

CORSO DI BIOLOGIA

LIBRI DI TESTO CONSIGLIATI

(aa 2015-2016)

1. Biologia e Genetica

Autori vari, a cura di De Leo G. Ginelli E e Fasano S.

EdiSES

2. L'essenziale di Biologia Molecolare della cellula

Alberts B. Bray D. Hopkin e altri

Zanichelli

3. Chimica Biochimica e Biologia Applicata

Stefani M. Taddei N.

Zanichelli

Corso di laurea in Tecnico di Laboratorio Biomedico

Programma del corso di Biologia (AA 2015-2016)

Ore	Data	Ore di lezione	Argomenti
1	7 ottobre	2	Origine della cellula; Differenze procarioti ed eucarioti; Metodi di laboratorio Componenti chimici della cellula
2			
3	8 ottobre	2	Macromolecole: zuccheri, lipidi Macromolecole: proteine
4			
5	14 ottobre	2	Macromolecole: acidi nucleici Organizzazione dei genomi
6			
7	15 ottobre	2	Organuli - parte 1 Organuli - parte 2
8			

Ore	Data	Ore di lezione	Argomenti
9	21 ottobre	2	Replicazione
10			
11	22 ottobre	2	Trascrizione
12			
13	28 ottobre	2	Traduzione
14			
15	29 ottobre	2	Meiosi e Mitosi Ciclo cellulare
16			

Dott.ssa Ilaria Bononi

LEZIONE 1

COSA STUDIA LA BIOLOGIA

ORIGINI DELLA CELLULE

EVOLUZIONE DELLA CELLULA

DIFFERENZE TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI

COME SI STUDIANO LE CELLULE

COSA STUDIA LA BIOLOGIA?

La **Biologia** studia gli **organismi viventi** che presentano le proprietà fondamentali che sono proprie della vita: la capacità di:

- riprodursi
- crescere (non solo in volume, ma anche differenziandosi)
- reagire
- cambiare e perpetrare le variazioni
- metabolizzare
- morire

Tutti gli **organismi viventi** sono accomunati da

unitarietà biochimica

unitarietà strutturale

un comune background per tutte le basilari reazioni biochimiche

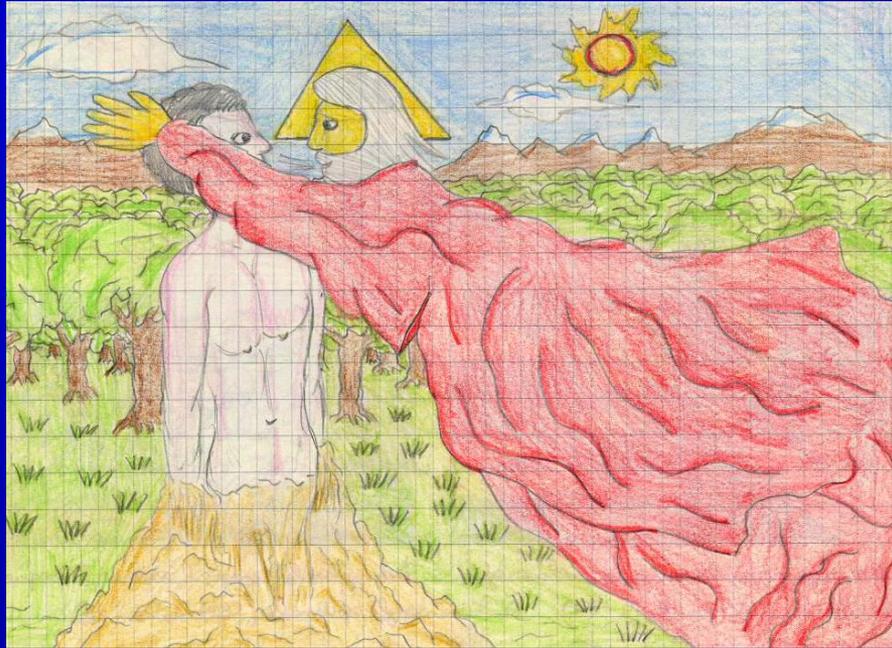
CELLULA



```
graph TD; A[unitarietà biochimica] --> B[un comune background per tutte le basilari reazioni biochimiche]; C[unitarietà strutturale] --> D[CELLULA]; B --- D;
```

ORIGINE DELLA VITA

Il concetto di **origine della vita** è stato trattato fin dall'antichità nell'ambito di diverse religioni e nella filosofia



...ma è diventato tema di **dibattito tra scienza e fede** grazie allo sviluppo di **modelli scientifici** spesso in contrasto con quanto affermato nei testi sacri delle religioni

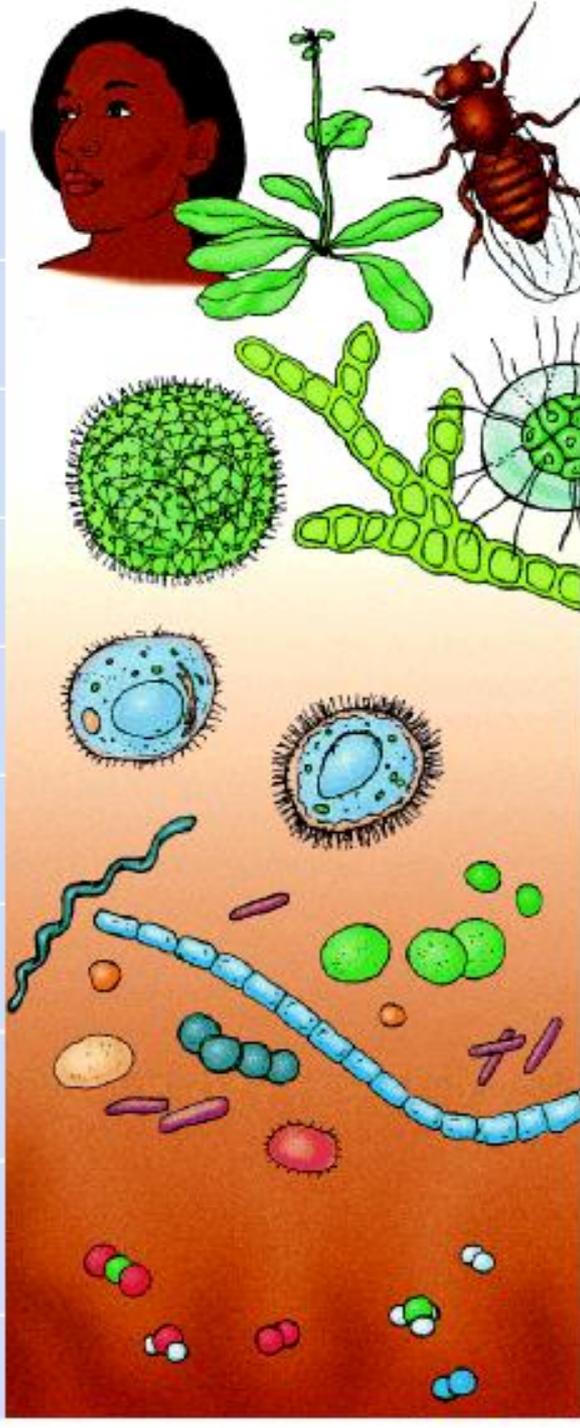
ORIGINI DELLA CELLULA

Scala temporale dell'evoluzione

miliardi di anni fa

Prima incontrovertibile evidenza della vita e dimostrazione dell'attività di fotosintesi

Origine della vita



ORIGINE DELLA VITA

Scienze naturali: **origine della vita**: ricondotta alla
teoria dell'**abiogenesi**

Dal punto di vista scientifico, la spiegazione dell'origine
della vita parte dal presupposto fondamentale che

le prime forme viventi
si originarono da materiale non vivente,

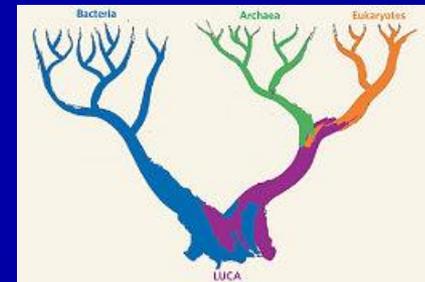
attraverso reazioni che, attualmente, non sono più in
atto sul nostro pianeta.

ORIGINE DELLA VITA

1858: **Teoria dell'evoluzione**

per selezione naturale
elaborata da Wallace e Darwin

Tutte le forme di vita sono legate da relazioni di discendenza comune, attraverso ramificati alberi filogenetici che riconducono ad un unico progenitore

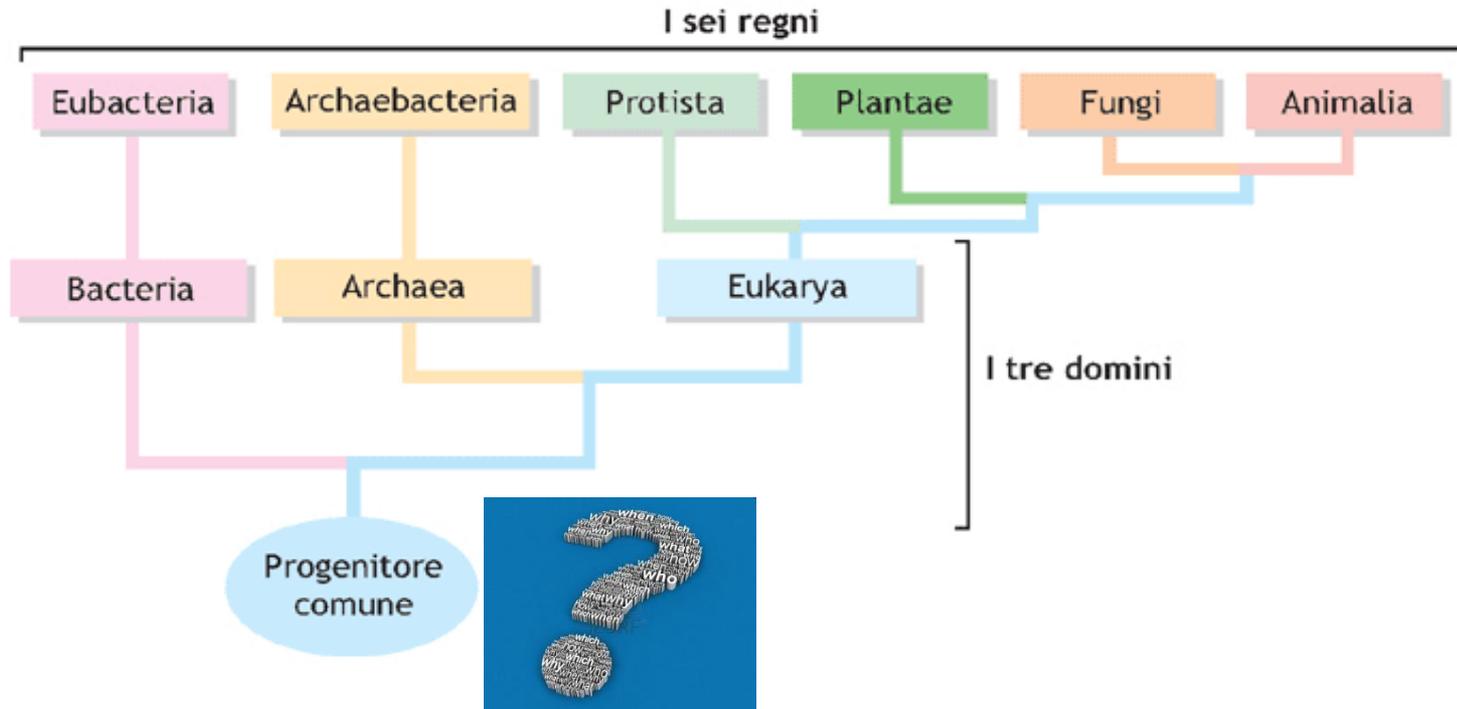


Il problema era capire come si originò questa semplice forma primordiale



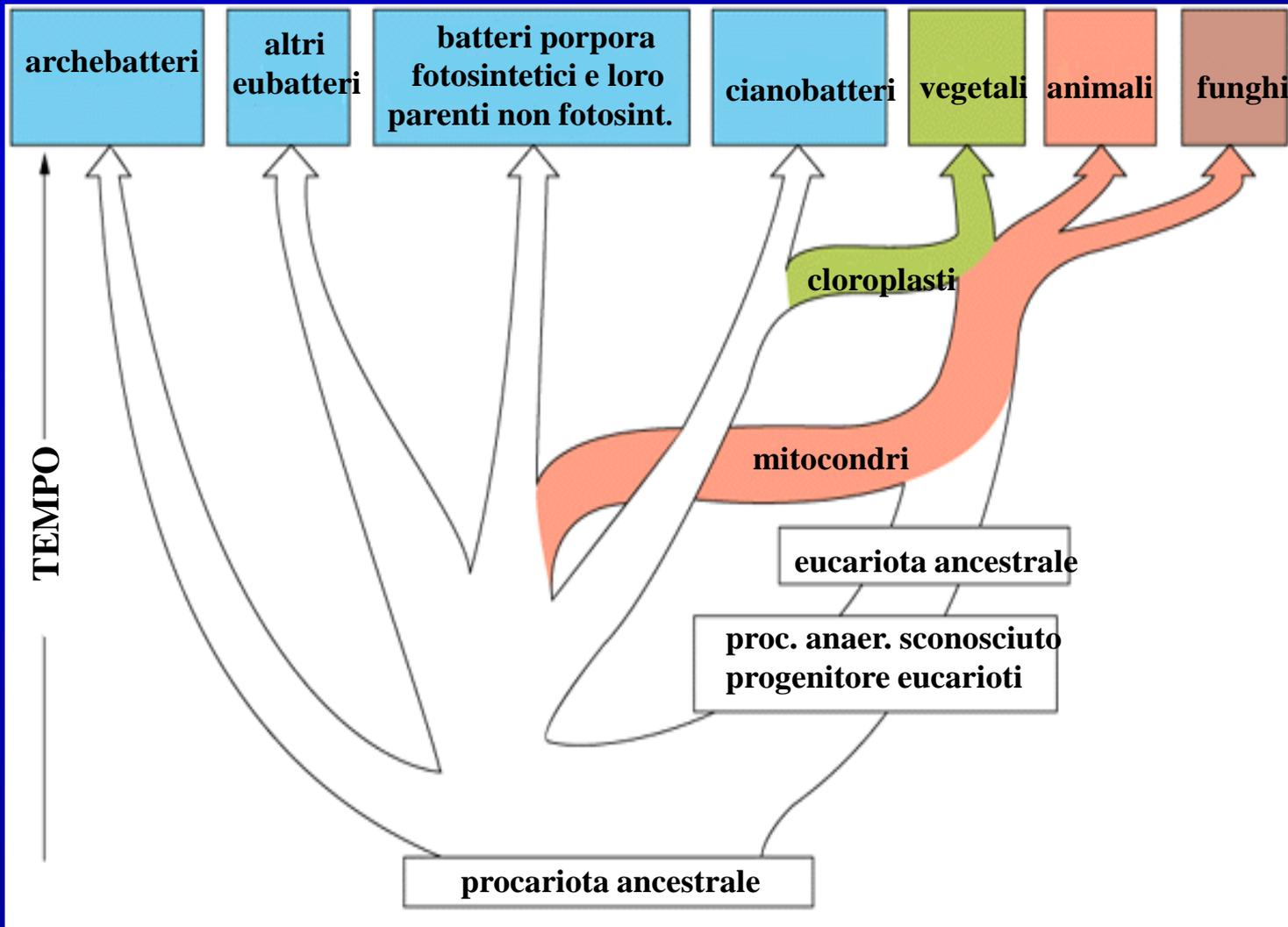
L'EVOLUZIONE DELLA CELLULA

L'albero filogenetico della vita



Gli organismi dei regni correntemente conosciuti sono derivati da un unico progenitore comune

L'EVOLUZIONE DELLA CELLULA



L'albero filogenetico della vita



ORIGINE DELLA VITA

Le sostanze fondamentali da cui si pensa che la vita si sia formata sono:

- Metano (CH_4)
- Ammoniaca (NH_3)
- Acqua (H_2O)
- Acido solfidrico (H_2S)
- Anidride carbonica (CO_2)
- Monossido di carbonio (CO)
- Fosfati (PO_4^{3-})

mentre invece:

- Ossigeno molecolare (O_2)
 - Ozono (O_3)
- } erano entrambi rari o assenti

ORIGINI DELLA CELLULA

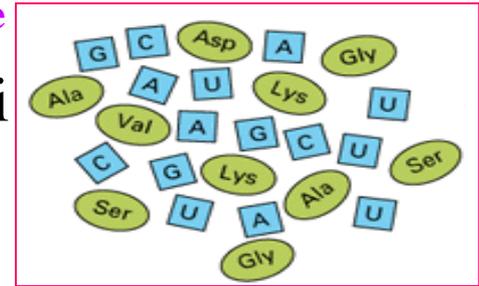
Molecole inorganiche

CO_2 N_2 H_2 H_2S CO

Composti
del C

Prime molecole organiche semplici

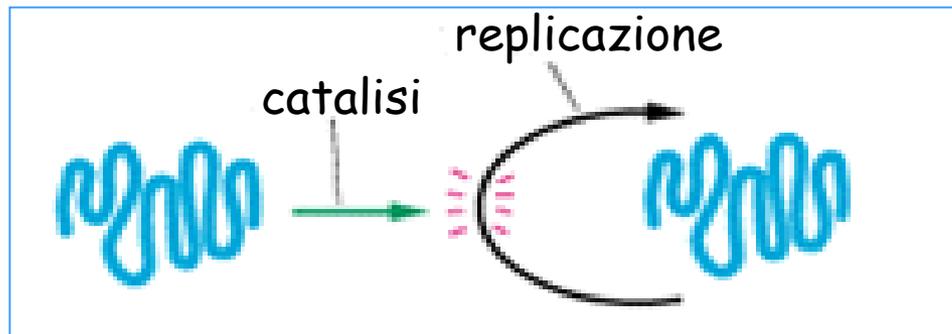
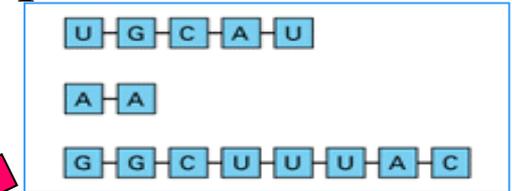
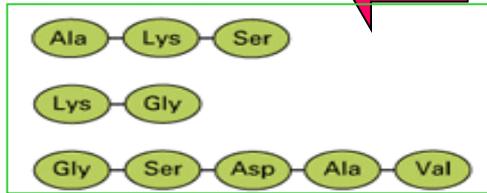
UV
scariche elettriche



polipeptidi

macromolecole

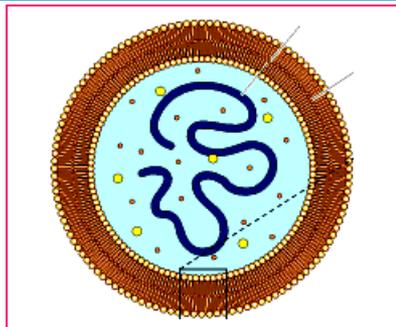
polinucleotidi



RNA autoreplicante

RNA racchiuso da una membrana
composta da fosfolipidi

(prima cellula)



ORIGINE DELLA VITA

Non esiste un modello standard dell'origine della vita.

I modelli attualmente accettati si basano su alcune scoperte circa l'origine delle componenti molecolari e cellulari della vita:

- 1. Monomeri**
- 2. Fosfolipidi**
- 3. Ribozimi autoreplicanti**
- 4. Ribosoma e sintesi proteica**
- 5. Le proteine sono diventate i biopolimeri dominanti**
- 6. Acidi nucleici: limitati ad una funzione genomica**

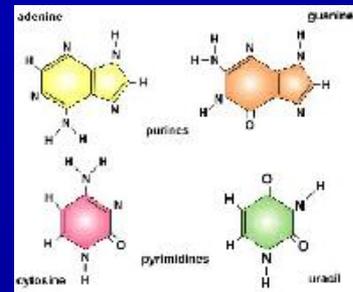
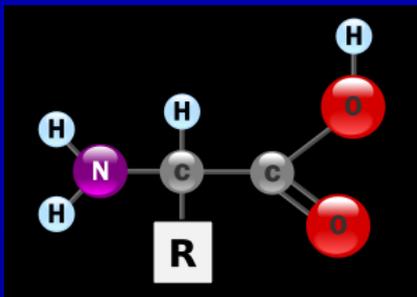
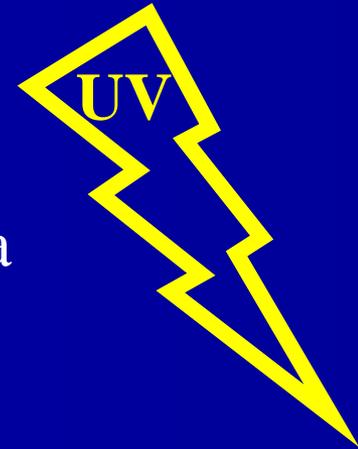
Esistono dubbi sull'esatto ordine cronologico delle tappe 2 e 3

ORIGINE DELLA VITA

Tappa n.1 del modello attualmente accettato dell'origine della vita:

Fu la carenza di O_2 a precedere la catena degli eventi che avrebbe condotto all'evoluzione della vita.

