

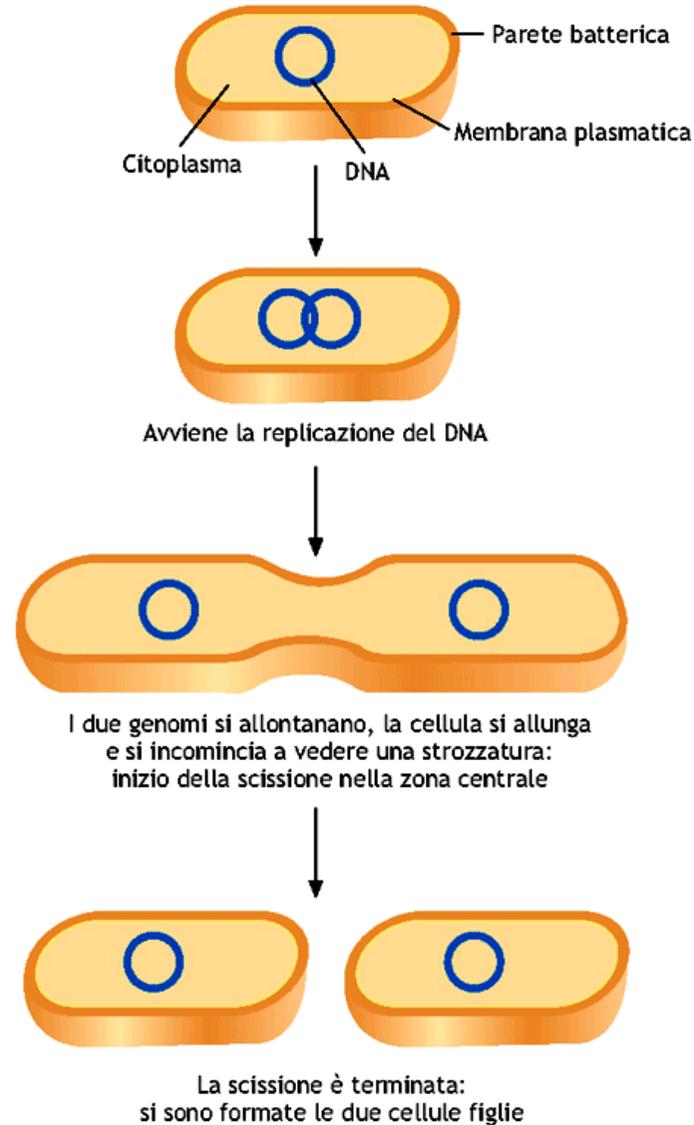
RIPRODUZIONE E CICLO CELLULARE

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.



■ Figura 7.1 Divisione per scissione di un batterio.

Divisione cellula eucariotica

Può avvenire:

1) per mitosi (cellule somatiche, la quasi totalità delle cellule): due cellule figlie uguali alla cellula madre.

2) per meiosi (cellule linea germinale, che daranno origine ai gameti e destinate a unirsi nel processo della fecondazione per dare origine a un nuovo individuo) : quattro cellule figlie aploidi che derivano da una cellula diploide

Cromosomi omologhi e aploidia/ diploidia

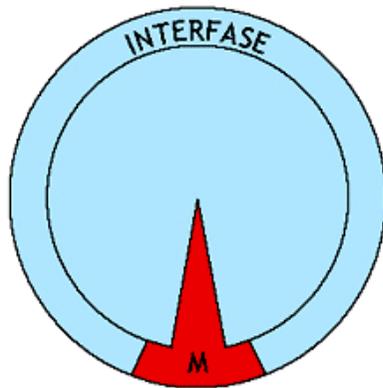
- **I CROMOSOMI OMOLOGHI** sono due copie di uno stesso cromosoma che portano gli stessi geni e sono di provenienza materna e paterna. Ad esempio, il gene della catena beta dell'emoglobina nell'uomo si trova sul cromosoma 11, questo vuol dire che l'uomo ha due geni per la catena B dell'emoglobina, dato 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)**.

La cellula eucariotica e ciclo cellulare

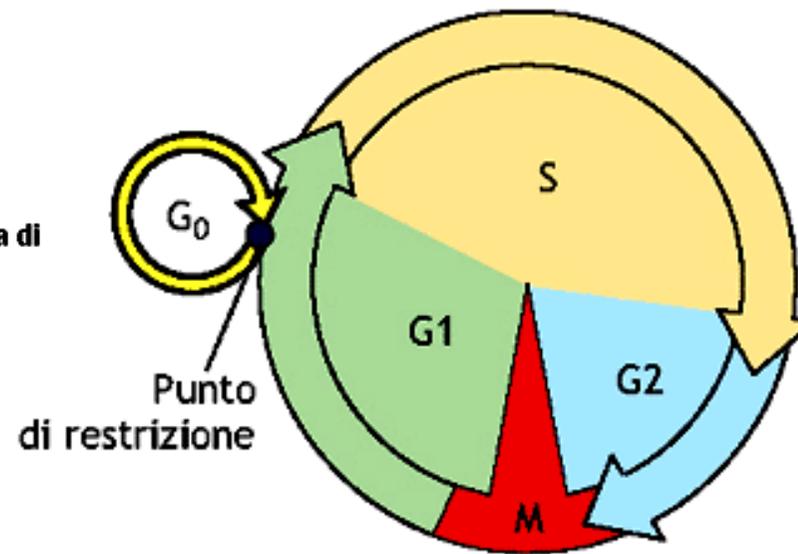
- La cellula eucariotica si divide secondo una sequenza di eventi **ordinata** che termina con la mitosi. Tale sequenza è definita ciclo cellulare.
- La durata del ciclo varia tra i vari tipi cellulari
 - fibroblasti 24 ore
 - fasi iniziali sviluppo embrionale poche ore
- cellule che non si dividono 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.

Ciclo cellulare

Negli eucarioti

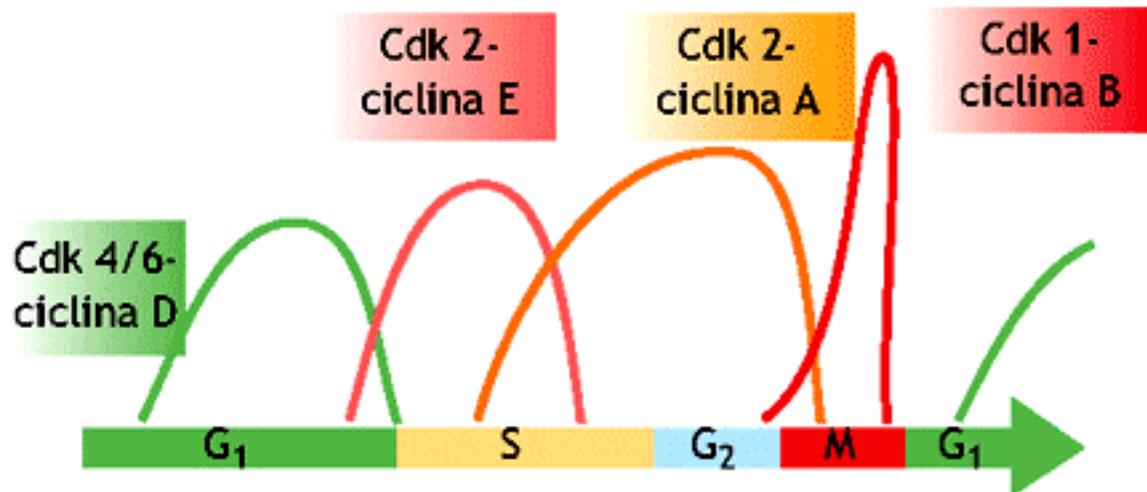


■ **Figura 7.2** Il ciclo cellulare rappresentato come un'alternanza di mitosi ed interfase.



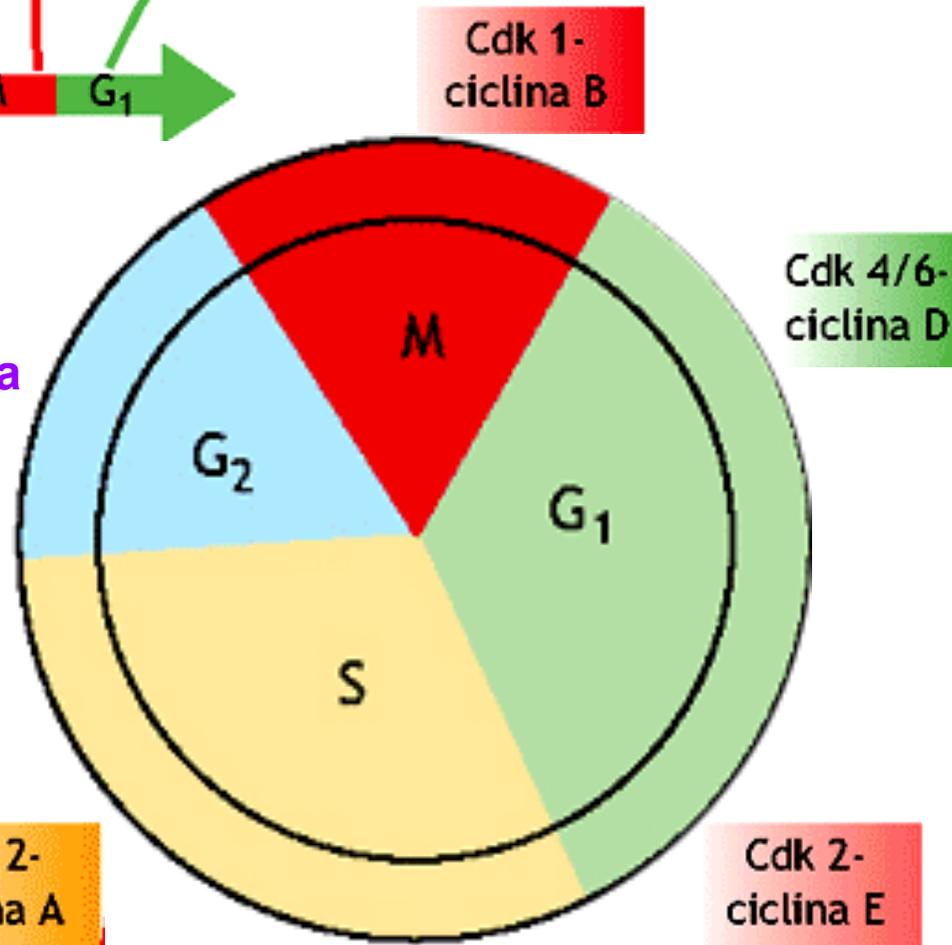
■ **Figura 7.3** Le diverse fasi del ciclo cellulare. Alla fase G_1 segue la fase S di sintesi del DNA, alla quale succede la fase G_2 . Il ciclo termina con la mitosi e la separazione in due della cellula (citodieresi). Il punto di restrizione in G_1 o START, nel lievito, è un momento decisionale molto 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 G_0 del ciclo cellulare o quiescenza.

Ogni fase del ciclo cellulare necessita un complesso ciclina/CDK

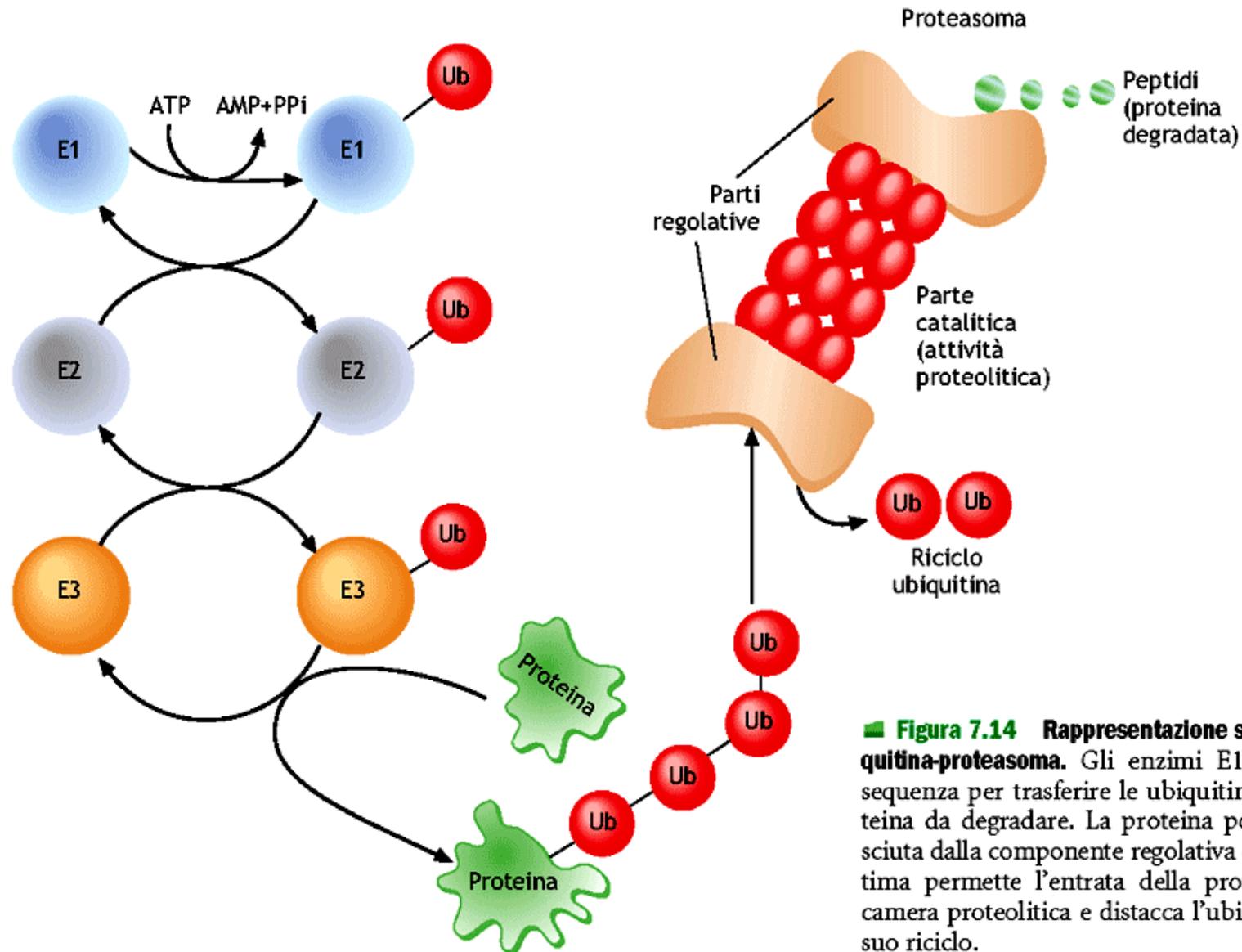


■ **Figura 7.16** Espressione delle diverse cicline durante le diverse fasi del ciclo cellulare. Le linee colorate indicano l'attività chinasi dei diversi complessi Cdk-ciclina durante le differenti fasi del ciclo nei mammiferi. Le attività dei diversi complessi identificano bene le differenti fasi del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

CDK è chinasi dipendente da ciclina



Le cicline vengono degradate dal proteasoma in seguito all'aggiunta di 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   riconosciuta dalla componente regolativa del proteasoma. Quest'ultima permette l'entrata della proteina da degradare nella camera proteolitica e distacca l'ubiquitina garantendo cos  il suo riciclo.

