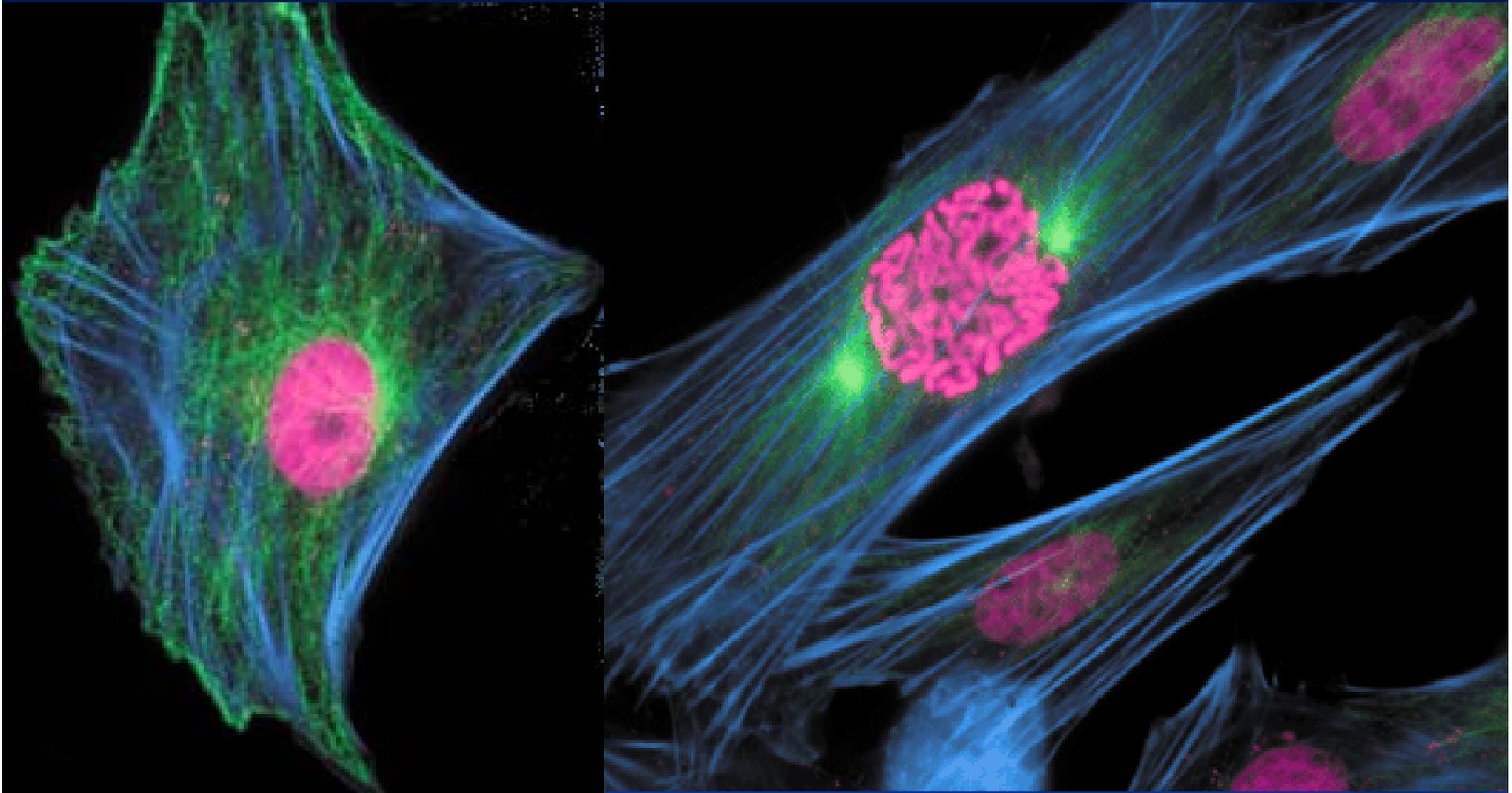
La fase M si conclude con la divisione citoplasmatica (CITODIERESI)



INTERFASE

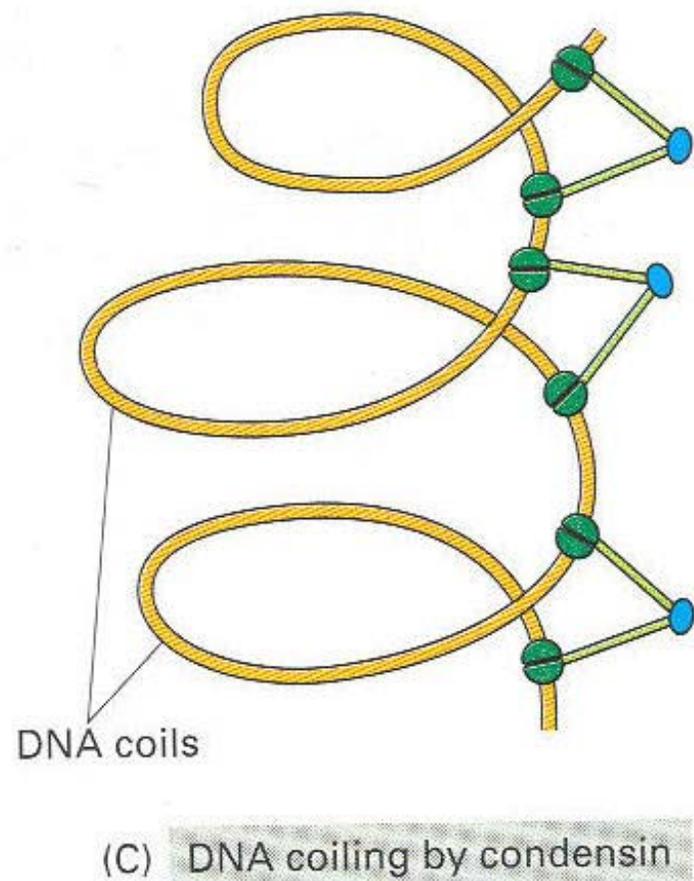
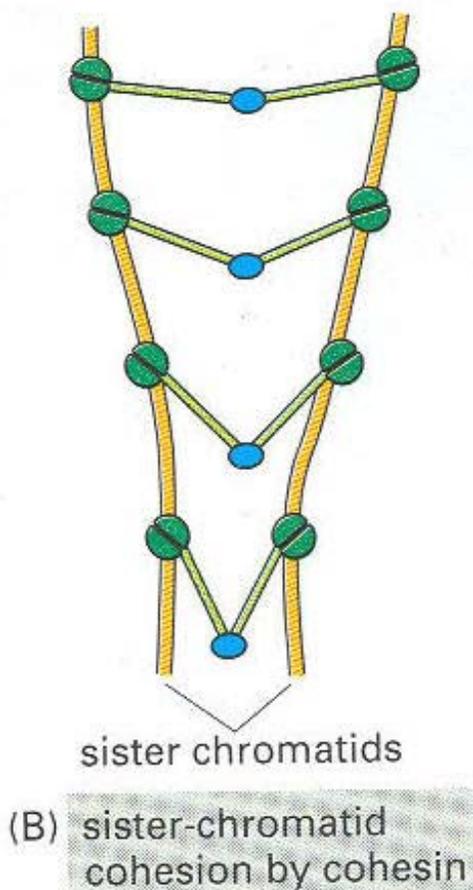
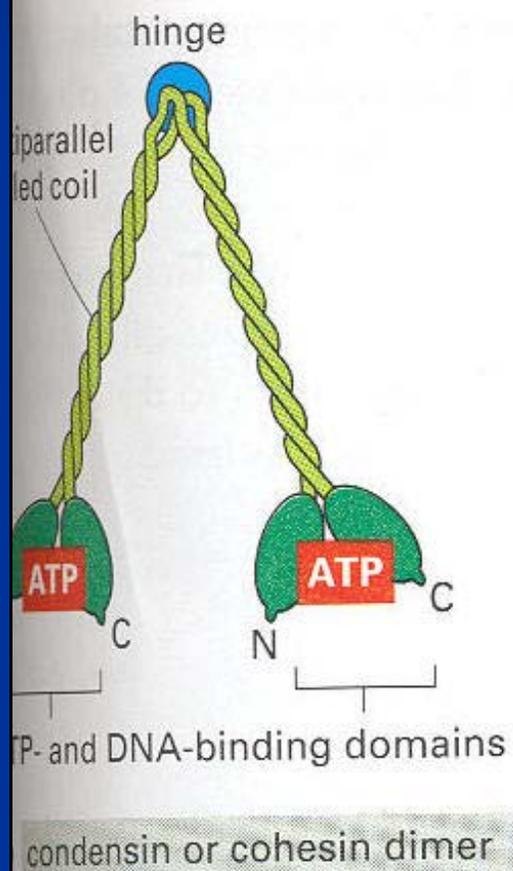