Il catalizzatore delle prime reazioni fu costituito dalla radiazione **UV** la quale, in presenza di O_2 , sarebbe stata prontamente schermata dalla formazione di O_3

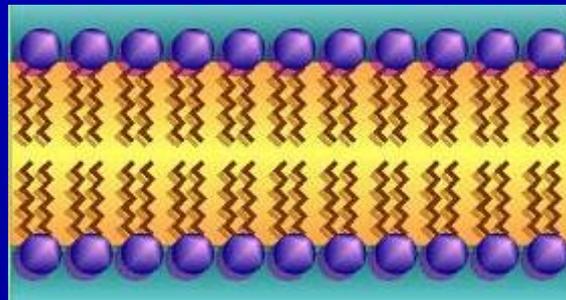


Le condizioni pre-biotiche hanno permesso lo sviluppo dei **monomeri** basilari per la vita, come gli **amminoacidi** e i **nucleotidi** (dimostrato da un esperimento del 1953)

ORIGINE DELLA VITA

Tappa n.2 del modello attualmente accettato dell'origine della vita:

I **fosfolipidi** (se di lunghezza appropriata) possono spontaneamente formare un doppio strato, componente base della **membrana cellulare**.



ORIGINE DELLA VITA

Tappa n.3 del modello attualmente accettato dell'origine della vita:

La **polimerizzazione** di nucleotidi in molecole casuali di RNA potrebbe aver originato i **ribozimi autoreplicanti** (*ipotesi del mondo a RNA*).



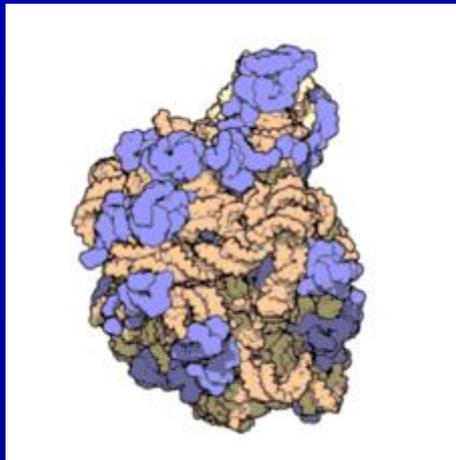
ORIGINE DELLA VITA

Tappa n.4 del modello attualmente accettato dell'origine della vita:

La **sintesi proteica** divenne più prevalente grazie all'origine dei **ribosomi**:

Struttura: complessi formati da oligopeptidi e molecole di RNA

Funzione: ribozimi dotati di attività peptidil transferasica



ORIGINE DELLA VITA

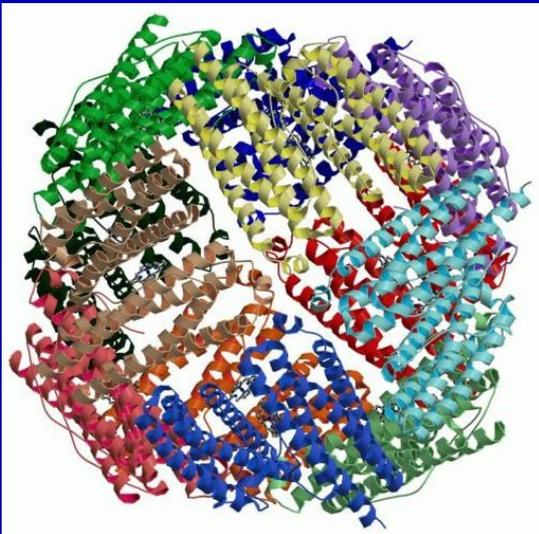
Tappa n.5 del modello attualmente accettato dell'origine della vita:

Le **proteine** hanno superato i ribozimi per abilità catalitica, divenendo quindi i biopolimeri dominanti



Tappa n.6 del modello attualmente accettato dell'origine della vita:

Gli **acidi nucleici** sono stati limitati ad una funzione prettamente genomica



ORIGINI DELLA CELLULA

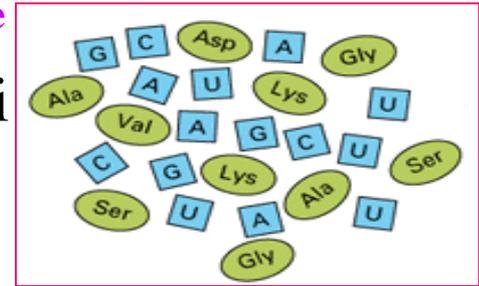
Molecole inorganiche

CO_2 N_2 H_2 H_2S CO

Composti
del C

Prime molecole organiche semplici

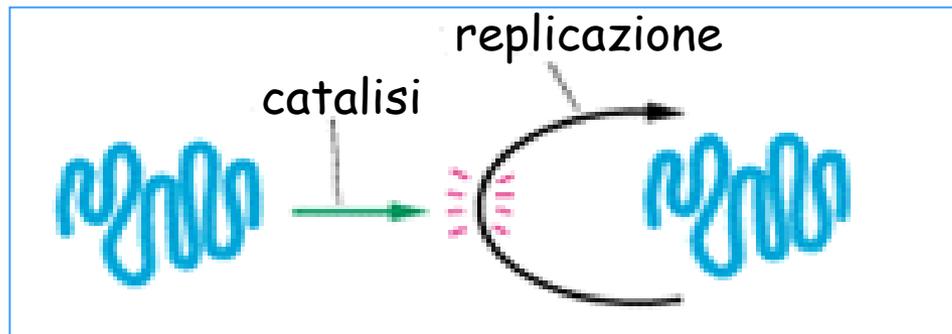
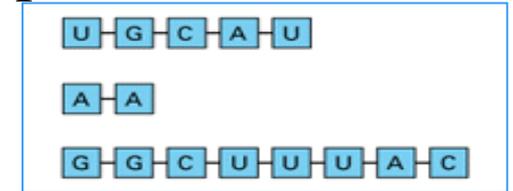
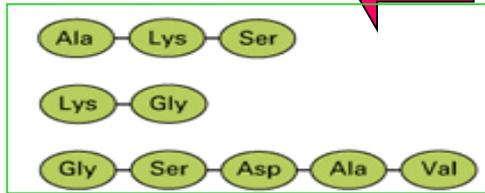
UV
scariche elettriche



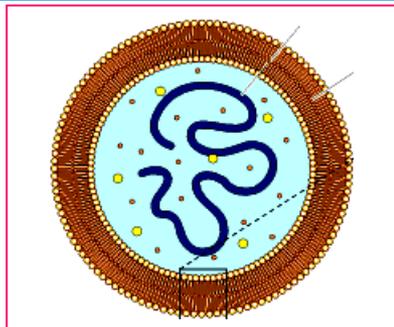
polipeptidi

macromolecole

polinucleotidi



RNA autoreplicante

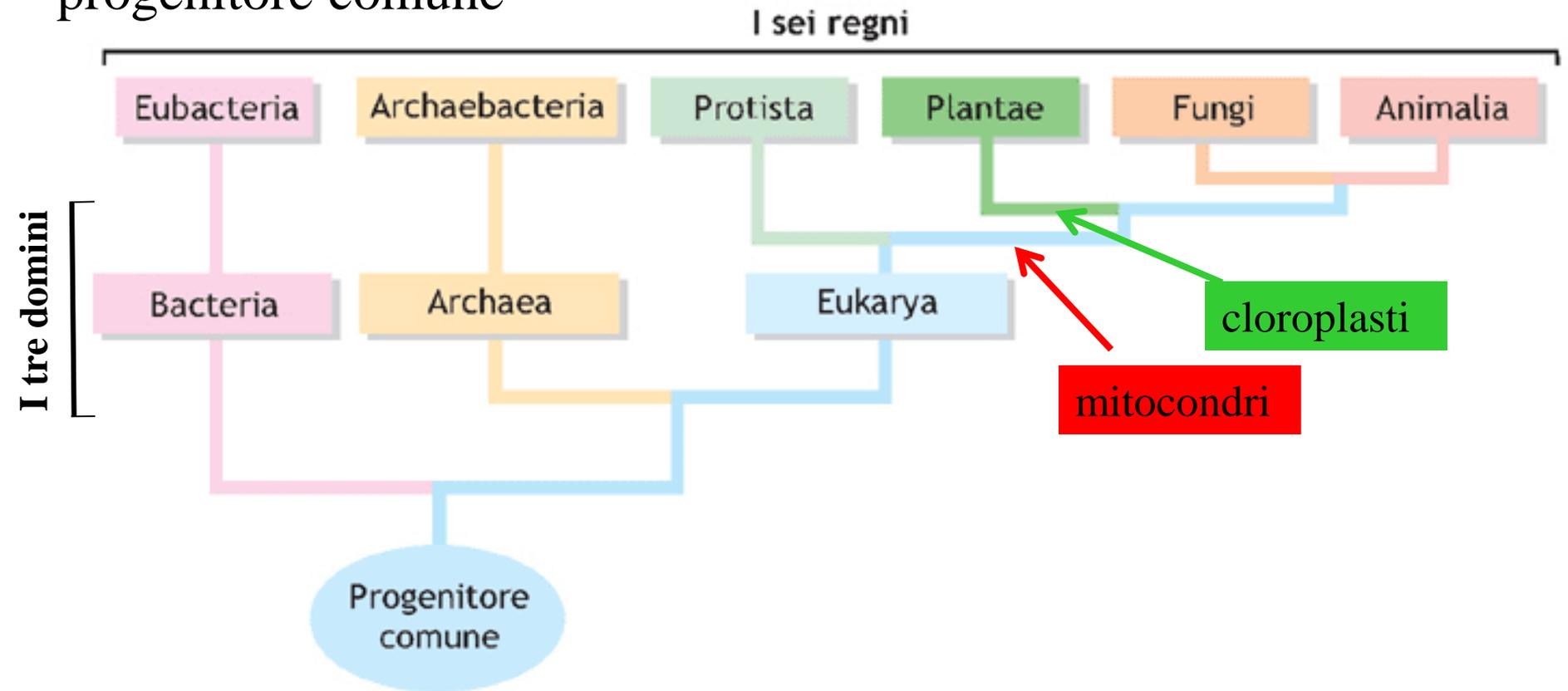


RNA racchiuso da una membrana
composta da fosfolipidi

(prima cellula)

EVOLUZIONE DELLA CELLULA

Tutti gli organismi sono derivati per divergenza da un unico progenitore comune

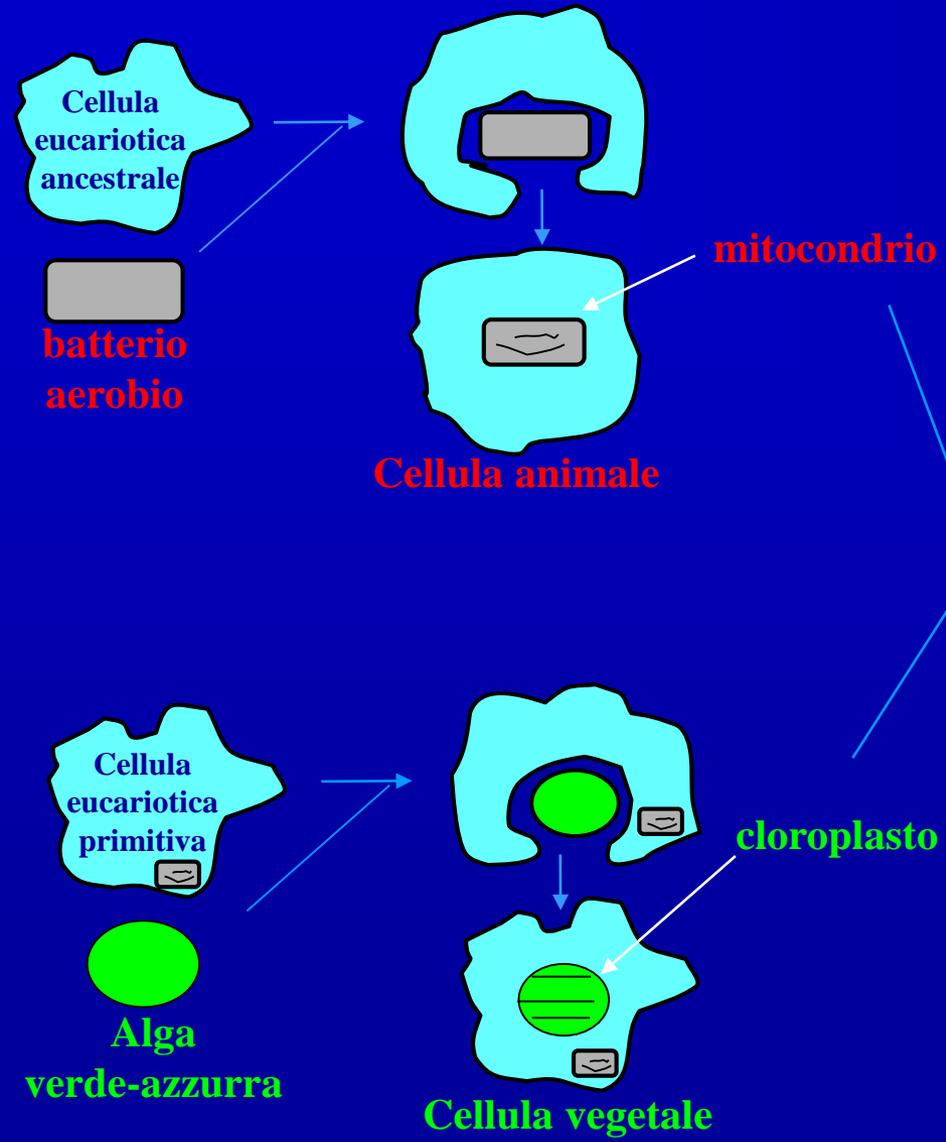


Le genealogie **eucariotica**, **batterica** ed **archebatterica** cominciarono a divergere tra loro molto precocemente nella storia evolutiva della vita sul nostro pianeta. Molto più tardi gli eucarioti acquisirono i **mitocondri** (sono gli stessi in piante, funghi e animali)

Più tardi ancora un sottoinsieme di eucarioti acquisì i **cloroplasti**

EVOLUZIONE DELLA CELLULA: DAI PROCARIOTI AGLI EUCARIOTI

TEORIA SIMBIONTICA: le cellule eucariotiche si sono evolute da una associazione simbiotica di procarioti –**endosimbiosi**; mitocondri e cloroplasti si pensa si siano evoluti dai batteri.



- Simili ai batteri per dimensioni
- come i batteri si riproducono dividendosi in due
- contengono un DNA proprio, che codifica alcuni dei loro componenti
- Il DNA dei mitocondri e dei cloroplasti si replica ogni volta che l'organello si divide e i geni che codificano sono trascritti all'interno dell'organello e tradotti da ribosomi dell'organello
- contengono sistemi genetici propri che sono distinti dal genoma nucleare della cellula
- ribosomi ed RNA ribosomali di questi organelli sono correlati strettamente a quelli dei batteri

L'origine e l'evoluzione delle cellule

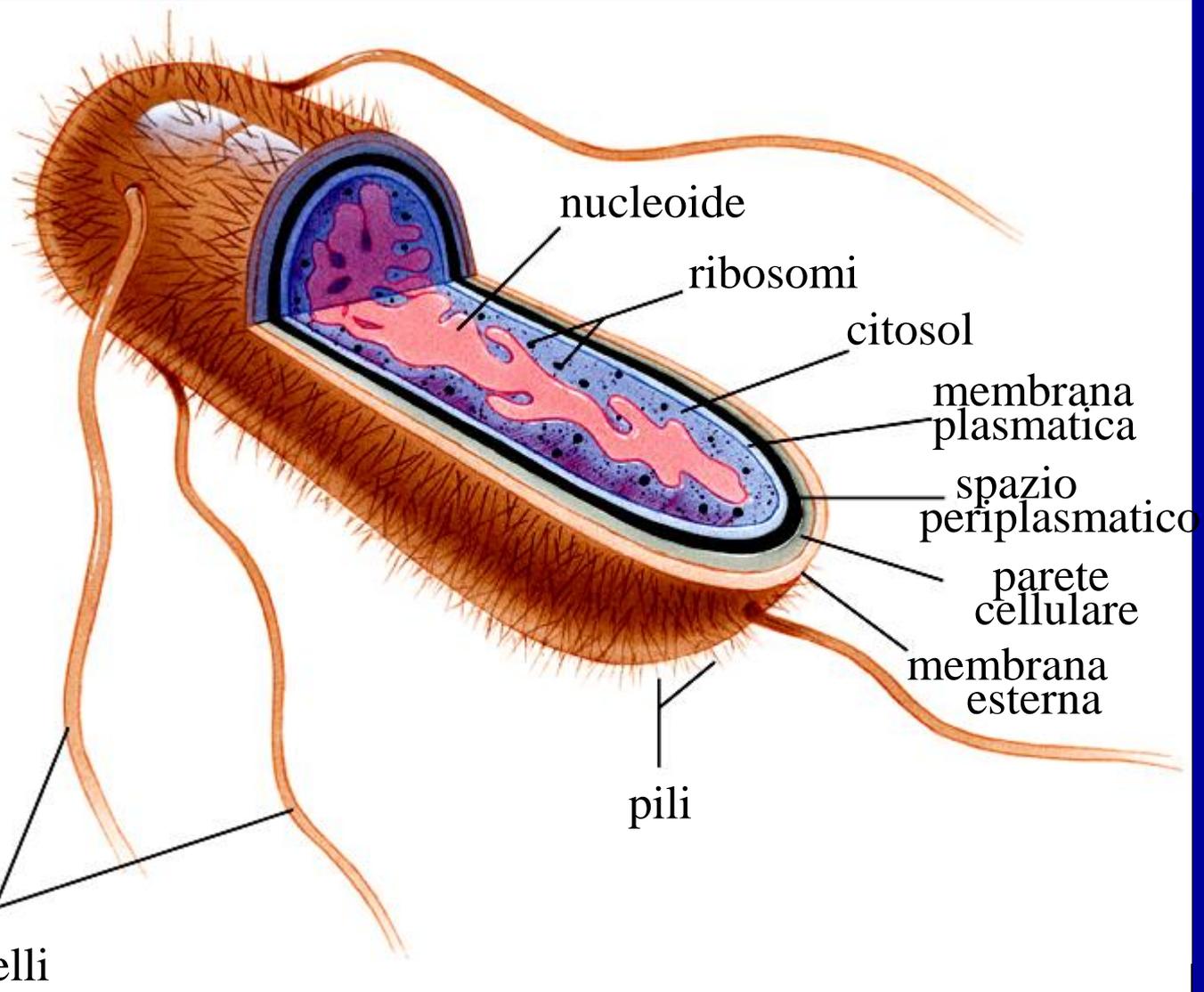
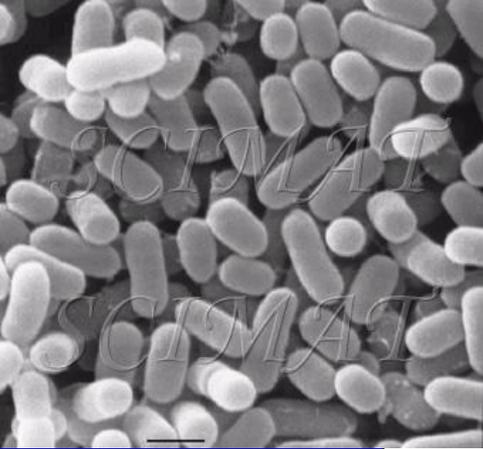
Le cellule si dividono in due classi principali, definite in prima istanza in base alla presenza o meno del nucleo:

1. **Cellule procariotiche** (batteri): sono prive di una membrana nucleare.
2. **Cellule eucariotiche**: hanno un nucleo in cui il materiale genetico resta separato dal citoplasma.