Fosforilazioni nel ciclo cellulare

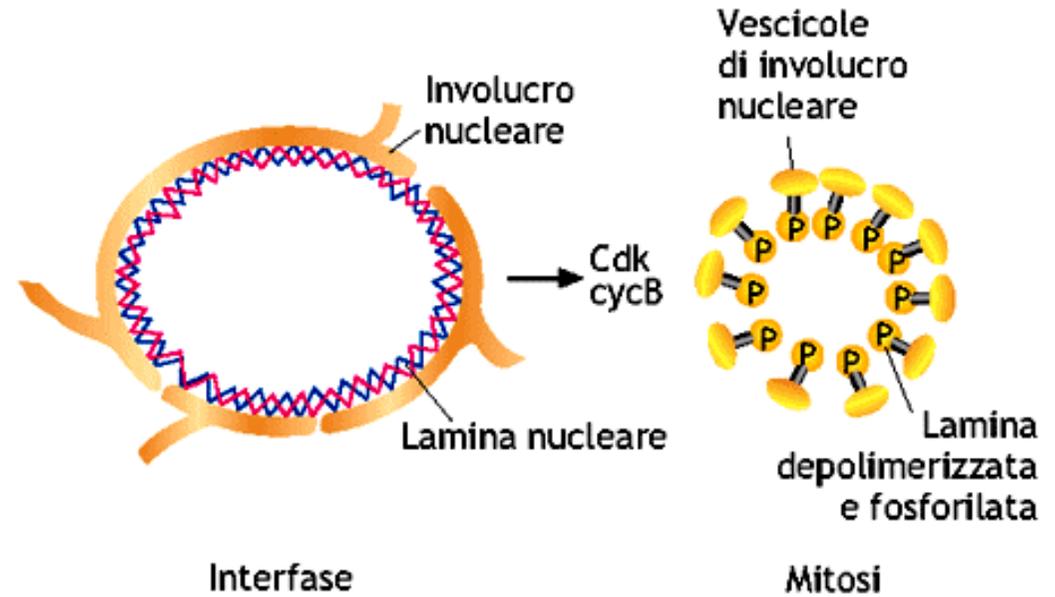
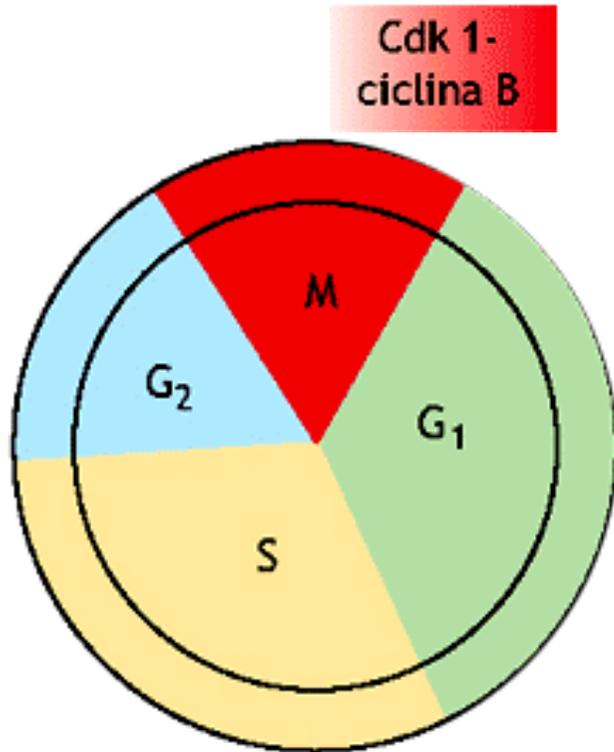


Figura 7.15 Fosforilazione, mediata da Cdk, della lamina nucleare in mitosi e conseguente vescicolazione della stessa membrana.

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

I fattori di crescita inducono la sintesi della ciclina D

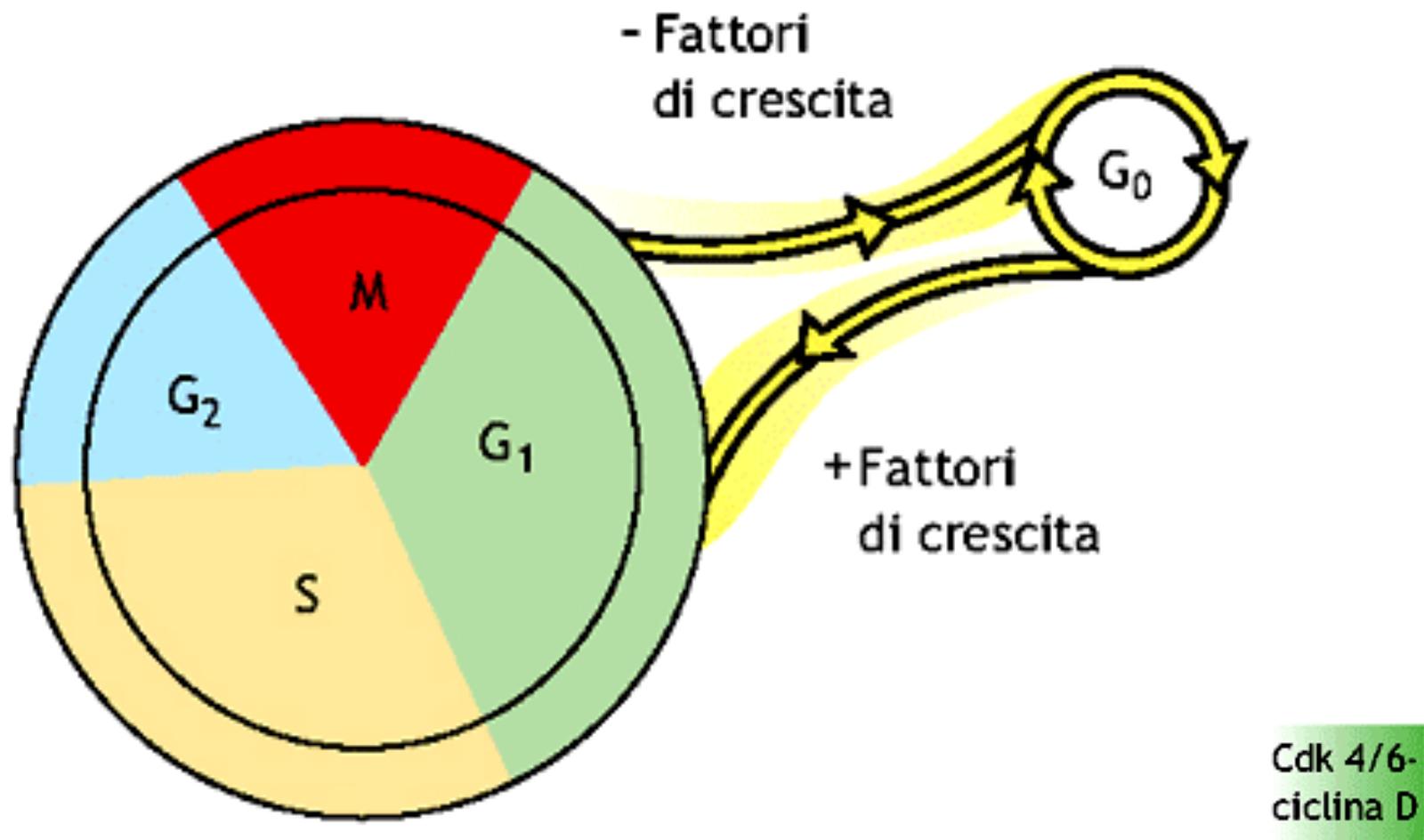


Figura 7.18 L'assenza di fattori di crescita provoca l'uscita dal ciclo cellulare e l'entrata nella fase G₀.

Checkpoints del ciclo cellulare

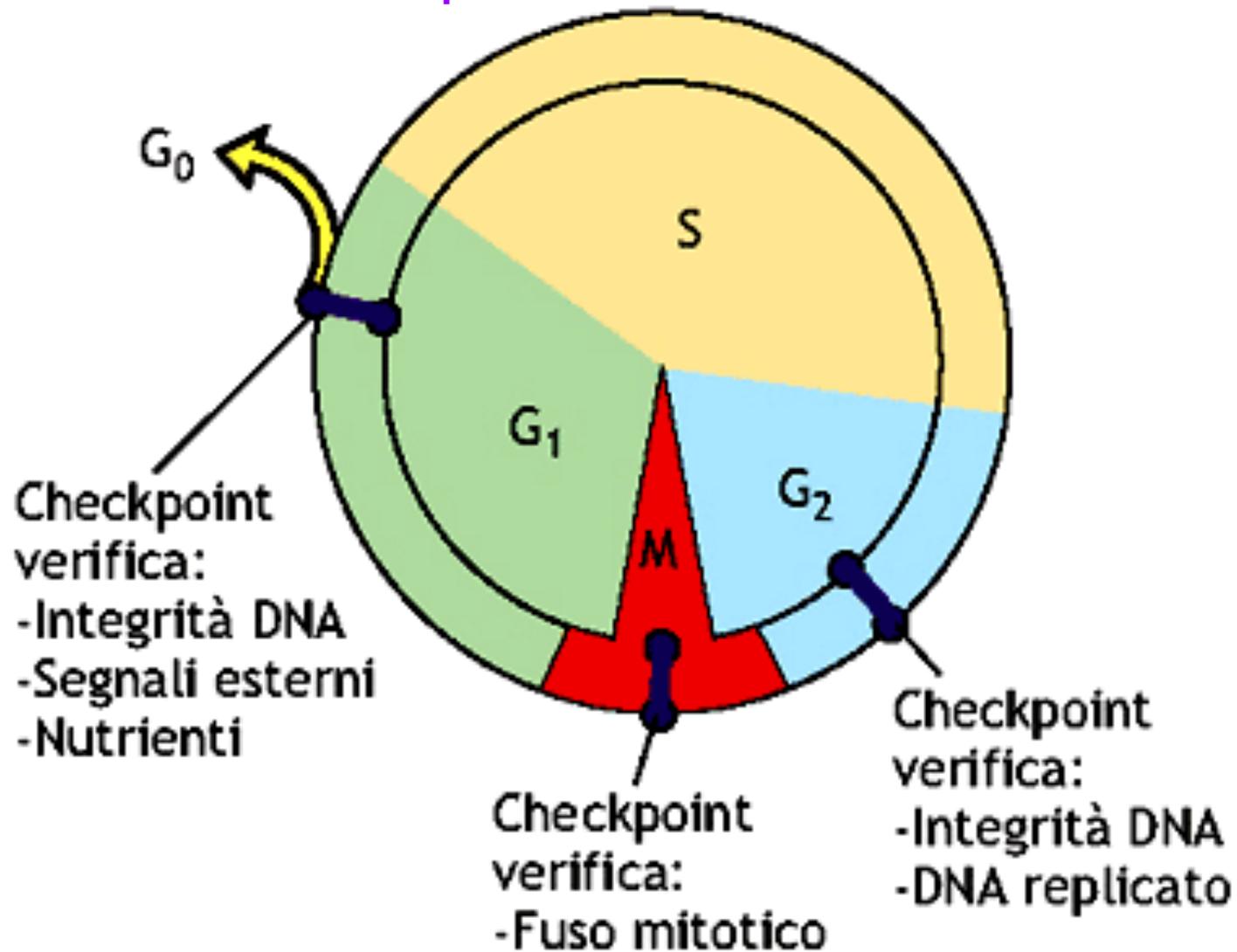


Figura 7.7 I diversi checkpoint (punti di controllo) che agiscono durante il ciclo cellulare.

Controllo della transizione G1- S → La proteina del retinoblastoma Rb

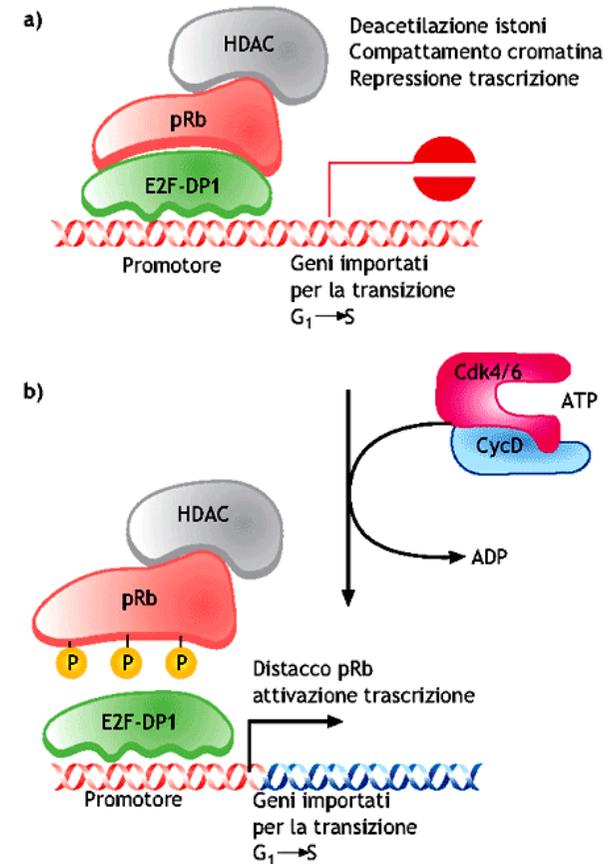
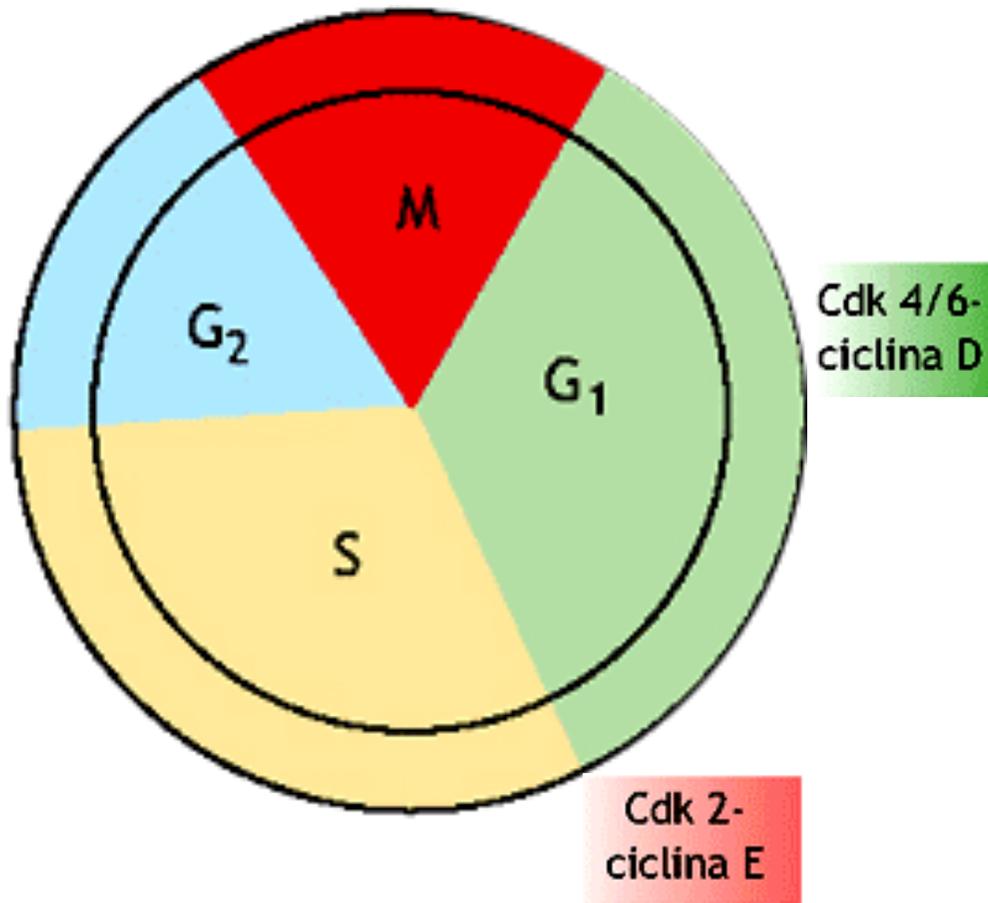
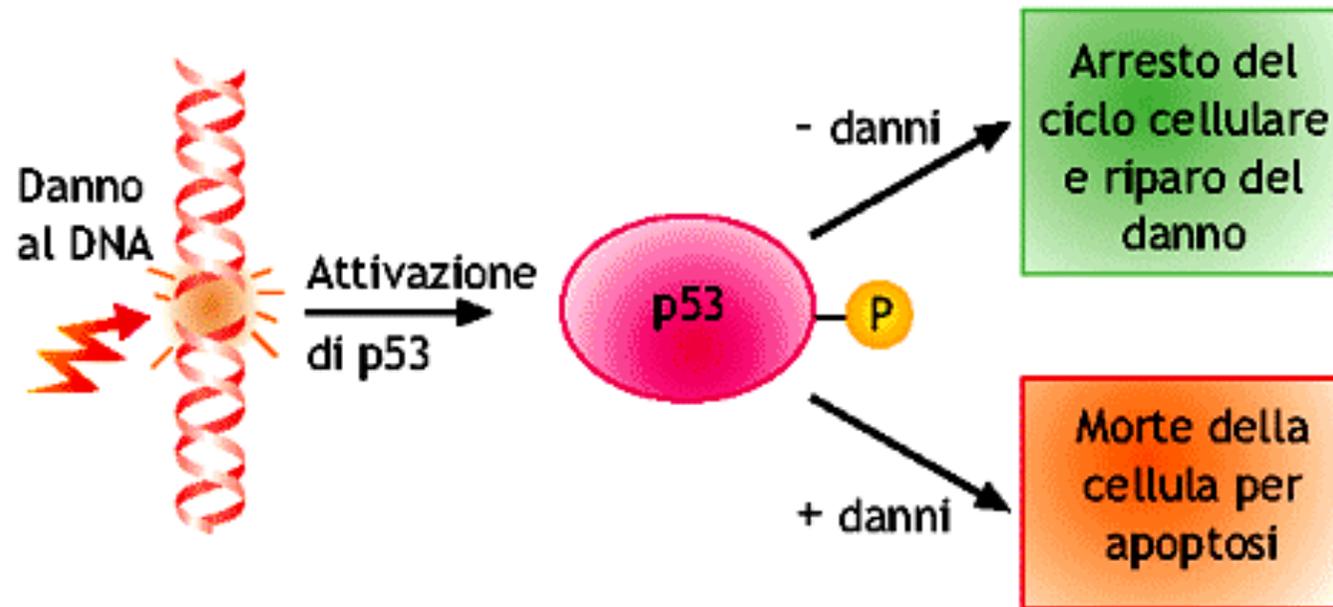