PROFASE

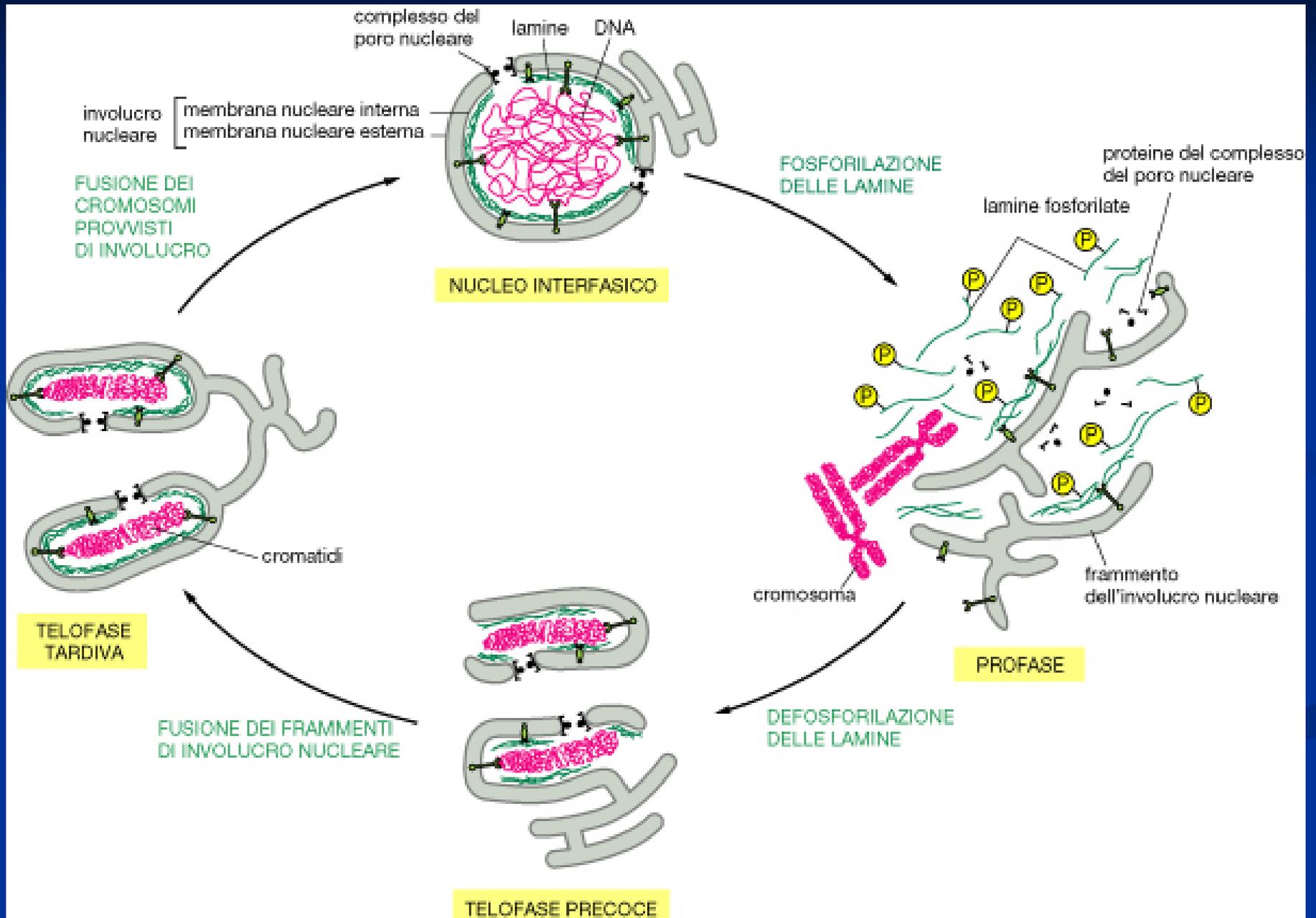


- **Condensazione cromatina**
- **Disassemblaggio involucro nucleare**

Condensazione della cromatina



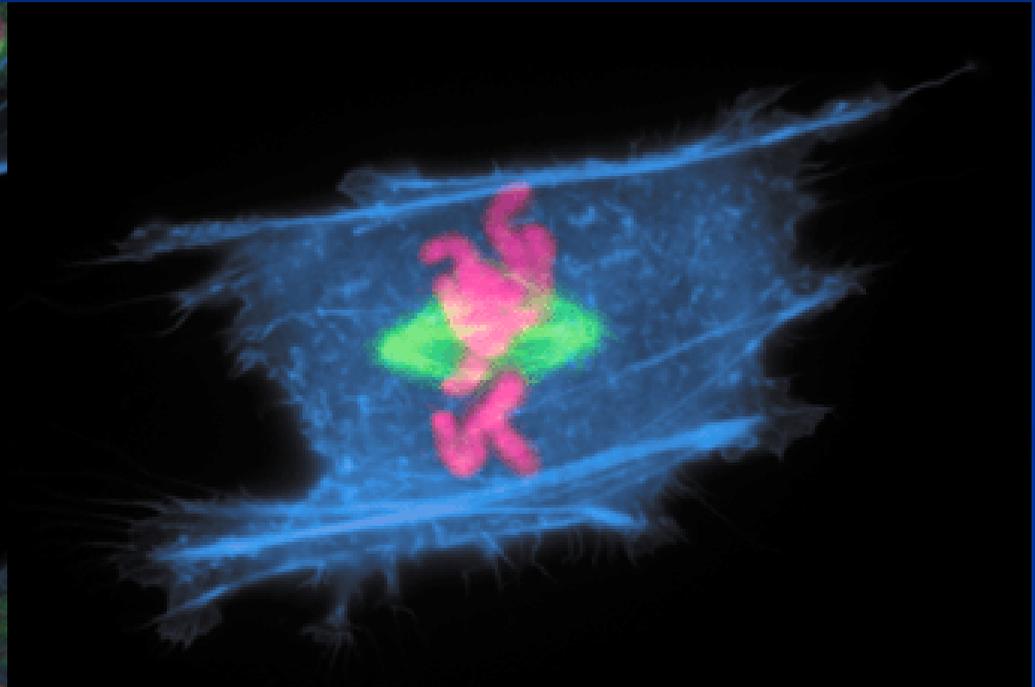
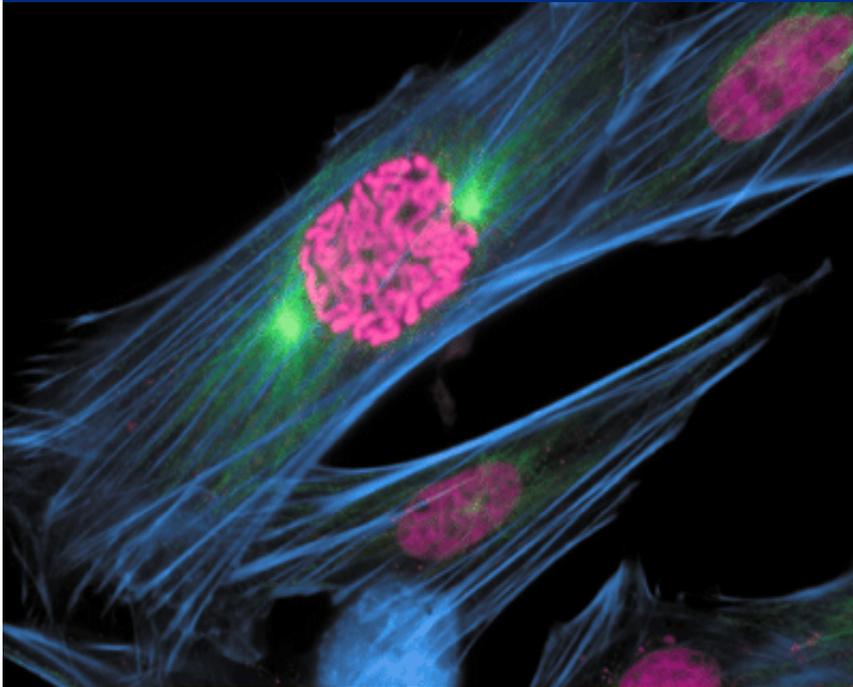
L'involucro nucleare è disassemblato durante la PROFASE



PROFASE

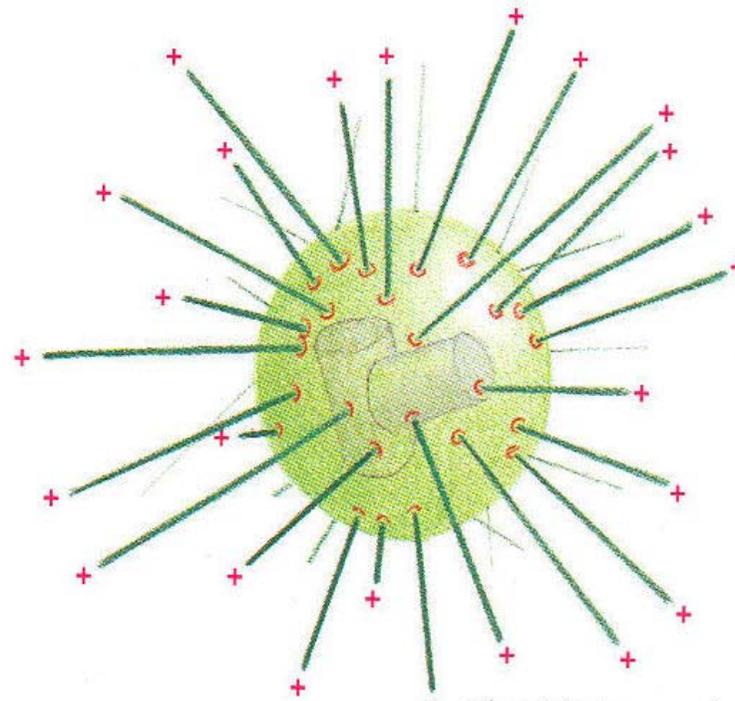
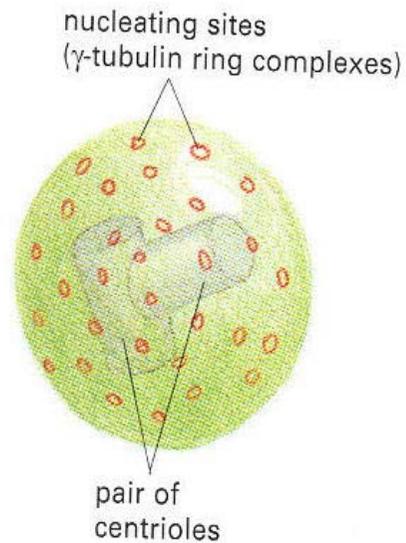