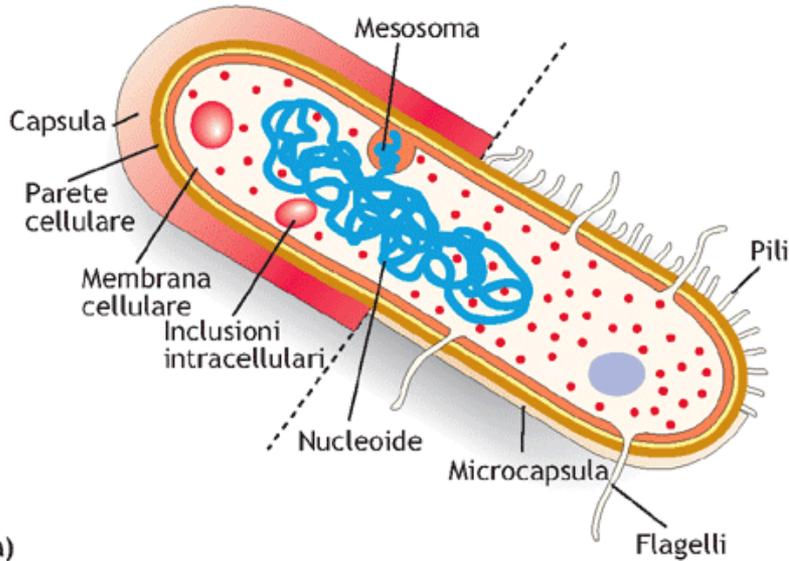
EVOLUZIONE DELLA CELLULA: DAI PROCARIOTI AGLI EUCARIOTI

	<i>PROCARIOTI</i>	<i>EUCARIOTI</i>
Organismi	batteri e cianobatteri	protisti, funghi, piante e animali
Dimensioni cellulari lineari	da 1 a 10 μm	da 5 a 100 μm
Metabolismo	anaerobio o aerobio	aerobio
Organelli	pochi o nessuno	nucleo, mitocondri, cloroplasti, reticolo endoplasmatico, ecc.
DNA	DNA circolare nel citoplasma	molecole molto lunghe di DNA lineare contenenti molte regioni non codificanti; circondate da un involucro nucleare
RNA e proteine	RNA e proteine sintetizzate nello stesso compartimento	RNA sintetizzato ed elaborato nel nucleo; proteine sintetizzate nel citoplasma
Citoplasma	assenza di citoscheletro; niente flussi citoplasmatici, endocitosi e esocitosi	citoscheletro composto da filamenti proteici; flussi citoplasmatici; endocitosi e esocitosi
Divisione cellulare	cromosomi separati mediante attacco alla membrana plasmatica	cromosomi separati da un fuso di citoscheletro
Organizzazione cellulare	in genere unicellulare	in genere multicellulare, con differenziamento di molti tipi cellulari

La cellula procariota



CELLULA PROCARIOTICA



Parete cellulare: composta da peptidoglicano (zuccheri insoliti e corte unità polipeptidiche) gram+: monostrato; gram-: peptidoglicano fra 2 membrane fosfolipidiche

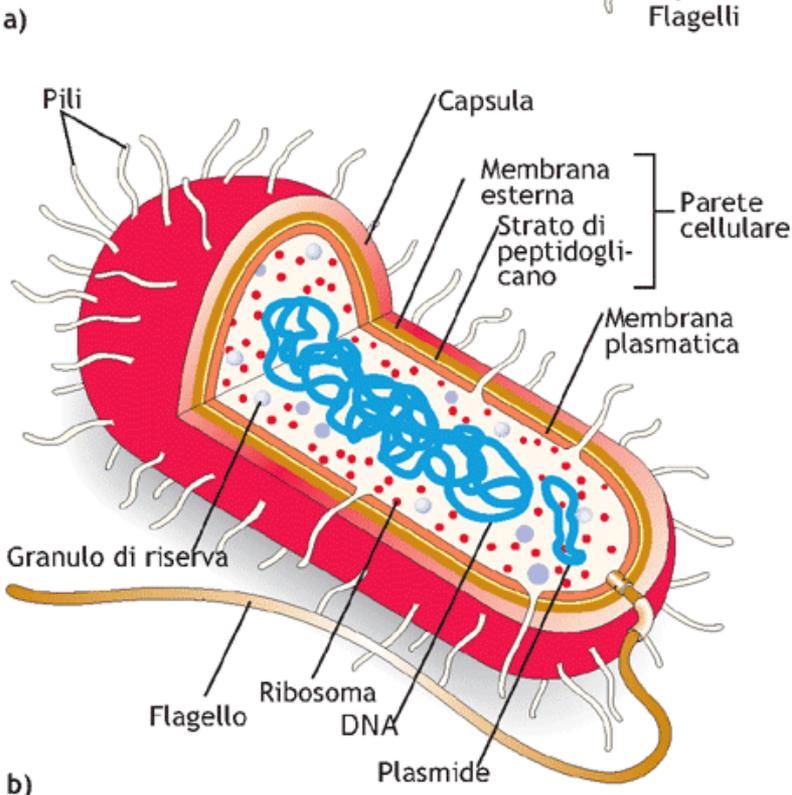
Citoplasma: privo di compartimenti interni, rappresenta l'unità dove si svolgono tutte le funzioni vitali; il DNA, gli enzimi, i ribosomi e gli altri costituenti cellulari sono liberi nel citoplasma

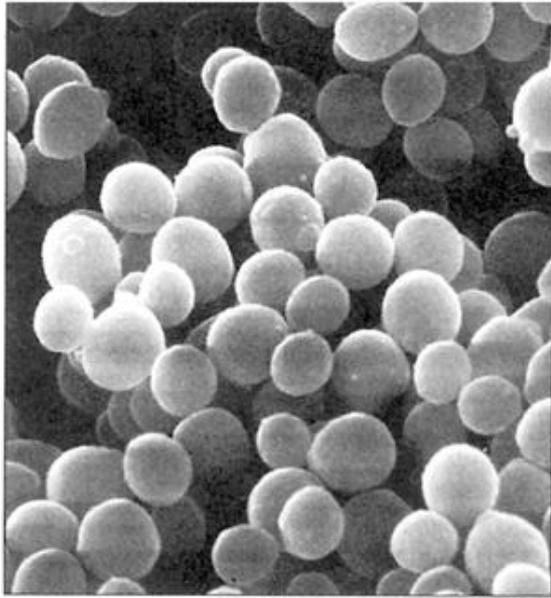
Nucleoide: zona del citoplasma dove si colloca il DNA (singolo cromosoma circolare)

Capsula: strato gelatinoso composto da polisaccaridi
Membrana plasmatica: funzioni: separazione fisica, trasporto, funzioni di alcuni organuli degli eucarioti: es. il DNA duplicato si lega alla membrana in 2 punti lontani assicurando che le cellule figlie contengano una delle 2 unità identiche del DNA

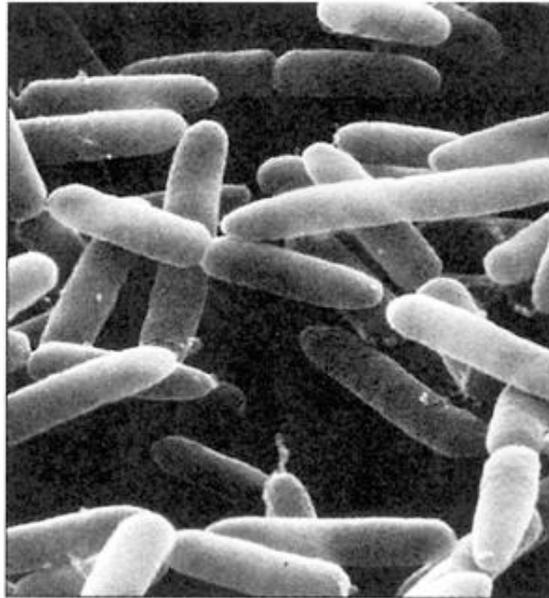
Flagelli: strutture utilizzate per la locomozione

Pili: strutture filamentose coinvolte nel processo di coniugazione

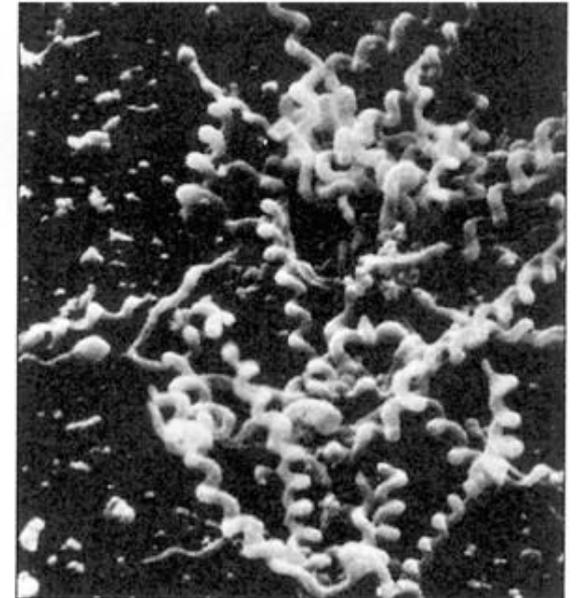




1,0 μm



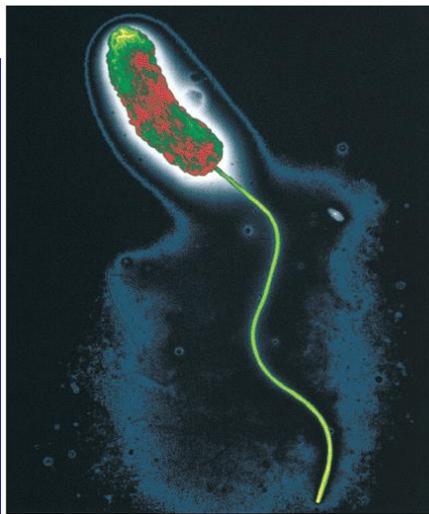
3,0 μm



2,0 μm

Figura 2.8 I batteri hanno forme e dimensioni diverse. Vari tipi di cellule batteriche viste al microscopio elettronico a scansione (SEM): cocci, sferici; bacilli, a forma di bastoncini; spirilli, batteri a spirale provvisti di flagelli alla estremità.

Vibrio Cholerae,
dotato di
flagello



Microscopio
contrasto di fase,
Treponema pallidum,
spirocheta che
provoca la sifilide



La cellula eucariotica

Membrana nucleare

Pori nucleari

Nucleo

Nucleolo

Mitocondri

Citoscheletro

Ribosomi

Apparato del Golgi

Lisosomi

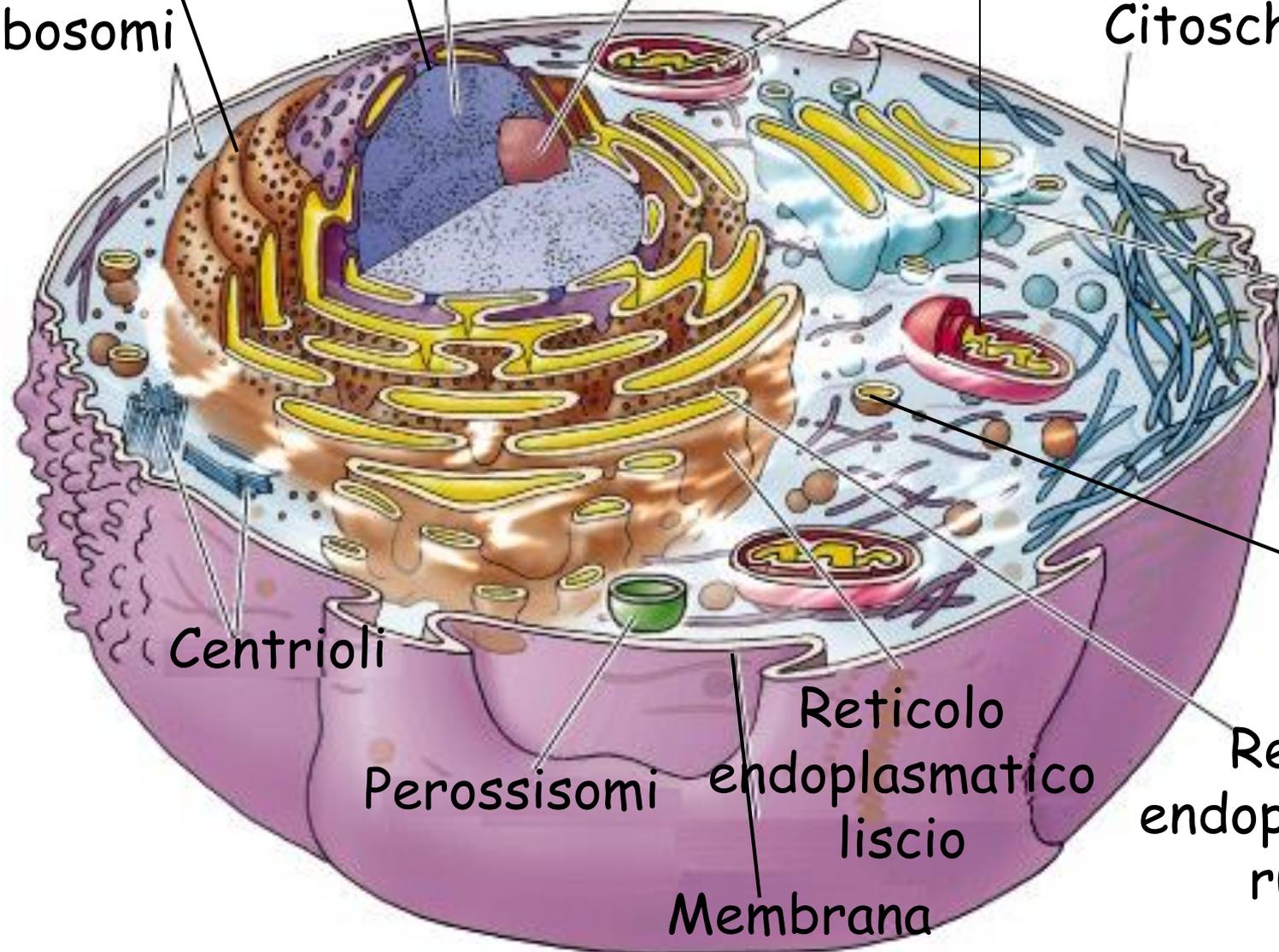
Centrioli

Perossisomi

Reticolo endoplasmatico liscio

Reticolo endoplasmatico rugoso

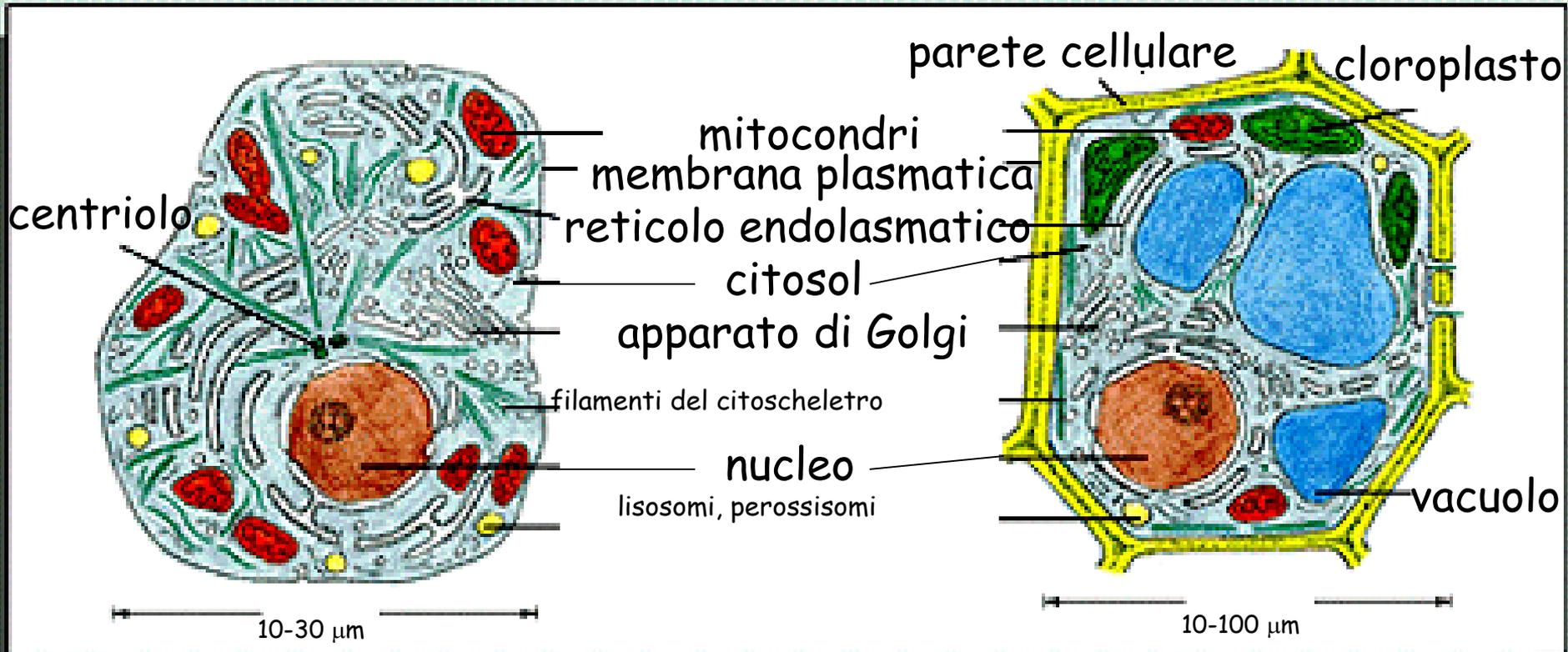
Membrana citoplasmatica



La cellula eucariotica

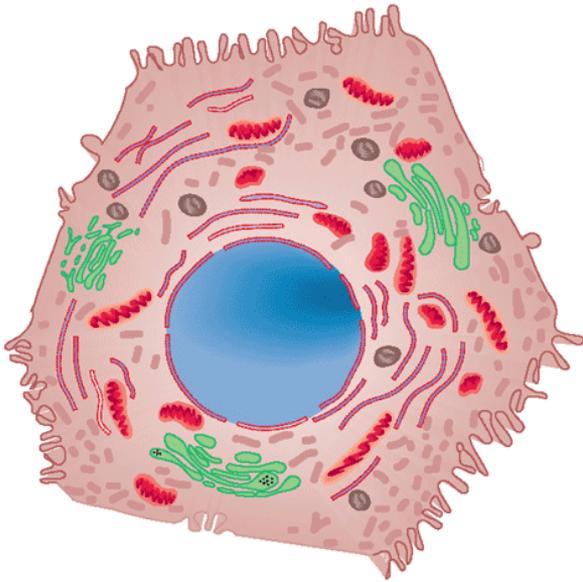
CELLULA ANIMALE

CELLULA VEGETALE

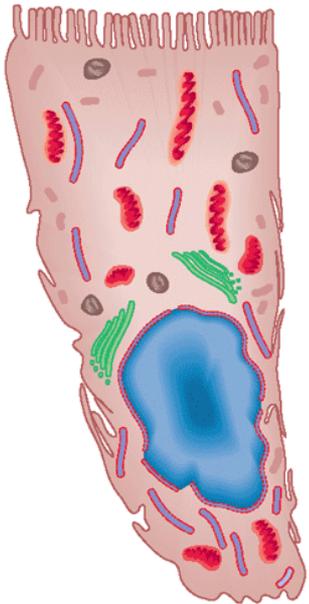
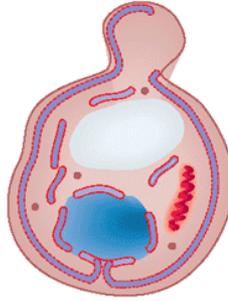


Organismi pluricellulari: differenziamento

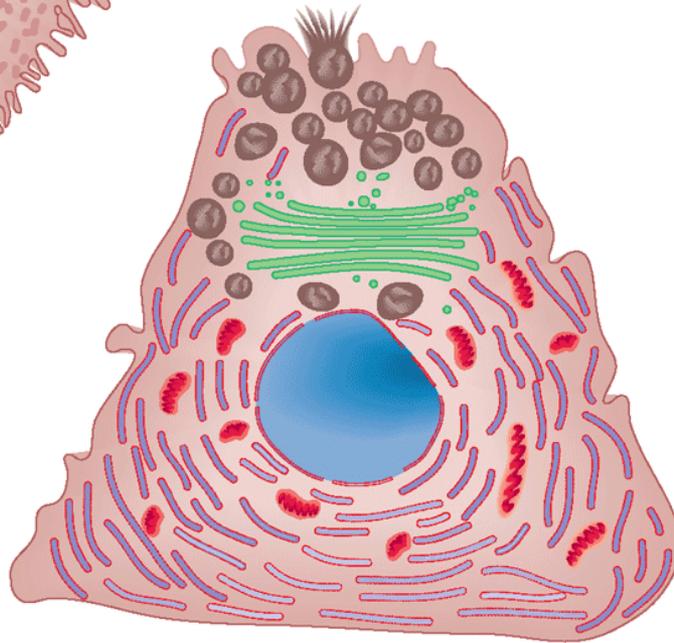
a) Cellula epatica



d) *Saccaromices cerevisiae*



b) Cellula intestinale



d) Cellula pancreatica

Le forme delle cellule possono essere le più svariate. Qui è sono rappresentate alcune tra le tante forme di cellule eucariotiche

COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

MICROSCOPIA



CELLULE

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

Southern

Northern

ACIDI NUCLEICI

Western

SDS page

PROTEINE

Immunoistochimica

Le cellule come modelli sperimentali

Alcuni tipi cellulari ed organismi, in base alle loro peculiarità, sono utilizzati più frequentemente come modelli sperimentali per studiare:

biologia cellulare / biologia molecolare / biochimica / genetica molecolare

Per la loro semplicità le cellule procariotiche sono modelli ideali per studiare alcuni aspetti fondamentali della biochimica e della biologia molecolare. In particolare, *Escherichia coli*, è la specie batterica più studiata.

E. coli. La maggior parte delle nostre conoscenze di biologia molecolare derivano infatti da studi condotti su questo batterio:

Replicazione, codice genetico, trascrizione, sintesi proteica

Genoma a doppio filamento, circolare, lungo 4,6 milioni di pb (completamente sequenziato nel 1997), 4000 **geni espressi**.

Cresce rapidamente (ogni 20' si divide) e in modo clonale (da una cellula iniziale si ottiene una popolazione di cellule tutte identiche) permettendo l'isolamento di **colonie** su terreno solido contenente agar



Le cellule come modelli sperimentali

Cellule eucariotiche

Lieviti

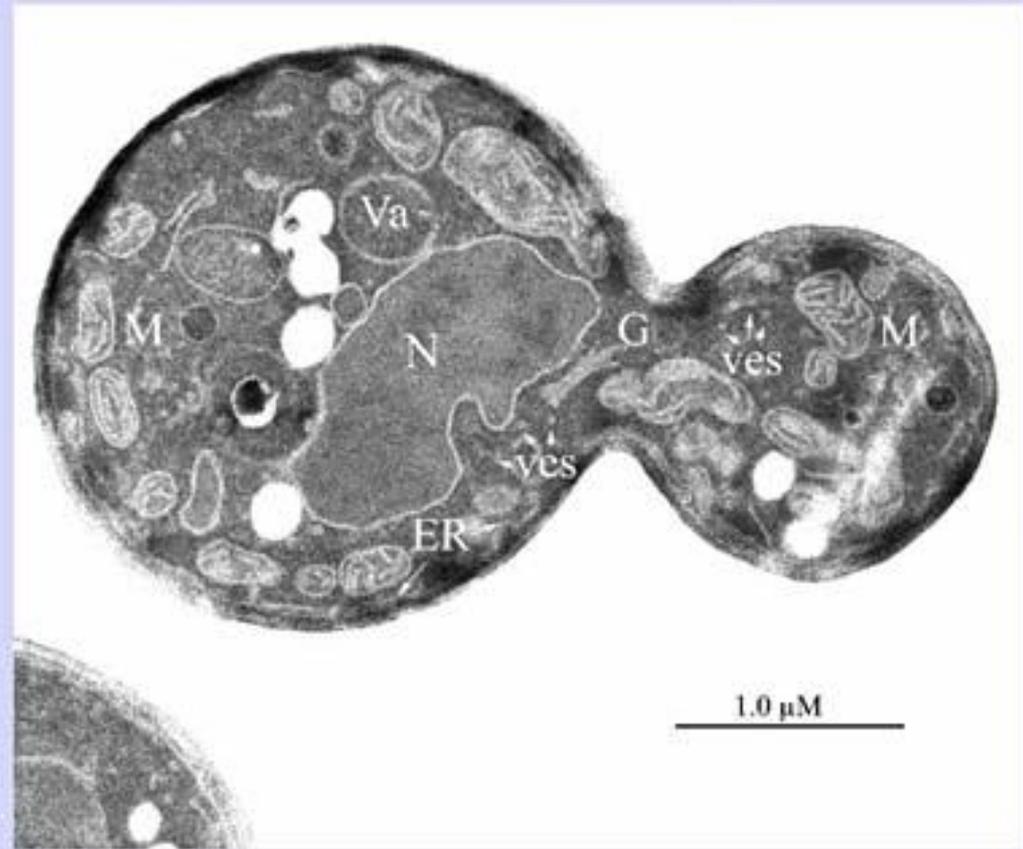
i più semplici eucarioti, unicellulari

Utilizzati per studiare gli aspetti riguardanti la struttura cellulare interna e quelle funzioni che sono uniche delle **cellule eucariotiche** (biologia cellulare e molecolare).