Figura 7.17 Fattore di trascrizione E2F e progressione G₁ → S. In assenza di segnali che promuovono la proliferazione cellulare, quali ad esempio fattori di crescita, pRb non è fosforilata dai complessi ciclina-cdk e può legare il fattore di trascrizione E2F-DP1. **(a)** In questo modo pRb posiziona 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.

Blocco del ciclo cellulare: la proteina p53, oncosoppressore



La p53 induce la proteina p21 un Inibitore dei complessi cdk-ciclina

■ **Figura 7.22** **Gli inibitori del complesso Cdk-ciclina.** L'oncosoppressore p53, stabilizzato dal danno al DNA, si lega ai promotori di geni di rilievo nel controllo del ciclo cellulare, promuovendone la trascrizione mediata dalla RNA polimerasi. Tra questi geni c'è il gene *p21* che rende possibile l'immediato blocco del ciclo grazie al suo prodotto proteico che si lega ed inibisce diversi complessi Cdk-ciclina.

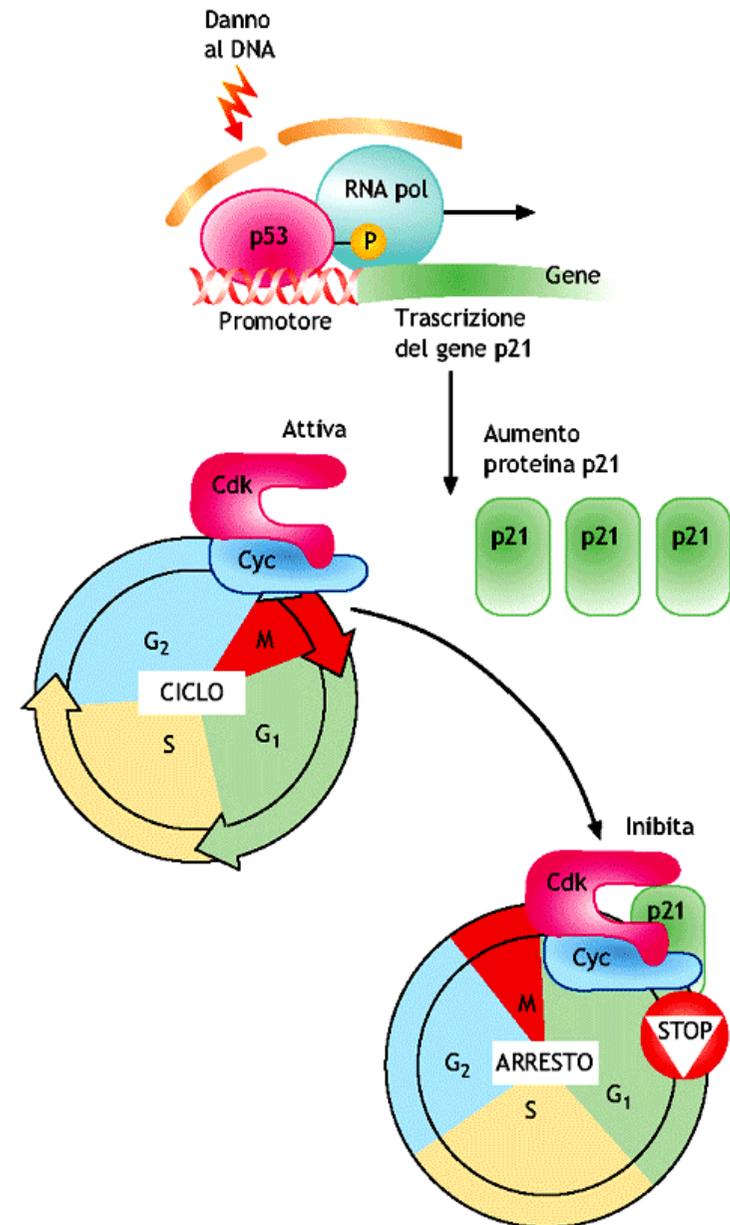
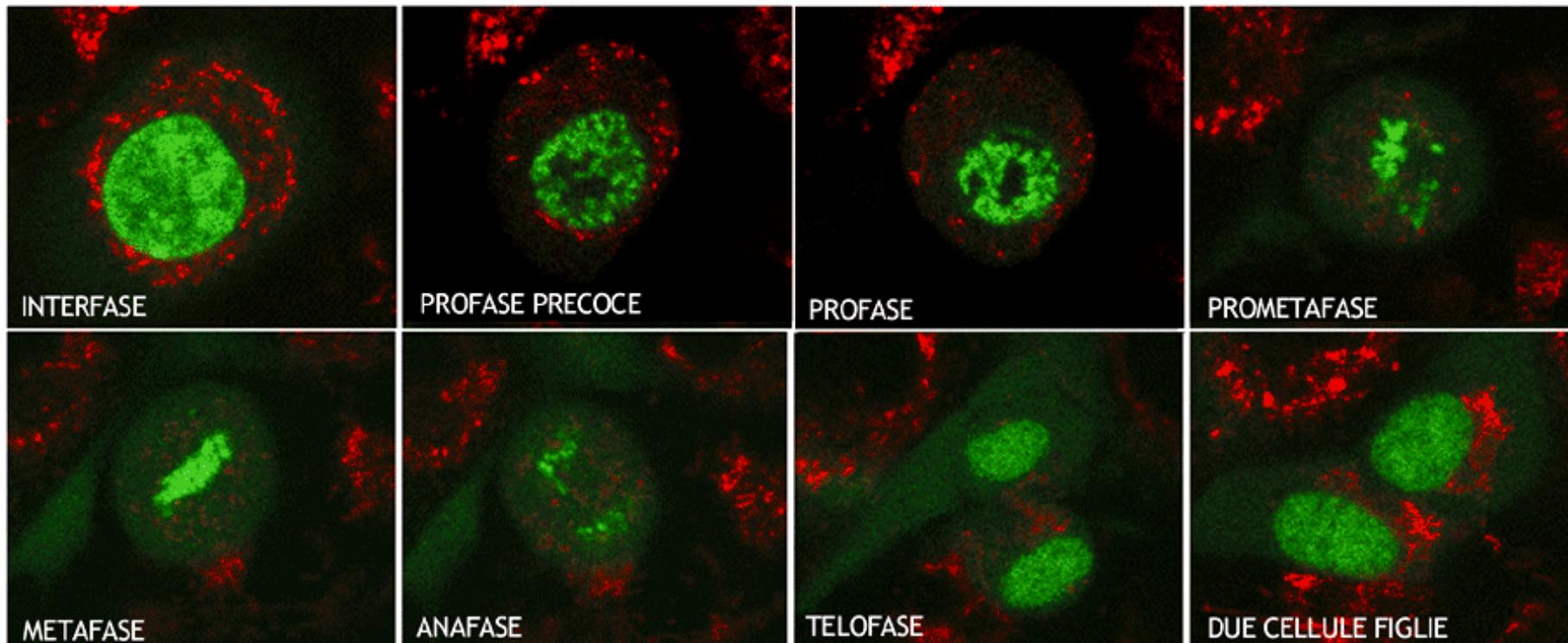


Table 8.3 Molecular changes in human cancers leading to deregulation of the cell cycle clock

Specific alteration	Clinical result
Alterations of pRb	
Inactivation of the <i>Rb</i> gene by mutation	retinoblastoma, osteosarcoma, small-cell lung carcinoma
Methylation of <i>Rb</i> gene promoter	brain tumors, diverse others
Sequestration of pRb by Id1, Id2	diverse carcinomas, neuroblastoma, melanoma
Sequestration of pRb by the HPV E7 viral oncoprotein	cervical carcinoma
Alteration of cyclins	
Cyclin D1 overexpression through amplification of <i>cyclin D1</i> gene	breast carcinoma, leukemias
Cyclin D1 overexpression caused by hyperactivity of <i>cyclin D1</i> gene promoter driven by upstream mitogenic pathways	diverse tumors
Cyclin D1 overexpression due to reduced degradation of cyclin D1 because of depressed activity of GSK-3 β	diverse tumors
Cyclin D3 overexpression caused by hyperactivity of <i>cyclin D3</i> gene	hematopoietic malignancies
Cyclin E overexpression	breast carcinoma
Defective degradation of cyclin E protein due to loss of hCDC4	endometrial, breast, and ovarian carcinomas
Alteration of cyclin-dependent kinases	
CDK4 structural mutation	melanoma
Alteration of CDK inhibitors	
Deletion of 15 ^{<i>INK4B</i>} gene	diverse tumors
Deletion of 16 ^{<i>INK4A</i>} gene	diverse tumors
Methylation of p16 ^{<i>INK4A</i>} gene promoter	melanoma, diverse tumors
Decreased transcription of p27 ^{<i>Kip1</i>} gene because of action of Akt/PKB on Forkhead transcription factor	diverse tumors
Increased degradation of p27 ^{<i>Kip1</i>} protein due to Skp2 overexpression	breast, colorectal, and lung carcinomas, and lymphomas
Cytoplasmic localization of p27 ^{<i>Kip1</i>} protein due to Akt/PKB action	breast, esophagus, colon, thyroid carcinomas
Cytoplasmic localization of p21 ^{<i>Cip1</i>} protein due to Akt/PKB action	diverse tumors
Multiple concomitant alterations by Myc, N-myc or L-myc	
Increased expression of Id1, Id2 leading to pRb sequestration	diverse tumors
Increased expression of cyclin D2 leading to pRb phosphorylation	diverse tumors
Increased expression of E2F1, E2F2 E2F3 leading to expression of cyclin E	diverse tumor
Increased expression of CDK4 leading to pRb phosphorylation	diverse tumors
Increased expression of Cul1 leading to p27 ^{<i>Kip1</i>} degradation	diverse tumors
Repression of p15 ^{<i>INK4B</i>} and p21 ^{<i>Cip1</i>} expression allowing pRb phosphorylation	diverse tumors

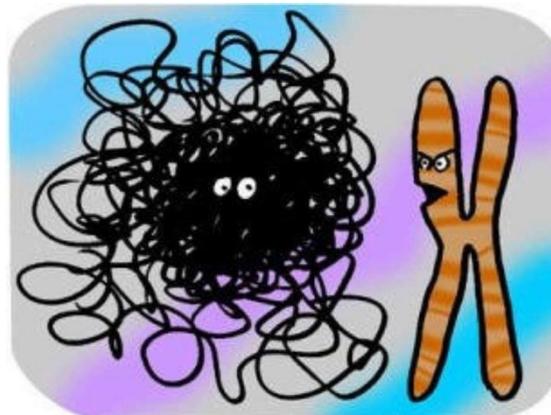
Ciclo cellulare



■ **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.