METAFASE



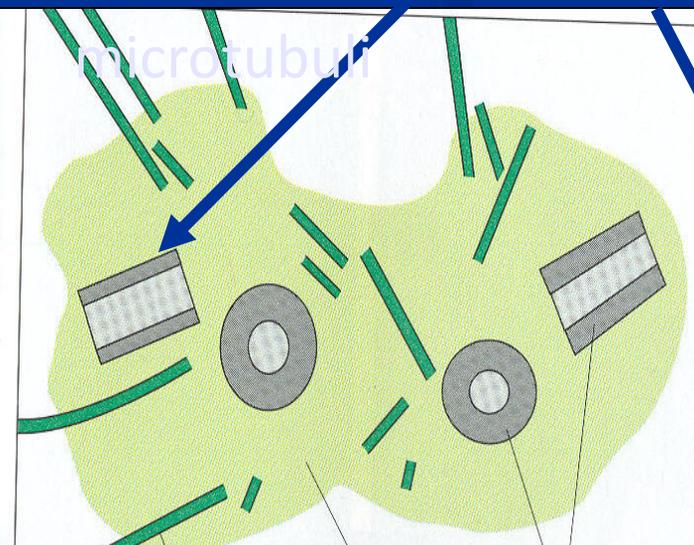
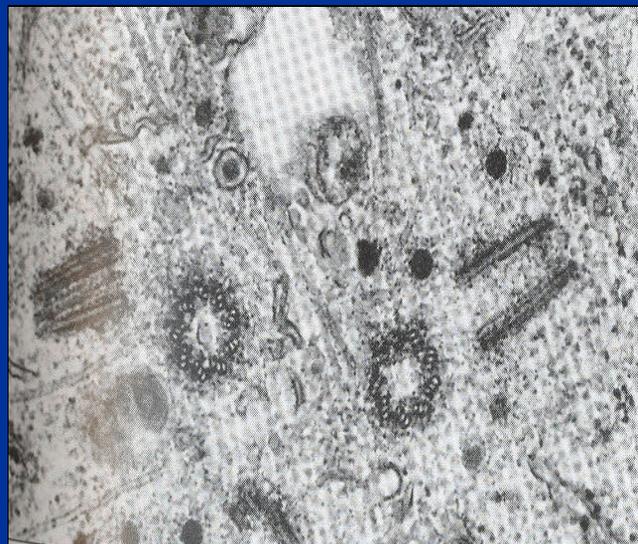
- **Cromosomi**: max livello di condensazione della cromatina
- **Assemblaggio fuso mitotico**

Organizzazione fuso cellulare



CENTROSOMA

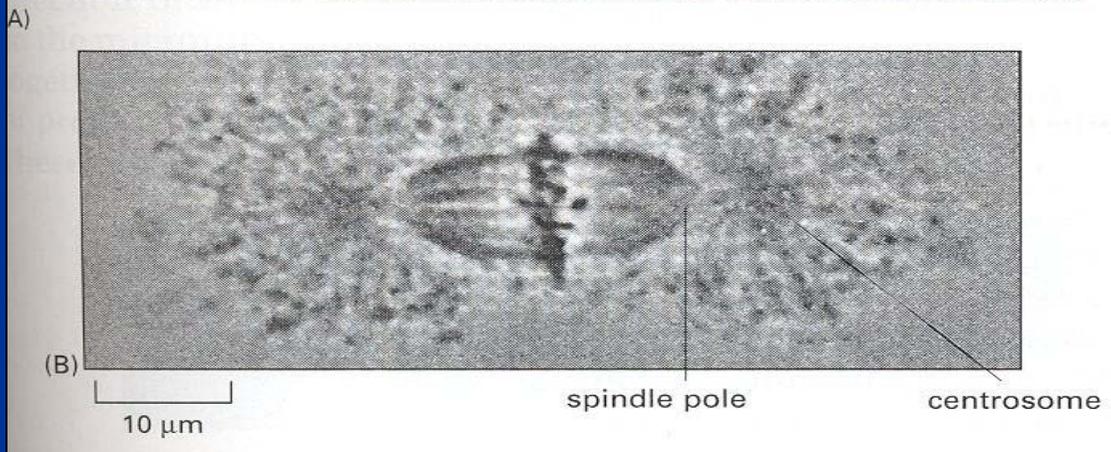
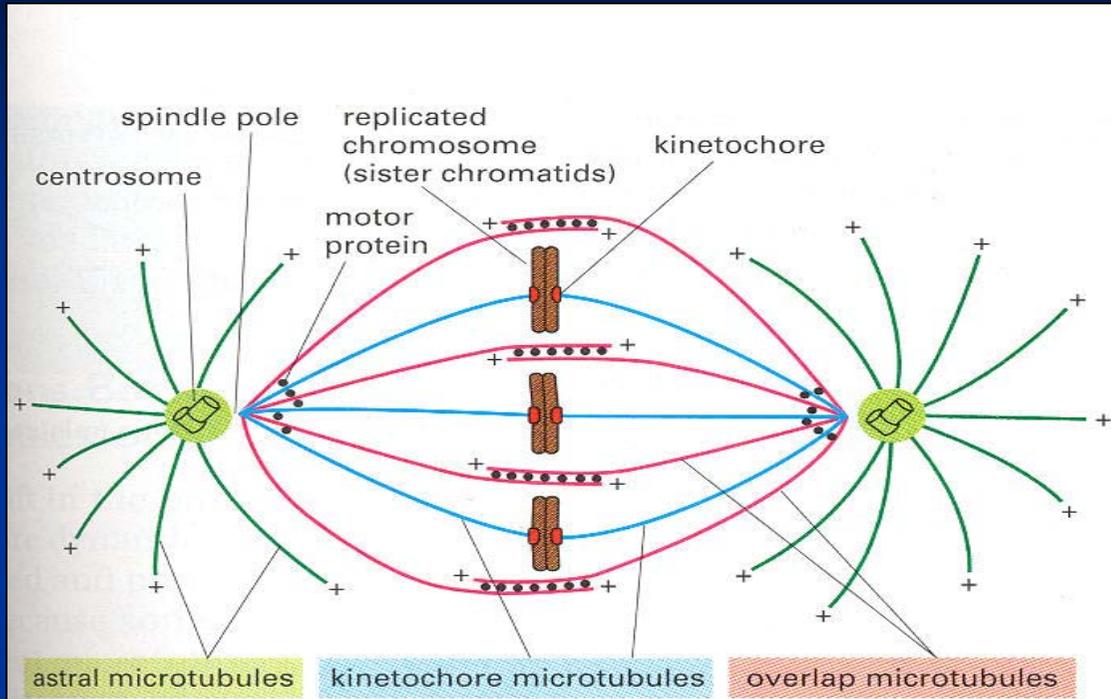
fatto da una matrice, una coppia di centrioli, dei complessi anulati della gamma-tubulina da cui parte la nucleazione dei microtubuli di tubulina



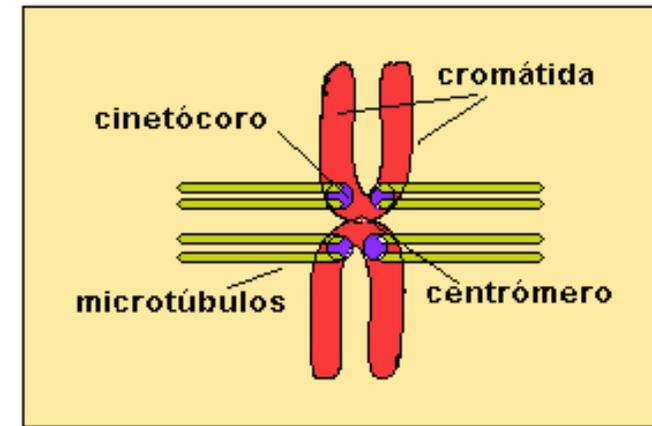
Il centrosoma viene duplicato dalla cellula durante la fase S

Organizzazione fuso

Localizzazione dei cromosomi omologhi sul piano equatoriale fuso



I cromosomi si attaccano alle fibre del fuso tramite i loro **cinetocori** e possono esercitare un movimento attivo verso i poli del fuso