Genoma, 12 milioni di pb;
6000 circa **geni espressi**;
16 **cromosomi** lineari

Si coltiva facilmente,
si divide ogni due ore
e può essere coltivato in maniera
clonale.

Saccharomyces cerevisiae

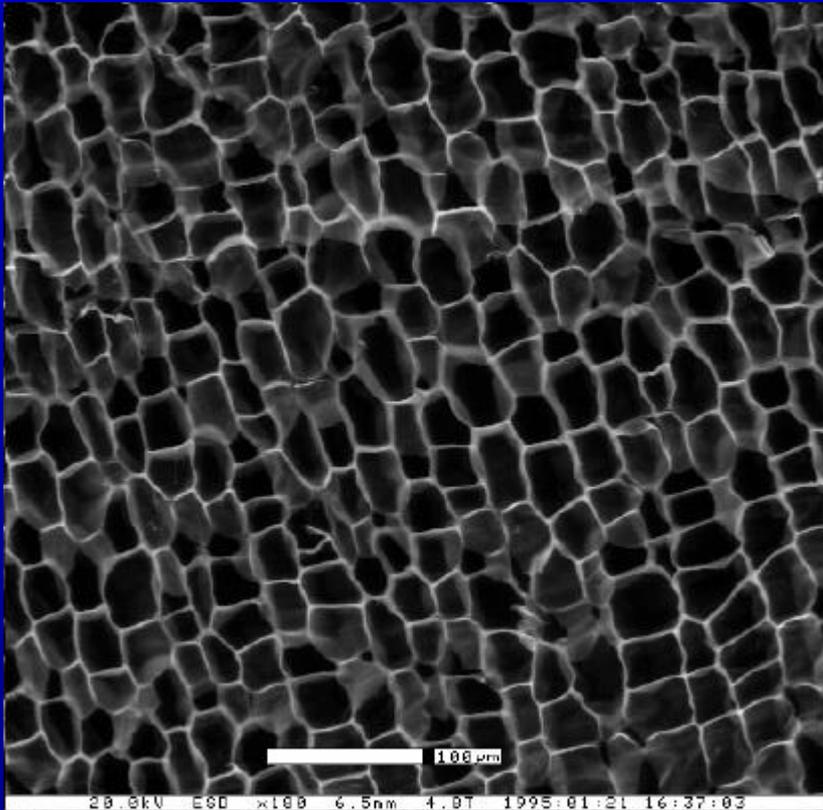


Gli strumenti della biologia cellulare

La biologia cellulare e molecolare dipende in maniera sostanziale dalle **metodologie** e dalle **strumentazioni** utilizzabili per studiare le cellule sia dal punto di vista strutturale che funzionale.

Poiché la maggior parte delle cellule **non** sono visibili ad occhio nudo, lo studio delle cellule è ampiamente basato sull'uso della

Microscopia ottica

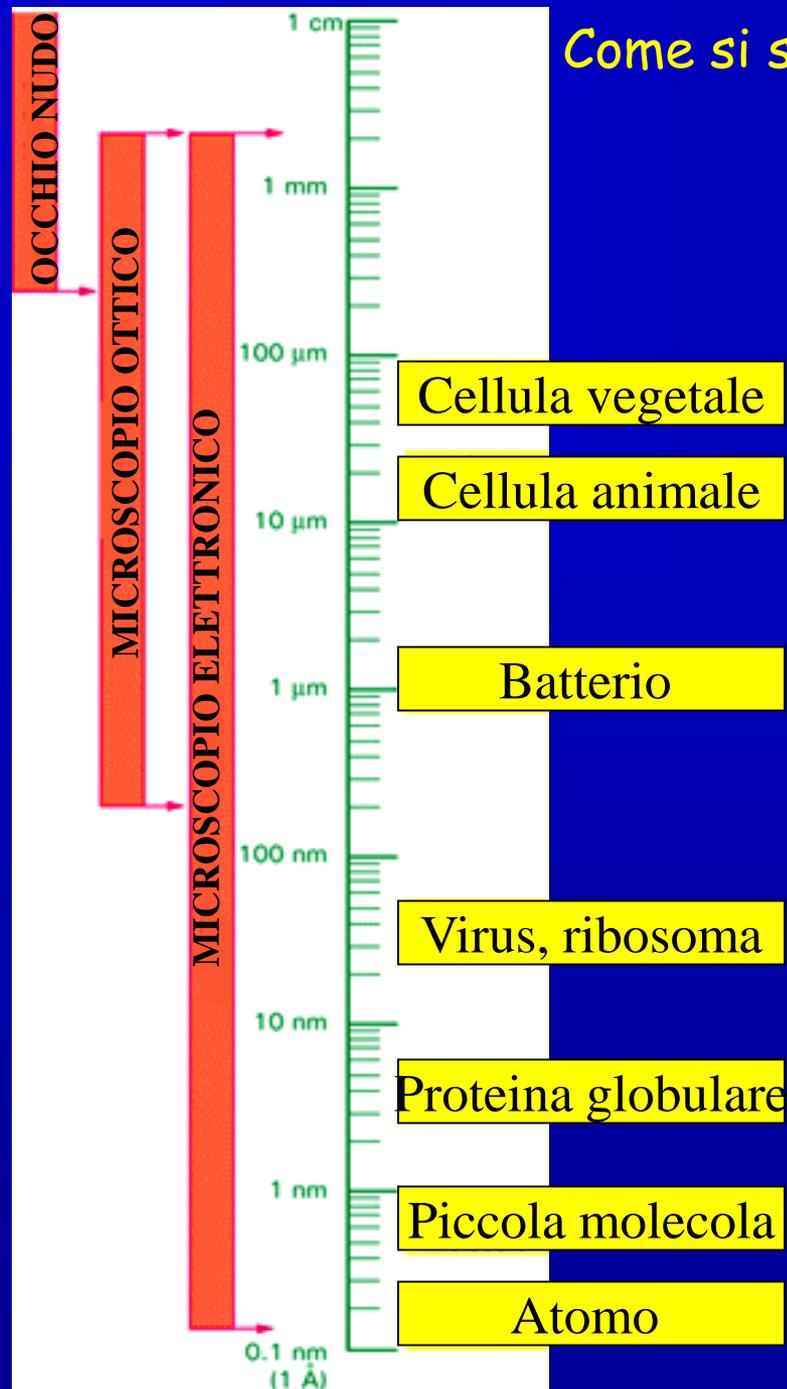


Si può dire che la reale scoperta della cellula è associabile allo **sviluppo delle tecniche di microscopia ottica**

Il termine "**cellula**" (**cella**) è stato coniato da Robert Hook, nel 1665, in seguito all'osservazione di un pezzo di sughero con un microscopio ottico abbastanza semplice

Come si studiano le cellule e le macromolecole

La microscopia



Le dimensioni delle cellule e dei loro componenti su scala logaritmica; si indicano le dimensioni degli oggetti che possono essere facilmente risolti ad occhio nudo, nel microscopio ottico e in quello elettronico. In microscopia si usano comunemente le seguenti unità di lunghezza:

$$\mu\text{m (micrometro)} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$\text{nm (nanometro)} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$\text{Å (ångström, non più in uso nel S.I.)} = 10^{-10} \text{ m}$$

Questa scala è logaritmica; ogni unità è dieci volte maggiore della precedente.

0,1 nm 1 nm 10 nm 100 nm 1 μ m 10 μ m 100 μ m 1 mm 1 cm 0,1 m 1 m 10 m 100 m 1 km

Microscopio elettronico

Microscopio ottico

Occhio nudo

Atomi

Lipidi

Fago T2

Cloroplasto

Cellule vegetali e animali

Uova di teleostei

Colibrì

Balenottera azzurra

Sequoia gigante

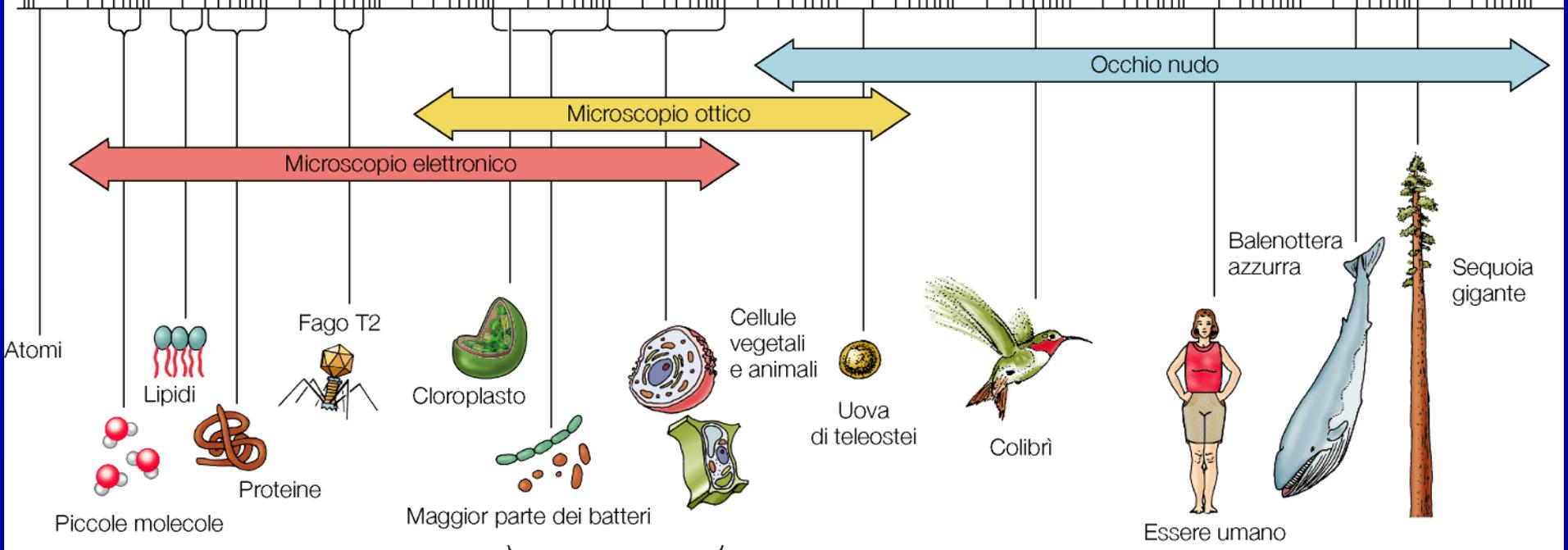
Piccole molecole

Proteine

Maggior parte dei batteri

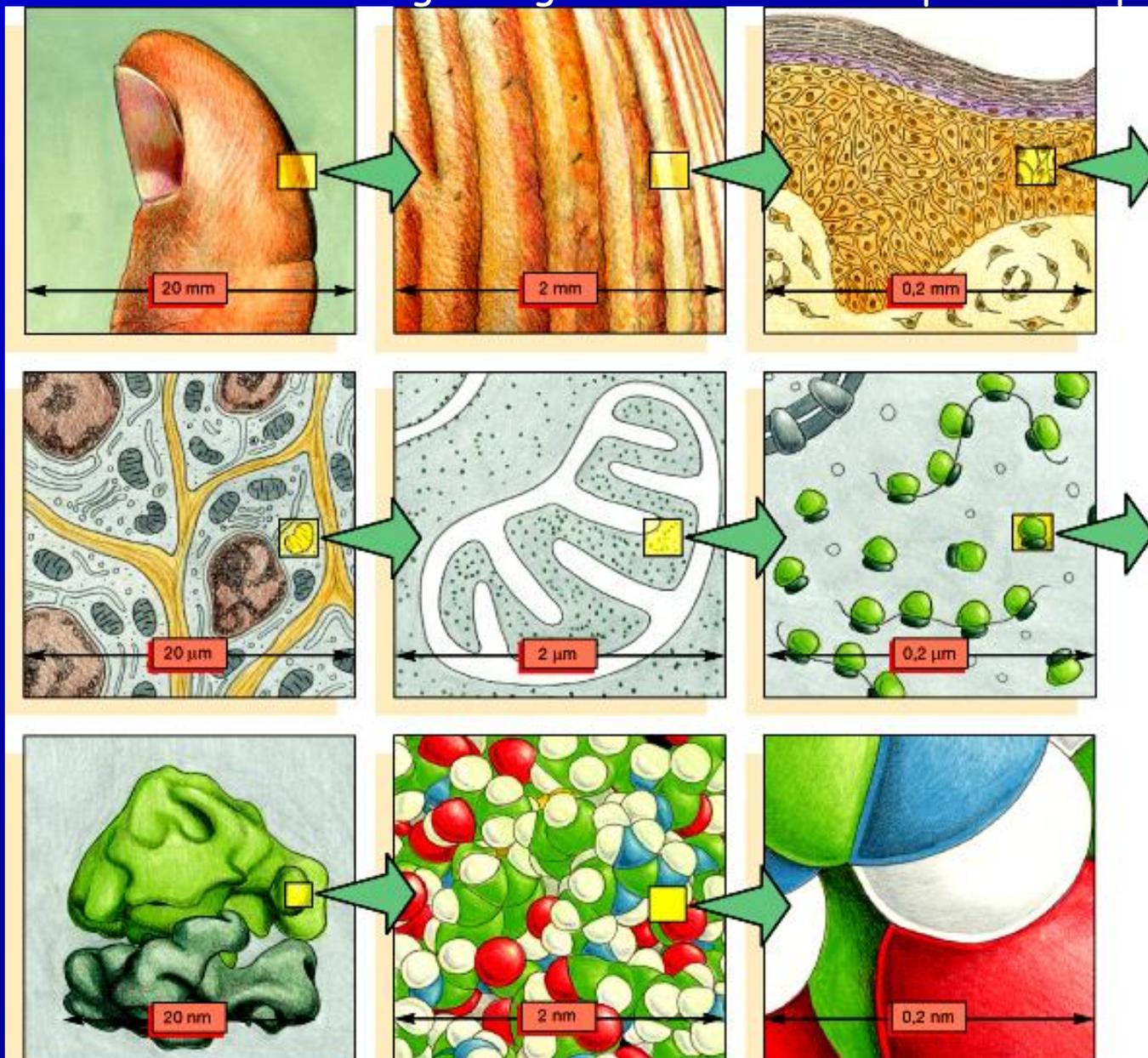
Essere umano

Le dimensioni cellulari si distribuiscono prevalentemente nell'intervallo da 1 a 100 μ m.

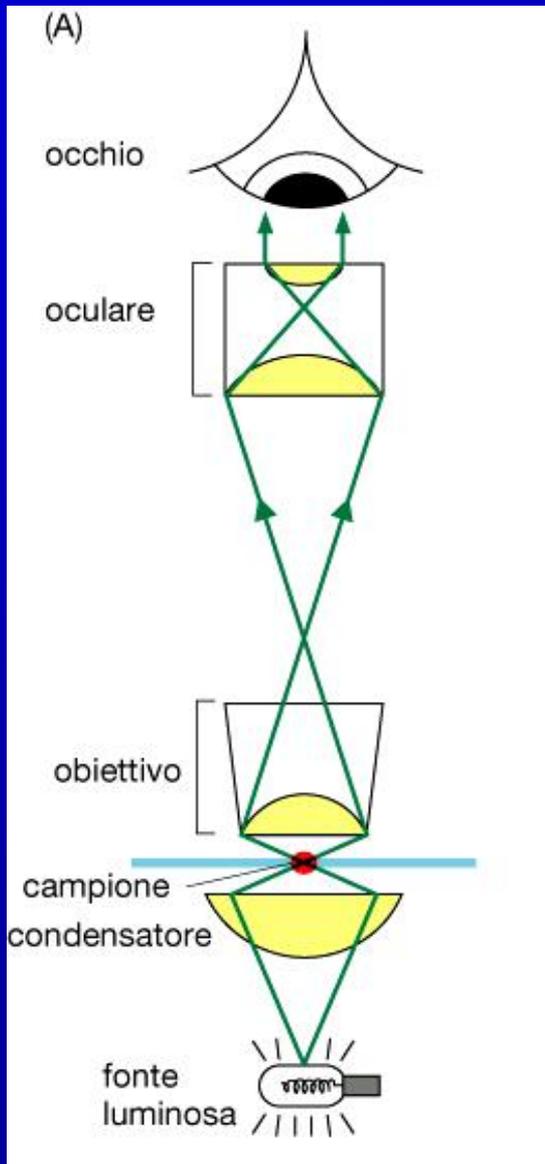


Rapporto dimensionale tra cellule ed atomi

Ogni riquadro mostra una immagine ingrandita 10 volte rispetto alla precedente



Microscopio Ottico



Per guardare le cellule al microscopio ottico servono 3 cose:

1. Concentrare una **luce intensa** sul campione foccheggiandola con la lente del **condensatore**
2. Preparare con cura il **campione** perché la luce possa **attraversarlo**
3. Disporre opportunamente una serie di **lenti (obiettivo e oculare)** per mettere a fuoco sull'occhio un'immagine

Microscopio Ottico

Permette di ingrandire le cellule fino a **mille volte circa**

Risoluzione: capacità di un microscopio di distinguere oggetti separati da piccole distanze

Limite di risoluzione. **$0,2 \mu\text{m}$** : determinato da 2 fattori:

1. **Lunghezza d'onda** (λ) della luce visibile
2. Potere di raccogliere la luce della lente del microscopio, **apertura numerica** (NA)



2 oggetti separati da una distanza inferiore a questa appaiono come una immagine singola, invece di essere distinti l'uno dall'altro

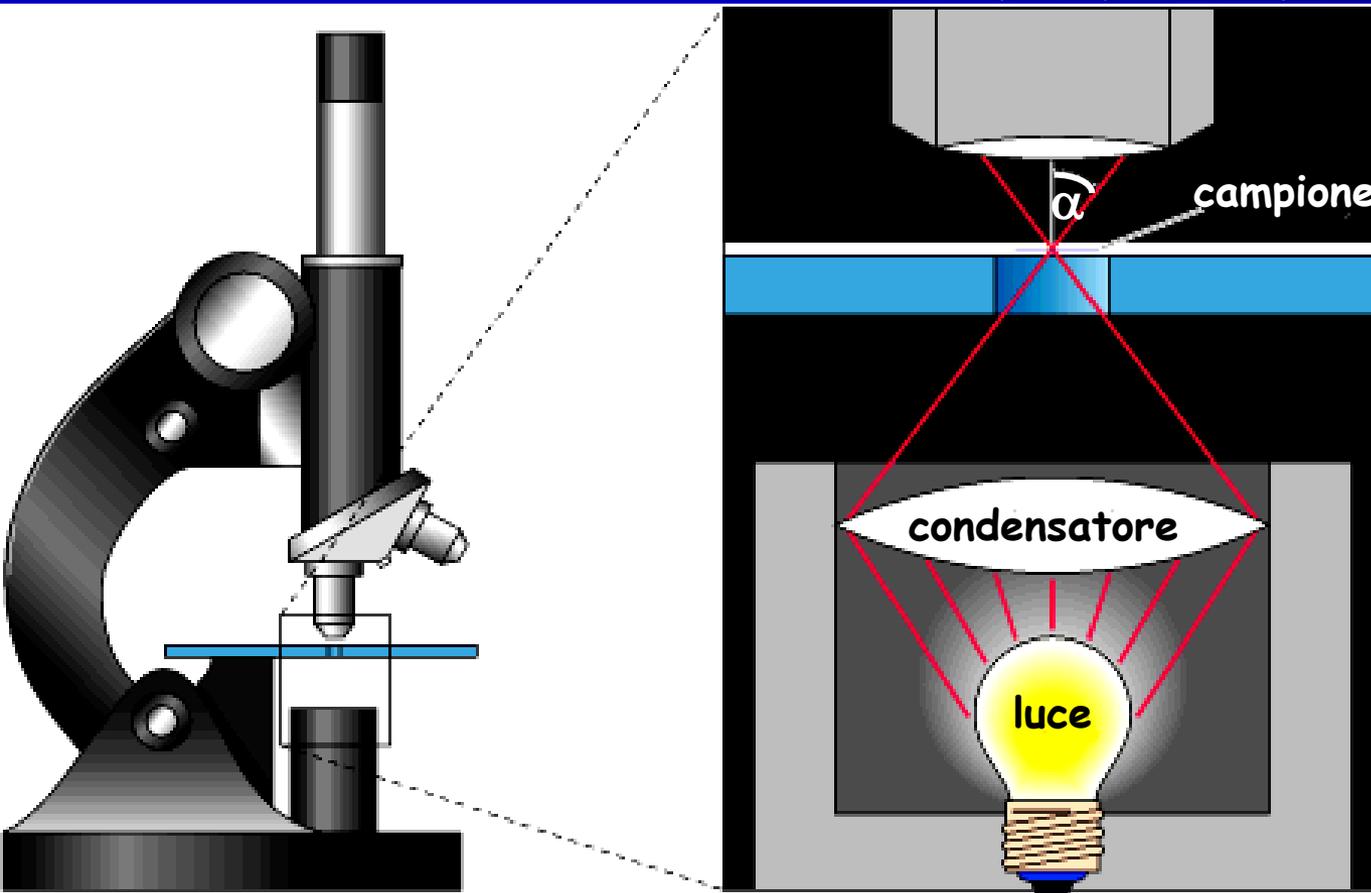
Come si studiano le cellule e le macromolecole

Microscopia ottica

Il limite di risoluzione del M.O. è di circa $0,2 \mu\text{m}$. Significa che due oggetti separati da una distanza minore di $0,2 \mu\text{m}$ non sono distinguibili.