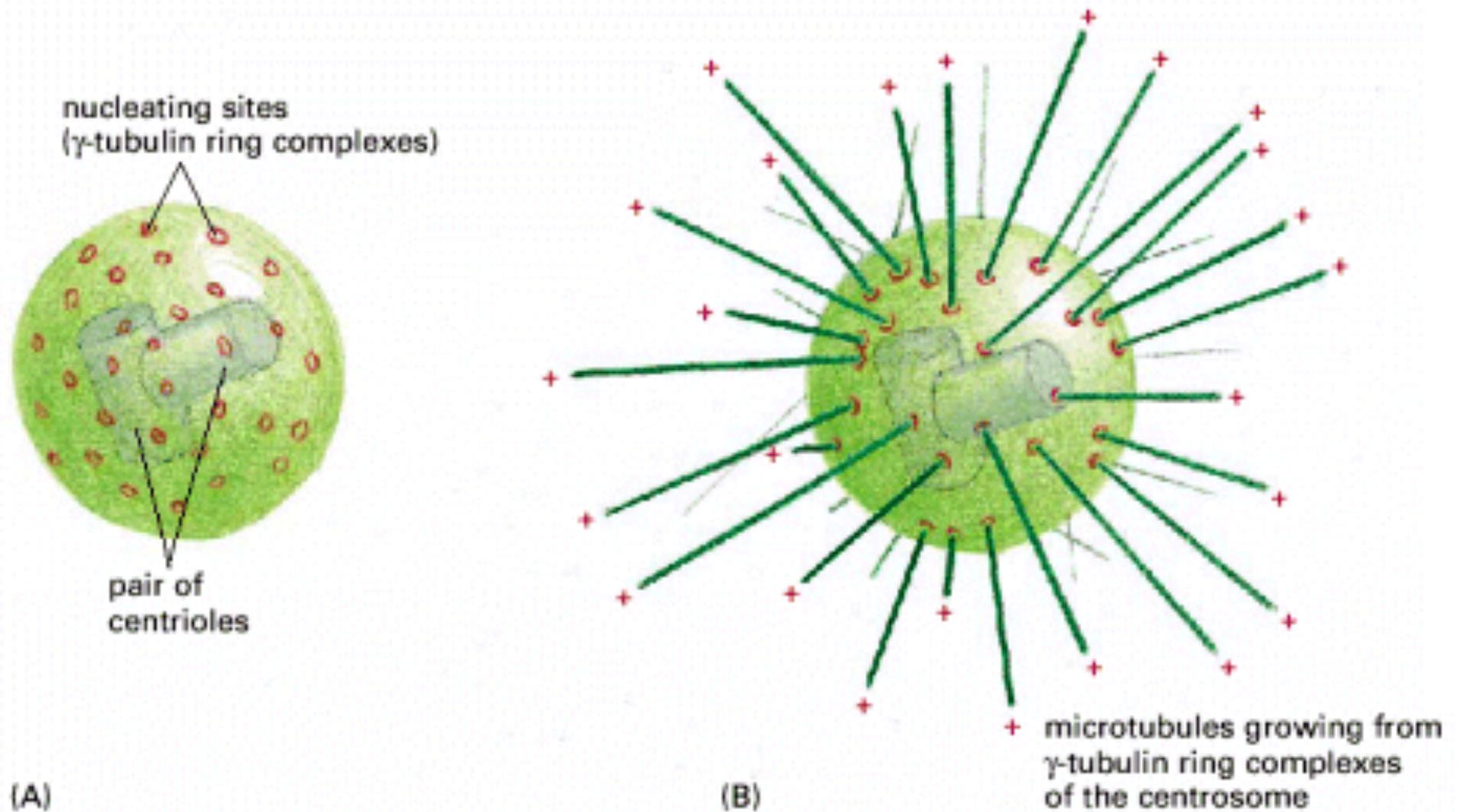
Profase

- 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
- Inizia la sintesi del nuovo fuso mitotico

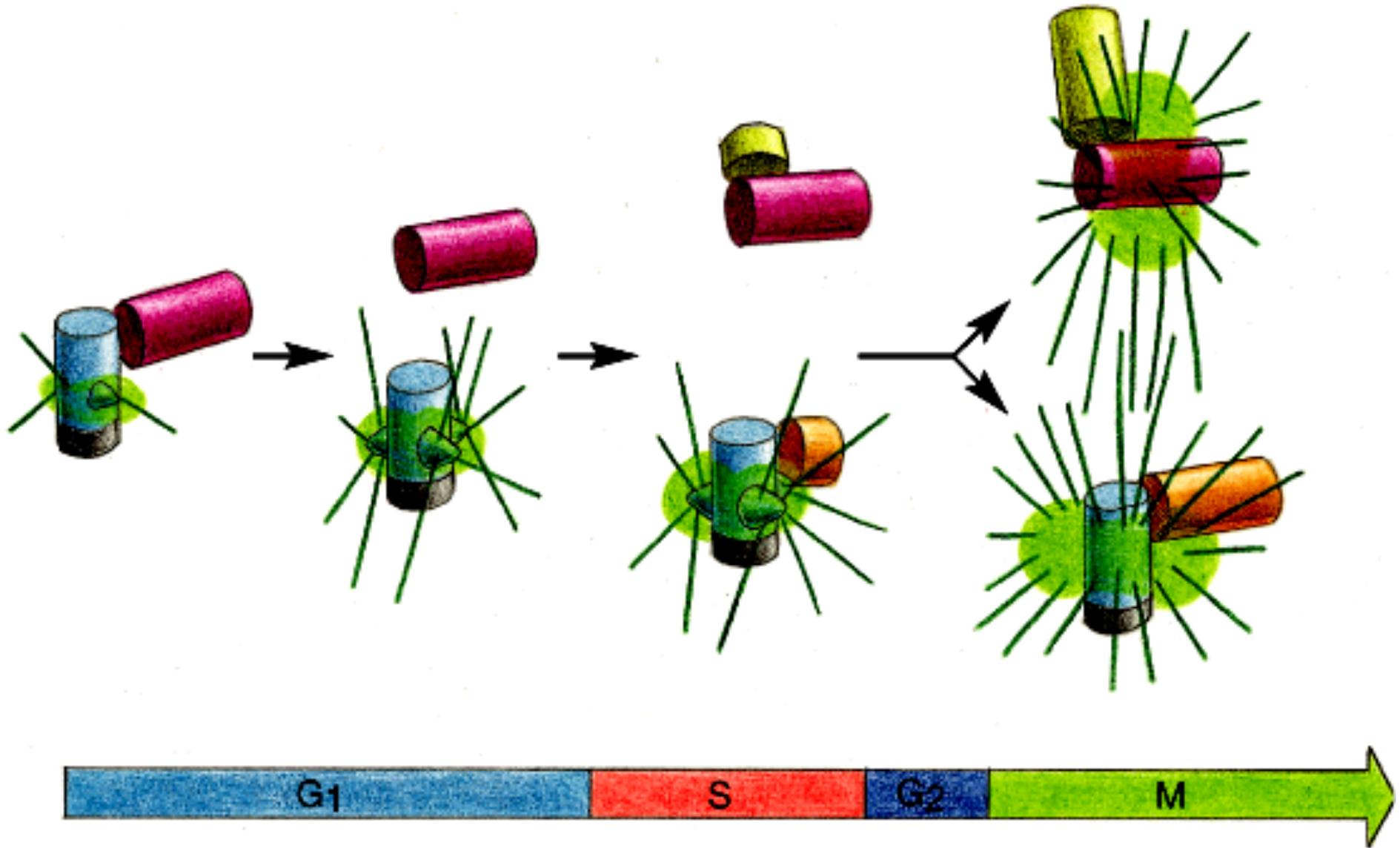


Dude, mitosis starts in five minutes...
I can't believe you're not condensed yet.

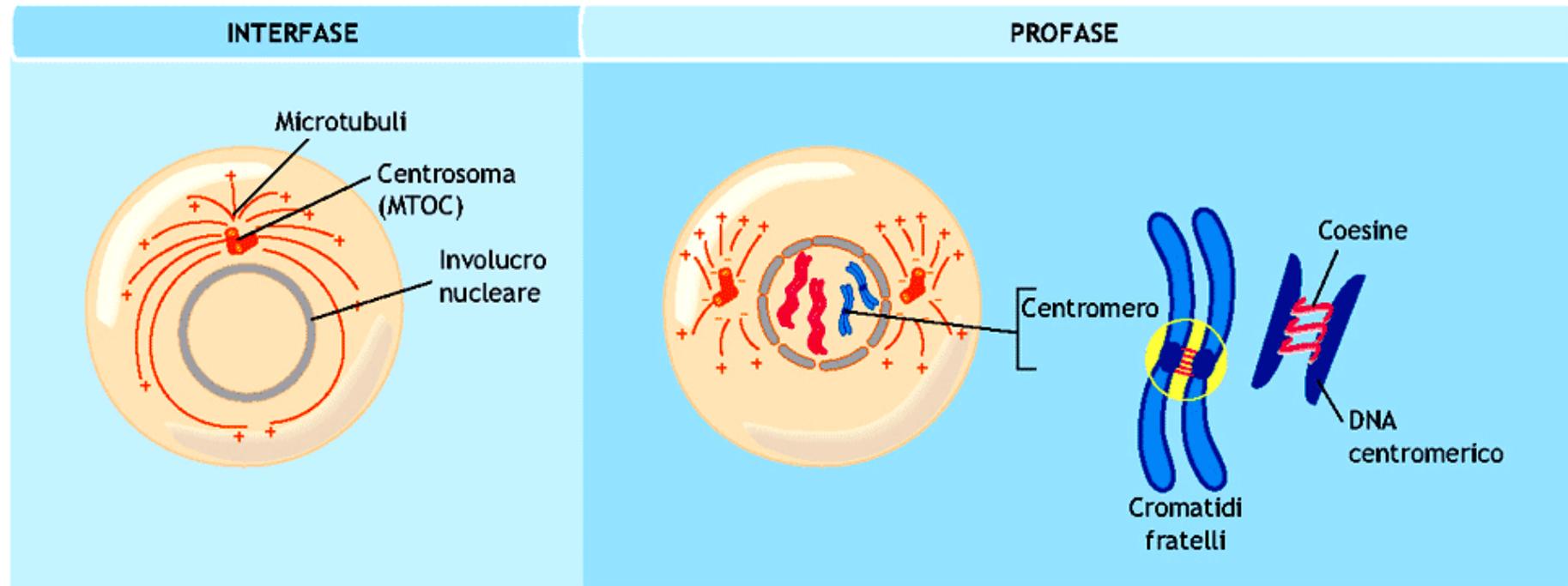
Il centrosoma organizza il fuso mitotico formato da microtubuli a partire dai centrioli



La cdk che innesca la la replicazione del DNA nella fase S, attiva anche la duplicazione del centriolo

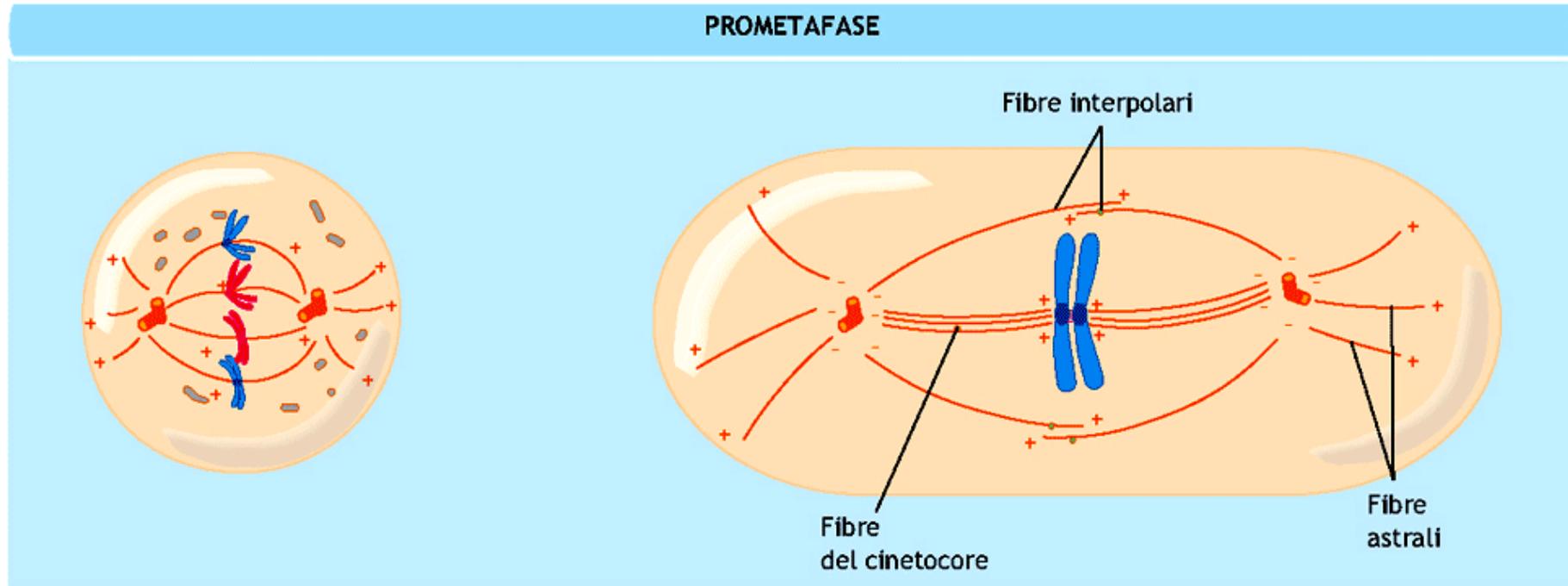


Profase



■ **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.

Prometafase

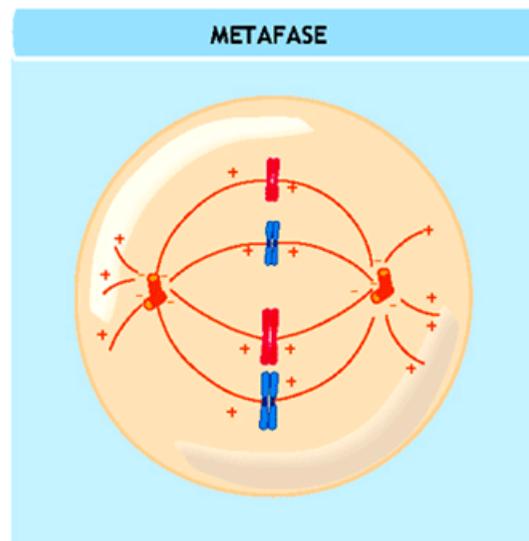


■ **Figura 7.25 Cambiamenti nell'organizzazione dei cromosomi e dei microtubuli nella cellula in prometafase.** Viene evidenziato il fuso mitotico nelle sue diverse componenti. Dai poli del fuso, formati dai due centrioli si dipartono: le fibre del cinetocore, che entrano in contatto con i cromosomi 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.

