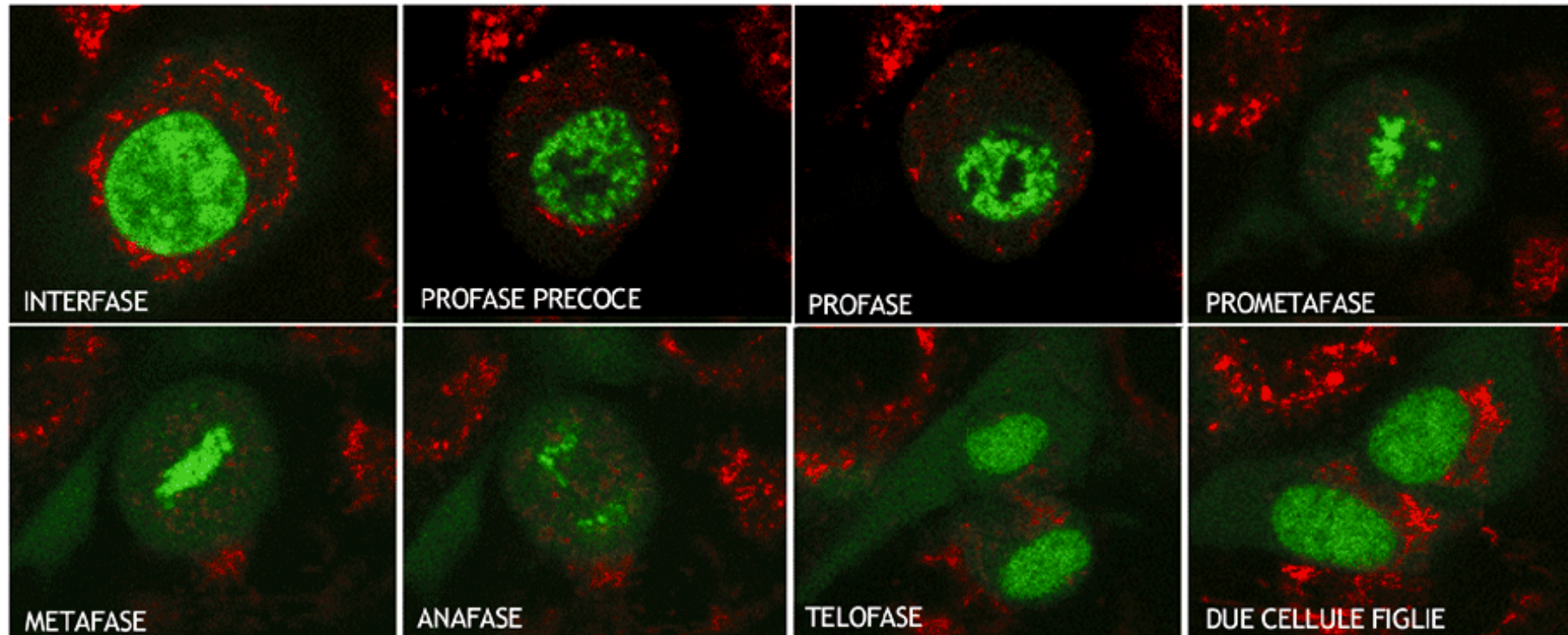


DIVISIONE E CICLO CELLULARE

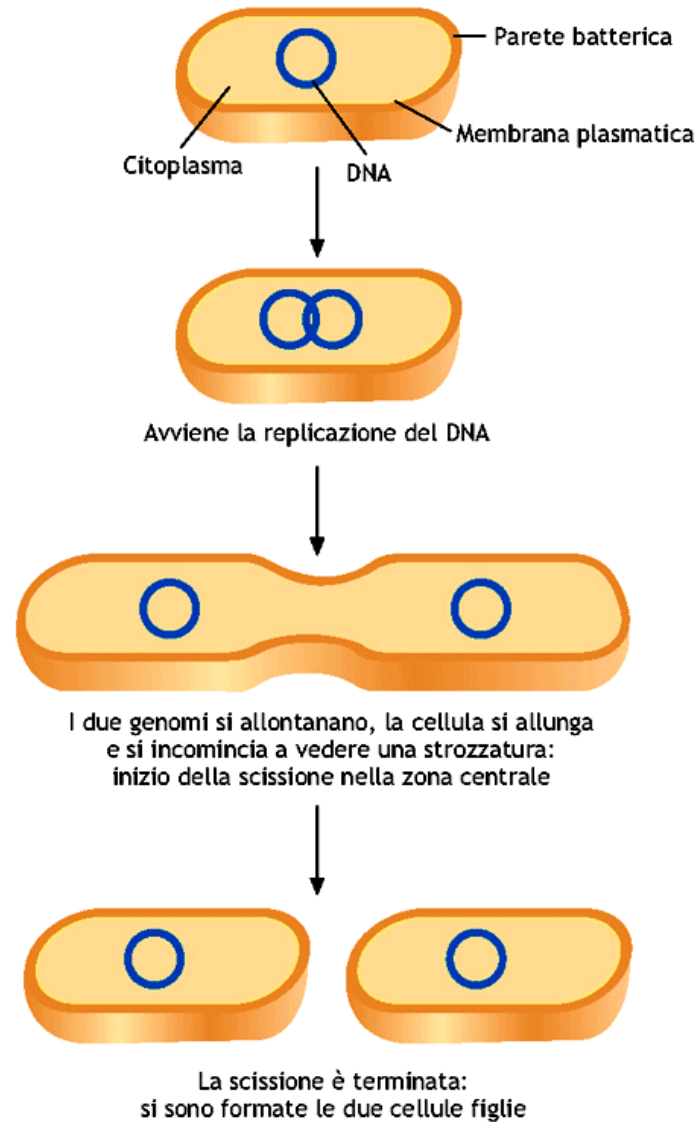


■ **Figura 7.23** **La microscopia confocale a fluorescenza.** La tecnica del time-lapse permette di registrare l'evoluzione di un fenomeno biologico dal vivo, acquisendo ad intervalli regolari immagini dello stesso campione lungo un certo numero di ore ed ottenendo così una sequenza relativamente fluida del fenomeno studiato. In questo caso le immagini rappresentano una cellula esprime la proteina istonica H1 fusa alla GFP (Green Fluorescent Protein), una proteina fluorescente della medusa *Aequorea victoria* che emette una fluorescenza verde se eccitata ad una particolare lunghezza d'onda. La fusione viene eseguita a livello dei cDNA generando un nuovo gene chimerico. Il gene è clonato in un vettore idoneo per l'espressione in cellule di mammifero ed introdotto all'interno delle cellule con la tecnica della microiniezione nucleare. Questa strategia permette di evidenziare indirettamente il DNA delle cellule (colore verde dell'istone che si lega al DNA). In rosso, invece sono evidenziati i mitocondri con un colorante cationico, la tetra-metil-rodamina (TMRM), che si accumula specificatamente in questi organelli attratta dal potenziale di membrana ed emette fluorescenza rossa se eccitata ad una particolare lunghezza d'onda. Le diverse fasi della mitosi sono indicate. Si osservano: il compattamento dei cromosomi in profase, l'allineamento dei cromosomi in piastra in metafase ed il loro trascinarsi verso i poli nell'anafase.

Divisione cellulare

La divisione cellulare è un processo che porta alla formazione di due o più cellule figlie a partire da una cellula genitore.

Nei procarioti la divisione cellulare avviene per scissione. E' un processo molto rapido- 30 minuti.



Divisione cellula eucariotica

Avviene:

1) per mitosi- cellule somatiche- dà origine a cellule diploidi

2) per meiosi- cellule linea germinale- da origine a cellule aploidi

Cromosomi omologhi e aploidia/ diploidia

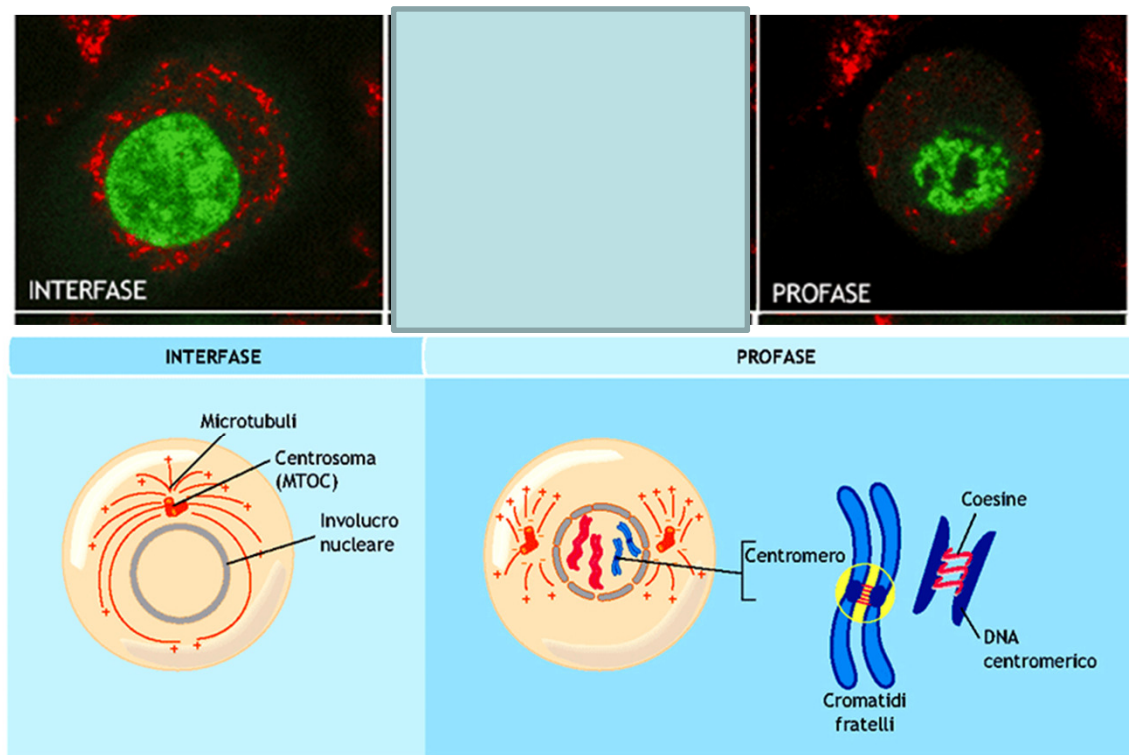
- **I CROMOSOMI OMOLOGHI** sono due copie di uno stesso cromosoma che portano gli stessi geni e sono di provenienza materna e paterna.

Ad esempio, il gene della catena beta dell'emoglobina nell'uomo si trova sul cromosoma 11, questo vuol dire che l'uomo ha due geni per la catena B dell'emoglobina, dato che avrà due cromosomi 11.

- Le cellule somatiche presentano quindi due corredi cromosomici e per questo sono dette diploidi. Spermatozoi e cellule uovo (gameti) che sono aploidi, cioè hanno un solo assetto cromosomico.
- Ogni individuo ha un numero fisso di cromosomi. Questo numero dipende dalla specie. Tutti gli esseri umani hanno **46 cromosomi in forma diploide (2n) e 23 in forma aploide (n)**.

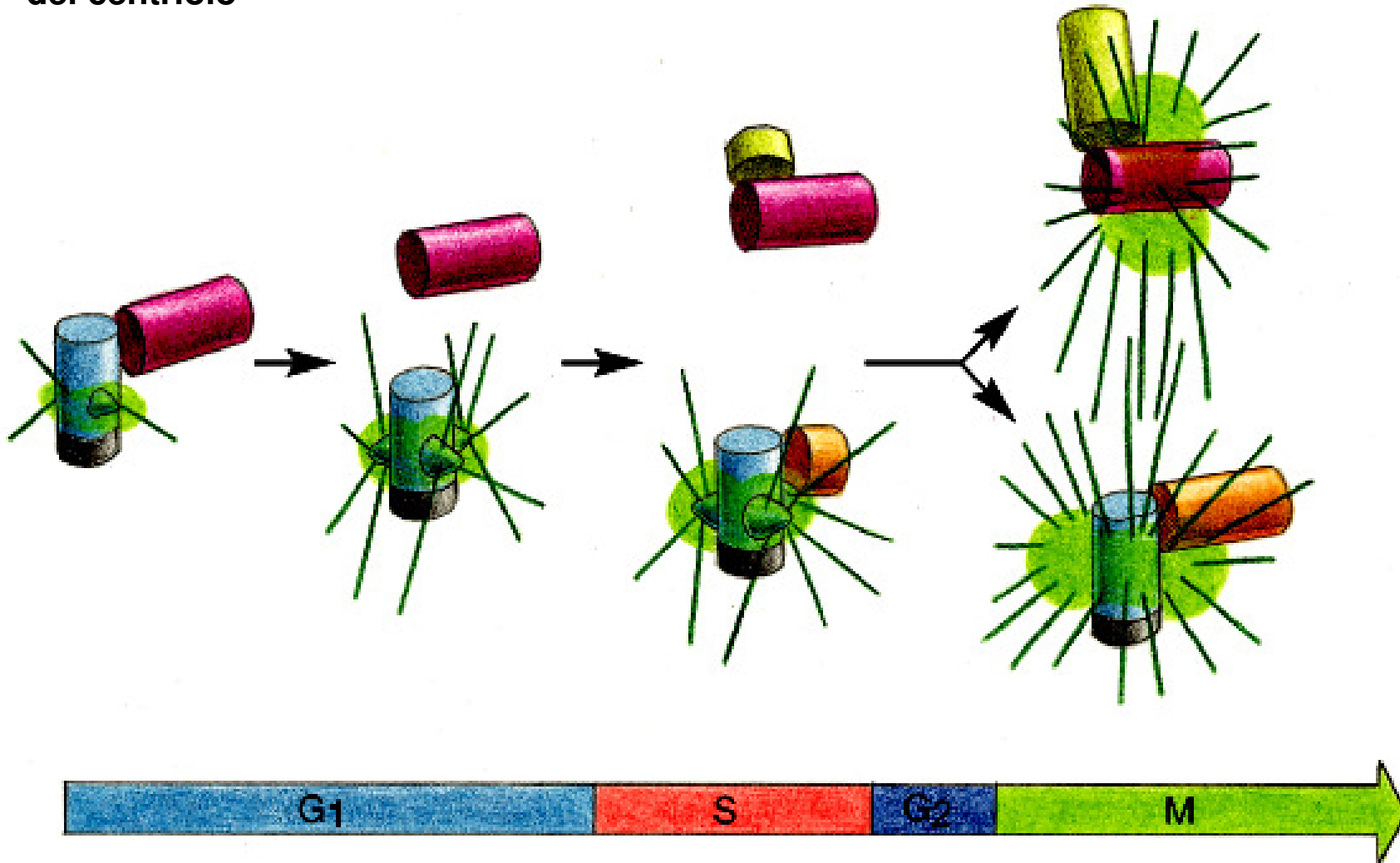
Fasi della mitosi: Profase

- Ogni cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli uniti a livello dei centromeri (tramite le **coesine**)
- Compattamento dei cromosomi attraverso la fosforilazione delle **condensine**
- La struttura del citoscheletro collassa, lamina nucleare e altri organelli si dissolvono
- I due centrosomi si separano per organizzare i due poli del fuso mitotico