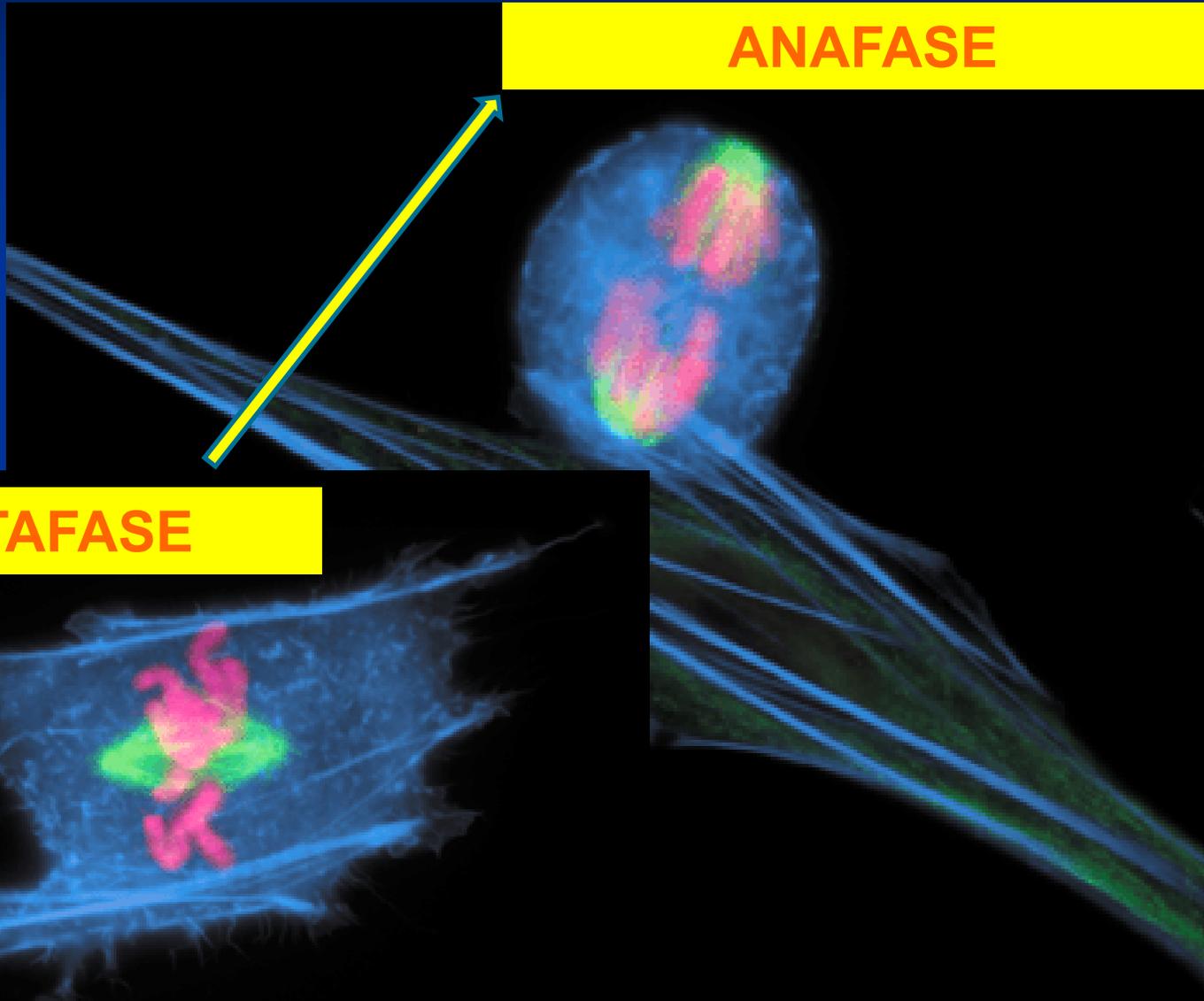
Il fuso si assembla tra i 2 **centrosomi** (la duplicazione dei centrosomi è avvenuta durante l'interfase)

La fosforilazione di proteine del citoscheletro induce l'organizzazione del fuso meiotico

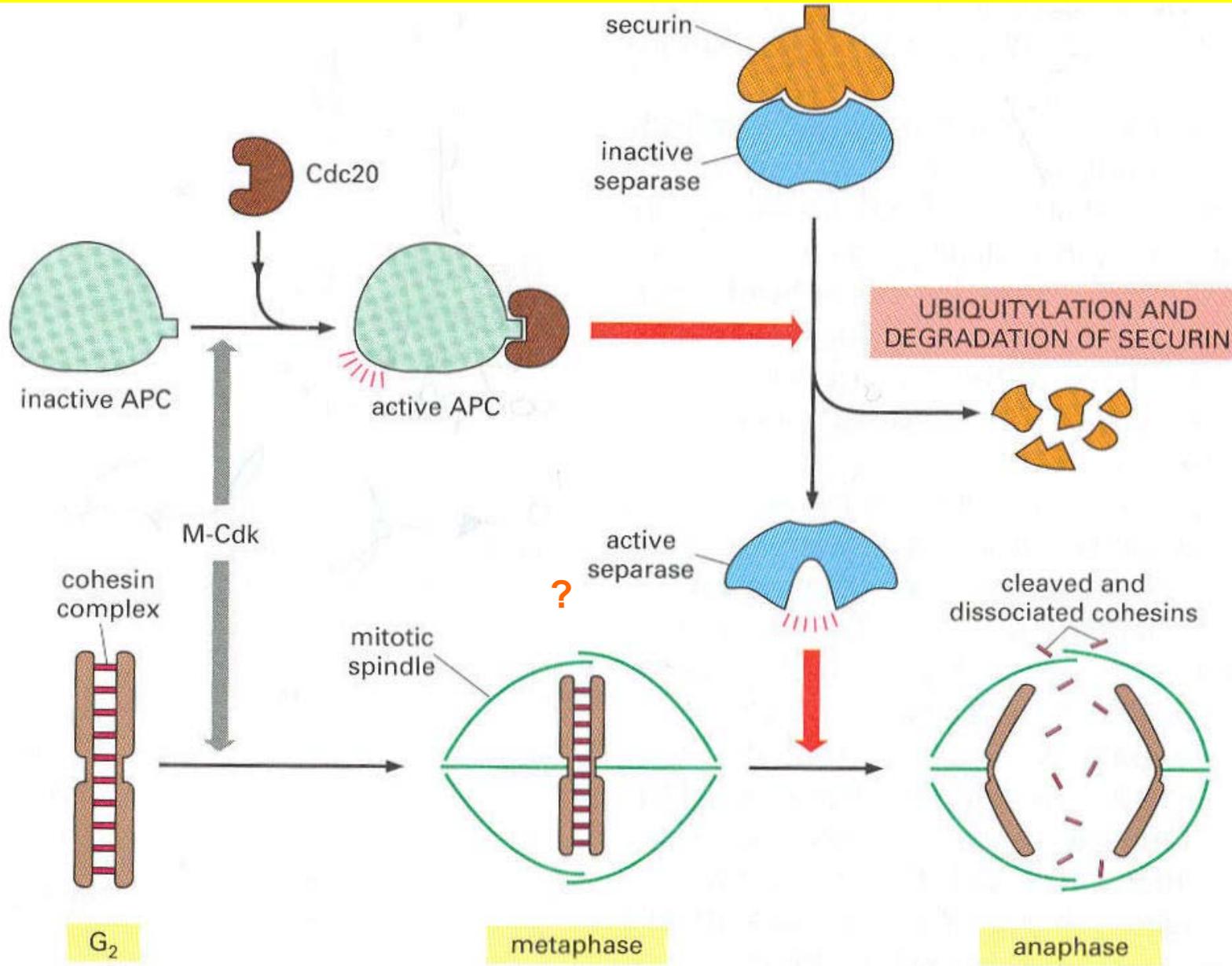
I **cromatidi fratelli** si separano
e ciascuno viene tirato verso
un polo del fuso

ANAFASE

METAFASE



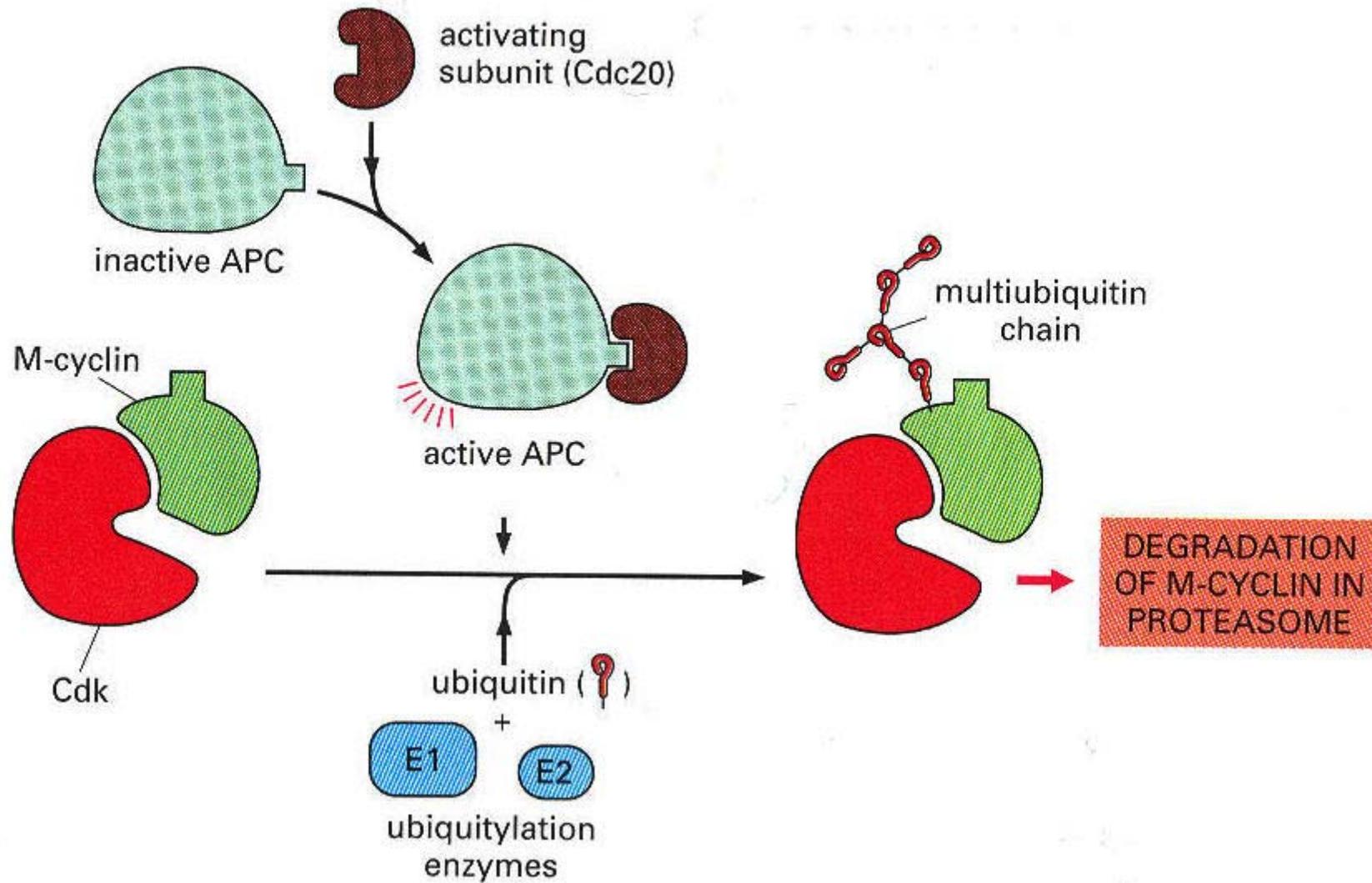
Il passaggio da metafase ad ANAFASE richiede l'attivazione di un complesso enzimatico (APC anaphase-promoting complex)