$0,61 \lambda$ —————> lunghezza d'onda luce visibile = $0,5 \mu\text{m}$

Risoluzione = $\frac{0,61 \lambda}{NA}$ —————> apertura numerica: può essere immaginata come le dimensioni del cono di luce che entra nella lente del microscopio dopo essere passata attraverso il campione



Può essere al max 90°
 $\text{sen}90 = 1$

$$NA = \eta \text{ sen } \alpha$$

Indice di rifrazione:
Aria = 1
Olio = 1,4

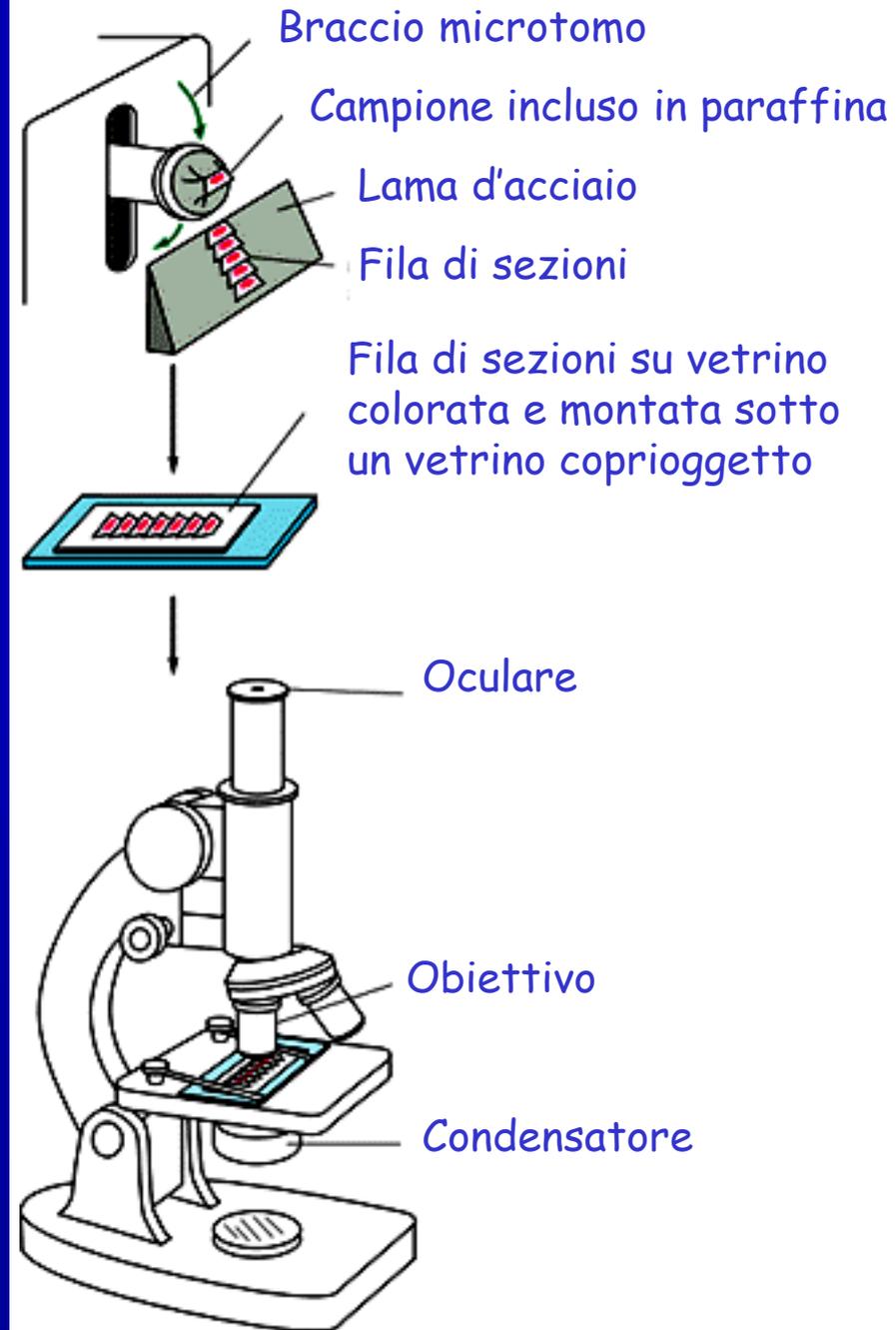
allora

$$\text{Risoluzione} = \frac{0,61 \times 0,5}{1,4} = 0,22 \mu\text{m}$$

Microscopia in campo chiaro

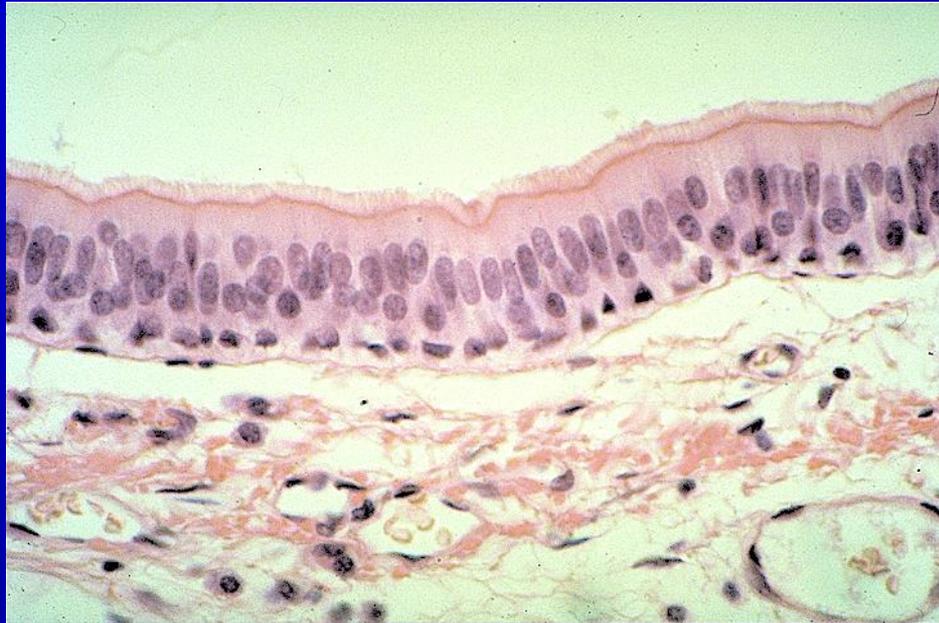
Il tessuto da studiare viene:

1. **Tagliato** al microtomo in fettine sottilissime
2. **Fissato** per stabilizzare e conservare le strutture
3. **Colorato** con sostanze che reagiscono con pt o acidi nucleici per migliorare il contrasto fra parti diverse della cell
4. Studiato al **microscopio in campo chiaro** in cui la luce passa direttamente **attraverso** la cellula



Microscopia in campo chiaro

È il più semplice: la luce passa direttamente attraverso la cellula.

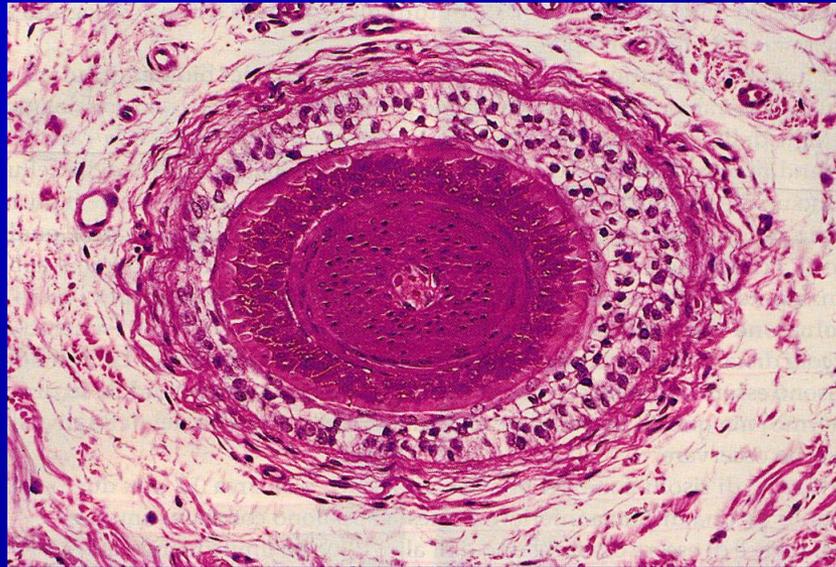


Esempio: Sezione di tessuto epiteliale pseudostratificato colorato con **ematossilina** (colora i nuclei) e **eosina** (colora le proteine del citoplasma).

Microscopia in campo chiaro

La capacità di distinguere parti diverse della cellula dipende dal **contrasto** che risulta dall'assorbimento della luce visibile da parte dei componenti della cellula

La colorazione aumenta il contrasto

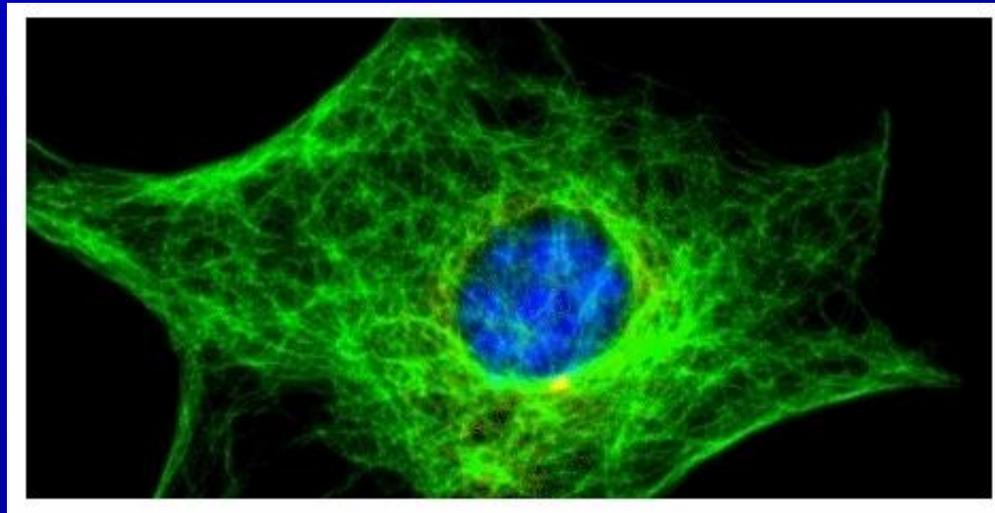


Sezione trasversale di un follicolo pilifero di pelle umana colorato con **ematossilina** (colora i nuclei) e **eosina** (colora le proteine del citoplasma).

Microscopio a fluorescenza

L'**immunofluorescenza** è uno strumento utile per studiare la distribuzione intracellulare delle molecole.

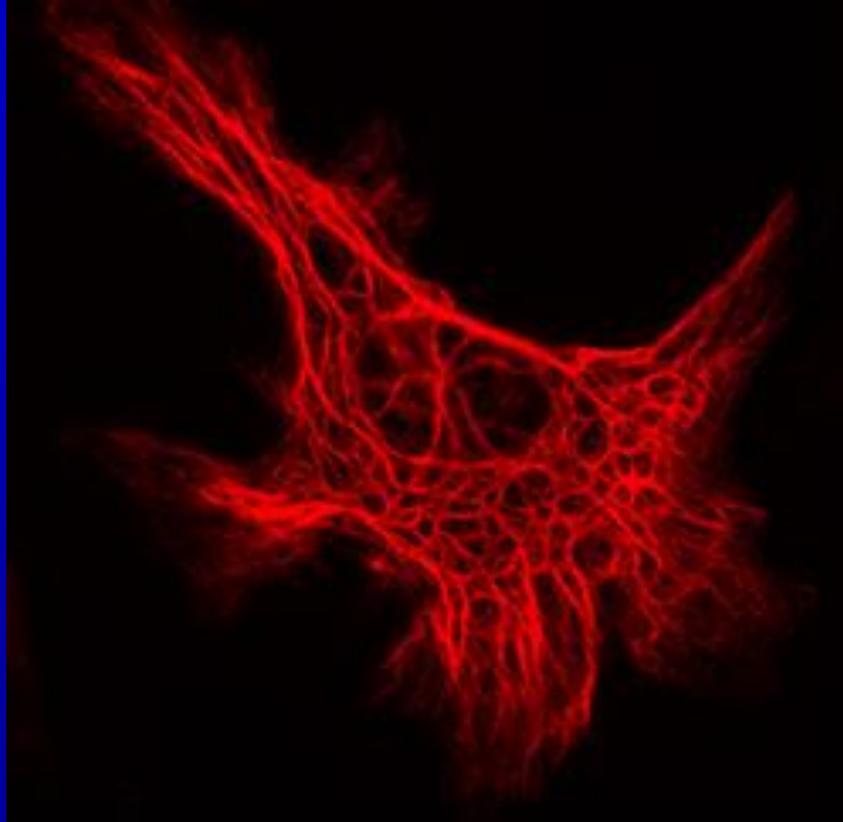
Si usa un composto **fluorescente** per marcare la molecola che interessa, sia in cellule fissate che in cellule vive.



Fibroblasti embrionali di topo 3T3.
Colorazione della tubulina del
citoscheletro con fluoresceina.

Microscopio a fluorescenza

La **sostanza fluorescente** è una molecola che assorbe la luce ad una lunghezza d'onda ed emette luce ad un'altra lunghezza d'onda.

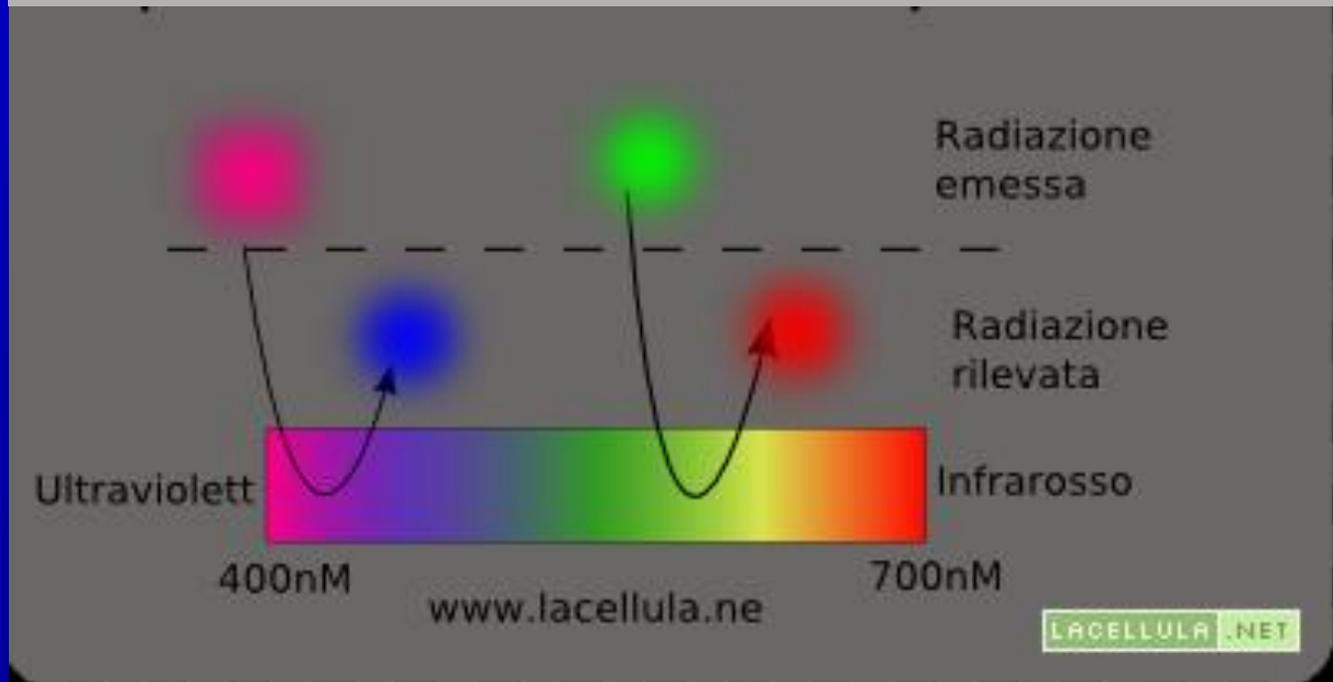


Cellula epiteliale timica umana.
Colorazione delle citocheratine del
citoscheletro con rodamina.

Microscopio a fluorescenza

La fluorescenza viene rivelata illuminando il campione con una luce di **lunghezza d'onda** tale che **eccita il composto fluorescente** e, usando filtri appropriati, si rivela la lunghezza d'onda specifica della **luce emessa** dalla sostanza.

Principio di funzionamento del microscopio a fluorescenza



Come si studiano le cellule e le macromolecole

La microscopia elettronica

Tecnica sviluppata negli **anni '30**
Applicata in camp. biologico: anni '40-'50

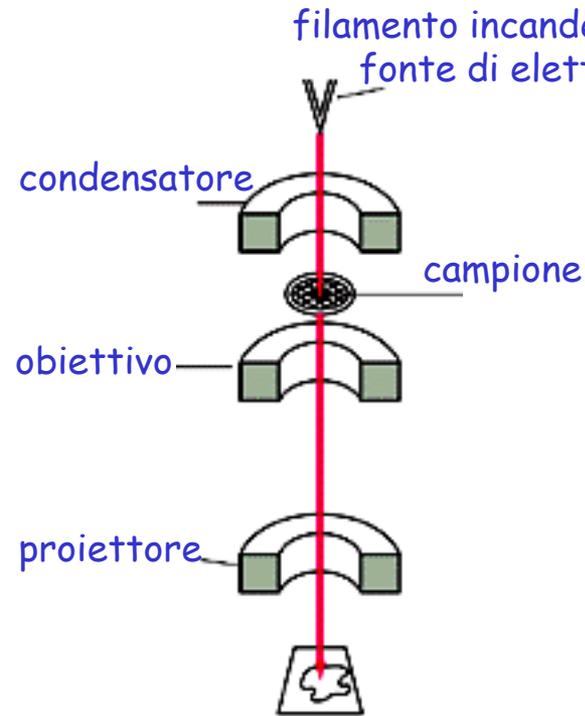
La luce visibile viene sostituita da un **fascio di elettroni** che attraversano il campione in esame
Le lenti sono **elettromagnetiche**

In condizioni ottimali il potere di risoluzione del M.E. è di **0,2 nm**; di fatto è di **1-2 nm**

Il potere di risoluzione aumenta perché la lunghezza d'onda degli e^- è minore della lunghezza d'onda della luce (0,004 nm)



La microscopia elettronica: microscopio elettronico a trasmissione



M. E.
A TRASMISSIONE

TEM:

assomiglia ad un microscopio ottico, che si serve di:

fascio di elettroni anziché di un raggio di luce

e

avvolgimenti elettromagnetici anziché di lenti di vetro

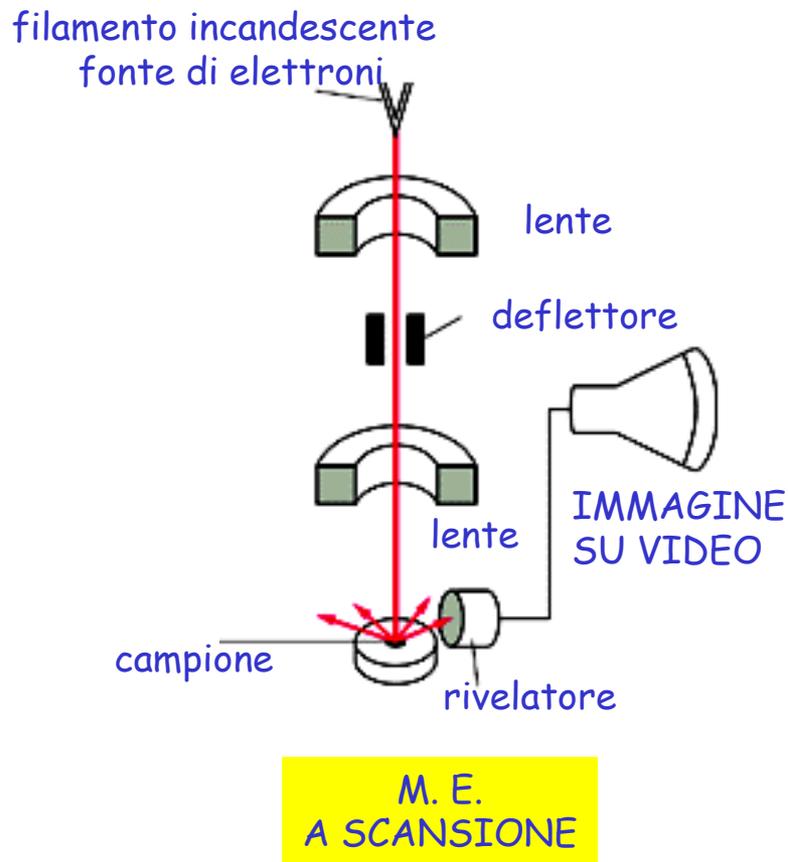
Il campione va posto nel **vuoto** e deve essere sottilissimo. Il **contrasto** si ottiene generalmente con **coloranti a base di metalli pesanti densi agli elettroni**, che li assorbono o li diffondono localmente, sottraendoli al fascio che attraversa il campione