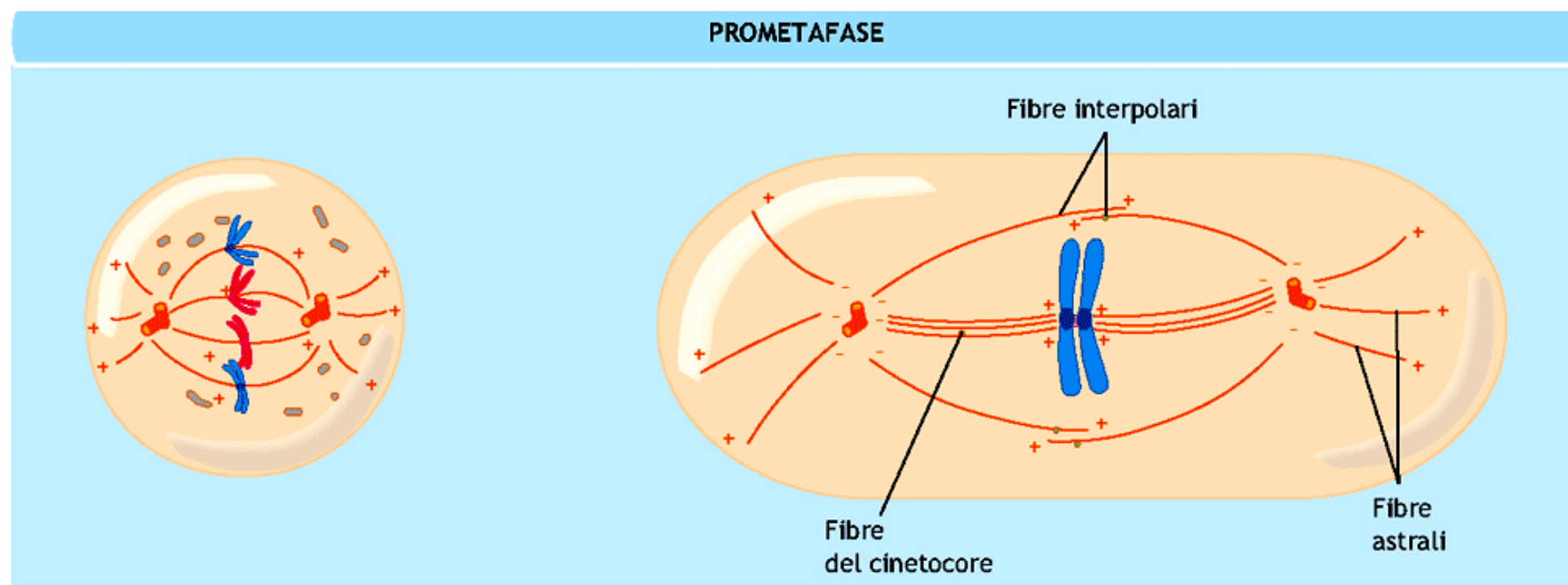
■ **Figura 7.24** Differenze tra una cellula in interfase ed una in profase nell'organizzazione dei cromosomi, dei centrioli, dei microtubuli e dell'involucro nucleare. Da ricordare la polarità dei microtubuli con la distribuzione ordinata delle estremità positive lontane dai centrioli. L'ingrandimento illustra l'interazione tra i cromatidi fratelli che si esplica a livello del centromero attraverso il coinvolgimento della coesina.

- Il fuso mitotico è formato da microtubuli a partire dal centrosoma
- Il centrosoma, formato da un paio di centrioli immersi in una matrice proteica
- Prima della mitosi, quando avviene la replicazione del DNA si ha anche la duplicazione del centriolo



Prometafase

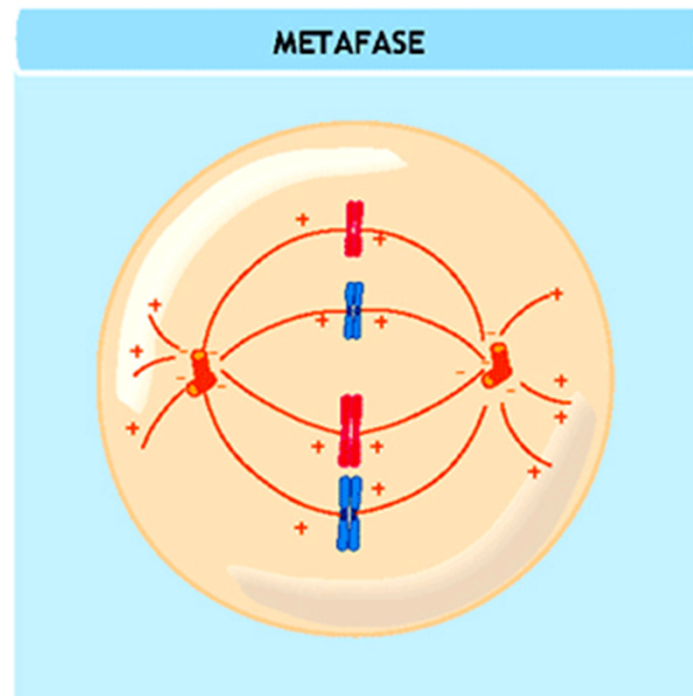
- Completata la frammentazione della membrana nucleare
- Viene evidenziato il fuso mitotico nelle sue componenti
- ✓ **Fibre astrali** che vanno dal polo verso il cortex **per allungamento del fuso** che viene trascinato verso la periferia
- ✓ **Fibre cinetocore** che si legano al cinetocore una placca proteica nel centromero per separare i cromosomi
- ✓ **Fibre interpolari** che partono dai poli e si sovrappongono all'equatore
- ✓ portano ad allungamento del fuso **per allontanare i cromosomi**



■ **Figura 7.25** Cambiamenti nell'organizzazione dei cromosomi e dei microtubuli nella cellula in prometafase. Viene evidenziato il fuso mitotico nelle sue diverse componenti. Dai poli del fuso, formati dai due centrioli si dipartono: le fibre del cinetocore, che entrano in contatto con i cromosomi a livello dei centromeri, le fibre astrali, che mediano i rapporti con il cortex cellulare, e le fibre interpolari, che stabiliscono contatti con i microtubuli provenienti dal polo opposto del fuso.

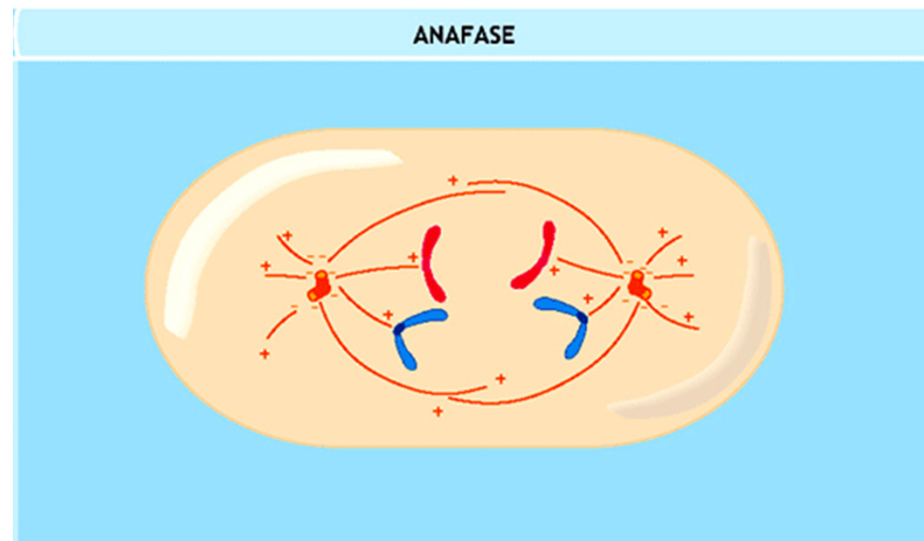
Metafase

- I cromosomi sono allineati in posizione mediana rispetto ai due poli del fuso a formare **la piastra metafasica**
- In questa fase i cromatidi fratelli sono ancora tenuti insieme dalle coesine mentre le fibre del fuso tendono a separarli
- **Attivo il checkpoint che assicura che il fuso sia pronto e che tutti i cromosomi siano sul fuso**
- Se tutto è in regola viene attivata una proteina chiamata Anaphase Promoting Complex (APC) e si passa all'anafase



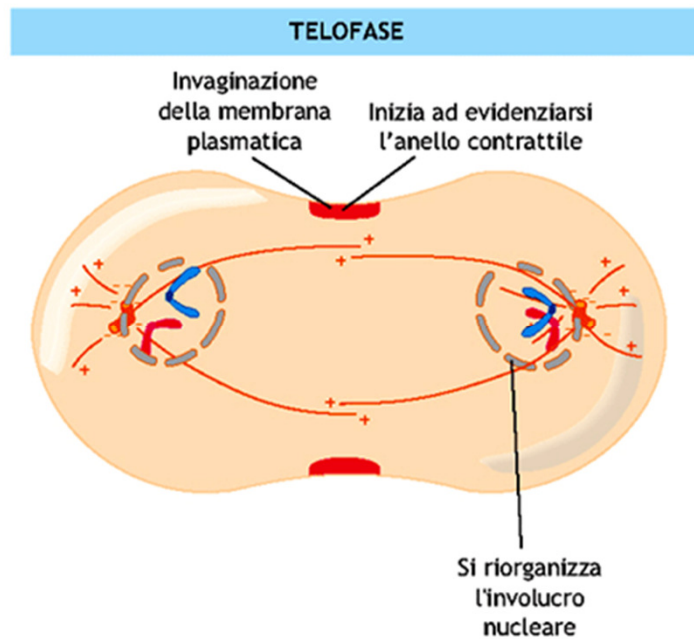
Anafase

- Anaphase Promoting Complex: induce la degradazione delle coesine
- I cromatidi fratelli si separano e migrano verso le estremità del polo



Telofase

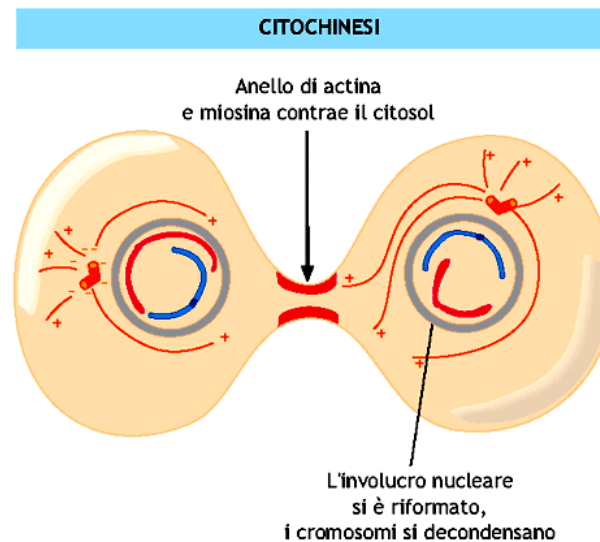
- Ogni cromatidio fratello si è portato alle due opposte regioni della cellula
- Si riforma la membrana nucleare con i pori nucleari
- Gli organelli si riorganizzano nella struttura interfascica
- I cromosomi gradualmente si decondensano
- Inizia ad invaginarsi la membrana plasmatica



■ **Figura 7.30** Cambiamenti della distribuzione dei cromosomi in telofase. Presso un'invaginazione della membrana plasmatica, nella zona equatoriale, si incomincia ad organizzare l'anello contrattile.