La proteolisi è un processo cruciale per chiudere la fase M



(B) control of proteolysis by APC

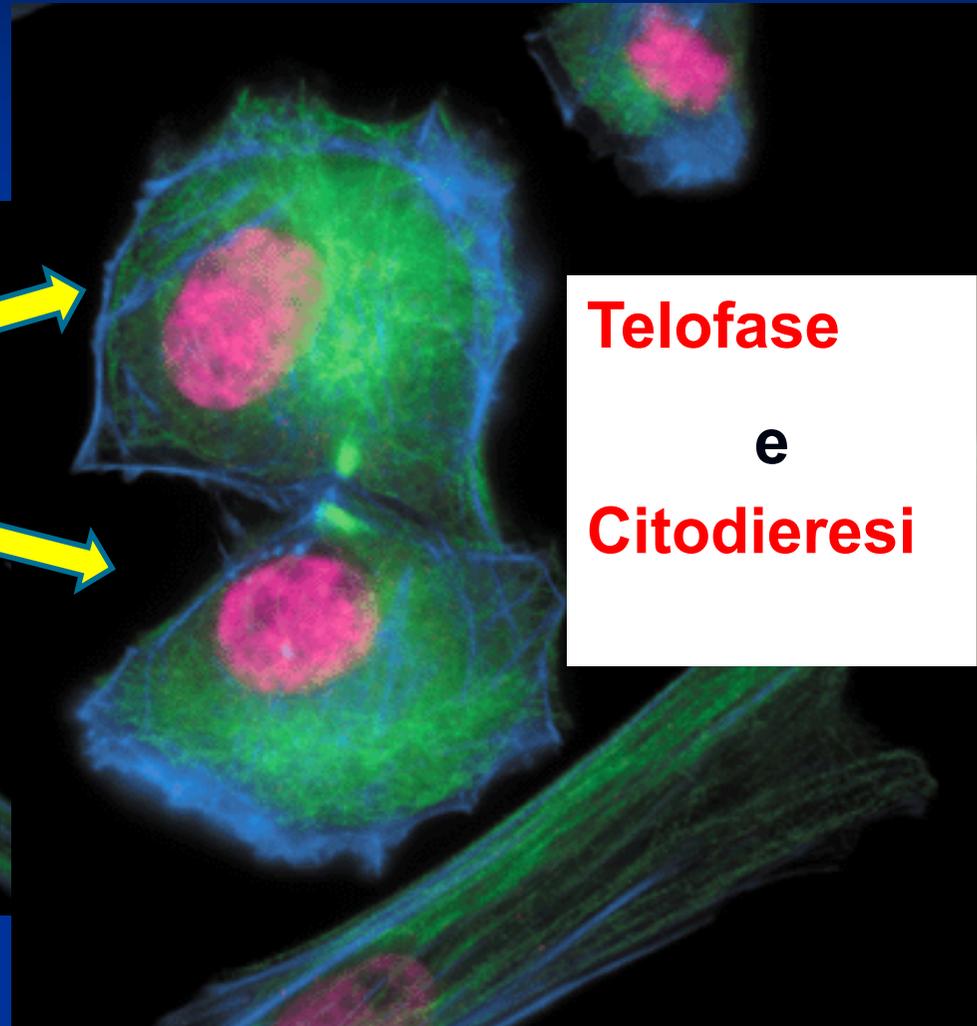


Il complesso APC attivato causa anche la degradazione di molecole importanti per la regolazione del ciclo cellulare (ciclina M)