- Frammentazione membrana nucleare
- **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**

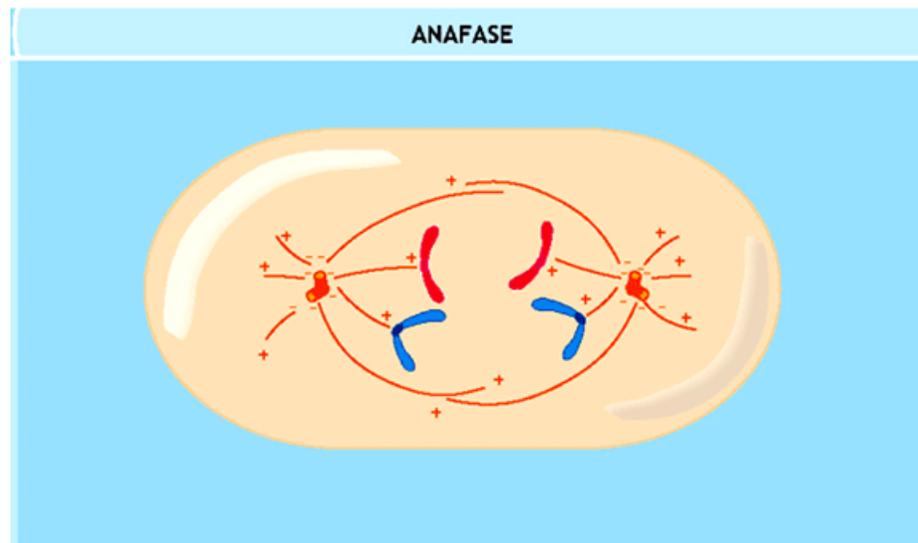
Metafase

- 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 Anaphase Promoting Complex (APC) e si passa all'anafase



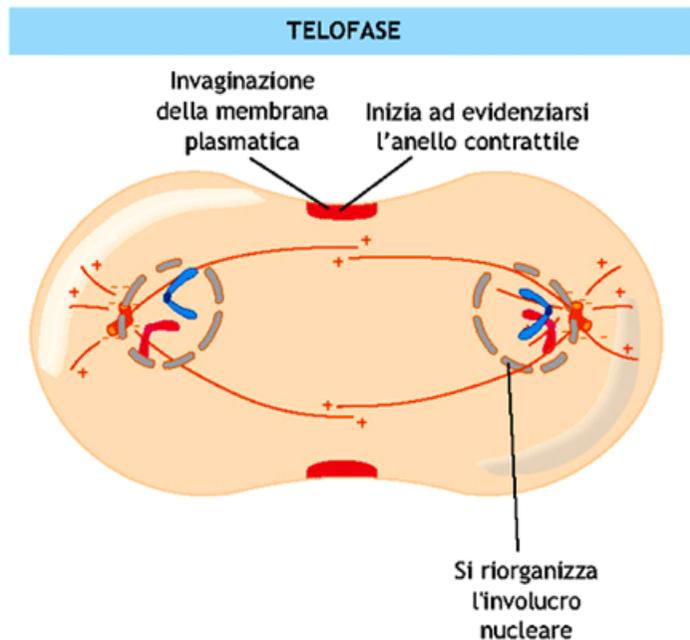
Anafase

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



Telofase

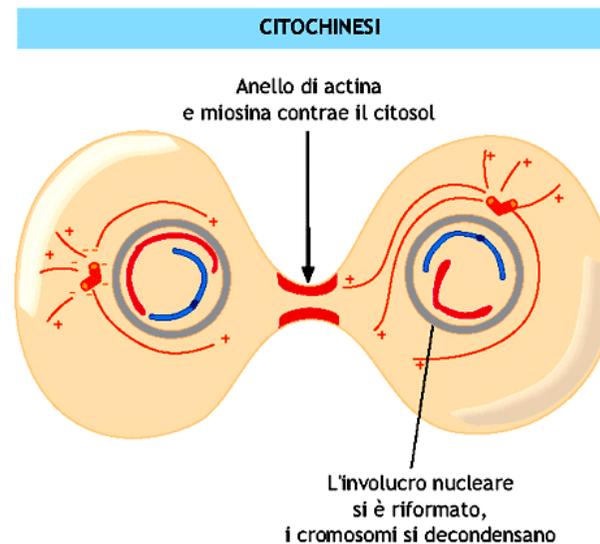
- Ogni cromatidio fratello si è portato alle due opposte regioni della cellula
- Si riforma la membrana nucleare con i pori nucleari
- Gli organelli si riorganizzano nella struttura interfascica
- I cromosomi gradualmente si decondensano
- Inizia ad invaginarsi la membrana plasmatica



■ **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.

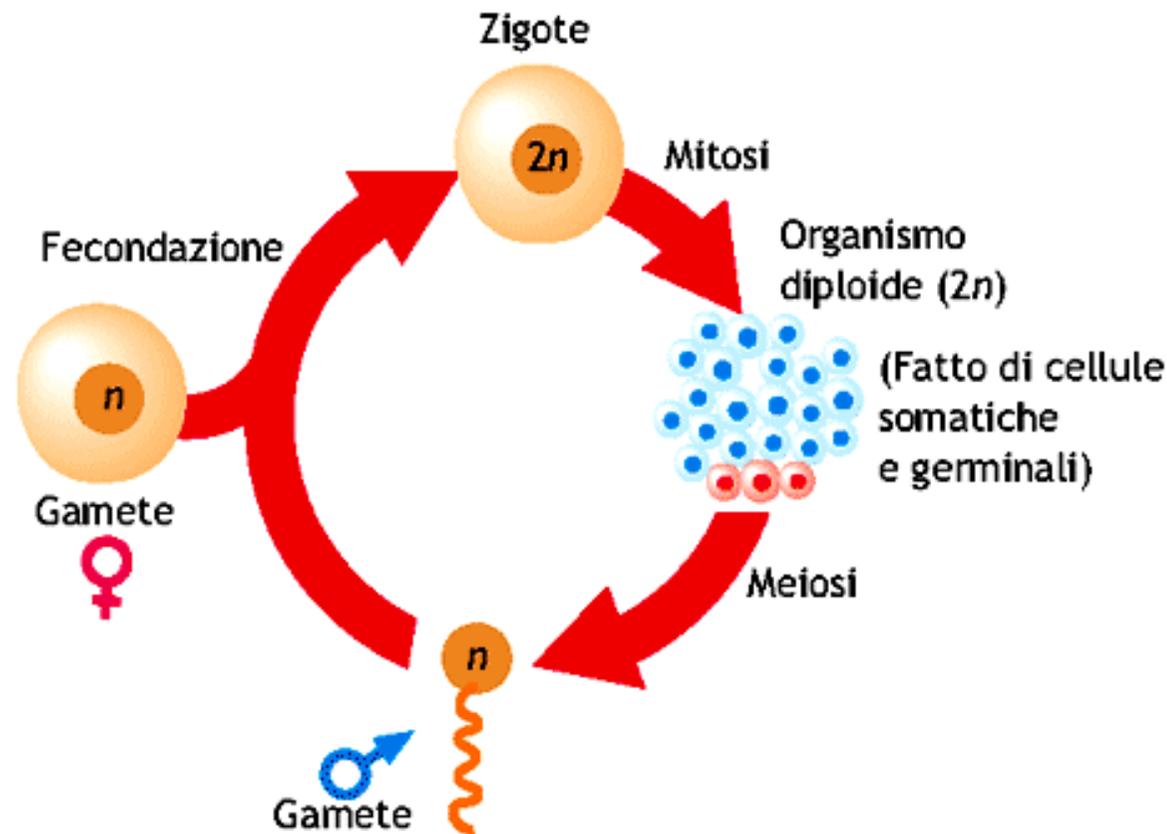
Citochinesi

- 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.

Meiosi

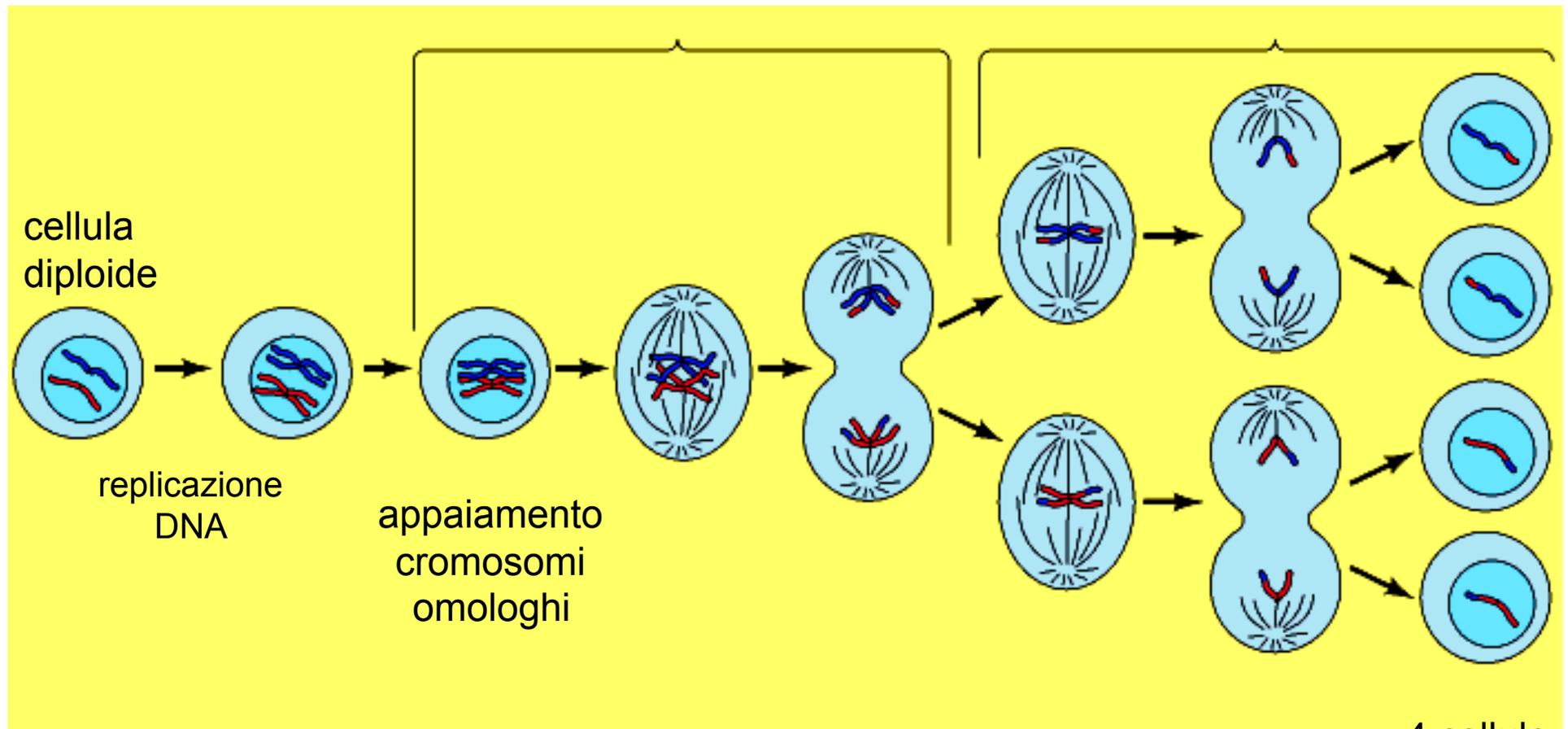


■ **Figura 7.32** La meiosi negli organismi pluricellulari svolge il suo ruolo alla fine del differenziamento delle cellule germinali per produrre i gameti (maschili o femminili) caratterizzati da un genoma aploide (n). Con la fecondazione, l'unione del gamete maschile con il gamete femminile ristabilisce 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

MEIOSI I

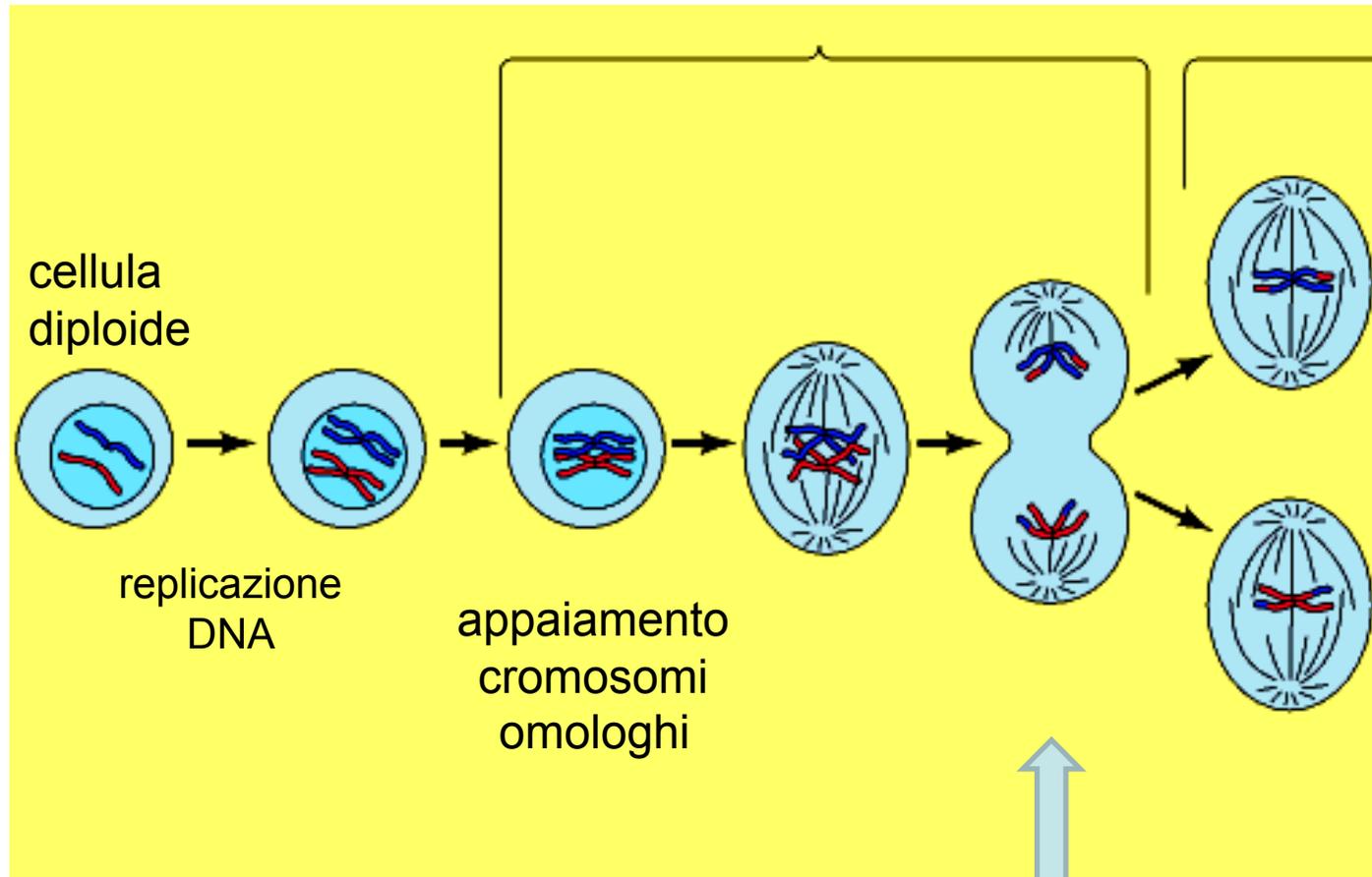
MEIOSI II



4 cellule aploidi

LA MEIOSI

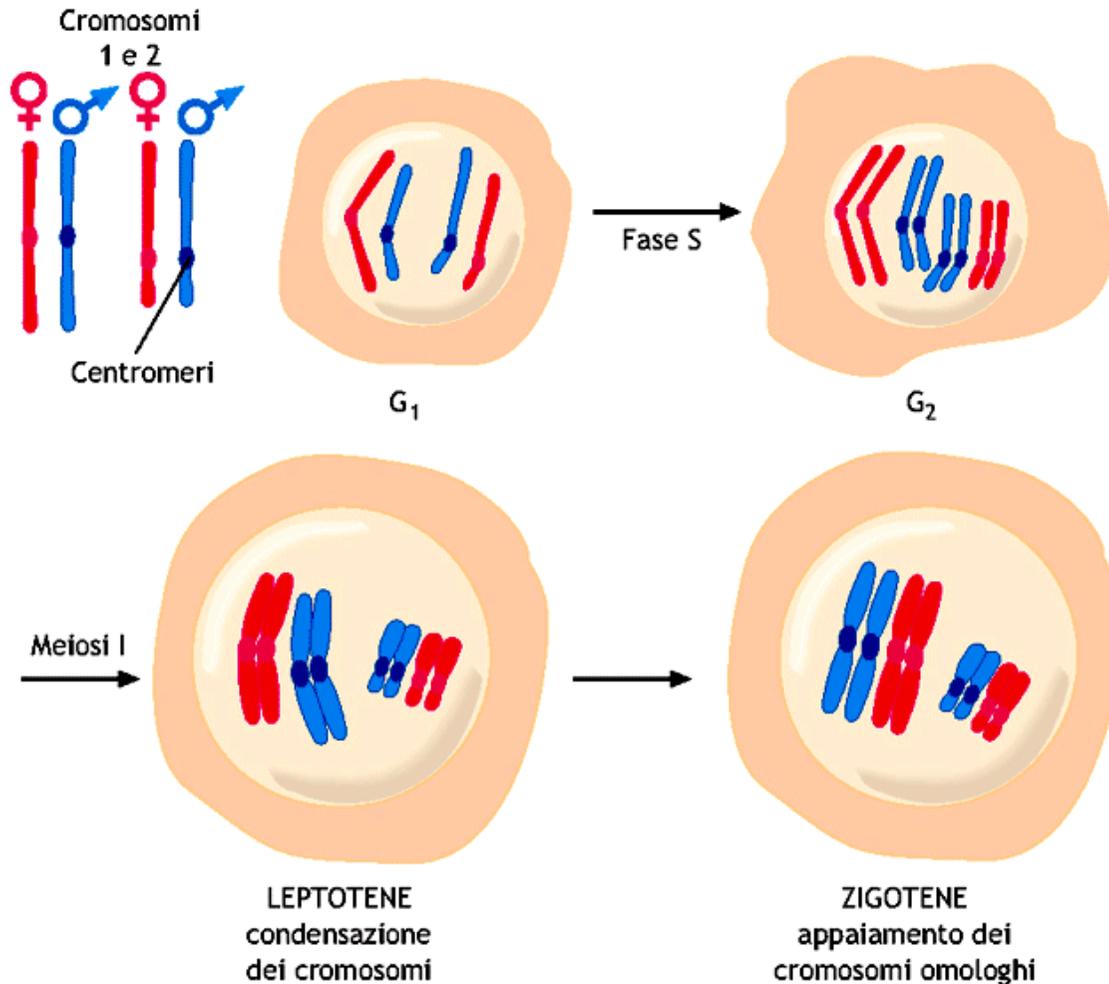
MEIOSI I



- 2 cellule
- aploidi (1 set di cromosomi omologhi o paterni o materni)
- $2n$ (DNA) ogni cromosoma ha due cromatidi