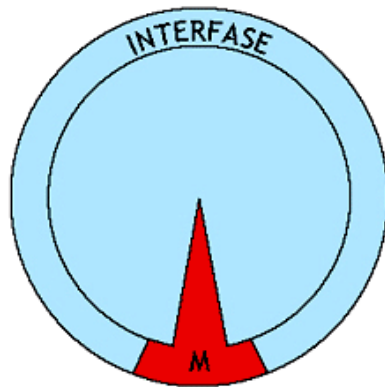
Citochinesi

- Il solco che si è iniziato a formare durante la telofase continua ad invaginarsi perpendicolarmente all'asse che separa i due poli del fuso
- Il sistema dei microfilamenti (actina e miosina) formerà un anello contrattile che causerà la contrazione del citoplasma e la separazione in due della cellula

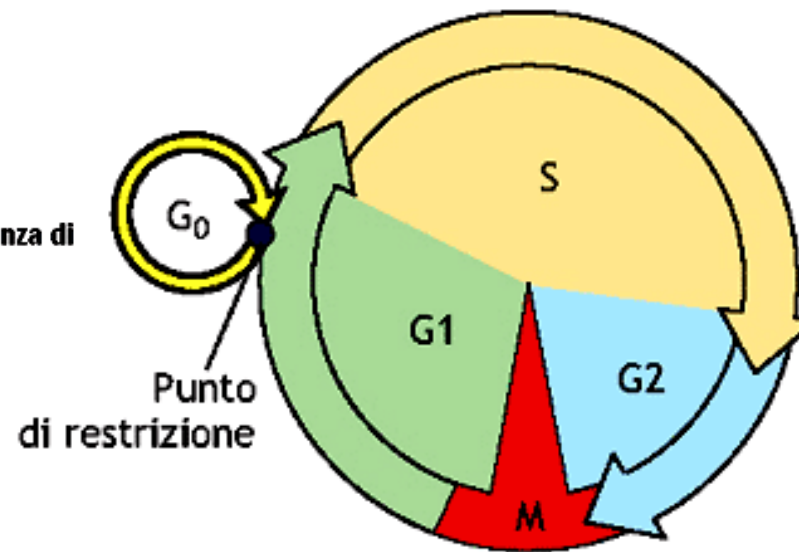


■ **Figura 7.31** Nella citochinesi l'azione continua dell'anello contrattile provoca la separazione in due del citoplasma che fissa la formazione di due nuove cellule. Attorno ai due poli del fuso, dove sono giunti al termine della loro corsa i cromosomi, si riorganizza l'involucro nucleare.

Ciclo cellulare è un'alternanza di mitosi e interfase



■ **Figura 7.2** Il ciclo cellulare rappresentato come un'alternanza di mitosi ed interfase.



■ **Figura 7.3** Le diverse fasi del ciclo cellulare. Alla fase G₁ segue la fase S di sintesi del DNA, alla quale succede la fase G₂. Il ciclo termina con la mitosi e la separazione in due della cellula (citodieresi). Il punto di restrizione in G₁ o START, nel lievito, è un momento decisionale molto importante prima del quale la cellula "sceglie" se dividersi ed entrare in fase S oppure se uscire dal ciclo per entrare in uno stato di non proliferazione denominato fase G₀ del ciclo cellulare o quiescenza.

La cellula eucariotica e ciclo cellulare

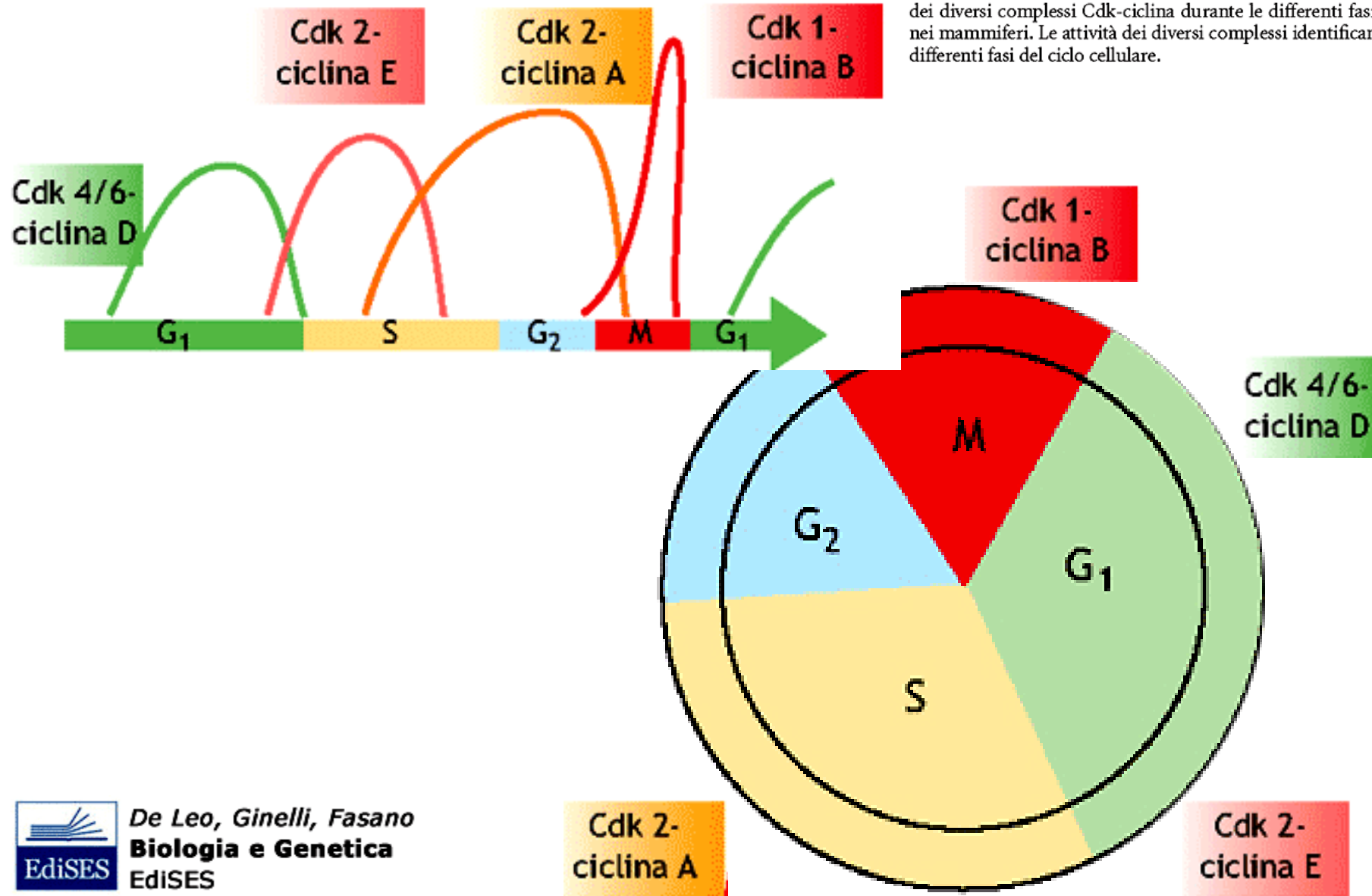
•La cellula eucariotica si divide secondo una sequenza di eventi **ordinata** che termina con la mitosi. Tale sequenza è definita **ciclo cellulare**.

La durata del ciclo varia tra i vari tipi cellulari

- fibroblasti 24 ore
- fasi iniziali sviluppo embrionale poche ore
- cellule che non si dividono mai (muscolari)
- cellule che eventualmente riprendono a dividersi (cellule epatiche)
- cellule che si dividono continuamente in tessuti che si rinnovano come epidermide, epitelio intestinale, endotelio.

Ogni fase del ciclo cellulare necessita un complesso ciclina/Cdk:
le cicline servono ad attivare le Cdk (cyclin dependent kinase)

■ **Figura 7.16** Espressione delle diverse cicline durante le diverse fasi del ciclo cellulare. Le linee colorate indicano l'attività chinasi dei diversi complessi Cdk-ciclina durante le differenti fasi del ciclo nei mammiferi. Le attività dei diversi complessi identificano bene le differenti fasi del ciclo cellulare.



Esempi di fosforilazioni durante il ciclo cellulare

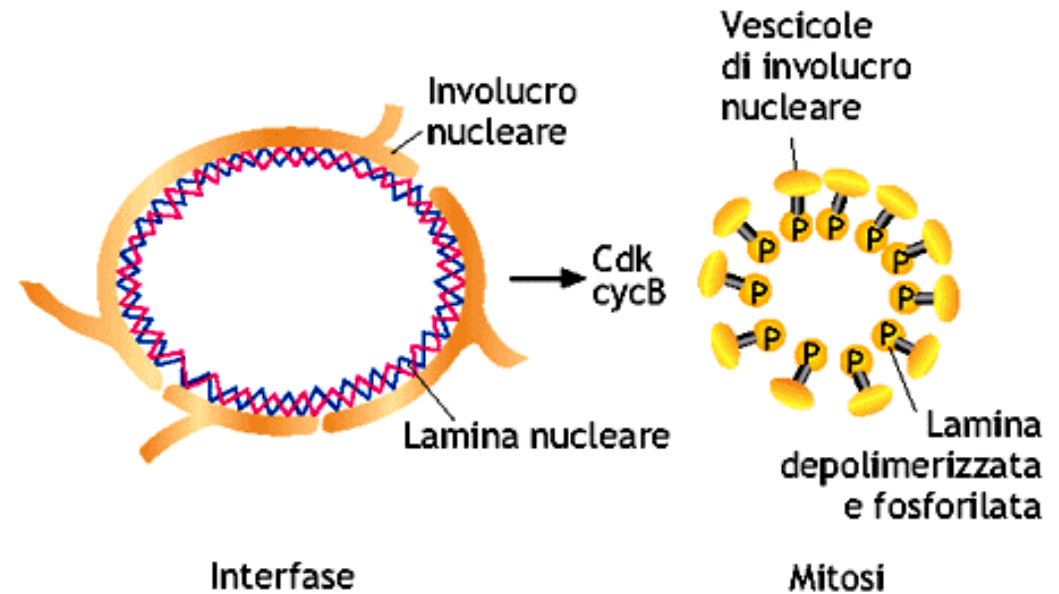
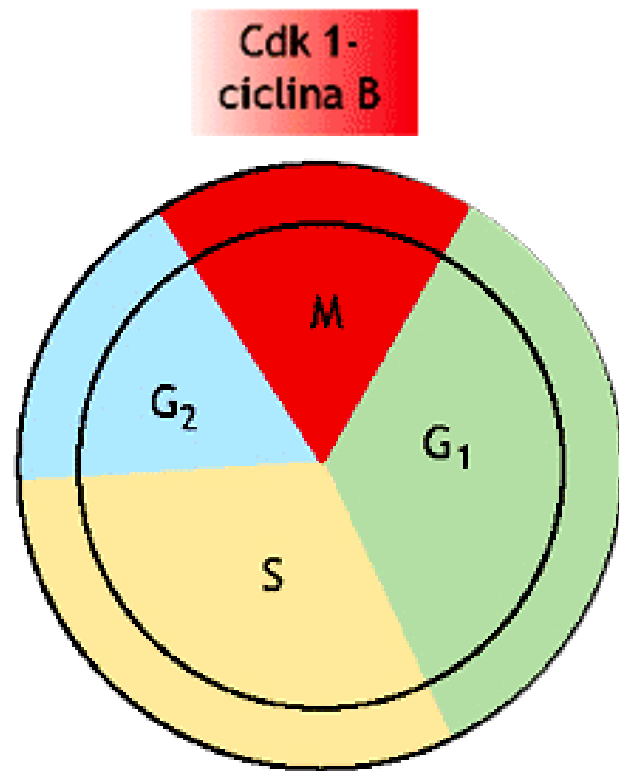


Figura 7.15 Fosforilazione, mediata da Cdk, della lamina nucleare in mitosi e conseguente vescicolazione della stessa membrana.