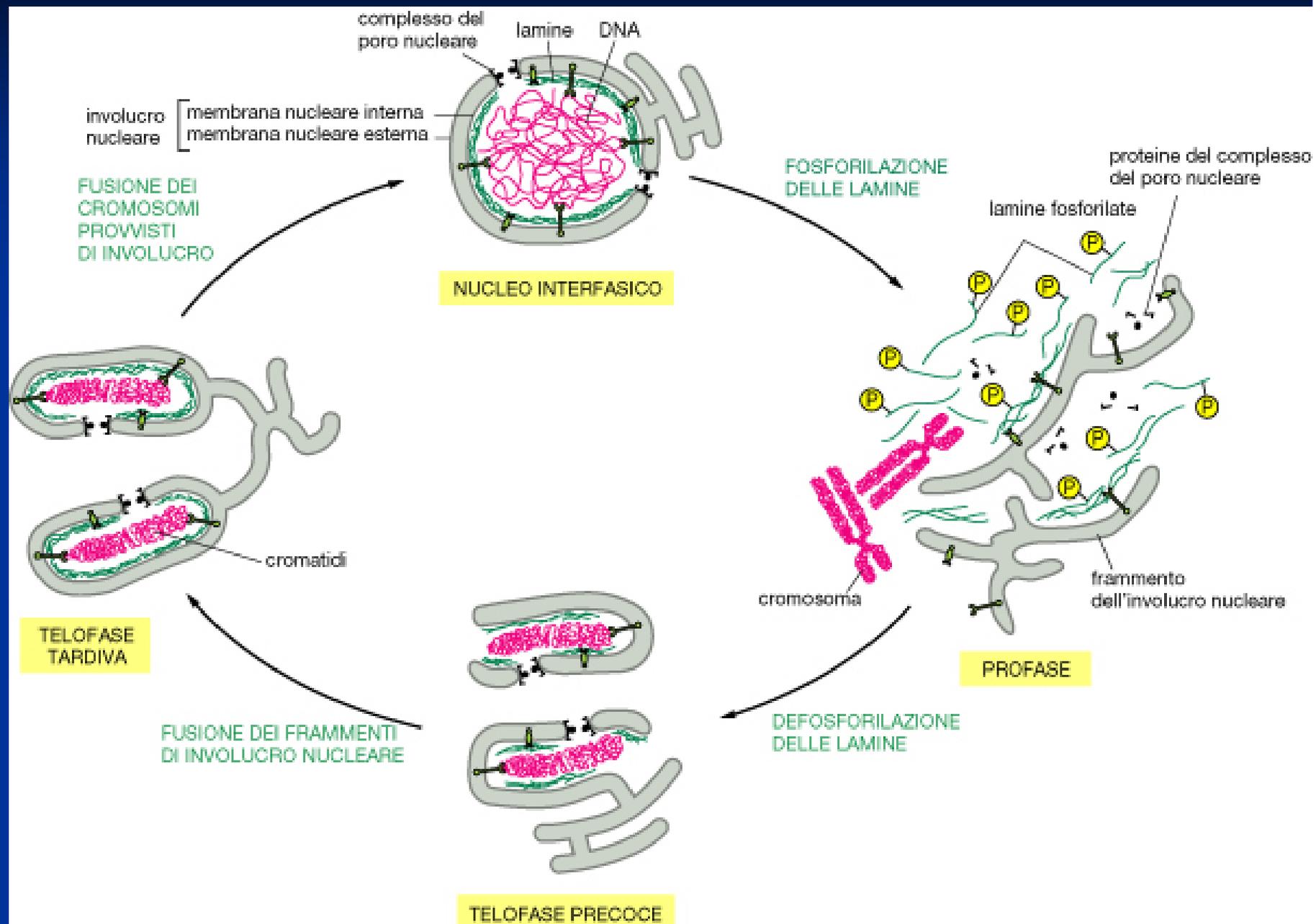
Fine della Fase M

anafase

Telofase
e
Citodieresi

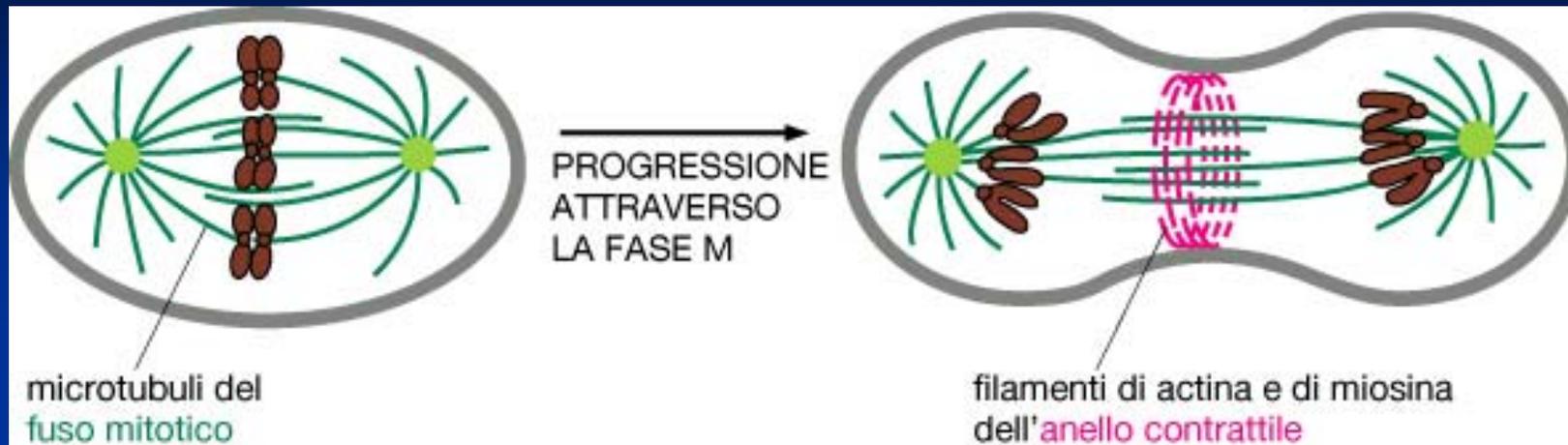


L'involucro nucleare si riassume in Telofase



FASE M: Citodieresi

Anello contrattile



■ CITODIERESI

Questo processo è dovuto a un fascio di **MICROFILAMENTI DI ACTINA** che si forma sotto la membrana plasmatica detto **anello contrattile**.

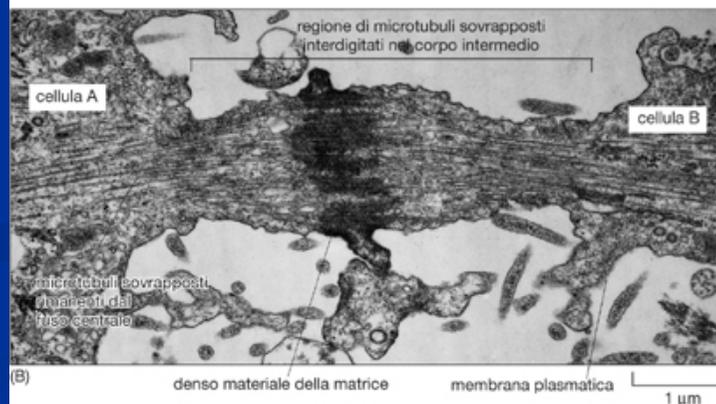
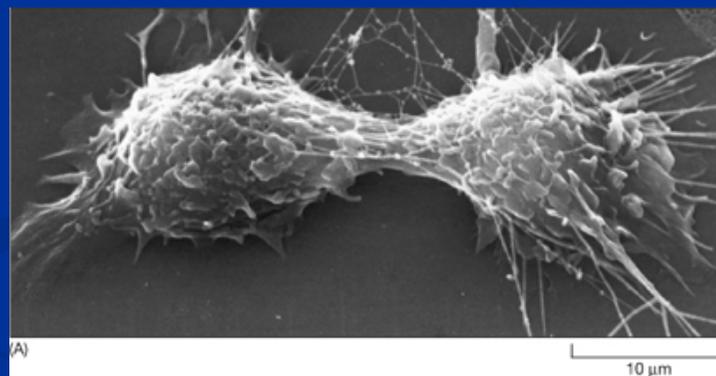
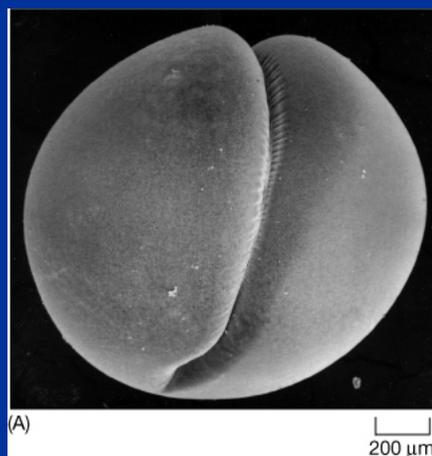
(l'actina necessaria alla formazione di questa struttura deriva dal disassemblaggio dei filamenti di actina del citoscheletro).

La strozzatura dell'anello avviene mediante L'INTERAZIONE CON LE MOLECOLE DI **MIOSINA** che inducono lo scorrimento dei filamenti di actina (come accade nelle fibre muscolari) e che costringe a sua volta il citoplasma a dividersi.

- Il solco si viene a formare generalmente nella parte mediana della cellula in corrispondenza della regione centrale del fuso.