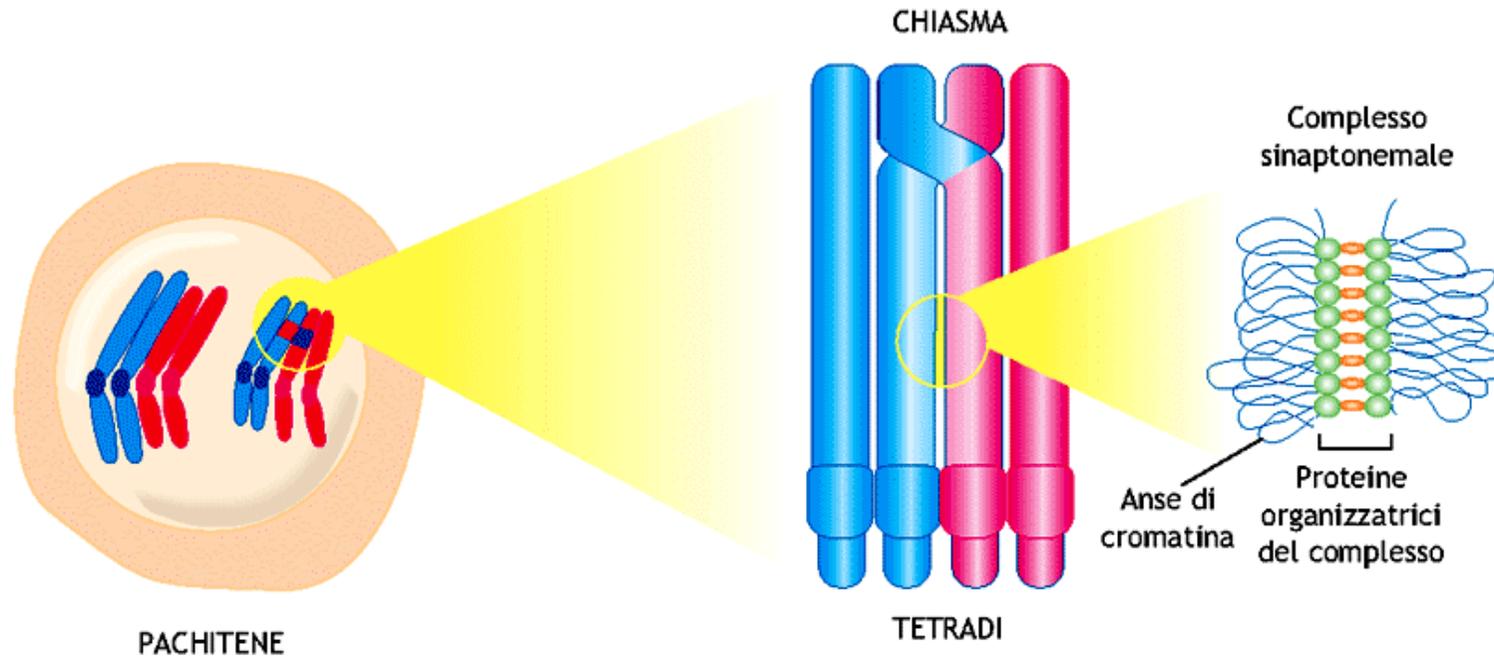
Meiosi

PROFASE I e' la fase più lunga della meiosi. In questa fase avviene il crossing over –scambio di materiale genetico



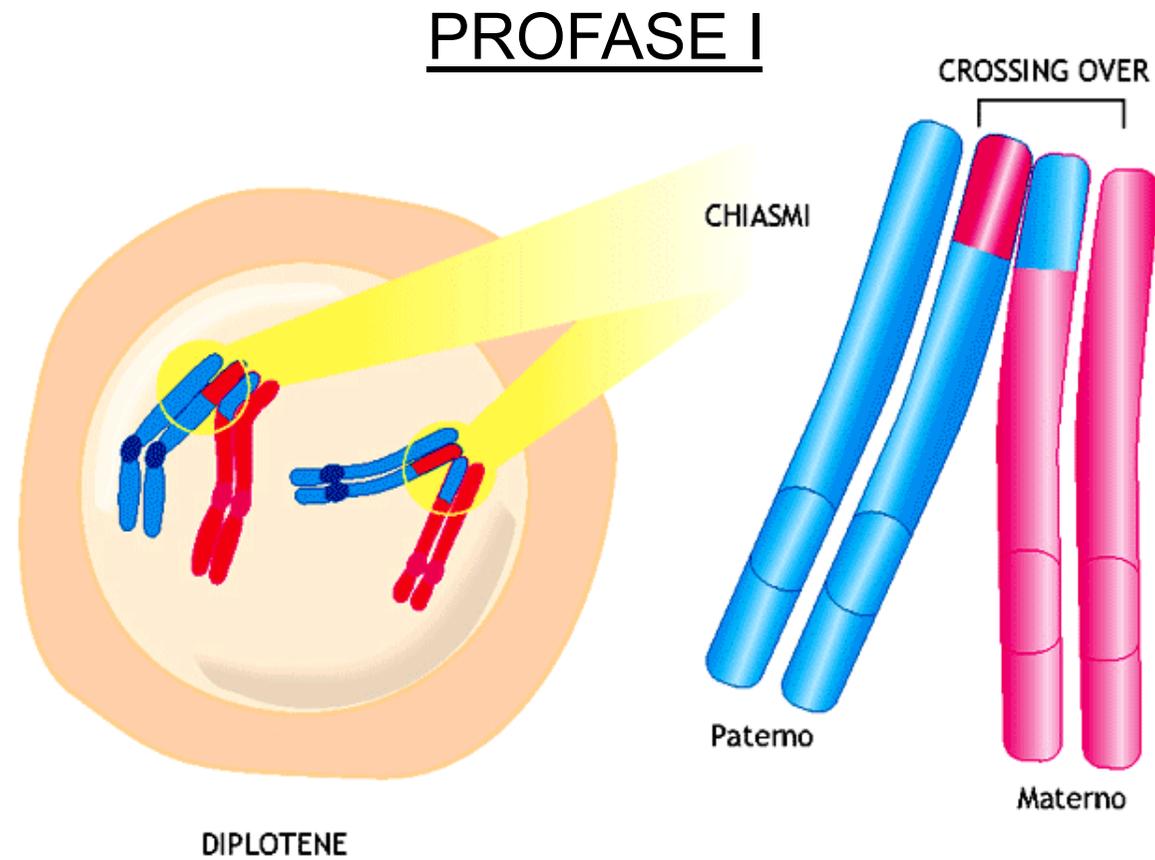
■ **Figura 7.33** Cambiamenti nel contenuto in DNA e nello stato di compattamento dei cromosomi nel corso del ciclo cellulare e della profase meiotica I. Le coppie paterna e materna di due diversi cromosomi (cromosoma 1 e 2) sono rappresentate con colori diversi.

PROFASE I

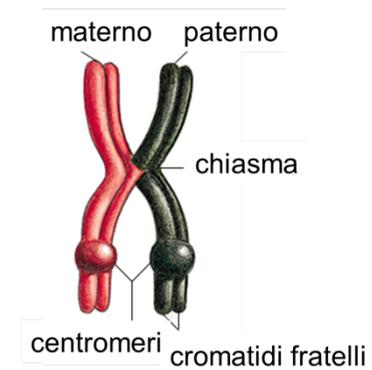


■ **Figura 7.34** **La cellula nel pachitene.** Il primo ingrandimento permette di osservare una tetrate che sta formando un chiasma, punti dove avvengono gli scambi del materiale genetico. Il secondo ingrandimento rappresenta il complesso sinaptonemiale.

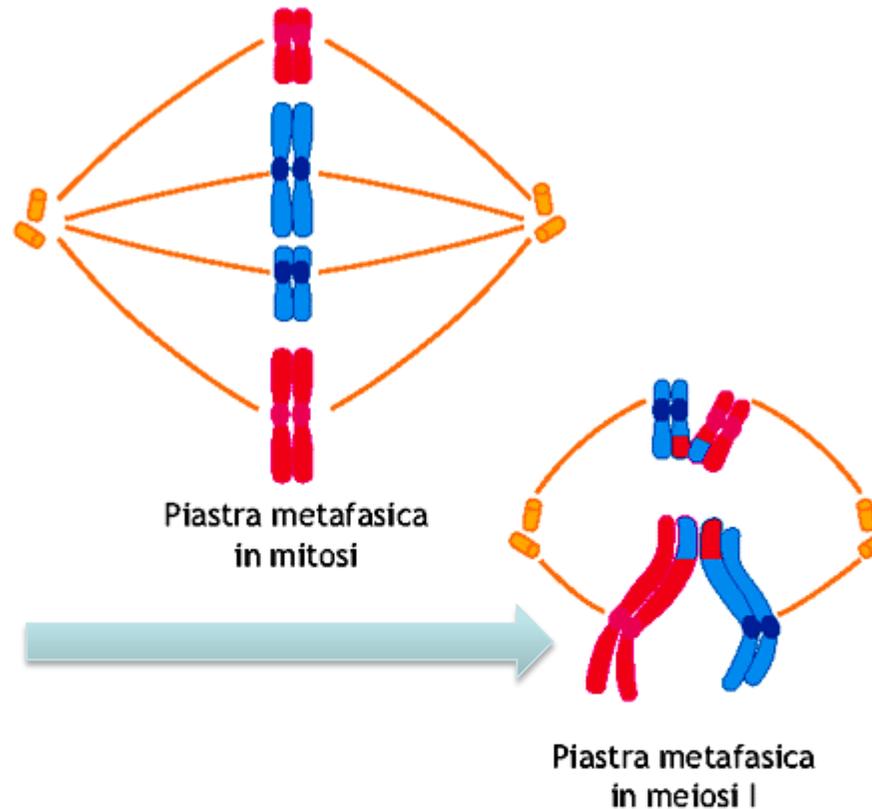
Meiosi



■ **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



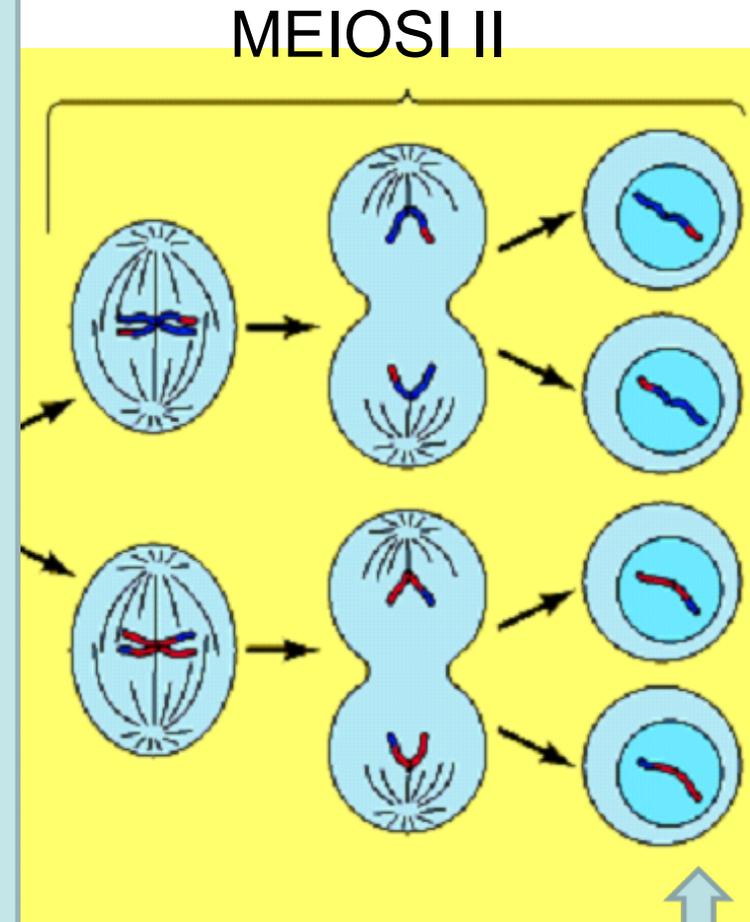
In meiosi I solo uno dei due centromeri di una coppia di cromatidi si lega al fuso

■ **Figura 7.36** Rappresentazione semplificata del posizionamento dei cromosomi in piastra metafase nella mitosi e nella meiosi I. In meiosi i 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.