condensazione della cromatina

fosforilazione dell'istone H1

demolizione dell'involucro nucleare

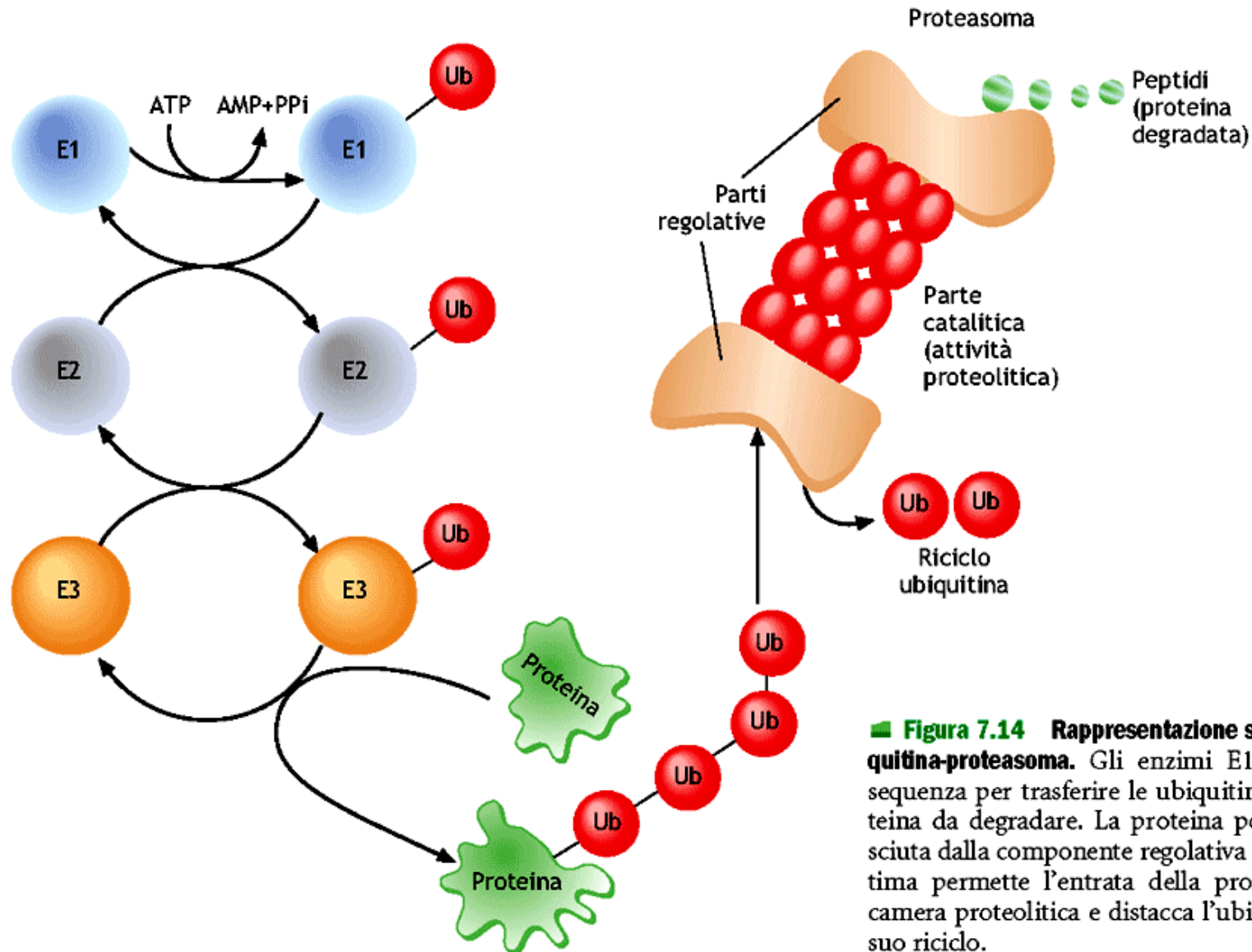
fosforilazione delle lamine

frammentazione di Golgi e RE

formazione del fuso

instabilità dei microtubuli

Per consentire il passaggio da una fase all'altra le cicline vengono degradate dal proteasoma in seguito all'aggiunta di una proteina chiamata ubiquitina



■ **Figura 7.14** Rappresentazione schematica del sistema ubiquitina-proteasoma. Gli enzimi E1, E2 ed E3 agiscono in sequenza per trasferire le ubiquitine sulle lisine di una proteina da degradare. La proteina poli-ubiquitinata è riconosciuta dalla componente regolativa del proteasoma. Quest'ultima permette l'entrata della proteina da degradare nella camera proteolitica e distacca l'ubiquitina garantendo così il suo riciclo.

Come viene regolato l'ingresso nel ciclo cellulare?
I fattori di crescita (specifici per ogni tipo cellulare, come VEGF; EGF; FGF) inducono la sintesi della ciclina D

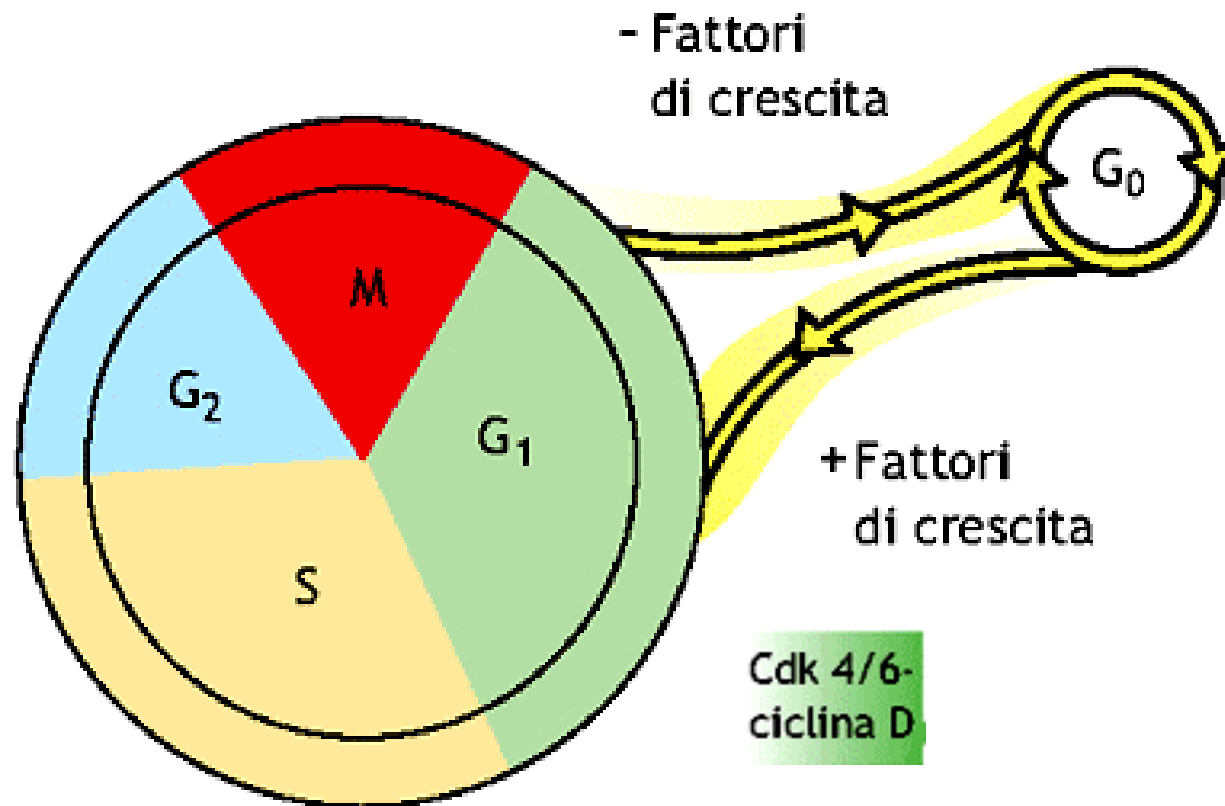


Figura 7.18 L'assenza di fattori di crescita provoca l'uscita dal ciclo cellulare e l'entrata nella fase G₀.

Complesso ciclina D/Cdk 4/6 inattiva (mediante fosforilazione) la proteina Rb e consente il passaggio alla fase S

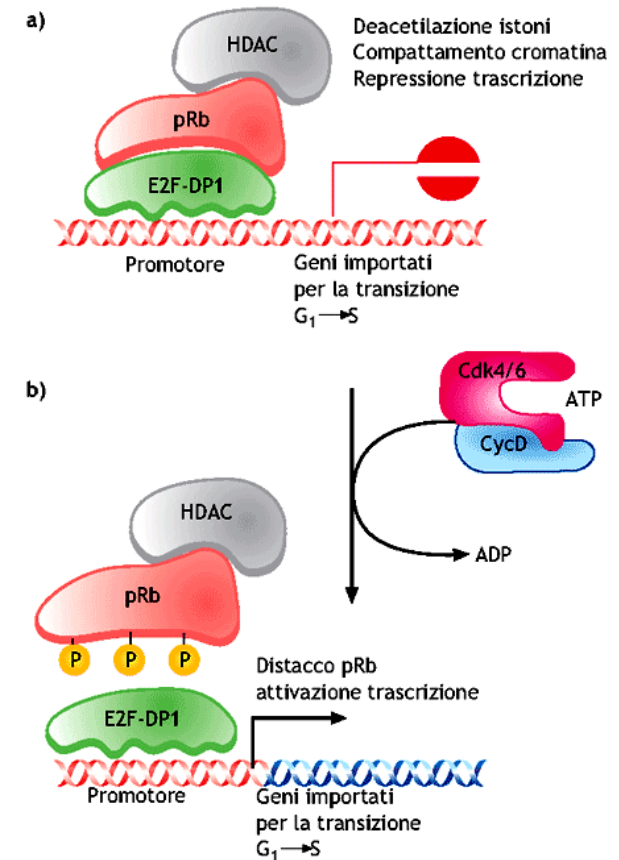
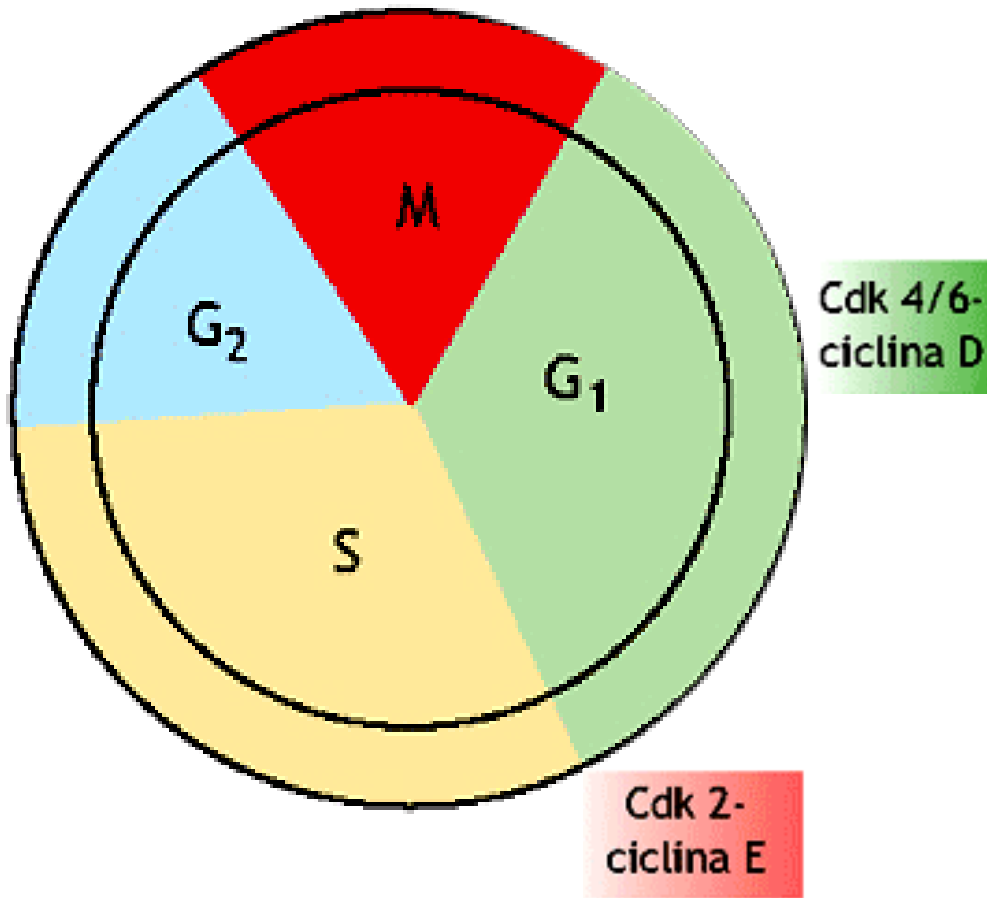


Figura 7.17 Fattore di trascrizione E2F e progressione G₁ → S. In assenza di segnali che promuovono la proliferazione cellulare, quali ad esempio fattori di crescita, pRb non è fosforilata dai complessi ciclina-cdk e può legare il fattore di trascrizione E2F-DP1. **(a)** In questo modo pRb posiziona sui promotori legati da E2F-DP1 enzimi modificatori della cromatina quali le HDAC che causano la repressione della trascrizione a causa del compattamento locale della cromatina. Questa condizione appena descritta è quella di una cellula nella fase G₀ del ciclo cellulare. **(b)** Segnali che portano all'attivazione del complesso Cdk-ciclina innescano la fosforilazione di pRb ed il suo distacco da E2F-DP1. In questo modo la cromatina è meno compatta e l'RNA polimerasi può iniziare a trascrivere i geni sotto il controllo di E2F.