FASE M: CITODIERESI

Anello contrattile

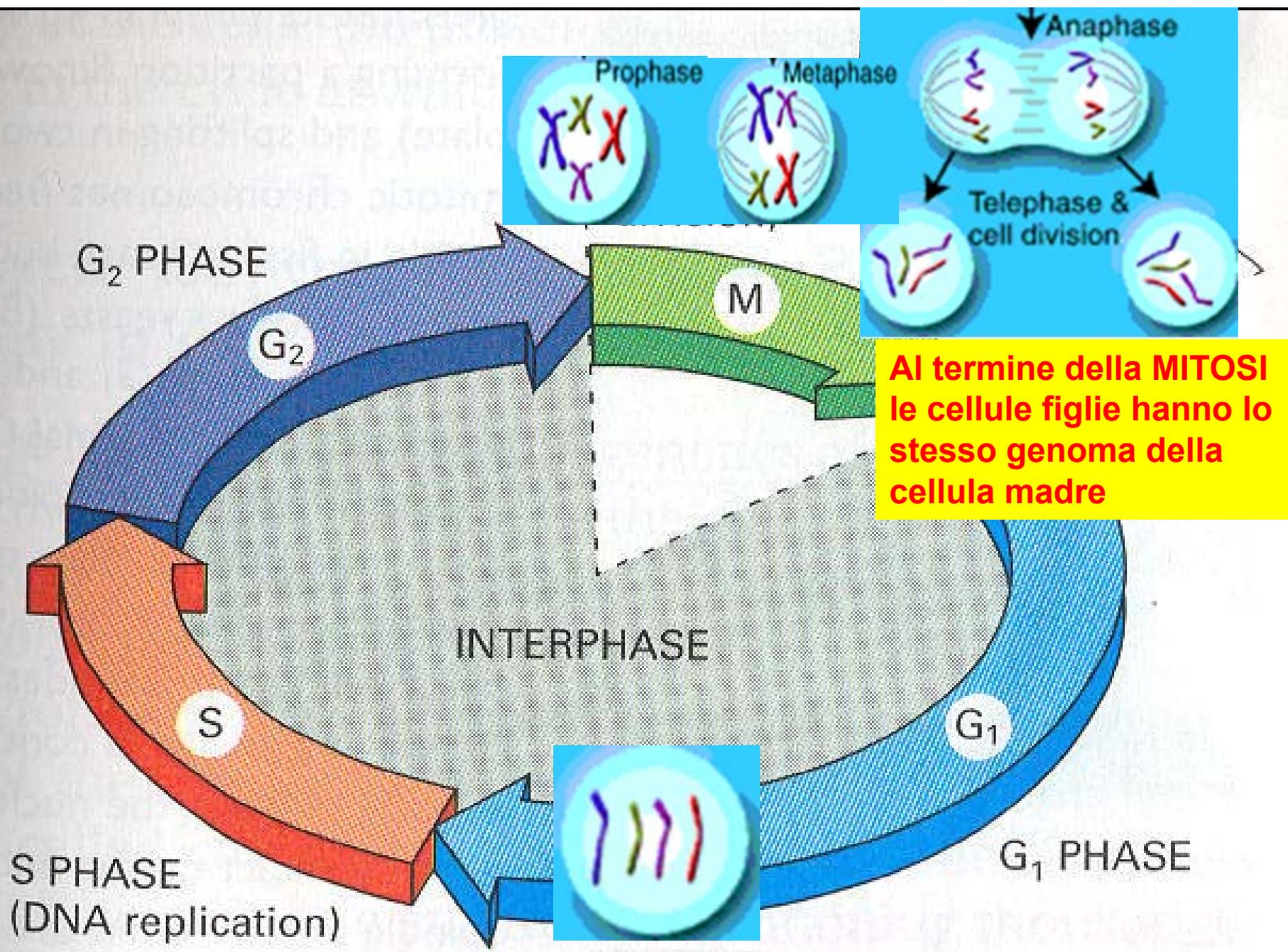


FASE M: CITODIERESI

Anello contrattile



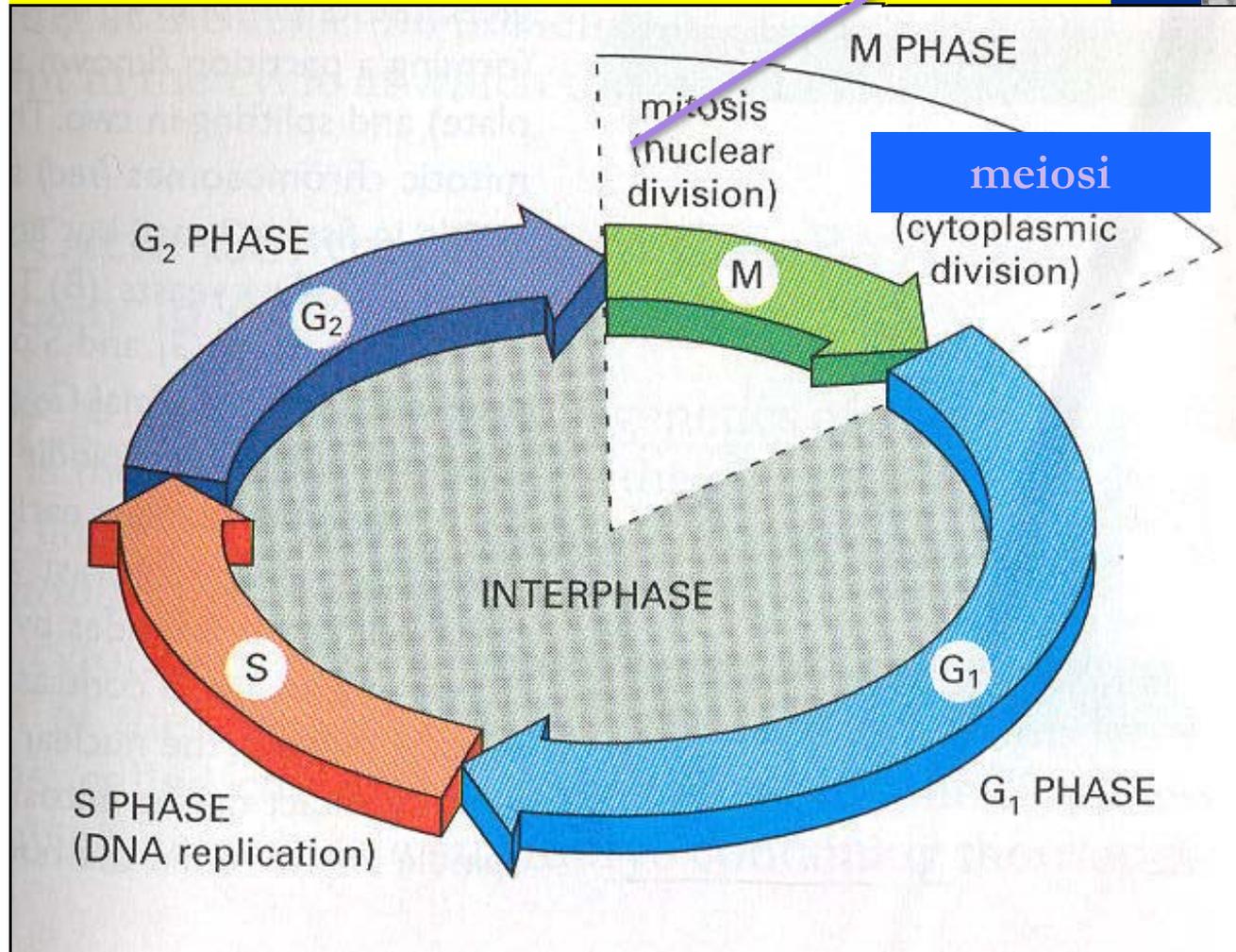
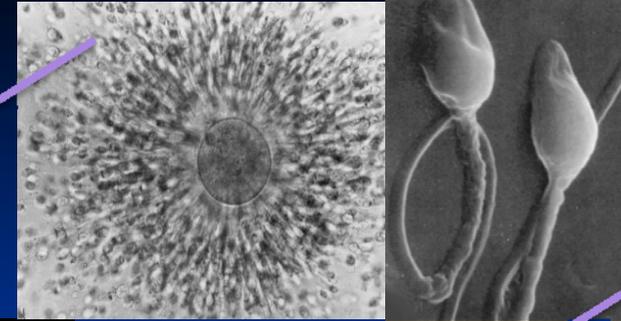
In particolari tipi di cellule (**oociti**) in cui il fuso non si trova in posizione centrale anche il solco segue il suo orientamento dividendo la cellula in due cellule figlie di dimensioni diverse.



Nei **GAMETI**, le cellule deputate alla riproduzione, la fase M prende il nome di **MEIOSI**

oocita

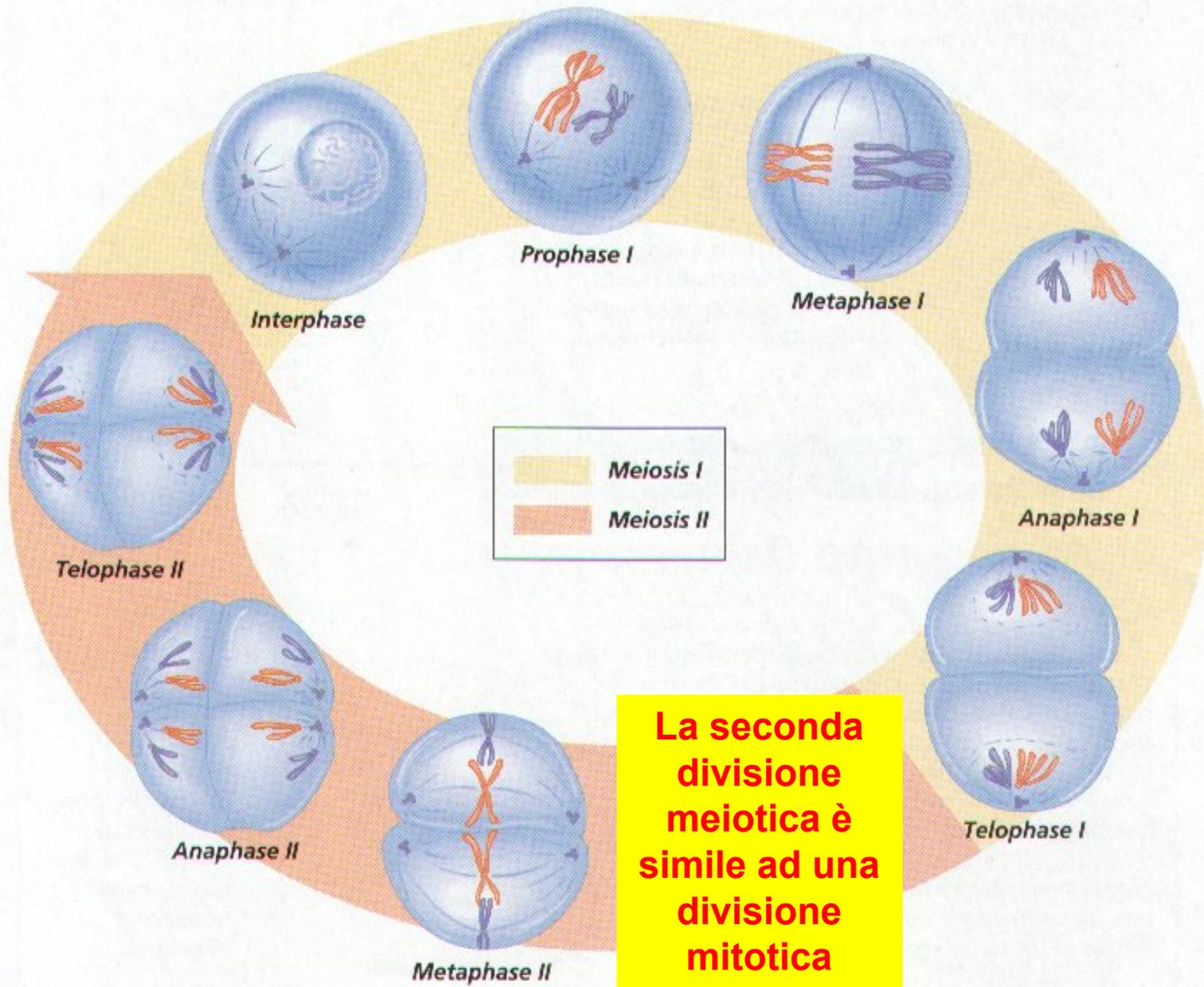
spermatozoi



gameti sono cellule specializzate dell'organismo che subiscono una particolare fase M del ciclo cellulare (**MEIOSI**) capace di produrre cellule, con **genoma dimezzato** (aploidi) e **diverso** dalla cellula madre