MEIOSI II. E' definita anche mitosi

DALLA MEIOSI I

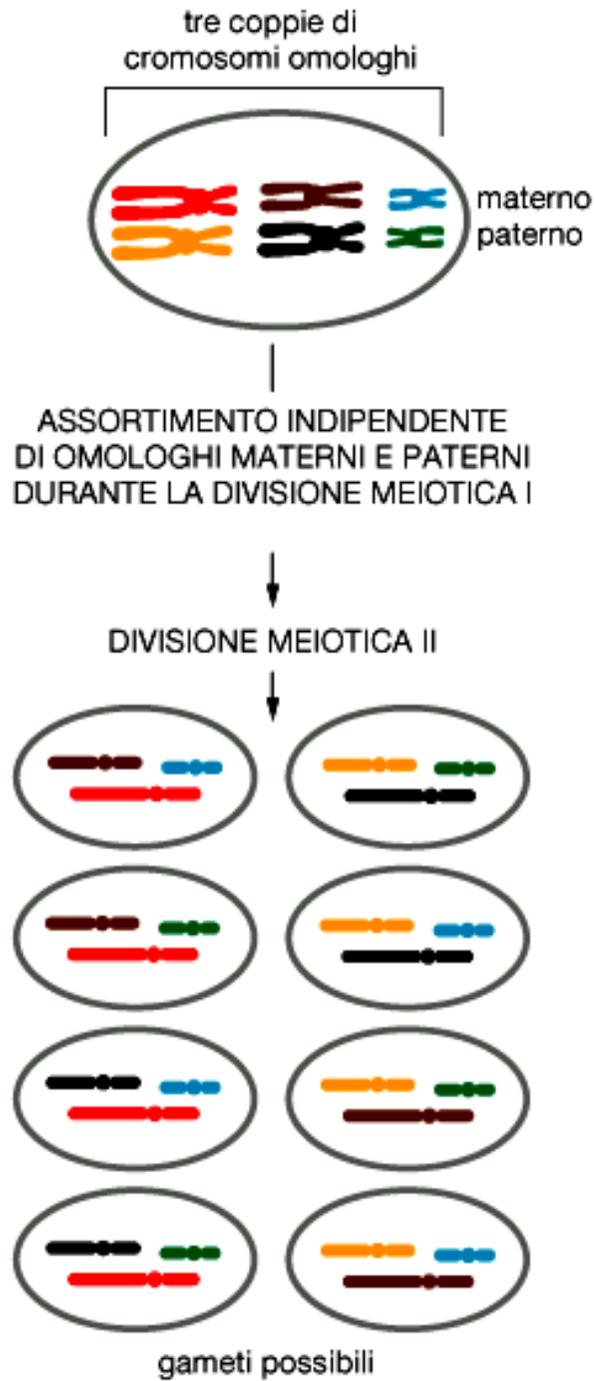
- 2 cellule aploidi (1 set di cromosomi omologhi o paterni o materni)
- 2 n (DNA) ogni cromosoma ha due cromatidi



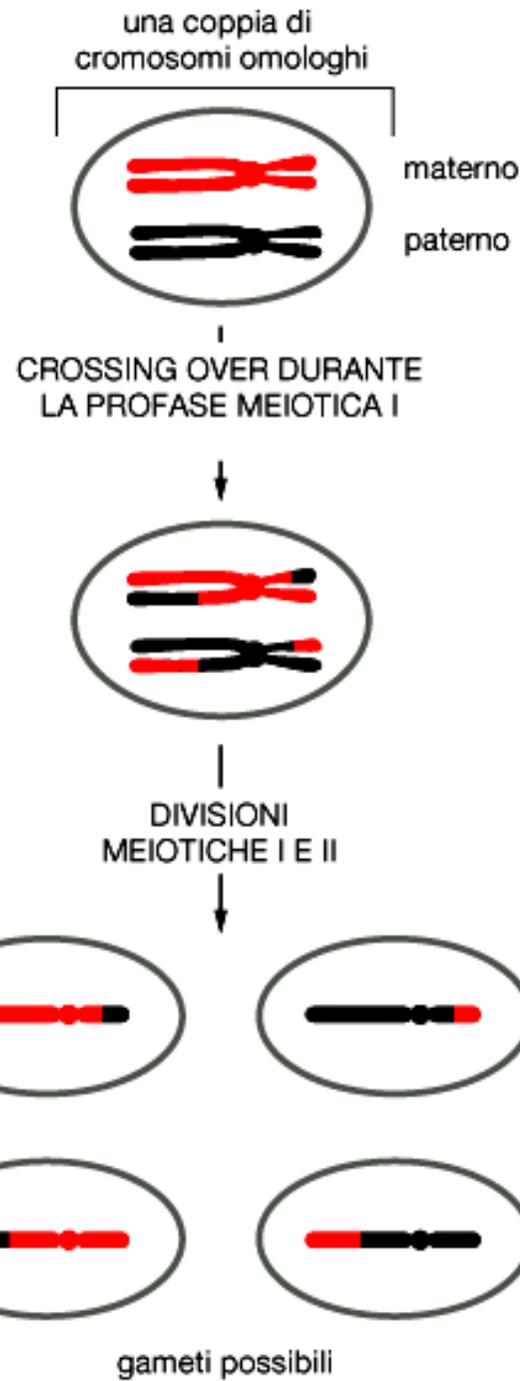
4 cellule
aploidi (1 copia di cromosomi
omologhi o paterni o materni
n DNA

Variabilità nella meiosi

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



(A)



(B)

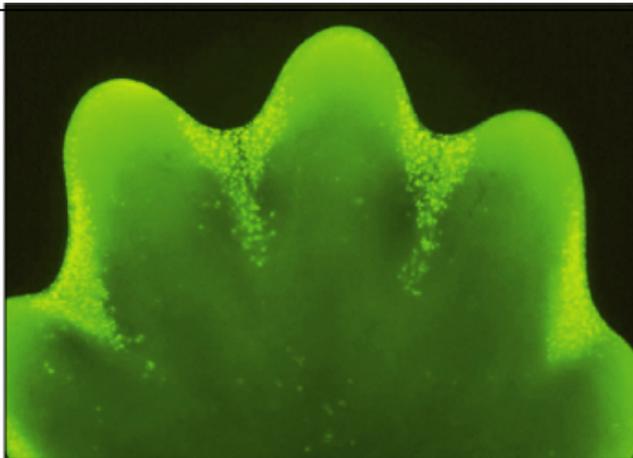
In base al 1° meccanismo di distribuzione casuale, un individuo può in linea di principio produrre 2^n gameti geneticamente diversi, dove n è il numero aploide di cromosomi. Ogni persona, per esempio, può in teoria produrre $2^{23} = 8,4 \times 10^6$ gameti diversi semplicemente per l'assortimento indipendente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

La morte cellulare programmata: apoptosi

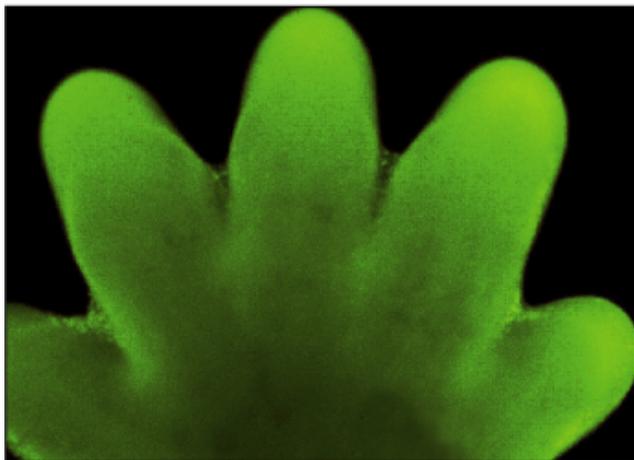
Se delle cellule non sono più necessarie, queste si suicidano attivando un programma intracellulare di morte. Questo processo è perciò chiamato morte cellulare programmata, anche se è chiamato più comunemente apoptosi (la parola greca ptosis significa “cadere”).

Che scopo può avere questa morte cellulare?

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



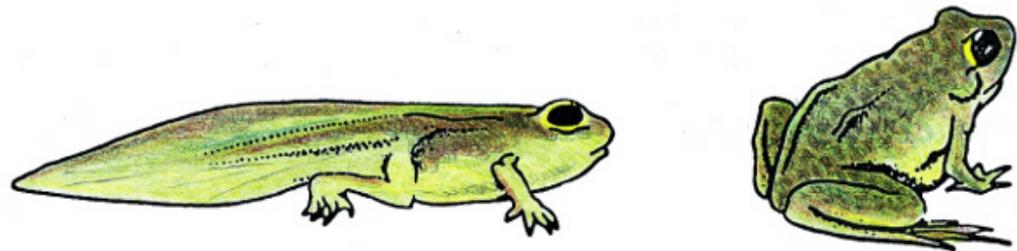
(A)



(B)

1 mm

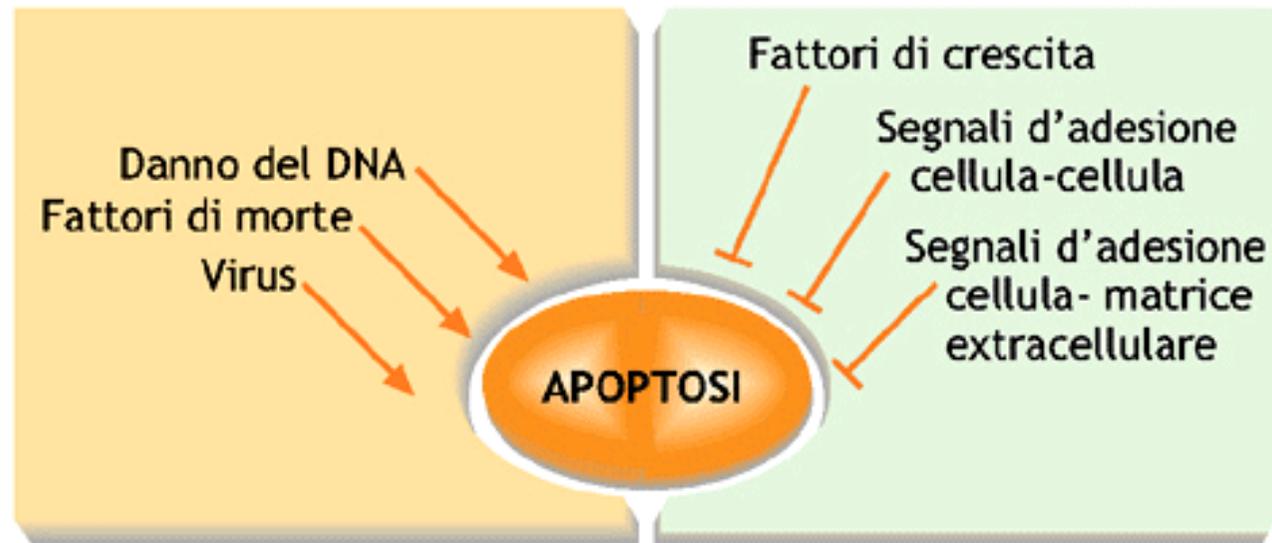
Apoptosi durante la metamorfosi di un girino in una rana



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 cellula 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.

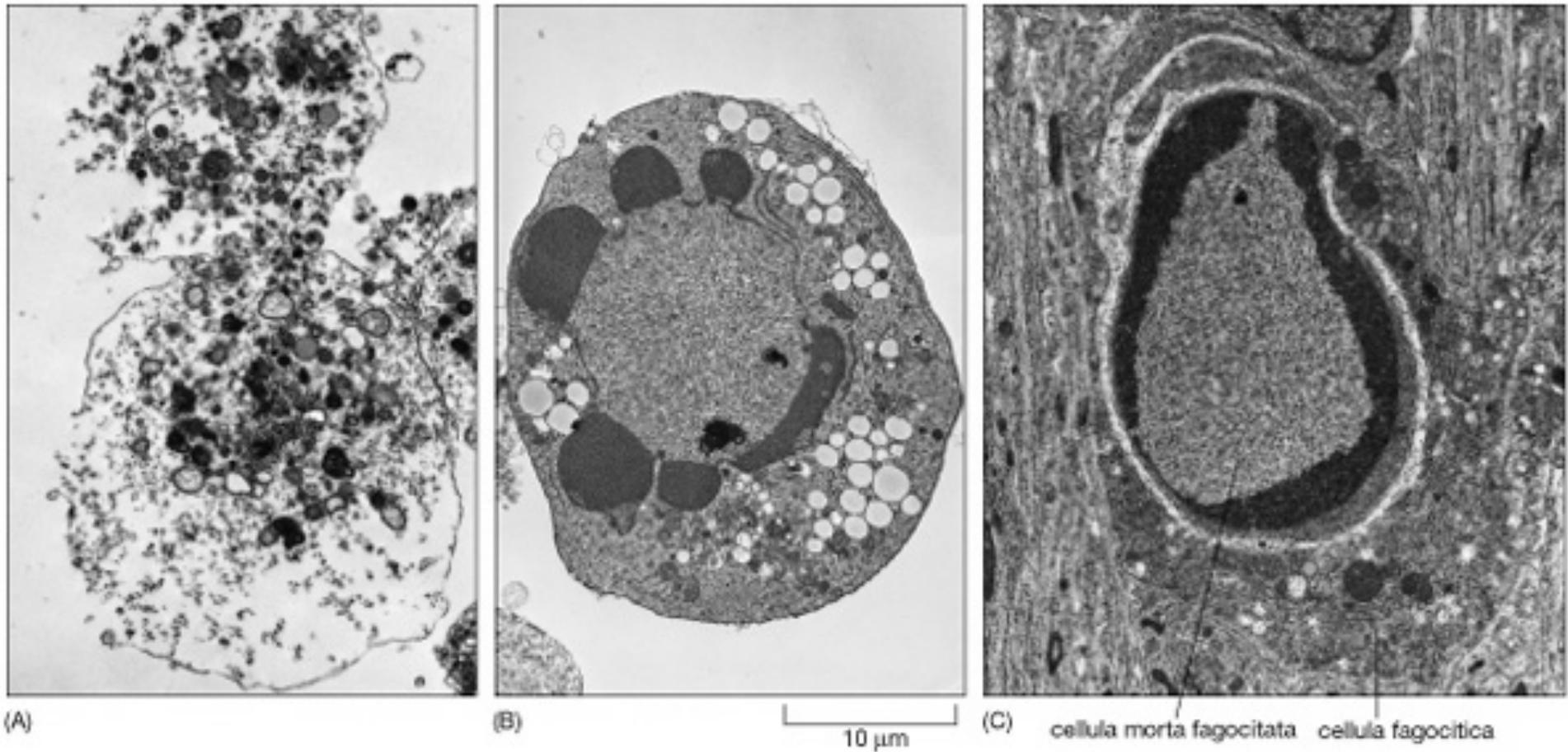
Apoptosi: morte cellulare programmata



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

Necrosi cellulare

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.