Checkpoints del ciclo cellulare: blocco della progressione del ciclo nel caso di eventi come:

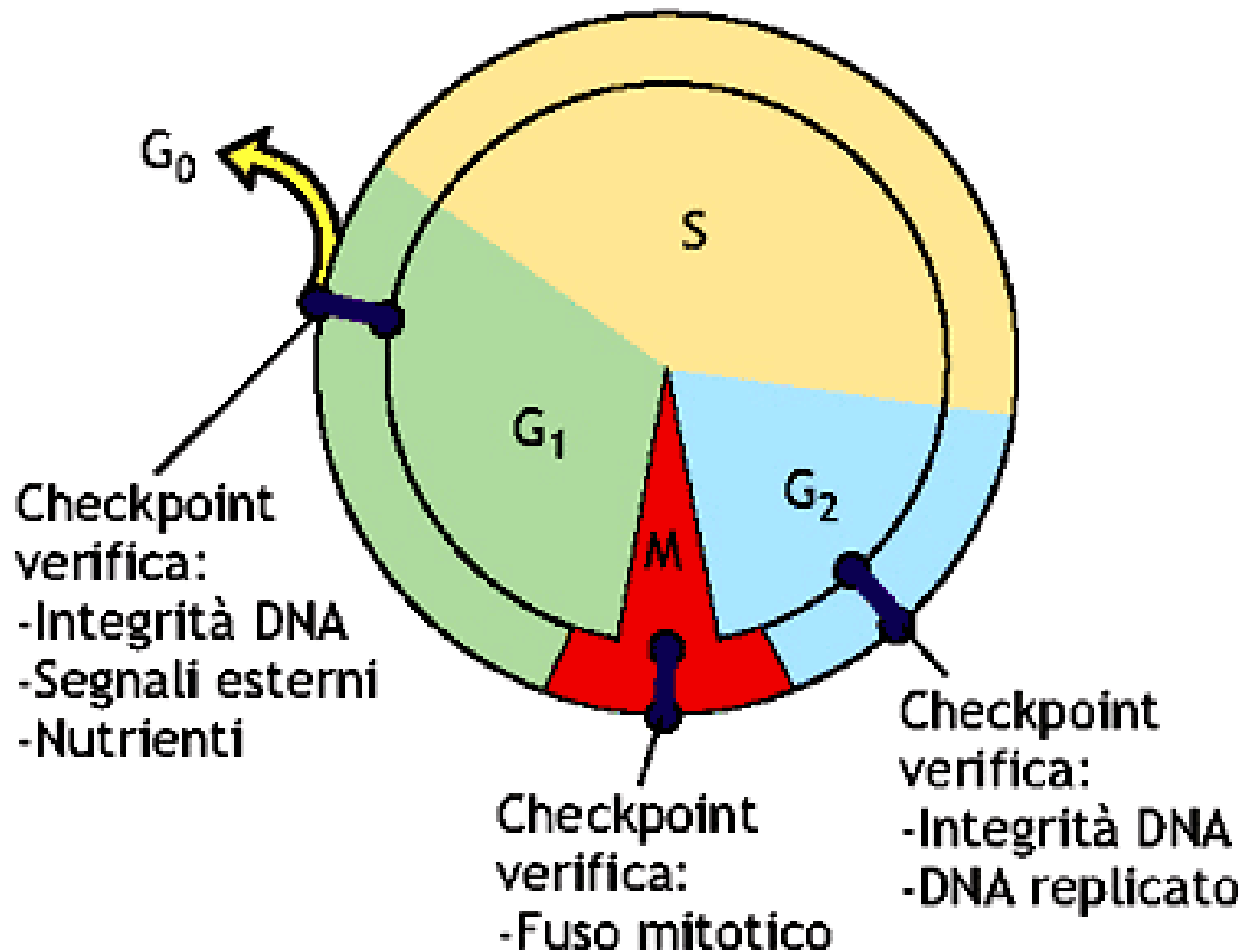
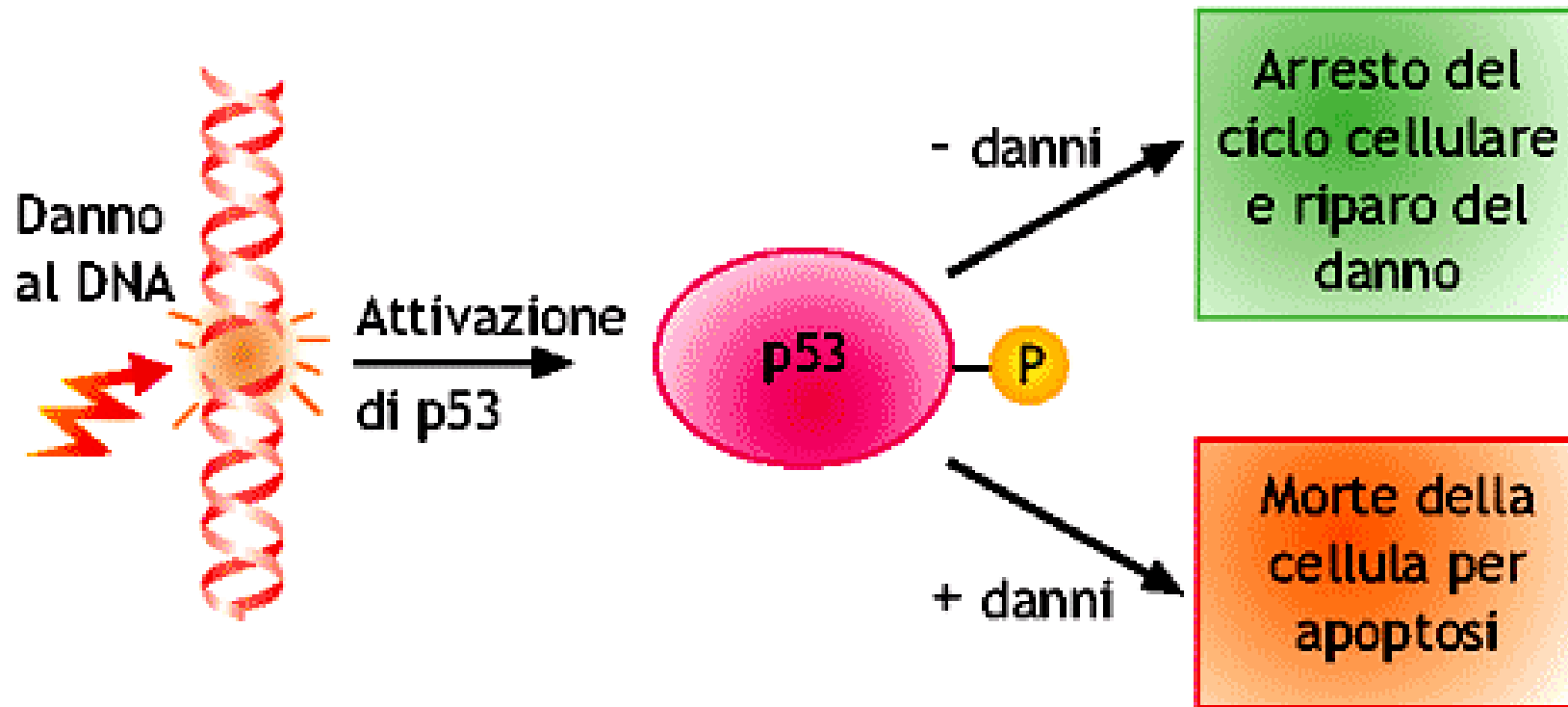
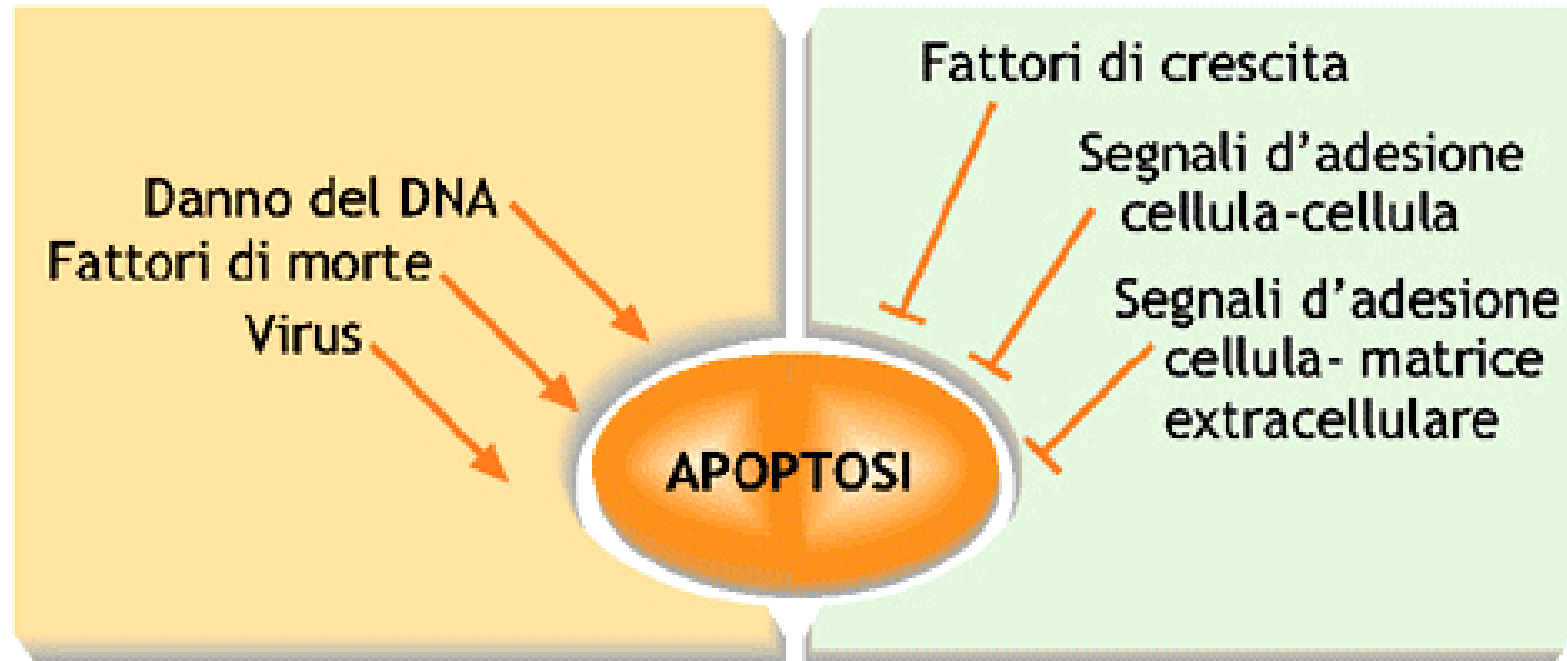


Figura 7.7 I diversi checkpoint (punti di controllo) che agiscono durante il ciclo cellulare.

Blocco del ciclo cellulare nel caso di danni al DNA: la proteina p53



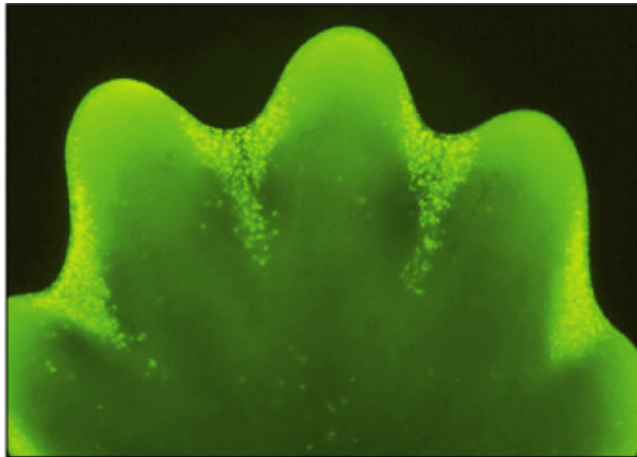
Apoptosi è una morte cellulare programmata



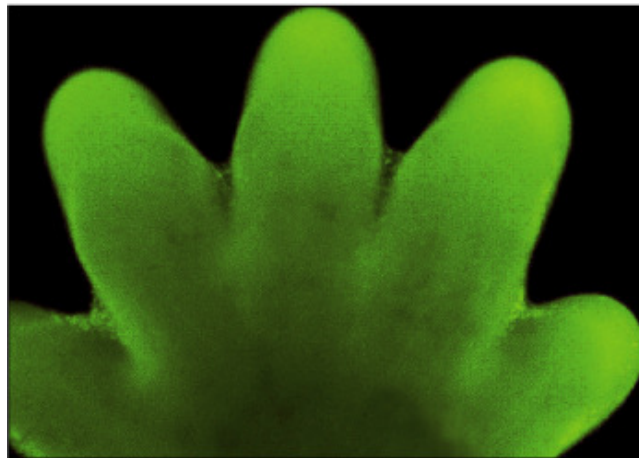
■ **Figura 7.39** I segnali che inducono e che reprimono l'apoptosi.

L'apoptosi svolge un ruolo importante durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto nell'omeostasi tissutale

La scultura delle dita durante lo sviluppo della zampa del topo per apoptosi



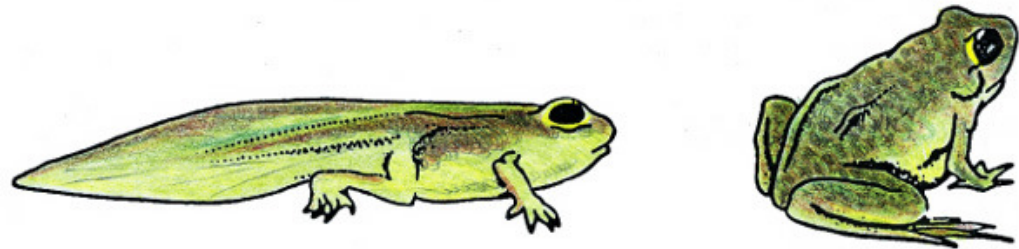
(A)



(B)

1 mm

Apoptosi durante la metamorfosi di un girino in una rana



In altri casi la morte cellulare aiuta a regolare il numero delle cellule.

Nel sistema nervoso in sviluppo, per esempio la morte cellulare adatta il numero di cellule nervose in modo che corrisponda al numero di cellule bersaglio che richiedono innervazione.

Nei tessuti adulti, la morte cellulare bilancia esattamente la divisione cellulare. Se non fosse così, il tessuto crescerebbe o si restringerebbe.

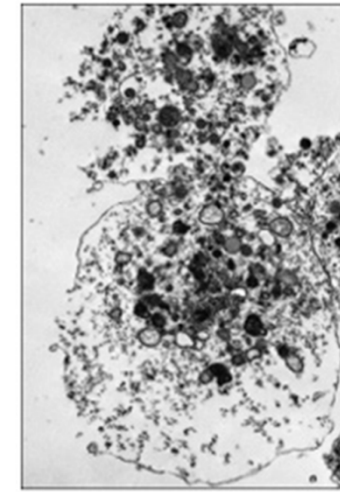
Necrosi vs Apoptosi

Le cellule che muoiono come risultato di un danno acuto tipicamente si rigonfiano e scoppiano, versando il loro contenuto su tutte le cellule vicine – un processo chiamato necrosi cellulare – provocando una risposta infiammatoria potenzialmente dannosa.