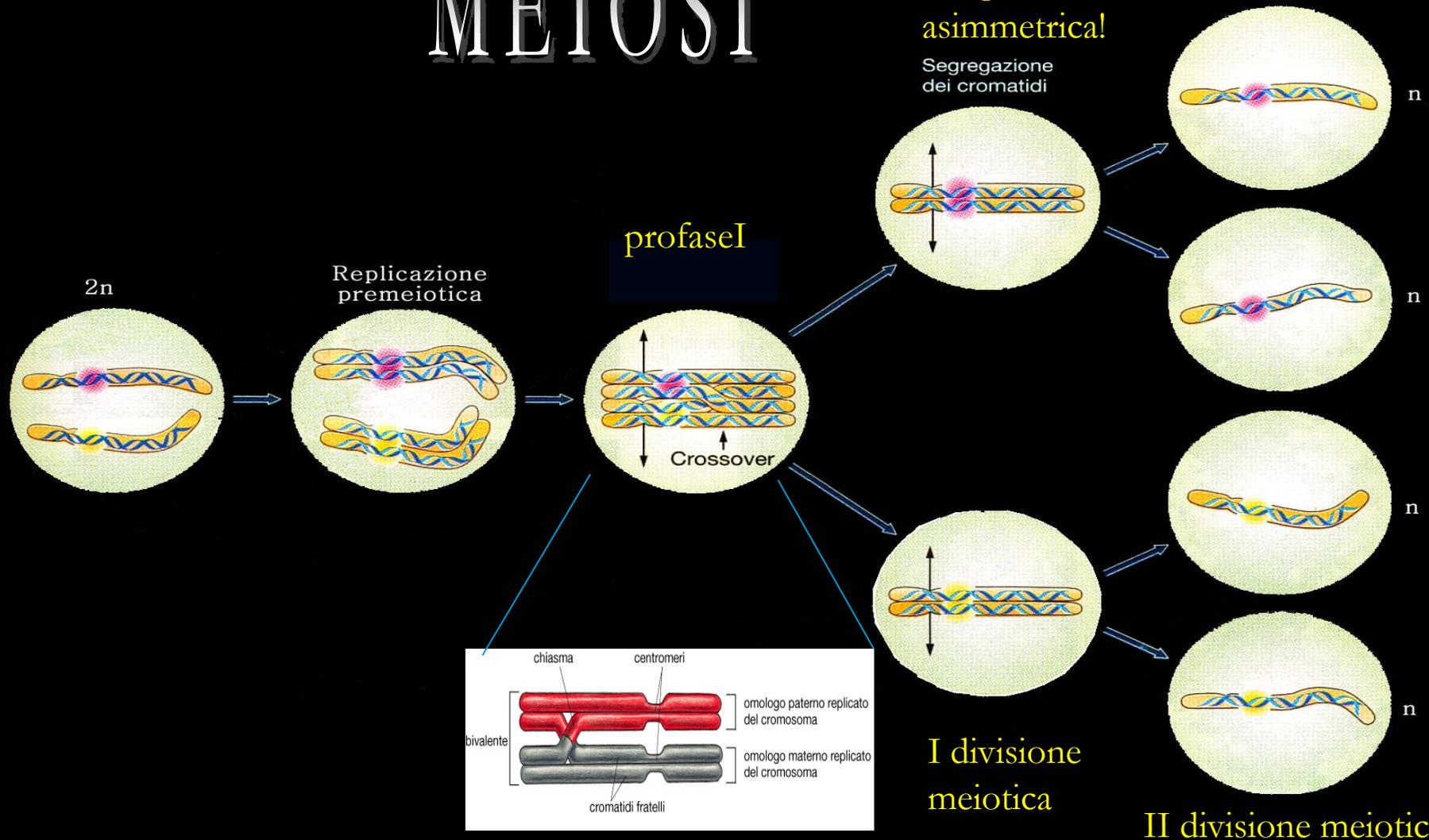
CICLO CELLULARE

Meiosis consists of two divisions, meiosis I and meiosis II. During meiosis I, the homologous chromosomes separate from each other. In meiosis II, the sister chromatids of each chromosome separate from each other.



MEIOSI

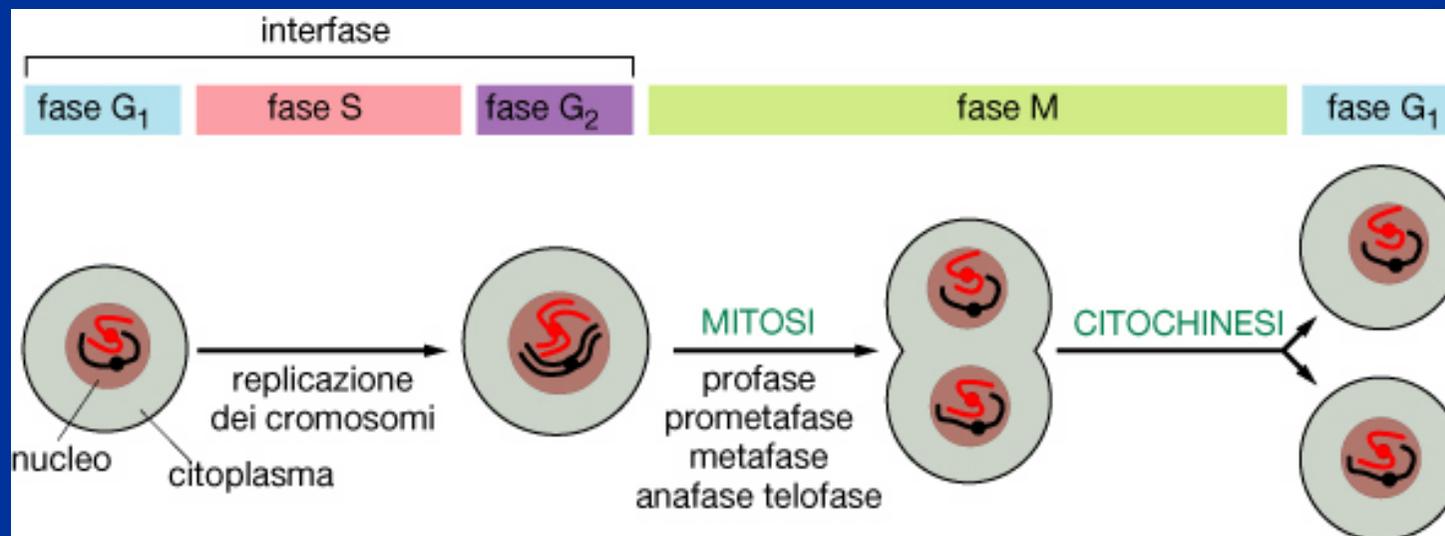
Nella meiosi femminile la citodieresi di ogni divisione meiotica è asimmetrica!



Durante la meiosi avviene il **CROSSING-OVER**, processo che introduce variabilità genetica nella specie

Cellule figlie con **genoma aploide (n)** e **diverso** dalla cellula madre

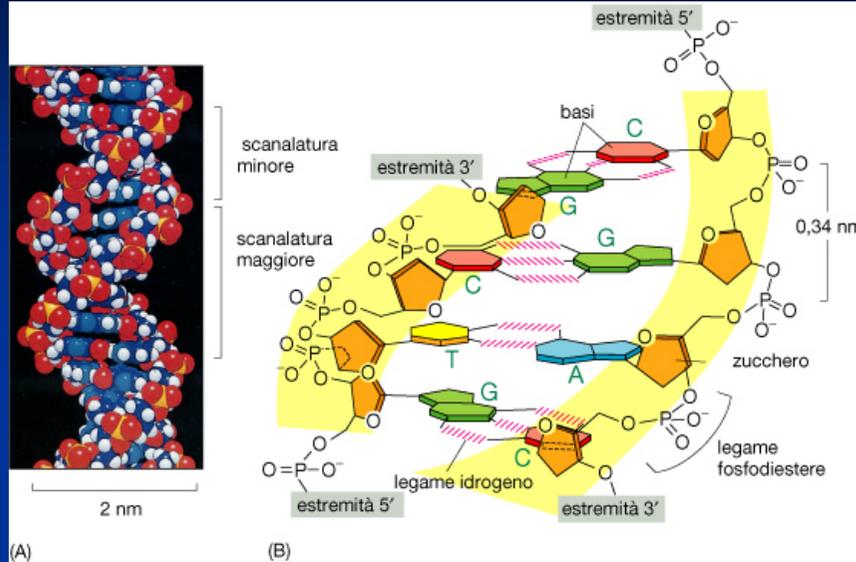
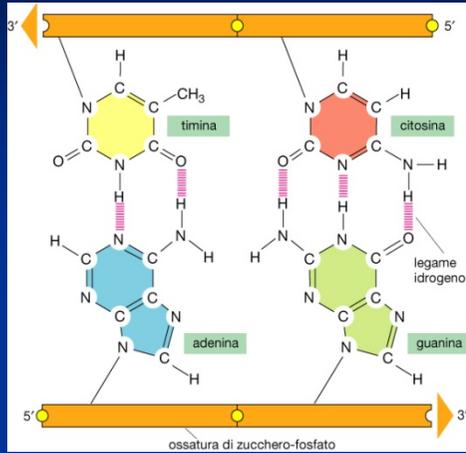
Studi di proliferazione cellulare mediante bromodesossiuridina (BrdU)



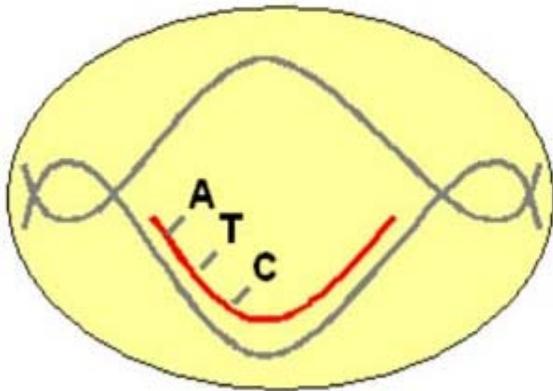
BrdU incorporation assay

Nel DNA l'accoppiamento tra le basi è sempre:

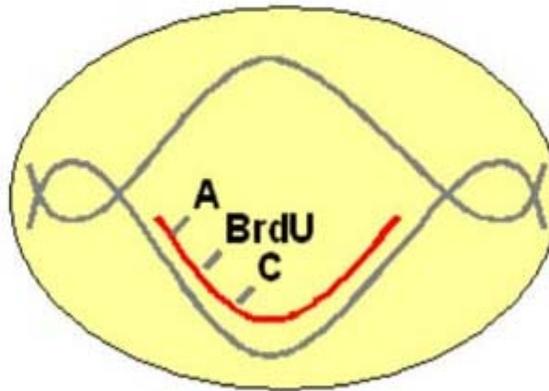
A con T e C con G



Nucleus in the S-phase



BrdU incorporation



BrdU detection