Ingrandimento di un milione di volte

Risoluzione di circa **2 nm**

La microscopia elettronica: microscopio elettronico a scansione

SEM:

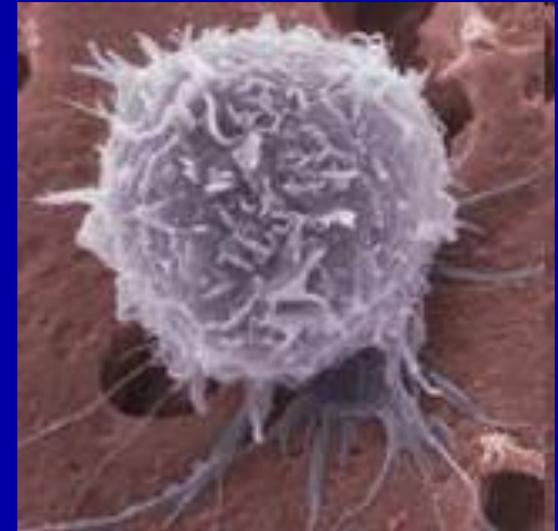
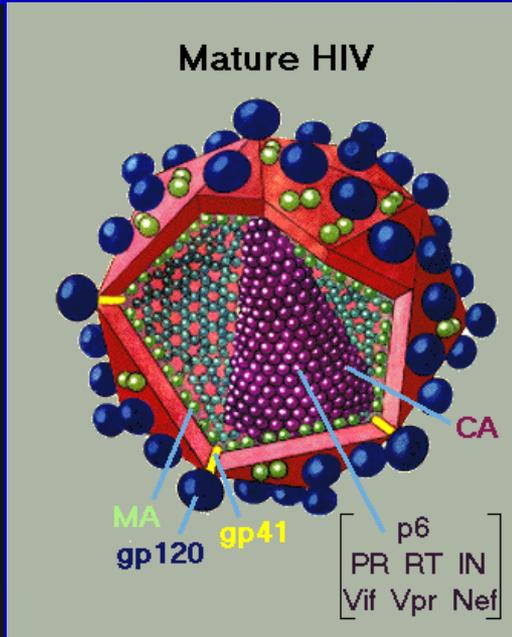
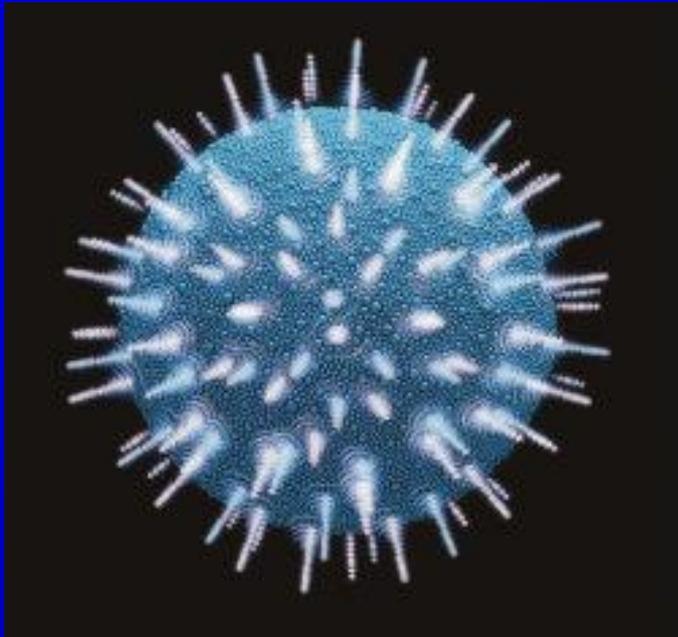


il **campione rivestito** di un velo sottilissimo di un metallo pesante, viene **esplorato (scansione)** da un **pennello di elettroni** foccheggiato da elettromagneti (che fungono da lenti nei microscopi elettronici)

La quantità di **elettroni diffusi o emessi** man mano che il pennello colpisce ogni punto successivo sulla superficie del campione viene misurata da un **rivelatore**, che regola l'intensità di un altro raggio deputato a visualizzare i punti corrispondenti su uno **schermo**, **dove si forma l'immagine**.

Il microscopio produce **immagini stupefacenti di oggetti tridimensionali** con grande profondità di campo e una risoluzione compresa tra 3 e 20 nm

La microscopia elettronica

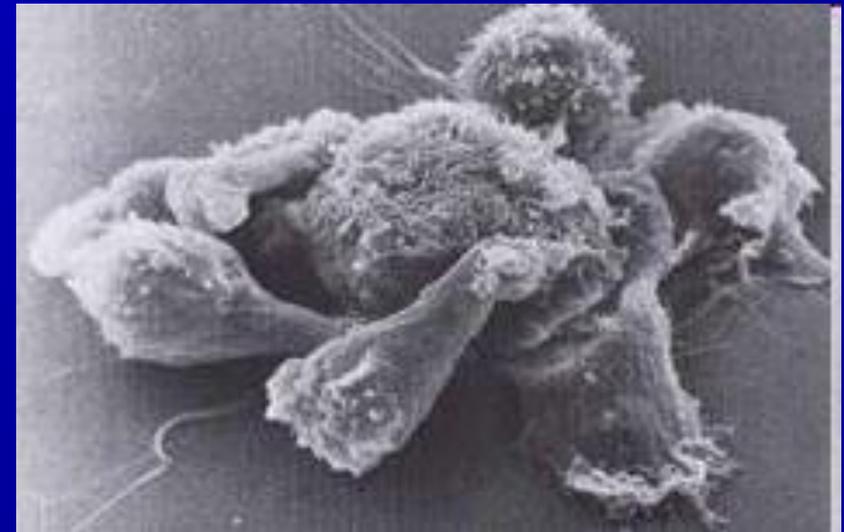


Cellula staminale del midollo osseo

HIV (human immunodeficiency virus)



M.E.S. Il virus HIV su una cellula T



Cellula cancerogena aggredita da un gruppo di linfociti

COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

MICROSCOPIA



CELLULE

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

Southern

Northern

ACIDI NUCLEICI

Western

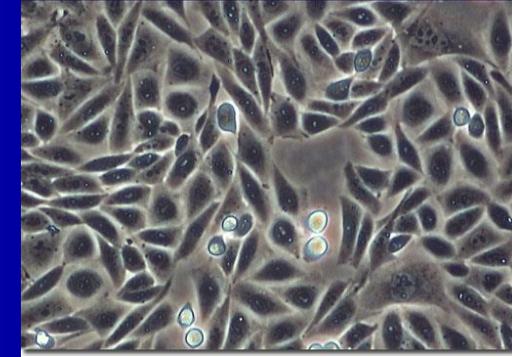
SDS page

PROTEINE

Immunoistochimica

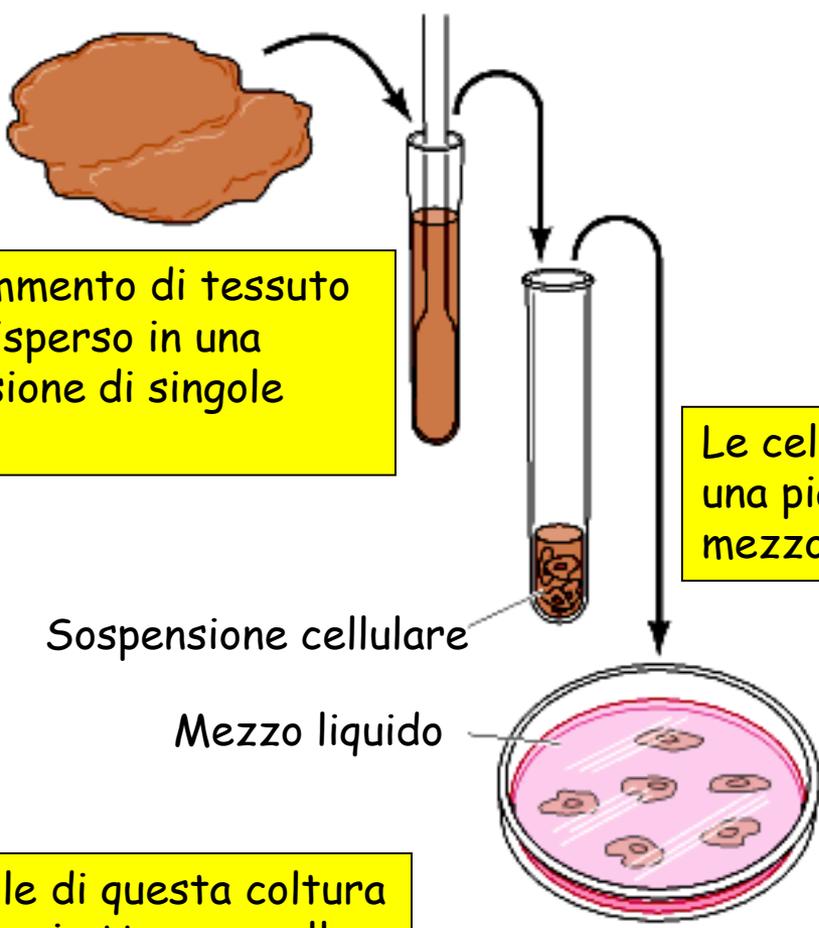
Come si studiano le cellule e le macromolecole

Crescita di cellule animali in coltura



Cellule di ovaio di criceto

Tessuto



Un frammento di tessuto viene disperso in una sospensione di singole cellule.

Le cellule sono piastrate in una piastra di coltura in un mezzo nutriente

Sospensione cellulare

Mezzo liquido

Coltura primaria

Coltura secondaria

Le cellule di questa coltura primaria si attaccano alla piastra e crescono fino a coprirne la superficie.

Le cellule possono quindi essere rimosse dalla piastra di coltura e ripiastrate a densità minore per formare una coltura secondaria.

Come si studiano le cellule e le macromolecole

Crescita di cellule animali in coltura

Composizione di un tipico terreno adatto alla coltivazione di cellule di mammifero:

Amminoacidi	Vitamine	Sali	Vari	Proteine (necessarie nei mezzi privi di siero chimicamente definiti)
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosio	Insulina
Cisteina	Colina	KCl	Penicillina	Transferrina
Fenilalanina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Streptomicina	Fattori di crescita specifici
Glutammina	Nicotinammide	NaHCO ₃	Rosso fenolo	
Isoleucina	Panotenato	CaCl ₂	Siero intero	
Leucina	Piridossale	MgCl ₂		
Leucina	Riboflavina			
Lisina	Tiamina			
Metionina				
Tirosina				
Treonina				
Triptofano				
Valina				

10

Mantenimento grado di umidità:

Ha lo scopo di limitare l'evaporazione del terreno di coltura per non provocare l'aumento della pressione osmotica del terreno di coltura.

Mantenimento del pH:

L'attività metabolica cellulare produce ioni H

+

La presenza della CO

2

permette al sistema tampone del terreno di mantenere la sua efficacia diminuendo la pressione della CO₂ l'efficacia del tampone si riduce del 75% in meno di 5 minuti

All'interno dell'incubatore c'è una pressione pCO

2

pari al

5% che corrisponde alla pCO

2

cellulare misurata all'interno dei tessuti

Per mantenere costante tale valore di pH, si ricorre per lo più ad incubatori con una fase gassosa contenente il 5% di

CO

2

e terreni contenenti

NaHCO

3

.

In soluzione acquosa il bicarbonato dissocia va incontro ad idrolisi basica (tende a riformare l'acido debole di partenza) e poi si ha rilascio di CO

2

.

La CO

2

presente nell'incubatore tende a controbilanciare questo aumento, mantenendo così il giusto pH del terreno.

Come si studiano le cellule e le macromolecole
Crescita di cellule animali in coltura



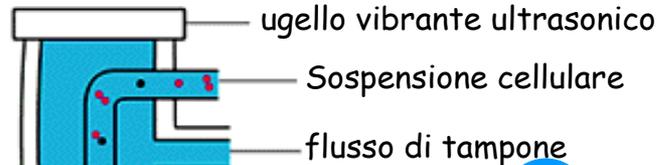
Isolamento e crescita in coltura delle cellule

Separatore cellulare attivato dalla fluorescenza (fluorescence activated cell sorter, **FACS**)

Si dissocia il tessuto in singole cellule vitali tramite l'utilizzo di enzimi proteolitici
Si fanno reagire le cellule con un anticorpo coniugato con un fluoroforo
e tramite FACS si separano i diversi tipi cellulari da una sospensione cellulare mista

1

Quando una cellula passa attraverso il raggio laser, la sua fluorescenza viene controllata.



3

Le goccioline sono poi deflesse da un campo elettrico in provette diverse secondo la loro carica.

gocce contenenti
singole cellule **fluorescenti**
vengono caricate **negativamente**

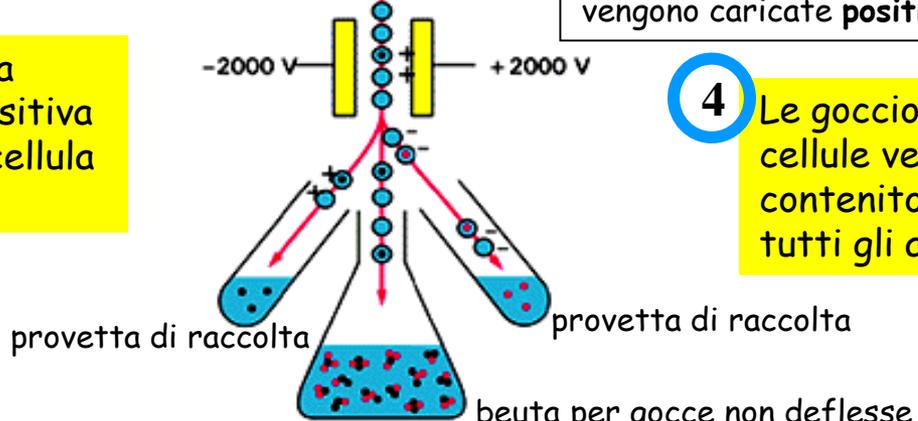
gocce contenenti
singole cellule **non fluorescenti**
vengono caricate **positivamente**

2

Goccioline contenenti una sola cellula ricevono una carica positiva o negativa, a seconda che la cellula sia fluorescente o no.

4

Le goccioline che non contengono cellule vengono deviate in un contenitore separato insieme a tutti gli aggregati di cellule

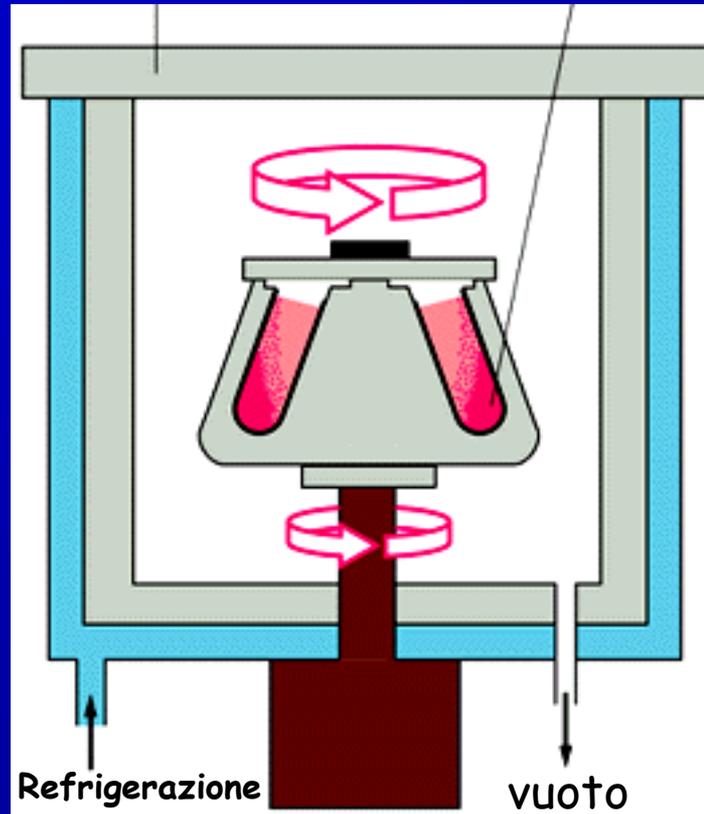


Come si studiano le cellule: Frazionamento subcellulare L'ultracentrifuga preparativa

camera corazzata materiale che sedimenta



La centrifuga è rivestita da una grossa armatura, perchè un rotore mal equilibrato può sganciarsi e causare una fuoriuscita esplosiva di energia.



La centrifugazione è il metodo più usato per separare l'omogenato nei suoi componenti, o frazioni. Le ultracentrifughe moderne raggiungono velocità di 100 000 giri al minuto e generano forze enormi, anche pari a 600 000 volte la forza di gravità.



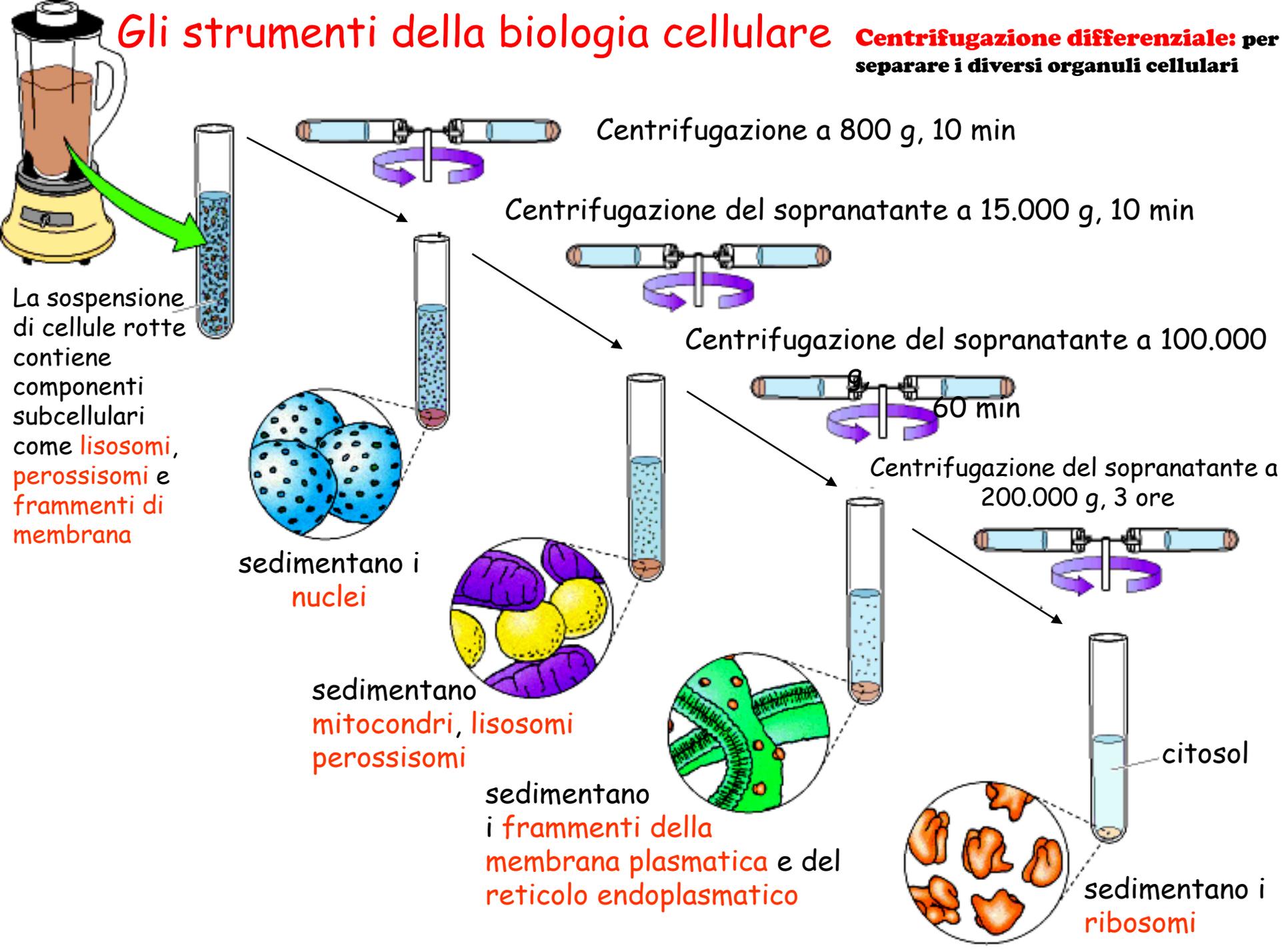
motore



A queste velocità le camere centrifughe devono essere raffreddate e svuotate dall'aria, in modo che l'attrito non scaldi l'omogenato.