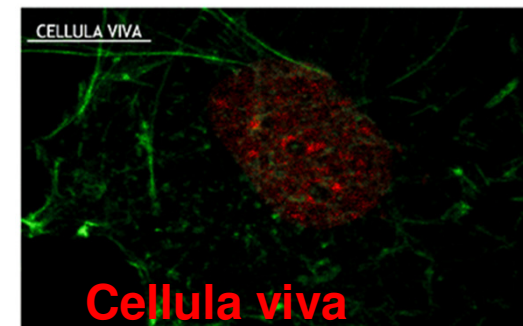
Una cellula che subisce l'apoptosi invece muore "pulitamente", senza danneggiare i suoi vicini.

- *La cellula si raggrinzisce e si condensa*
- *Il citoscheletro collassa*
- *Il DNA nucleare si rompe in frammenti e i nuclei si riducono di dimensioni e si frammentano*
- *la superficie cellulare si altera, mostrando proprietà che causano la rapida fagocitosi della cellula morente da parte di un macrofago, prima che ci sia una perdita del suo contenuto.*

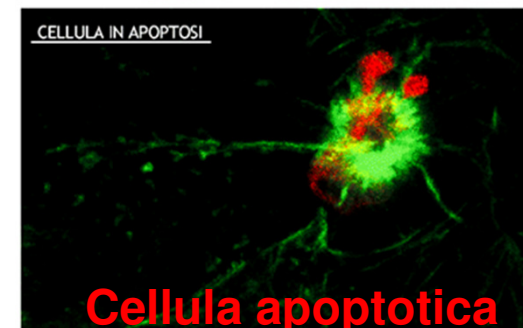
Ciò non soltanto evita le conseguenze dannose della necrosi cellulare ma permette anche il riciclaggio dei componenti organici della cellula morta da parte della cellula che la ingerisce.



(A) **Cellula necrotica**



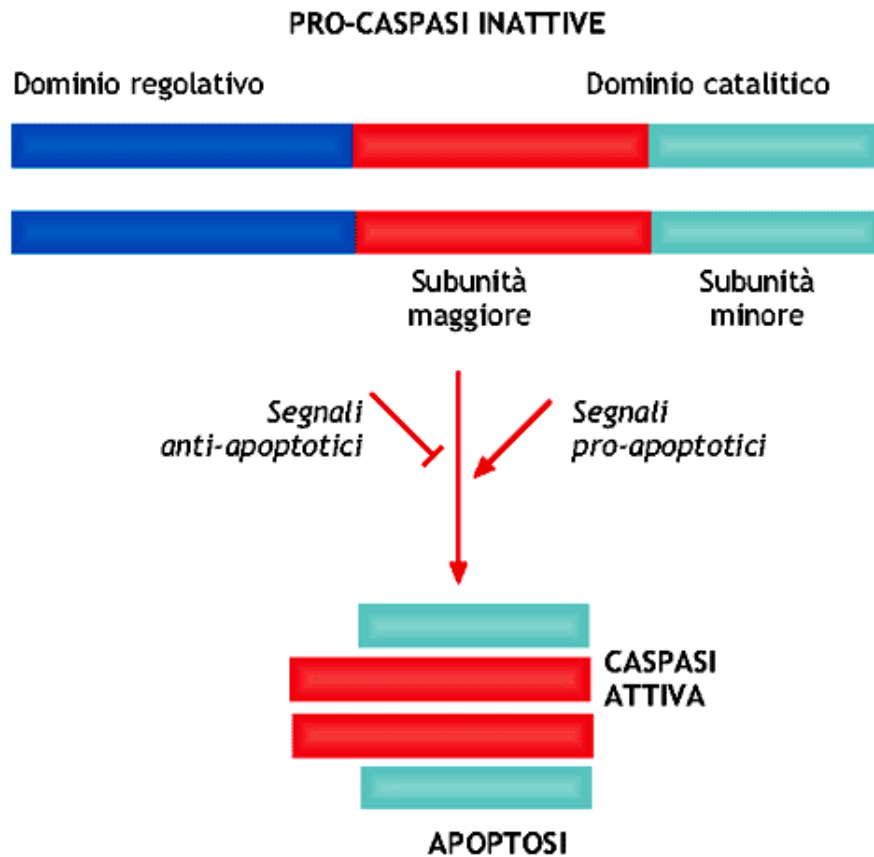
Cellula viva



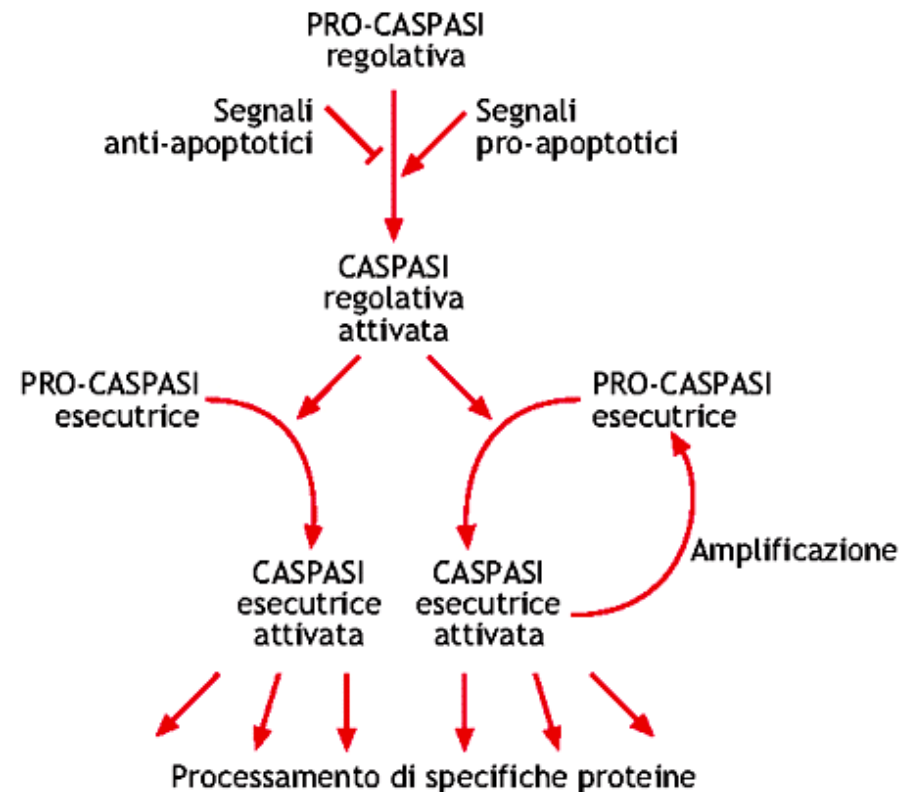
Cellula apoptotica

■ **Figura 7.38** Fluorescenza al microscopio confocale di una cellula in apoptosi. In rosso sono colorati i nuclei ed in verde il citoscheletro di actina. Da notare la frammentazione del nucleo e la compattazione del citoplasma nella cellula apoptotica.

L'apoptosi è eseguita da proteasi chiamate caspasi



■ **Figura 7.41 Le caspasi.** Durante l'apoptosi queste cistein-proteasi vengono attivate mediante processamento proteolitico. La forma attiva dell'enzima è formata da un tetramero.



■ **Figura 7.42 La cascata proteolitica delle caspasi.** Un segnale apoptotico attiva la caspasi regolativa la quale processa le caspasi esecutrici in un sistema di amplificazione a cascata. Le caspasi esecutrici processano specifiche proteine cellulari innescando così i cambiamenti morfologici tipici dell'apoptosi.

Via estrinseca che coinvolge il recettore Fas presente sulla membrana della cellula: interviene nell'apoptosi di cellule infettate da virus

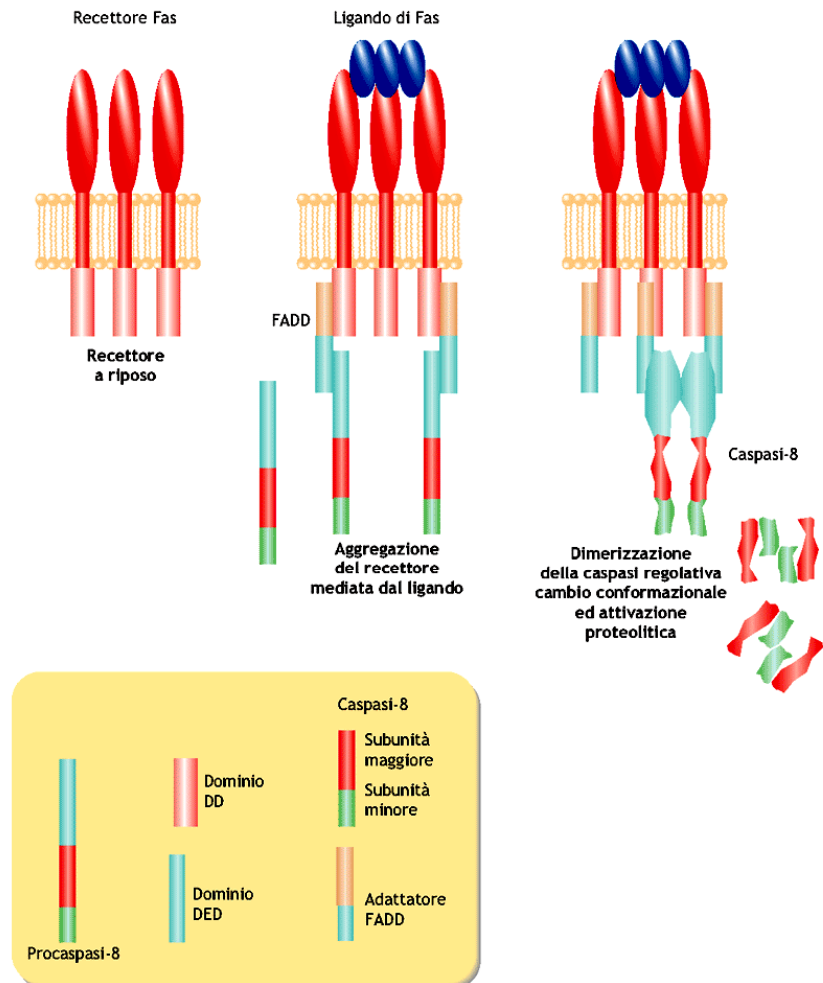
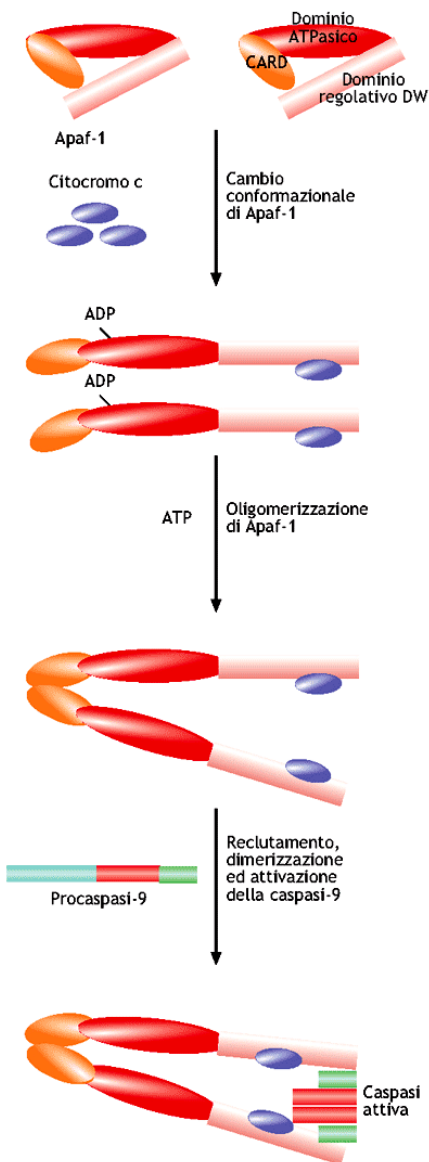
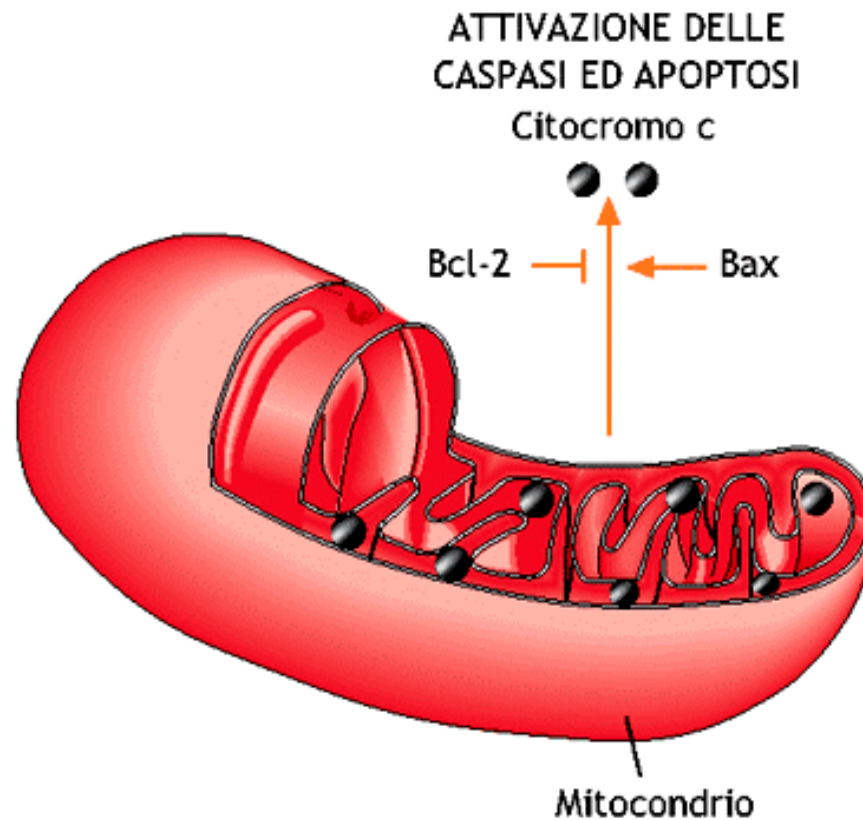


Figura 7.43 Attivazione della caspasi-8 mediata dall'interazione del FasL (ligando) con il FasR (recettore). FasL induce l'aggregazione del recettore, successivamente la proteina FADD si lega al dominio di morte del recettore mediando, a sua volta, il reclutamento del proenzima caspasi-8 presso il recettore, grazie all'interazione tra i due domini DED. L'avvicinamento di più procaspasi-8 stimola la dimerizzazione di due pro-enzimi con il conseguente cambio conformazionale richiesto per l'innescio dell'attività proteolitica. Il complesso proteico che controlla l'attivazione di caspasi-8 è denominato DISC. Caspasi-8 può essere rilasciata dopo processamento proteolitico dal DISC e processare i suoi substrati tra i quali la caspasi esecutrice caspasi-3 e la proteina BH3-only Bid.