Necrosi vs Apoptosi

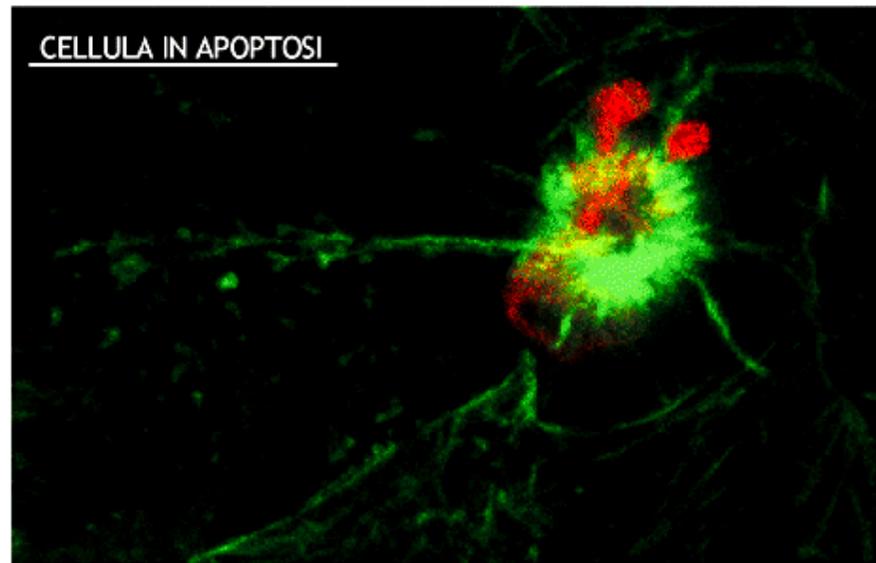
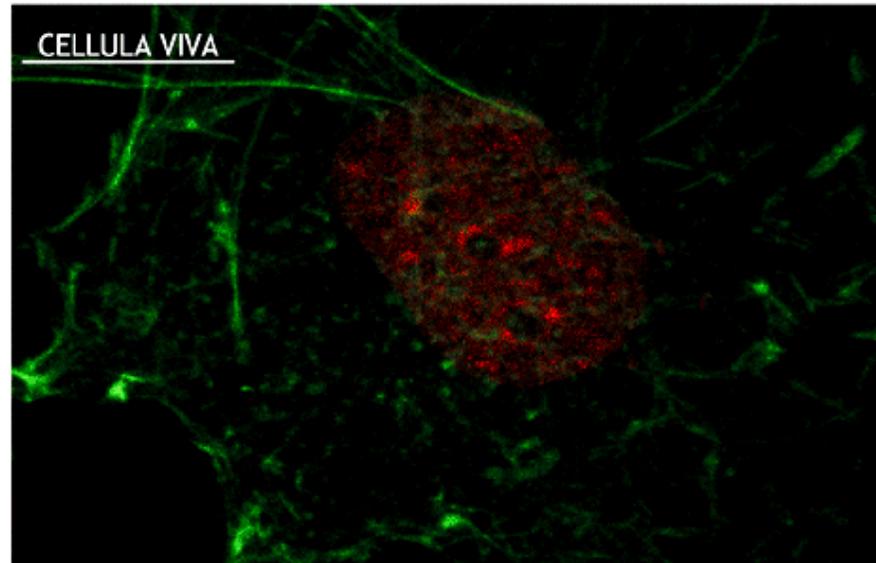
Le cellule che muoiono come risultato di un danno acuto tipicamente si rigonfiano e scoppiano, versando il loro contenuto su tutte le cellule vicine – un processo chiamato necrosi cellulare – provocando una risposta infiammatoria potenzialmente dannosa.

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.

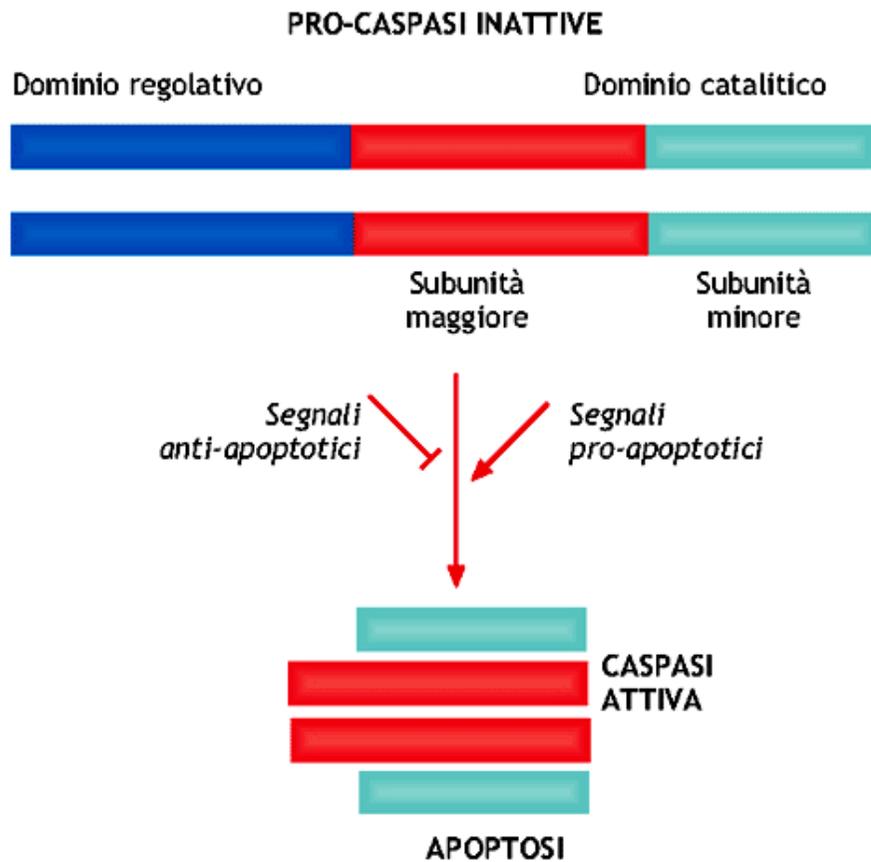
Cosa più importante, la superficie cellulare si altera, mostrando proprietà che causano la rapida fagocitosi della cellula morente, da parte di una cellula circostante o da parte di un macrofago, prima che ci sia una perdita del suo contenuto.

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.

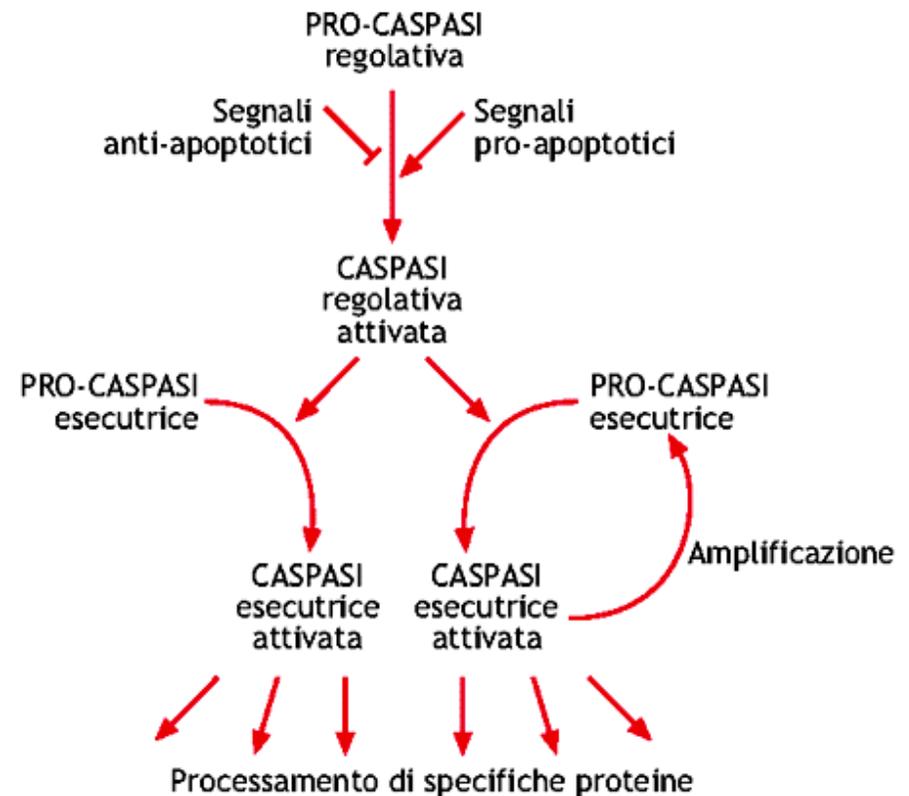


■ **Figura 7.38** Fluorescenza al microscopio confocale di una cellula in apoptosi. In rosso sono colorati i nuclei ed in verde il citoscheletro di actina. Da notare la frammentazione del nucleo e la compattazione del citoplasma nella cellula apoptotica.

Apoptosi: morte cellulare programmata è eseguita dalle 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

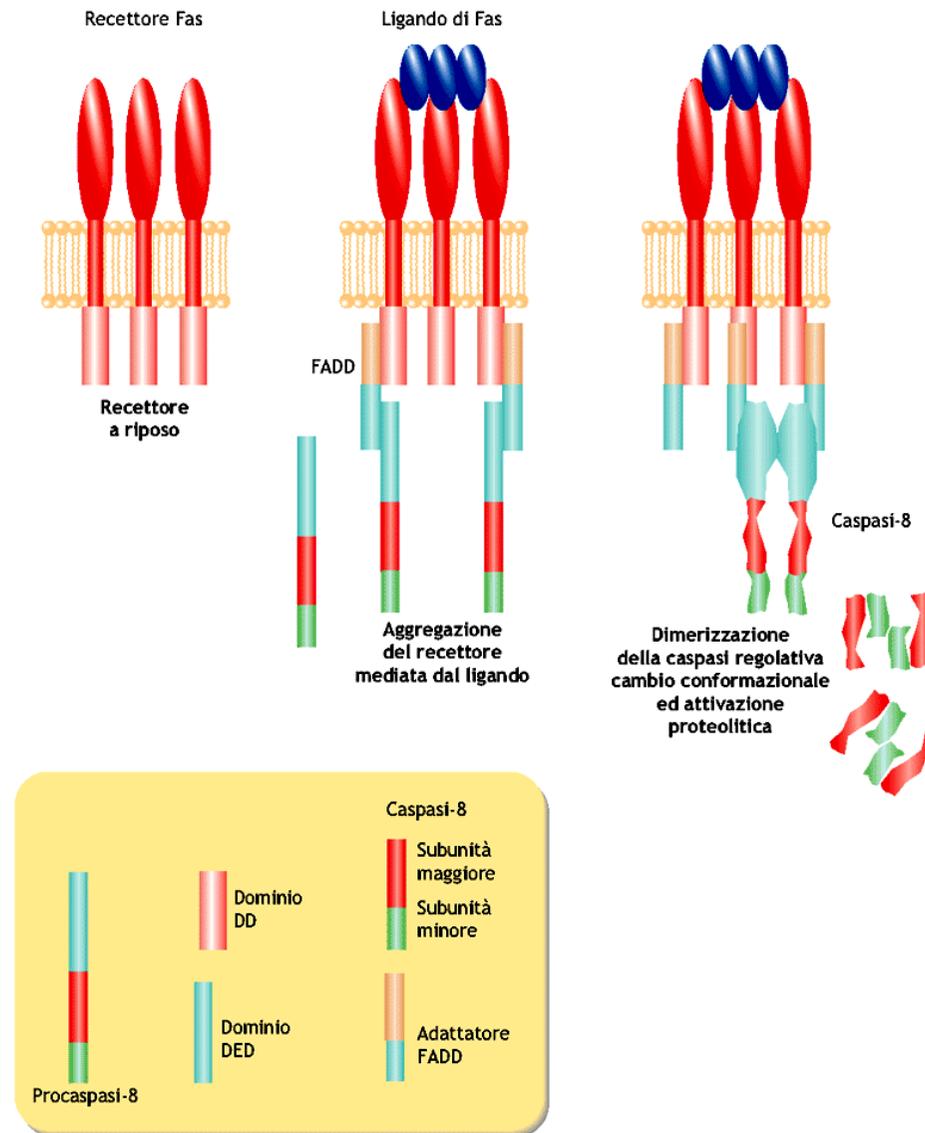
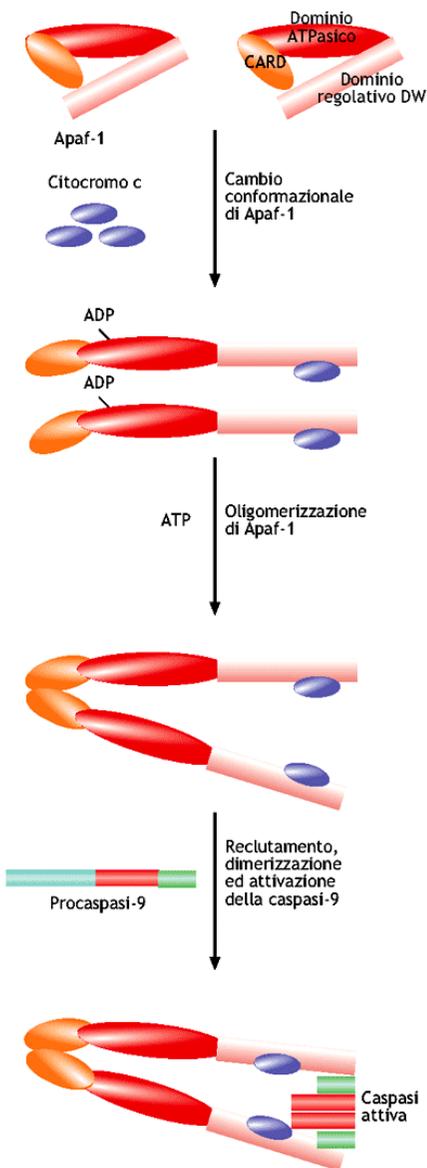
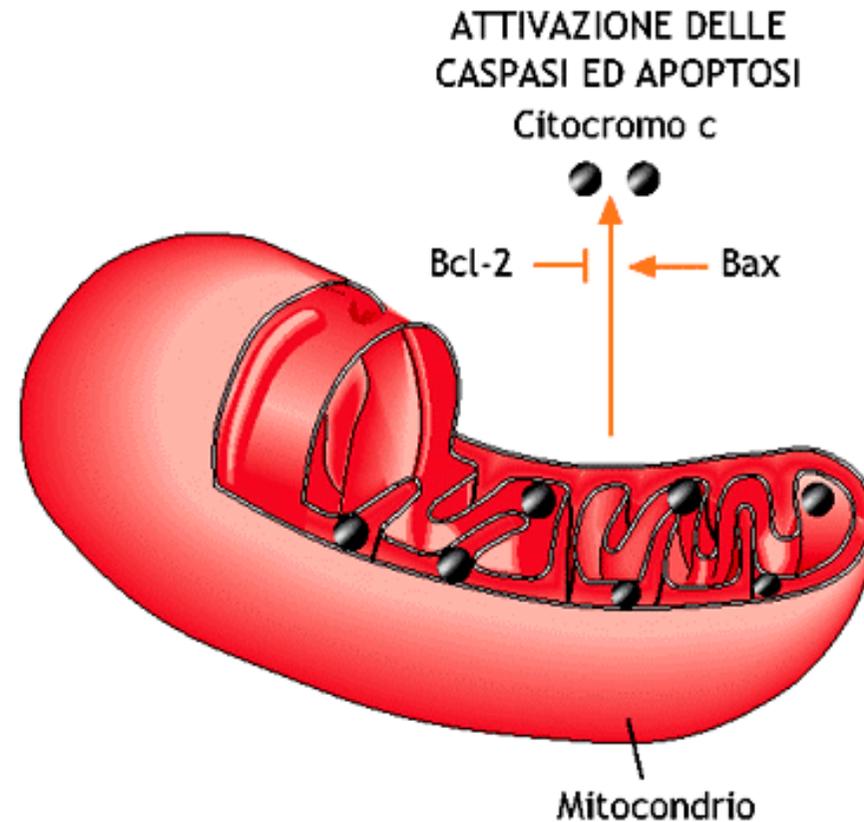


Figura 7.43 Attivazione della caspasi-8 mediata dall'interazione del FasL (ligando) con il FasR (recettore). FasL induce l'aggregazione del recettore, successivamente la proteina FADD si lega al dominio di morte del recettore mediando, a sua volta, il reclutamento del proenzima caspasi-8 presso il recettore, 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'innescò 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



■ **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.