Gli strumenti della biologia cellulare

Centrifugazione differenziale: per separare i diversi organuli cellulari



COME SI STUDIANO LE CELLULE

Dimensioni delle cellule

Microscopio ottico

Microscopio a fluorescenza

Microscopio elettronico

MICROSCOPIA

CELLULE

Colture cellulari

FACS

Centrifuga

Frazionamento subcellulare

Centrifugazione in gradiente di densità

Southern

Northern

ACIDI NUCLEICI

Western

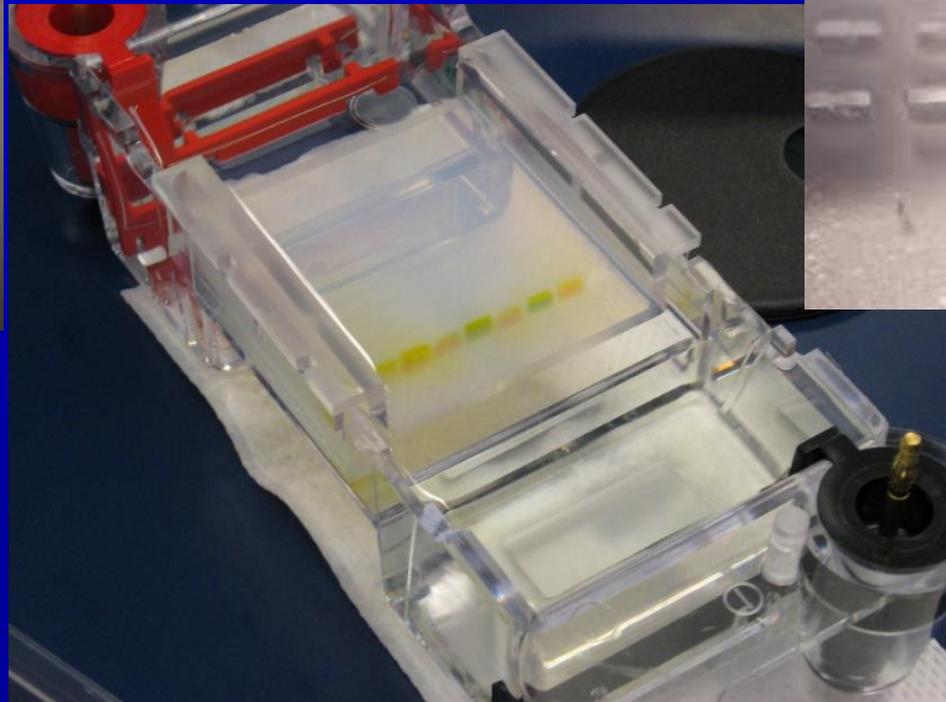
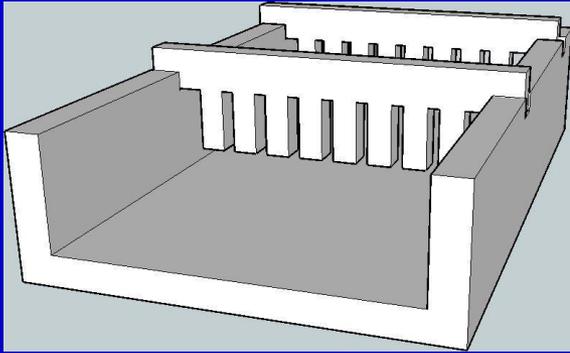
SDS page

Immunoistochimica

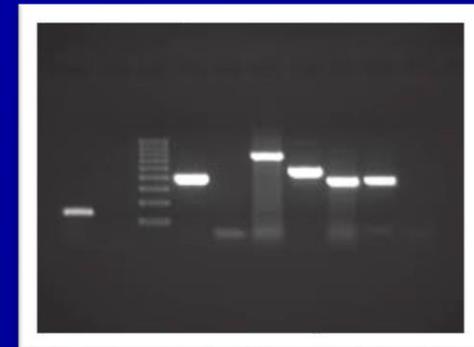
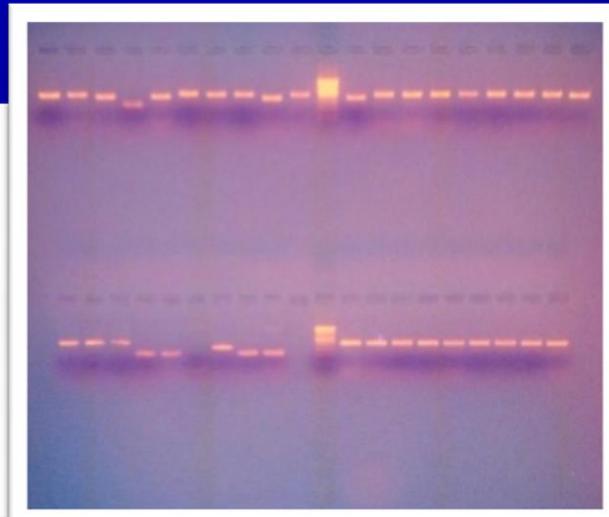
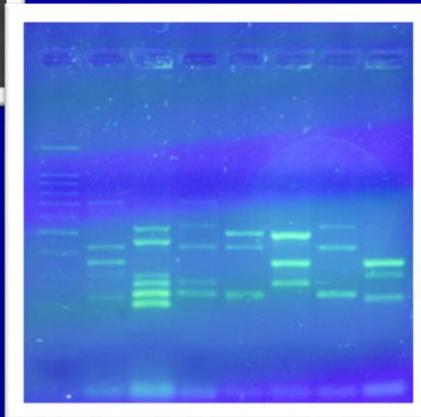
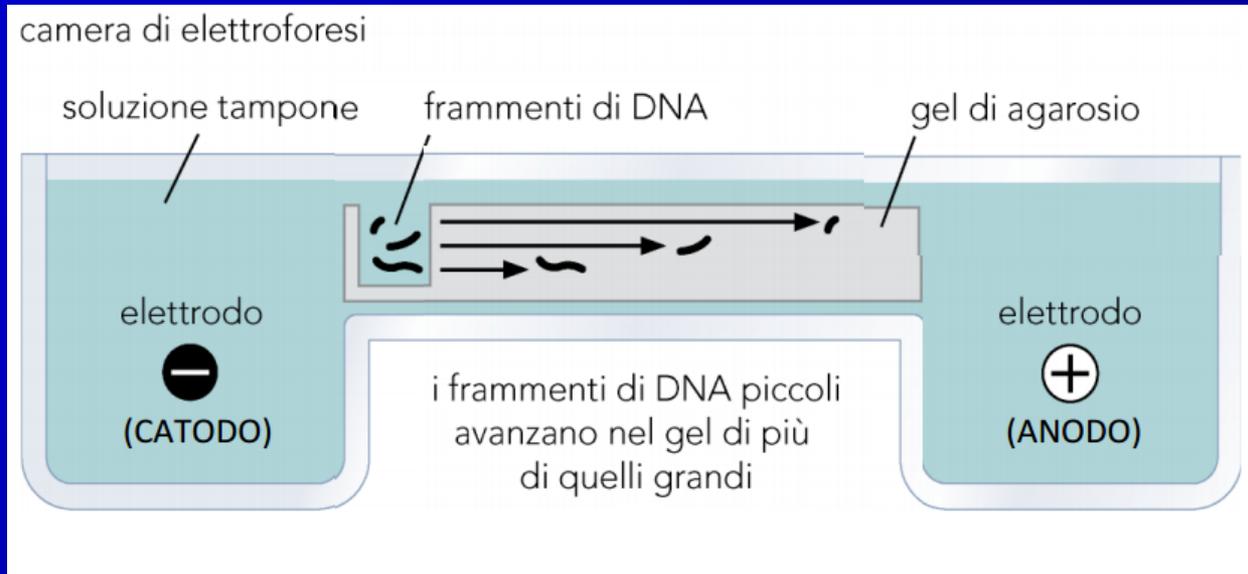
PROTEINE



Elettroforesi su gel d'agarosio

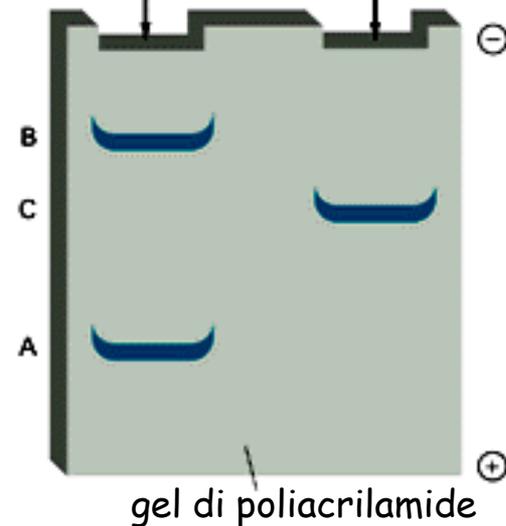
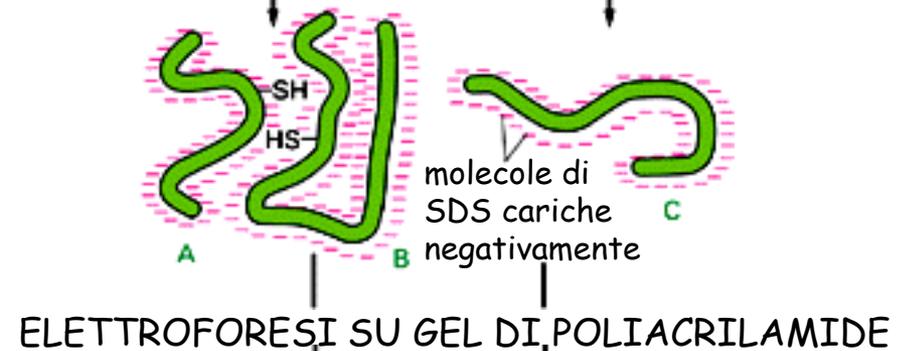
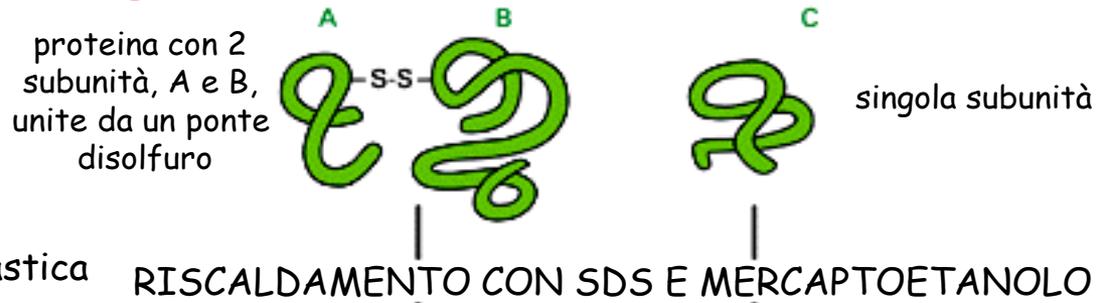
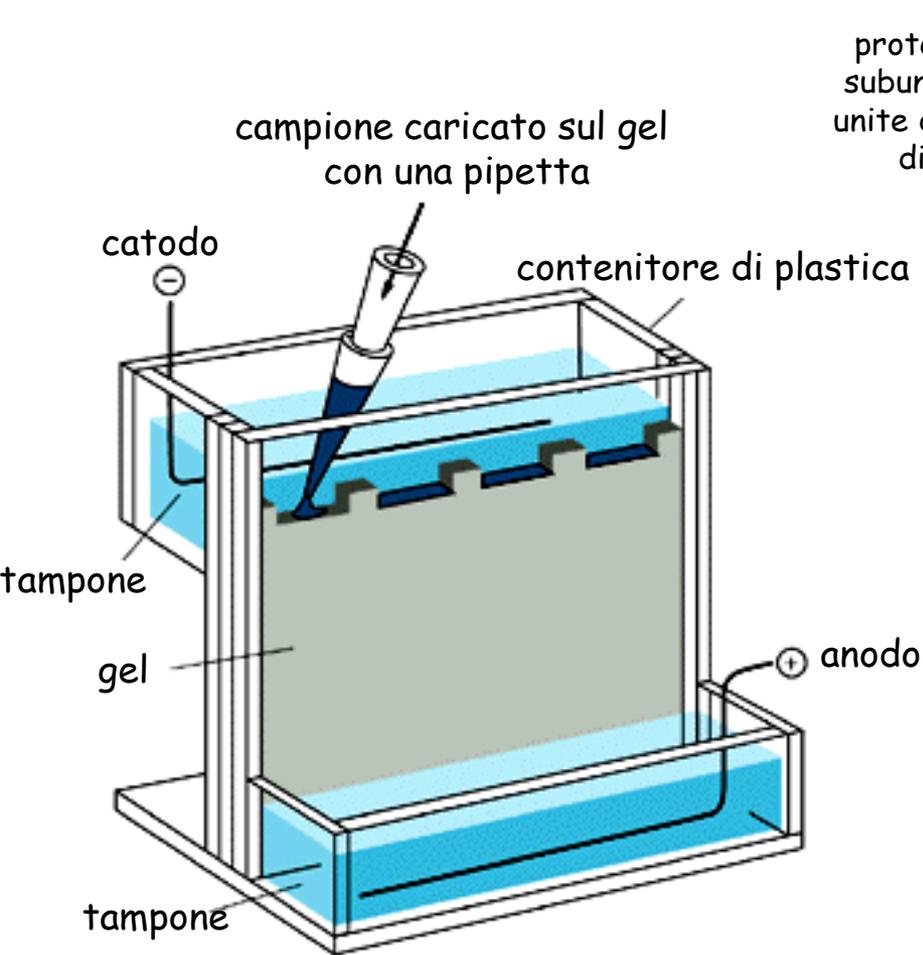


Elettroforesi su gel d'agarosio



Come si studiano le macromolecole: le proteine

Le dimensioni e la composizione in subunità di una proteina possono essere determinate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)



Marcatura di DNA, RNA, proteine

Gene P

DNA



Il DNA viene tagliato con enzimi di restrizione



RNA_m del gene P



RNA totale

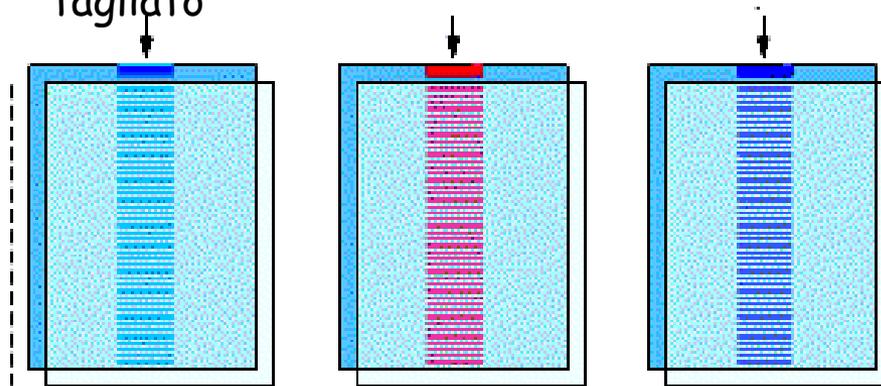
Proteina del gene P



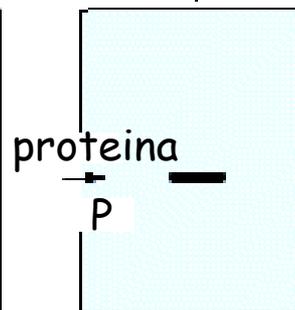
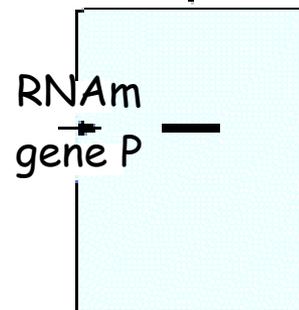
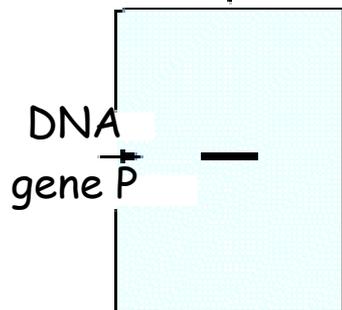
Proteine totali

elettroforesi

frazionamento



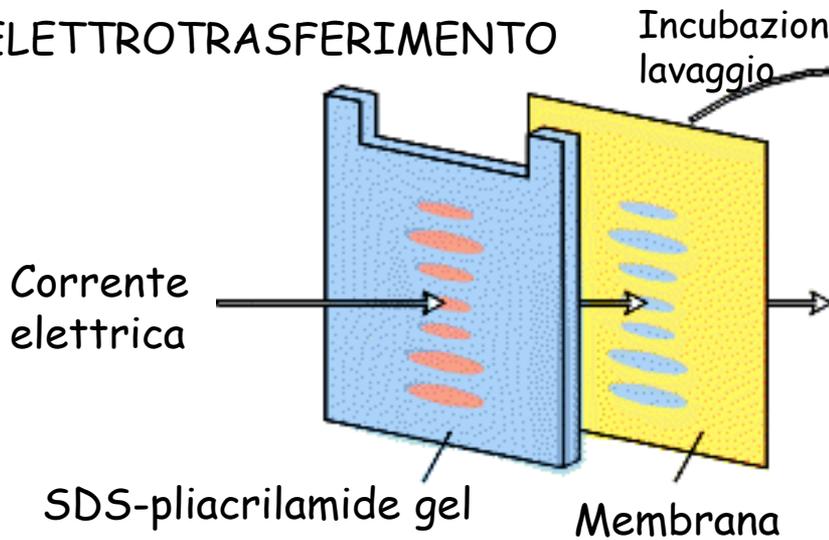
Southern blot Northern blot Western blot



Come si studiano le macromolecole: le proteine

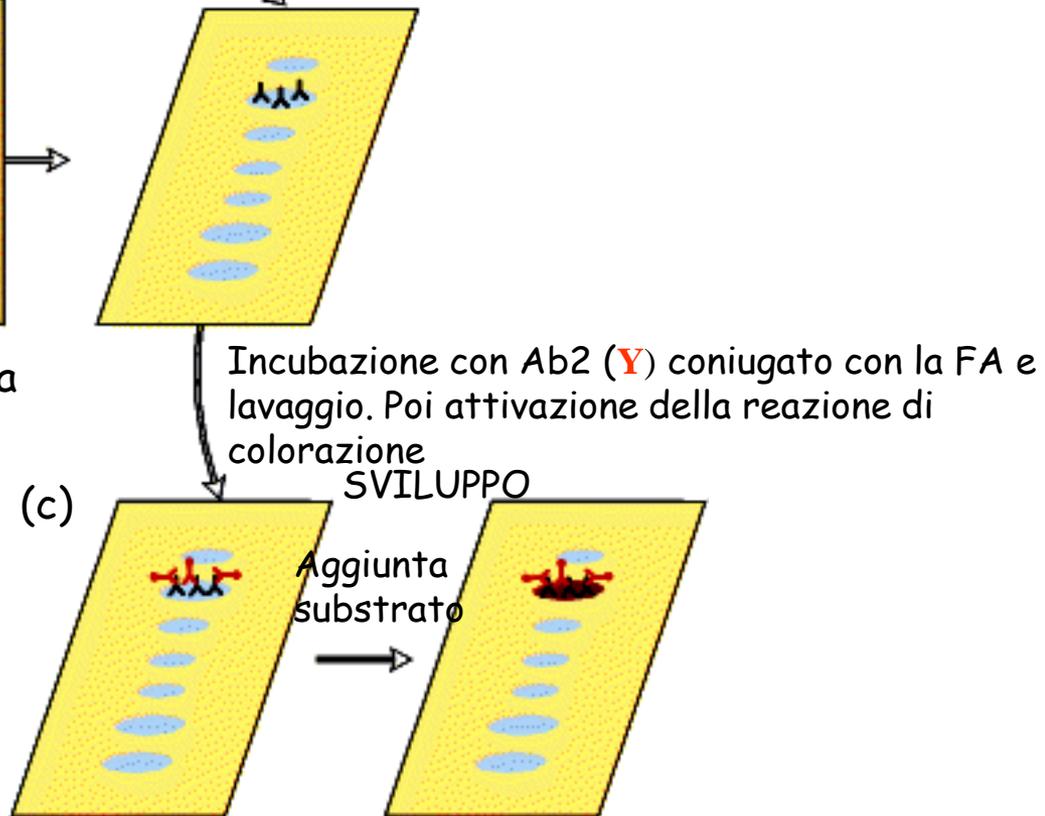
Per identificare una particolare proteina in una miscela totale di proteine si ricorre all'utilizzo della corsa elettroforetica su gel, di un anticorpo specifico primario e di uno secondario coniugato con un enzima che rivela un segnale colorimetrico. Questa tecnica prende il nome di **Western blotting o immunoblotting**.