■ **Figura 7.44** Attivazione della caspasi-9 dopo il rilascio del citocromo c dal mitocondrio. Il citocromo c legandosi ad Apaf-1, al dominio DW, così chiamato per la presenza di molti residui di aspartico (D) e triptofano (W), ne determina un cambiamento conformazionale, che provoca l'esposizione del dominio CARD. A questo punto Apaf-1 è disponibile per il processo di oligomerizzazione (interazione tra sette molecole di Apaf-1). Questo processo necessita di energia che deriva dall'idrolisi di ATP da parte di Apaf-1. Quando il dominio CARD di Apaf-1 è disponibile, è possibile l'interazione con il dominio CARD della caspasi-9, ciò promuove la dimerizzazione della caspasi-9 e la sua attivazione. La caspasi-9 attivata processa le caspasi esecutrici 3 e 7.

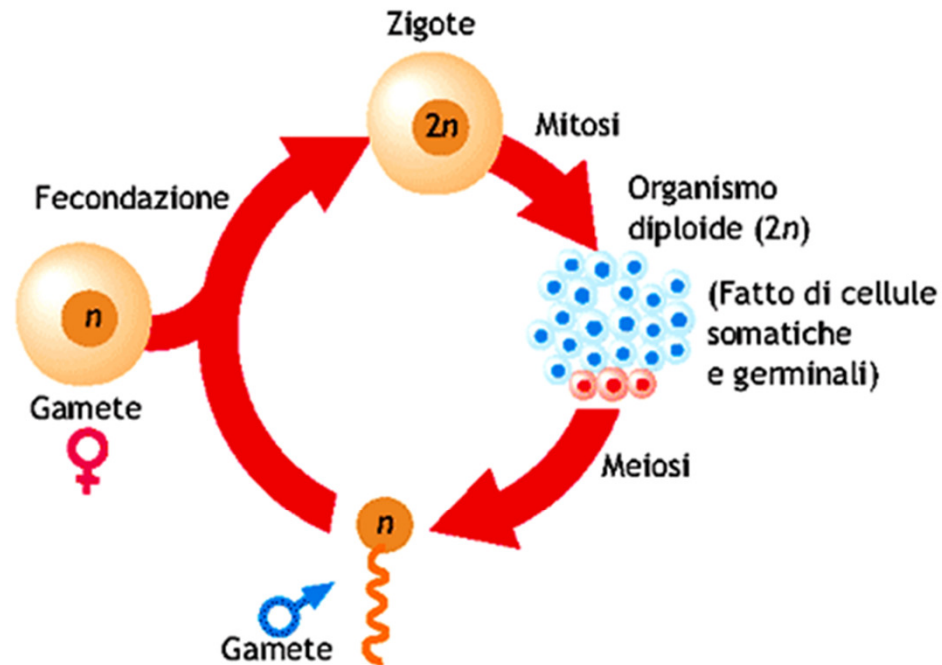
Via intrinseca che coinvolge il mitocondrio: causata da mancanza di nutrienti o danno esteso al DNA.



■ **Figura 7.45** Controllo della fuoriuscita del citocromo c dal mitocondrio da parte delle proteine della famiglia di Bcl-2. Bcl-2 anti-apoptotica, che contiene tutti e 4 i domini BH, blocca la fuoriuscita del citocromo c dal mitocondrio; al contrario, Bax pro-apoptotica, caratterizzata dalla presenza dei domini BH1, 2 e 3, ne facilita l'uscita.

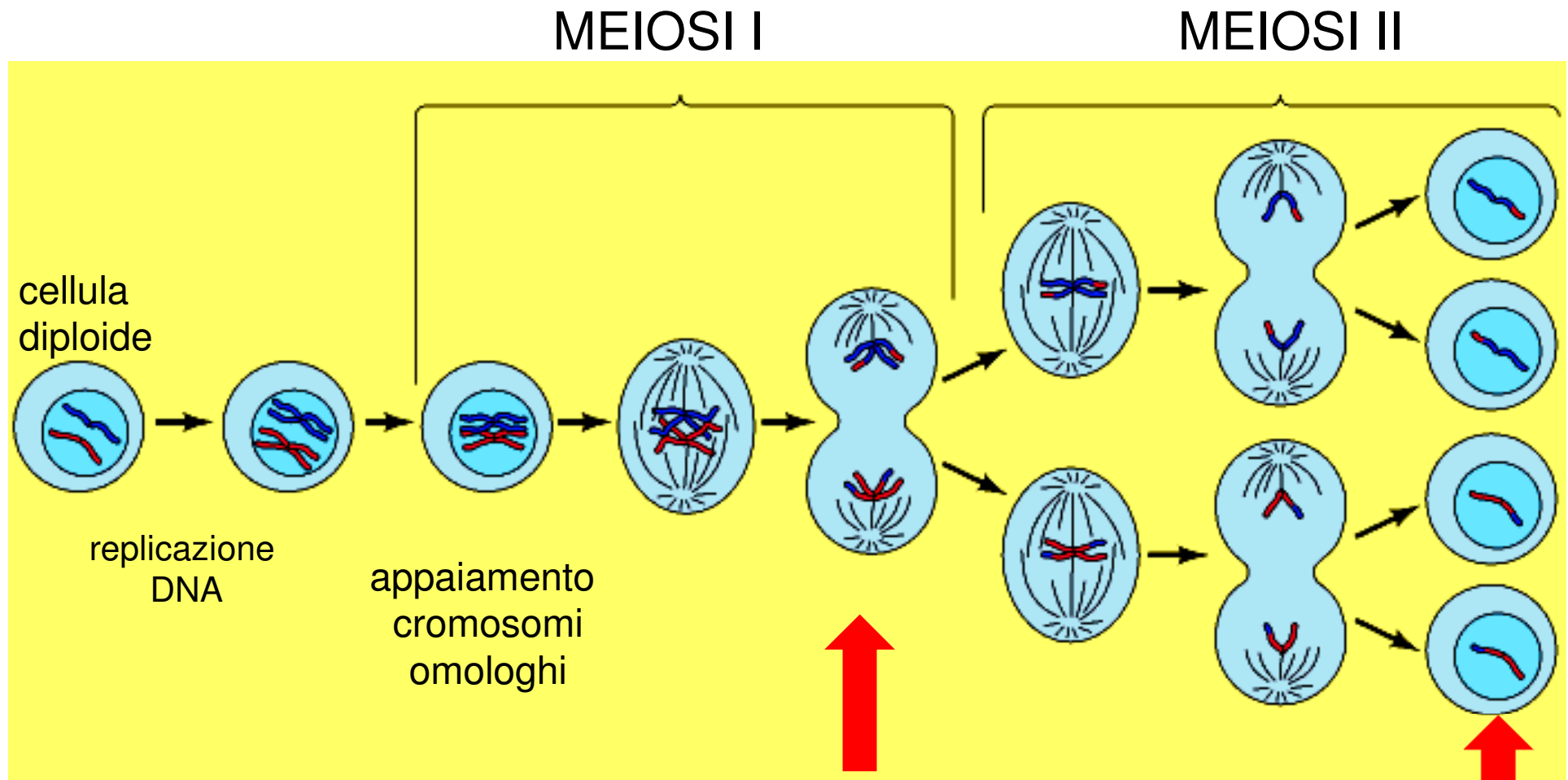
Divisione cellula eucariotica

Avviene **per meiosi** nella cellule della linea germinale, che daranno origine ai gameti e destinate a unirsi nel processo della fecondazione per dare origine a un nuovo individuo). La meiosi dà origine quattro cellule figlie **aploidi** che derivano da una cellula **diploide**



■ **Figura 7.32** La meiosi negli organismi pluricellulari svolge il suo ruolo alla fine del differenziamento delle cellule germinali per produrre i gameti (maschili o femminili) caratterizzati da un genoma aploide (n). Con la fecondazione, l'unione del gamete maschile con il gamete femminile ristabilisce una cellula (lo zigote) con un genoma diploide ($2n$). Scopo della meiosi è dimezzare il corredo cromosomico e generare variabilità genetica. Le cellule somatiche, invece, mantengono sempre un genoma diploide e si dividono per mitosi.

La meiosi è caratterizzata da due divisioni cellulari precedute da una sola duplicazione del DNA

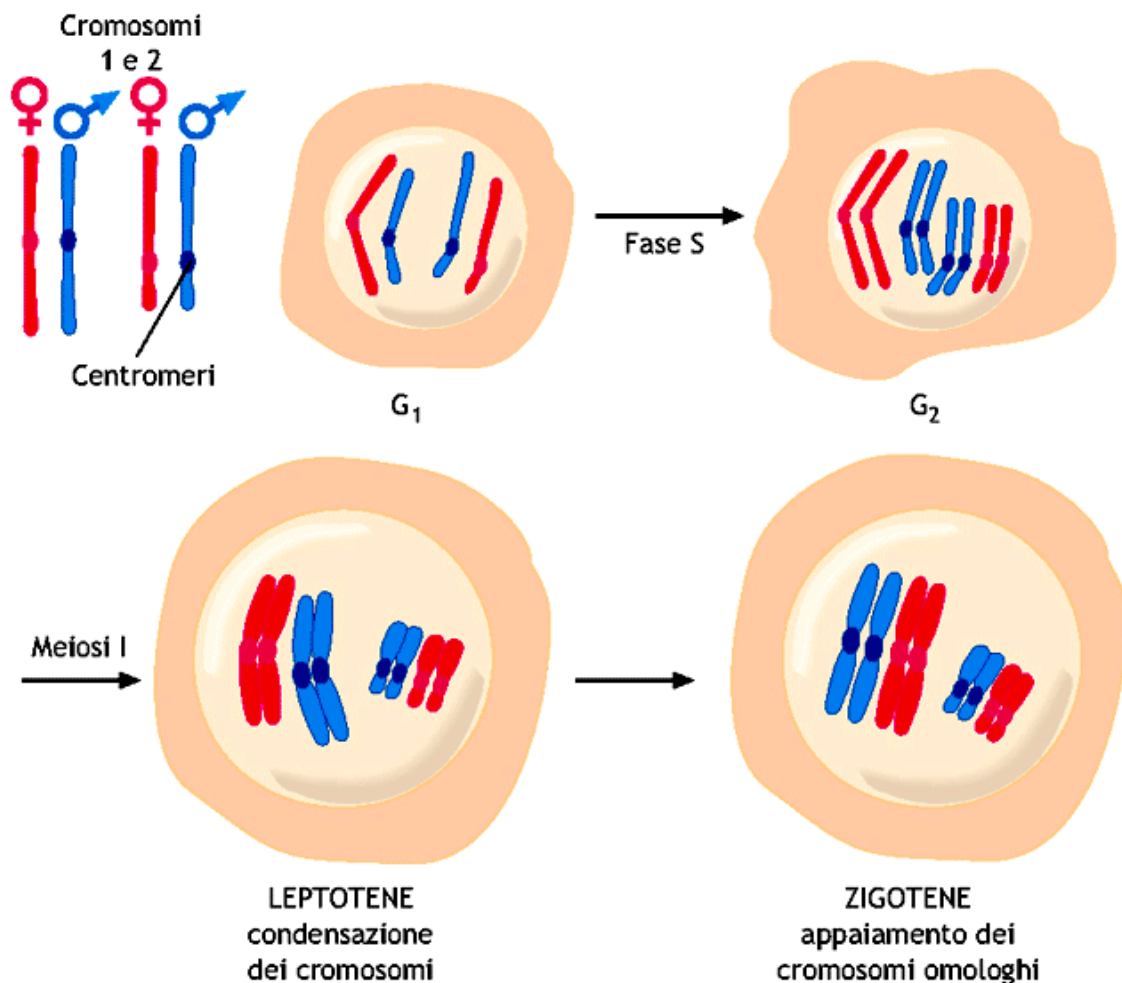


Meiosi 1:
2 cellule con metà del numero di cromosomi ma stessa quantità di DNA della cellula madre

Meiosi 2:
4 cellule con metà del numero di cromosomi e metà del DNA della cellula madre aploidi

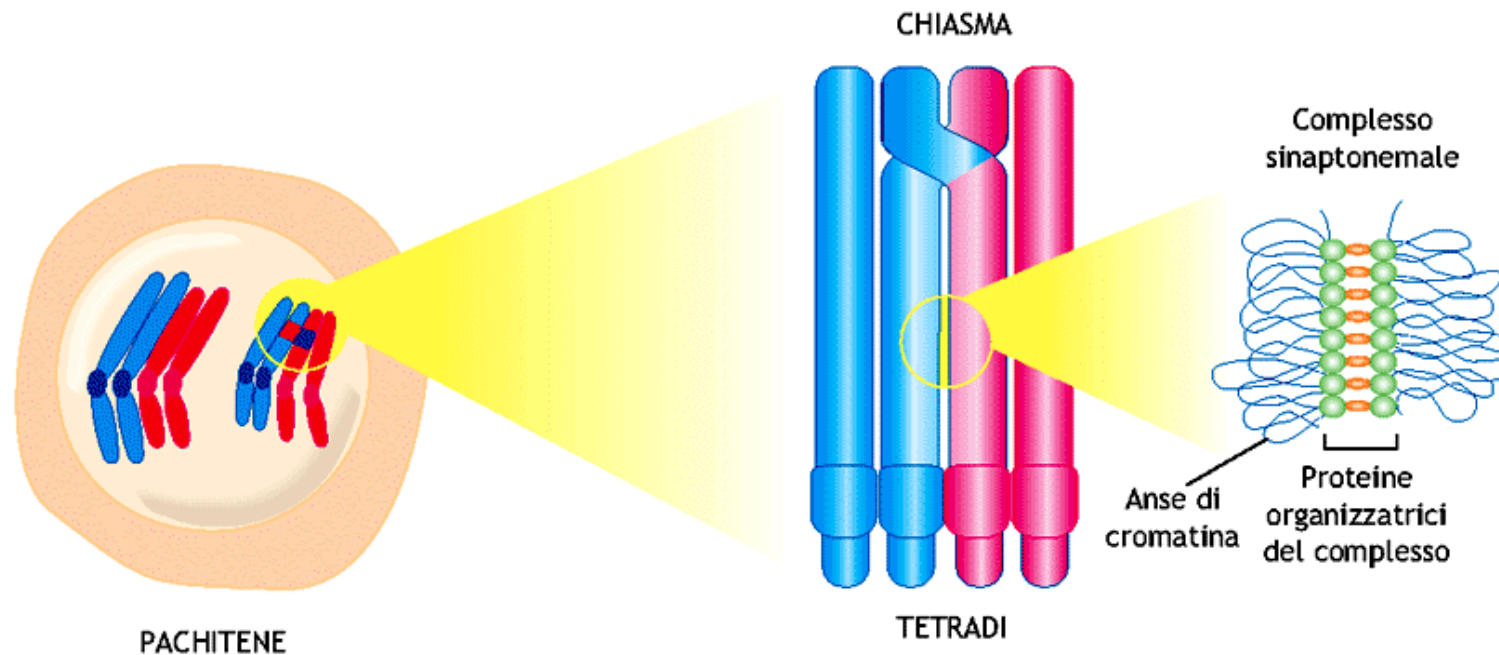
Profase I è la fase più lunga della meiosi e si suddivide in 1) leptotene 2) zigotene

i



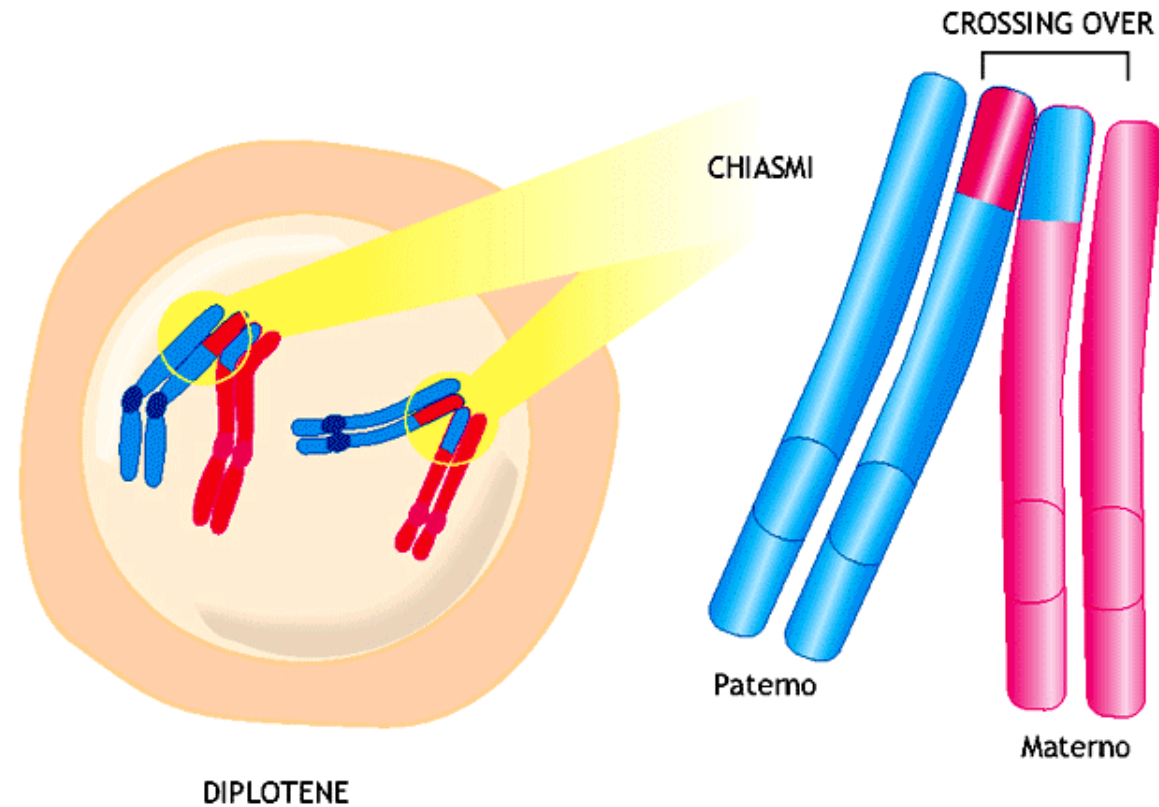
■ **Figura 7.33** Cambiamenti nel contenuto in DNA e nello stato di compattamento dei cromosomi nel corso del ciclo cellulare e della profase meiotica I. Le coppie paterna e materna di due diversi cromosomi (cromosoma 1 e 2) sono rappresentate con colori diversi.

**3) pachitene , in questa fase avviene il crossing over ,
lo scambio di materiale genetico tra cromosomi paterni e materni**

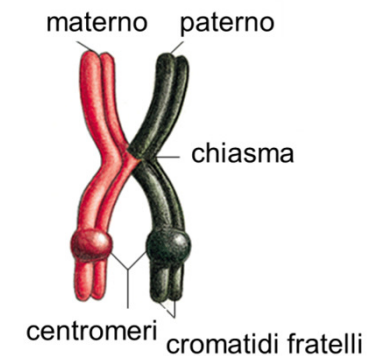


■ **Figura 7.34** La cellula nel pachitene. Il primo ingrandimento permette di osservare una tetrate che sta formando un chiasma, punti dove avvengono gli scambi del materiale genetico. Il secondo ingrandimento rappresenta il complesso sinaptonemiale.

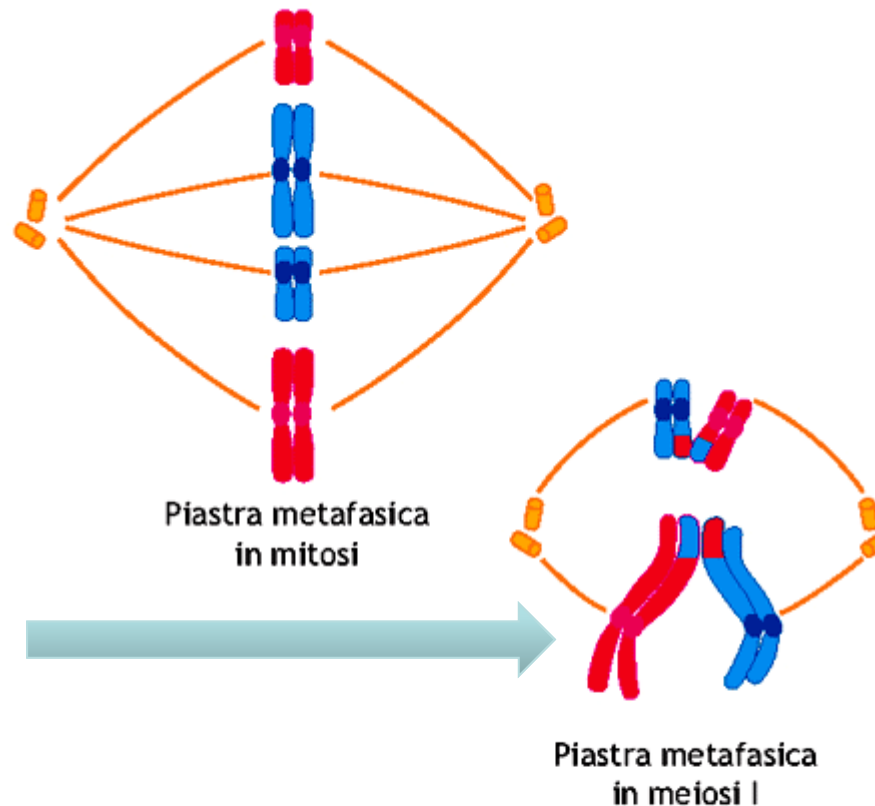
4) diplotene, i cromosomi sono a contatto solo a livello dei chiasmi



■ **Figura 7.35 La cellula in diplotene.** Sono bene evidenti i chiasmi che sono i punti di contatto tra i quattro cromatidi. L'ingrandimento sottolinea il chiasma e lo scambio di materiale genetico avvenuto nel corso del crossing over.



Metafase I



In meiosi I solo uno dei due centromeri di una coppia di cromatidi si lega al fuso

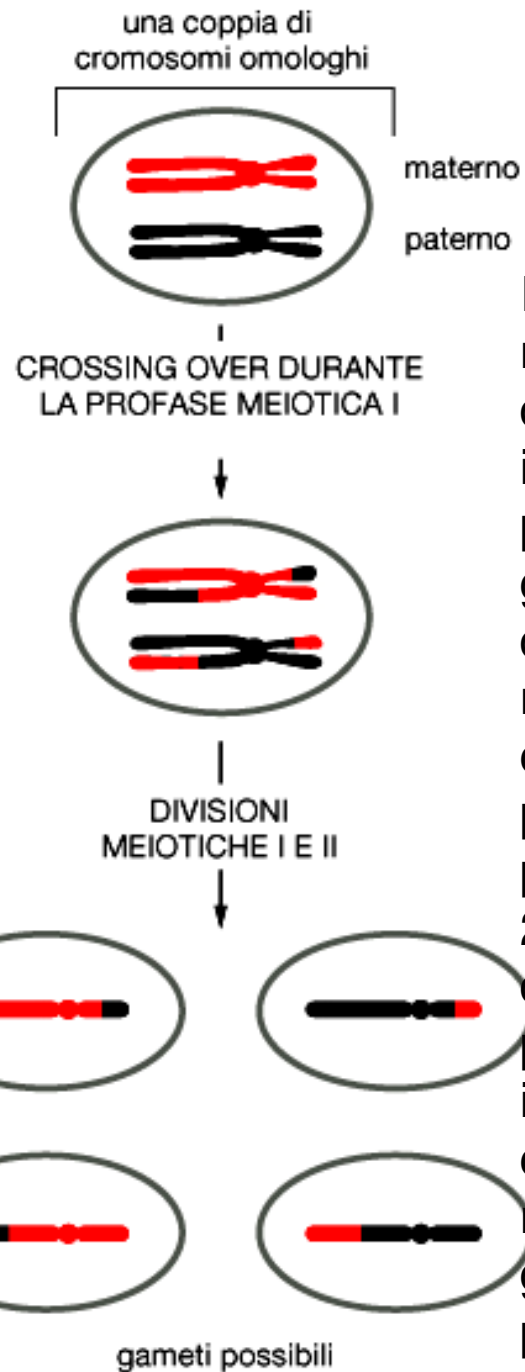
■ **Figura 7.36** Rappresentazione semplificata del posizionamento dei cromosomi in piastra metafase nella mitosi e nella meiosi I. In meiosi I i chiasmi, mantenendo uniti i cromosomi omologhi, conducono al loro allineamento in piastra metafase; inoltre, solo un centromero, per ciascuna coppia di cromatidi fratelli, aggancia le fibre del cinetocore. Al contrario nella metafase mitotica non si verifica l'allineamento dei cromosomi omologhi ed entrambi i centromeri di ogni coppia di cromatidi fratelli ancorano le fibre del cinetocore.

La variabilità di gameti che si originano per meiosi deriva da:

- **Scambio di materiale genetico tra cromatidi fratelli**
- **Orientamento casuale degli omologhi rispetto alla piastra nella prima meiosi.**



(A)



(B)

In base al 1° meccanismo di distribuzione casuale, un individuo può in linea di principio produrre 2^n gameti geneticamente diversi, dove n è il numero aploide di cromosomi. Ogni persona, per esempio, può in teoria produrre $2^{23} = 8,4 \times 10^6$ gameti diversi semplicemente per l'assortimento indipendente dei cromosomi. Tuttavia il numero effettivo di gameti che una persona può produrre è 10^{23} .