(a) ELETTROTRASFERIMENTO



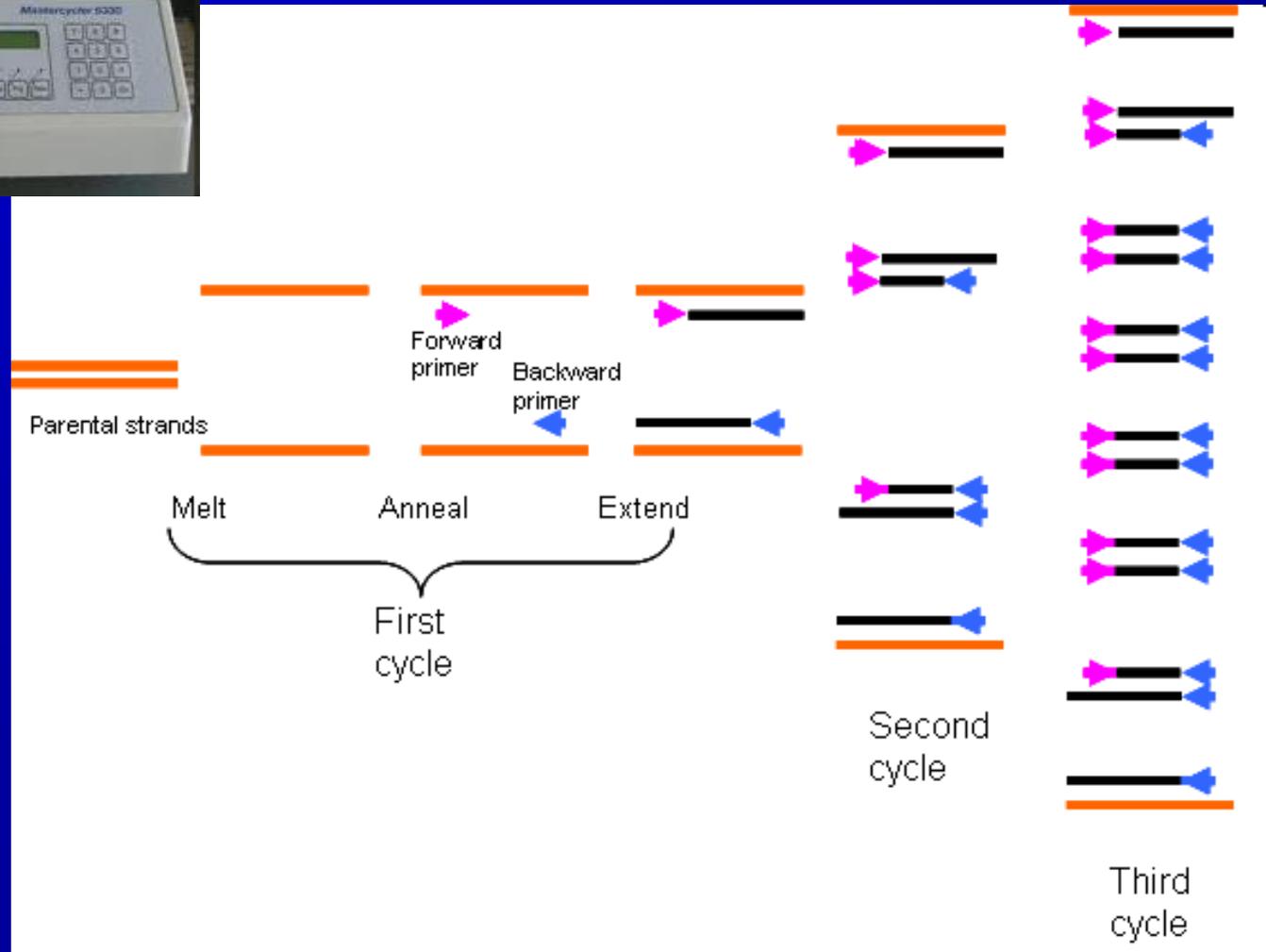
Incubazione con Ab1 (Y) e lavaggio

(b) LEGAME ANTICORPO ANTIGENE

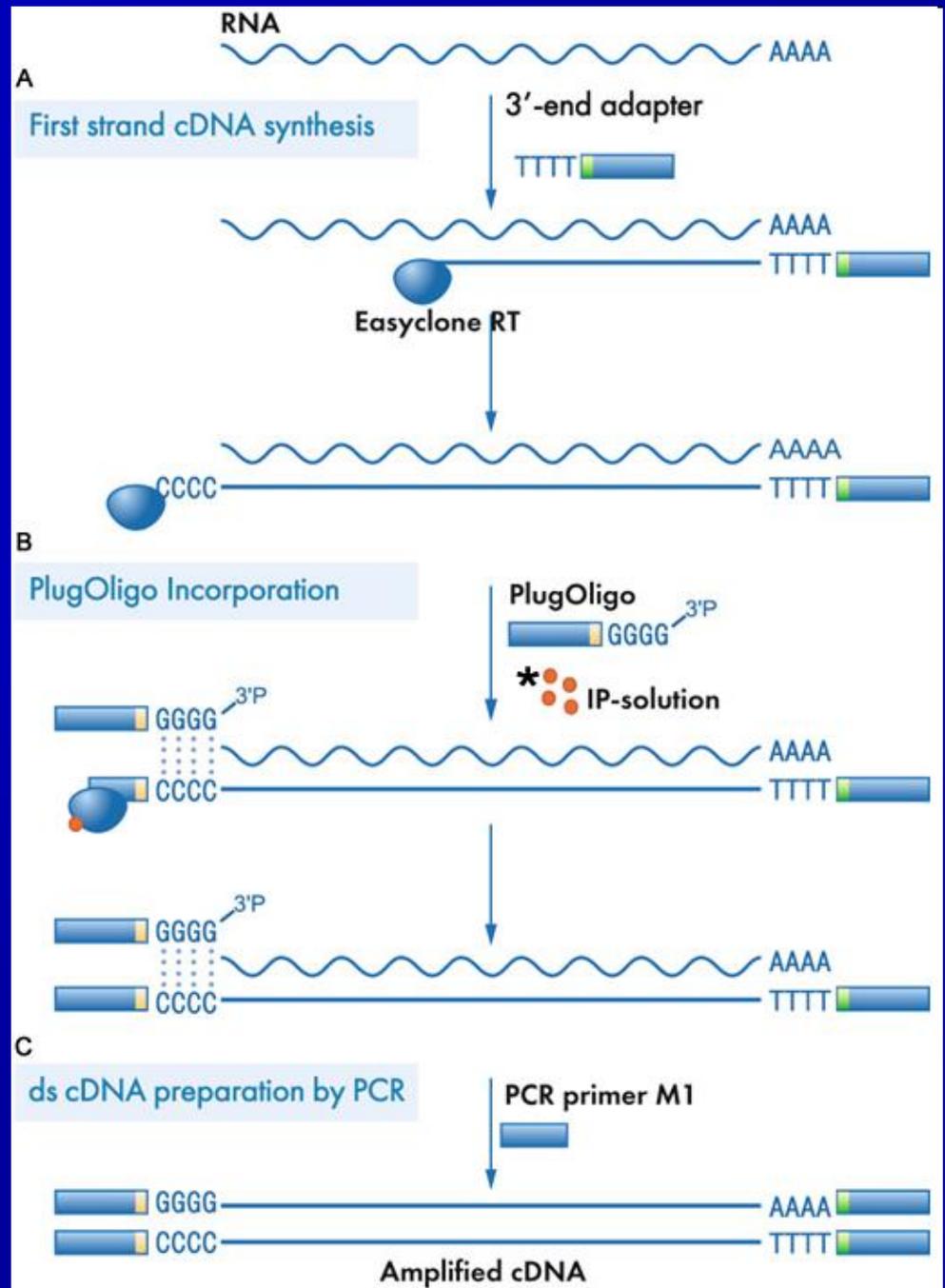


- Le proteine totali vengono fatte migrare su un gel di poliacrilamide-SDS e trasferite su una membrana.
- La membrana viene incubata con un anticorpo specifico (Ab1) che riconosce un epitopo specifico della proteina di interesse. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario la membrana viene lavata per togliere l'anticorpo in eccesso.
- La membrana viene incubata con un anticorpo secondario (Ab2) che si lega al primario. L'Ab2 è covalentemente legato all'enzima fosfatasi alcalina (FA) che catalizza una reazione cromogenica in presenza di un adeguato substrato. In questo modo si forma un precipitato scuro che permette di visualizzare la proteina desiderata.

PCR

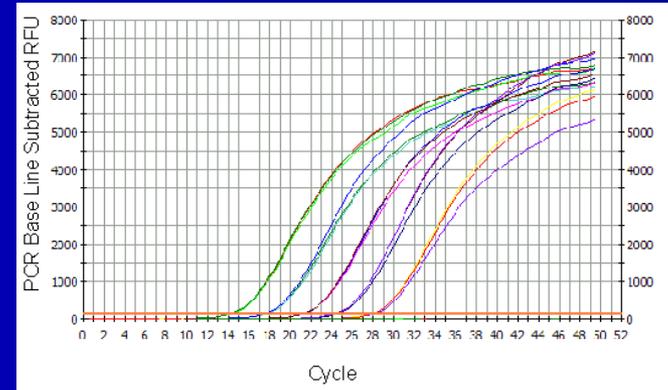


RT-PCR (retrotrascrizione)



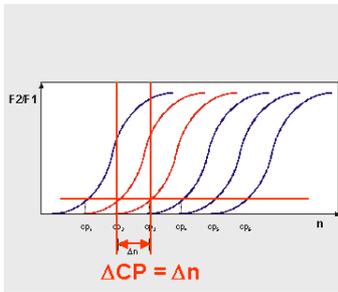
Real-time PCR

(seconda generazione della PCR)



Calculation of real-time PCR efficiency

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \Rightarrow E = 10^{-1/-3.337} \Rightarrow E = 10^{0.299} \Rightarrow E = 1.99$$



$$N_2 = N_{02} \times E^{n_2} \quad N_3 = N_{03} \times E^{n_3}$$

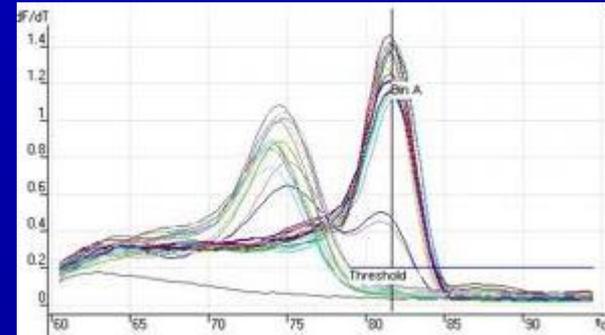
$$\text{For } N_2 = N_3:$$

$$N_{02} / N_{03} = E^{n_3 - n_2} = E^{\Delta n}$$

$$\text{For } N_{02} = 10 \times N_{03} \text{ (10-fold dilutions):}$$

$$\Delta n = 1 / \log E \quad E = 10^{-1/\text{slope}}$$

e.g. $E = 2.0 \quad \Delta n = 3.32$
 $E = 1.9 \quad \Delta n = 3.58$
 $E = 1.8 \quad \Delta n = 3.91$



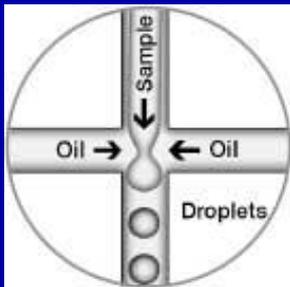
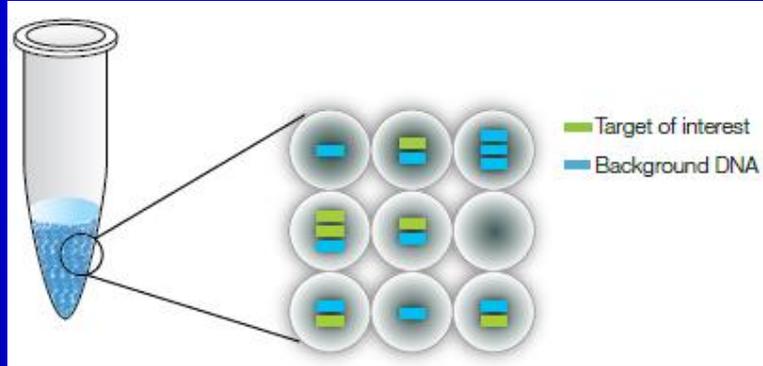
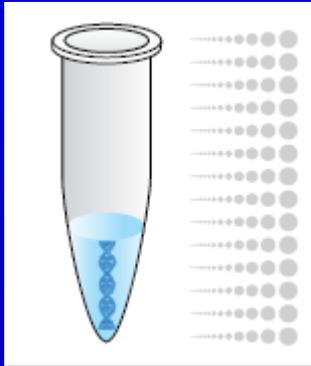
Roche Diagnostics, LC rel. Quantification software, March 2001

Rasmussen, R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds.

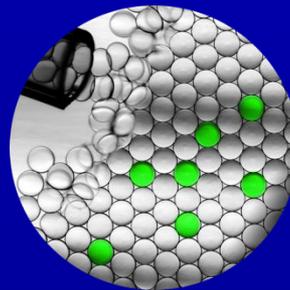
Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications Springer Press, Heidelberg, page 21-34

Digital-PCR

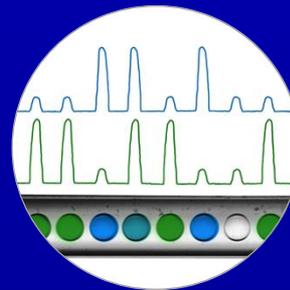
(terza generazione della PCR)



Make Droplets



PCR Droplets



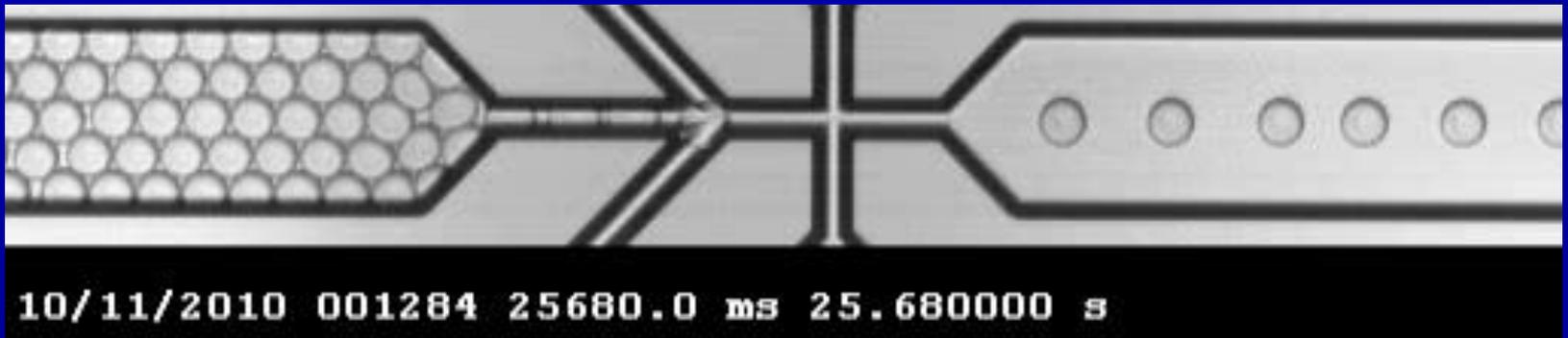
Read Droplets



Results

Digital-PCR

(terza generazione della PCR)



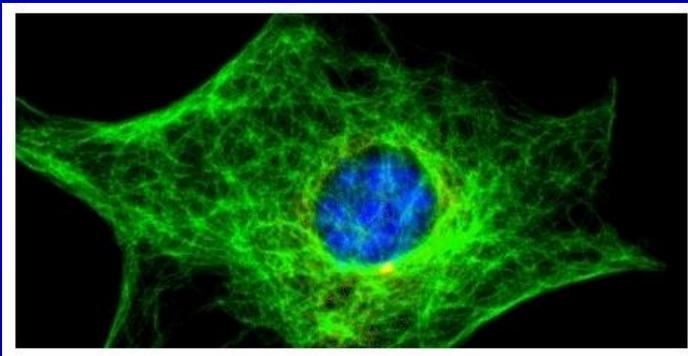
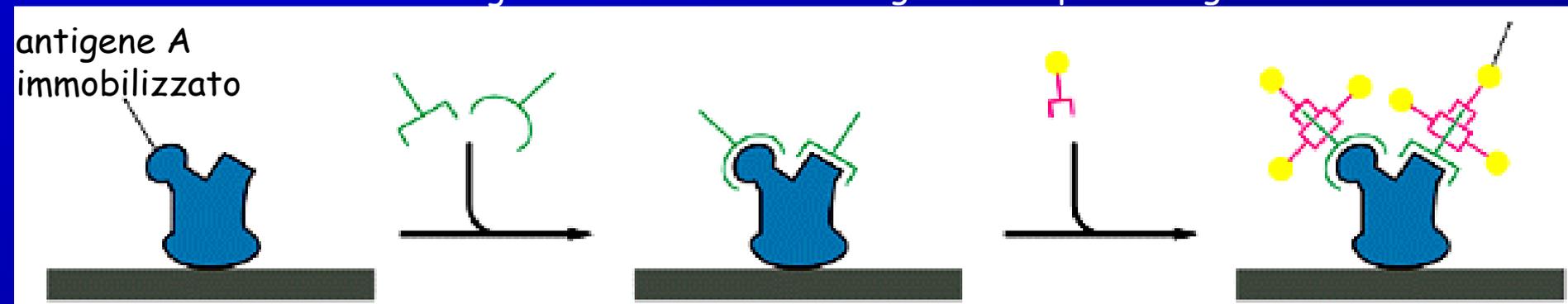
Identificazione e studio delle molecole all'interno delle cellule

Immunoistochimica

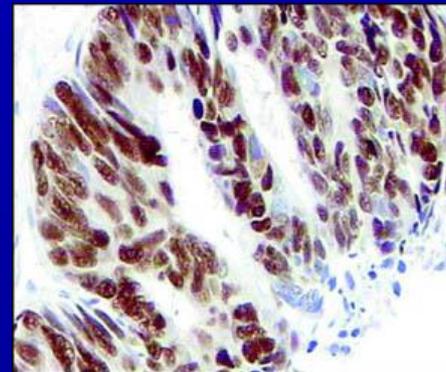
anticorpi primari:
anticorpi di coniglio
diretti contro
l'antigene A

anticorpi secondari:
anticorpi accoppiati ad un
marcatore diretti contro
gli anticorpi di coniglio

marcatore



Immunofluorescenza:
Fibroblasti embrionali di topo T3T;
tubulina in verde e DNA in blu



Immunoistochimica:
Sovraespressione di p53 mutata in cellule
metastatiche epatiche provenienti da un tumore
colonrettale umano.

fine

ORIGINE DELLA VITA

1. La produzione di semplici molecole organiche (dimostrato)
2. concentrati nei mari in un *brodo primordiale*
3. Formazione di cellule dotate dei requisiti minimi essenziali per poter essere considerate viventi
 - i primi polimeri biologici e, tra questi, di una molecola capace di produrre copie di se stessa, dalla quale derivano i nostri geni
 - la formazione delle prime membrane biologiche che hanno creato dei compartimenti isolati dall'ambiente esterno, nei quali si sono evoluti i primi sistemi di reazioni e le prime vie metaboliche catalizzate da enzimi.

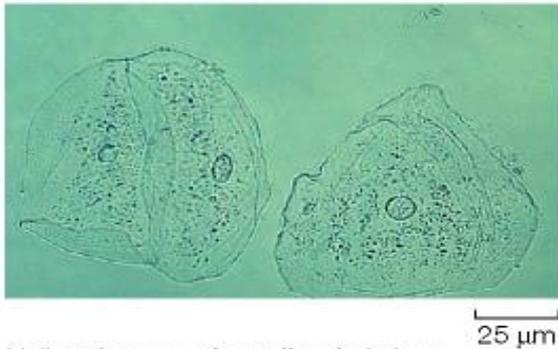
ORIGINE DELLA VITA

Fu la carenza di ossigeno atmosferico a precedere la catena degli eventi, la quale avrebbe condotto all'evoluzione della vita. Il catalizzatore delle prime reazioni fu costituito dalla radiazione ultravioletta la quale, in presenza di ossigeno, sarebbe stata prontamente schermata dalla formazione di ozono.

In un'atmosfera povera di ossigeno e per azione della luce solare, si sarebbero prodotte molecole organiche, le quali, accumulate nei mari primitivi, avrebbero formato un "brodo primordiale". Queste prime sostanze organiche si sarebbero combinate formando molecole sempre più complesse, fino ad arrivare ai coacervati. Queste goccioline, simili nell'aspetto alle attuali cellule, si sarebbero accresciute per fusione con altre gocce e riprodotte attraverso la divisione in gocce figlie, ottenendo così un metabolismo primordiale in cui quei fattori

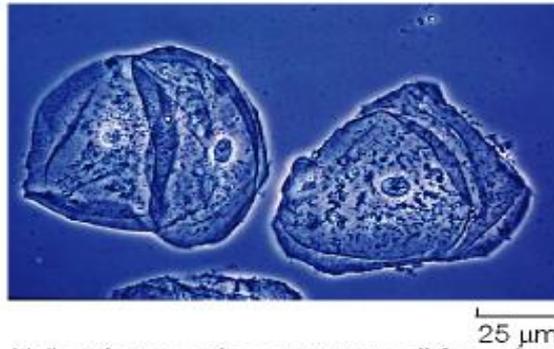
Gli strumenti della biologia cellulare

Microscopia ordinaria



Nella **microscopia ordinaria** la luce attraversa le cellule senza subire rilevanti modificazioni. In assenza di pigmenti naturali, l'immagine risulta scarsamente contrastata e i dettagli sfuggono all'osservazione.

Microscopia a contrasto di fase



Nella **microscopia a contrasto di fase** si può agire aumentando il contrasto delle strutture sfruttando il loro specifico indice di rifrazione (che esprime la capacità di deviare il raggio di luce incidente). Le differenze legate all'indice di rifrazione vengono trasformate in ritardo di fase nella luce trasmessa. In tal modo appaiono evidenti le differenze tra i vari componenti della cellula, alcuni dei quali risultano chiari e altri scuri.

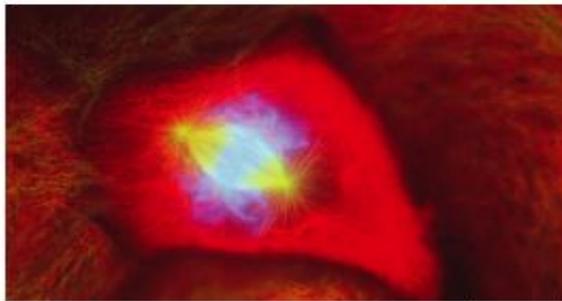
Microscopia a contrasto di fase per interferenza differenziale



La **microscopia a contrasto di fase per interferenza differenziale** utilizza due fasci di luce polarizzata. Le immagini combinate danno l'impressione che la cellula proietti un'ombra su un lato.

Gli strumenti della biologia cellulare

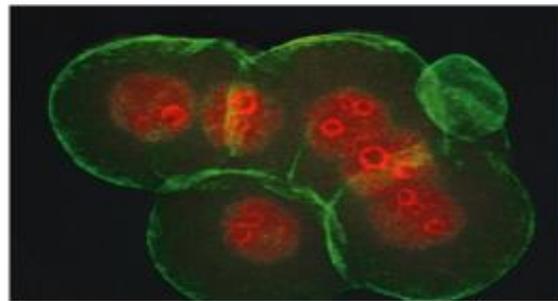
Microscopia a fluorescenza



40 μm

Nella **microscopia a fluorescenza** un fascio di luce (di solito nell'ambito degli UV) stimola una sostanza fluorescente presente naturalmente nella cellula, o un colorante fluorescente che si lega a uno specifico substrato cellulare; la luce fluorescente di lunghezza d'onda maggiore di quella eccitante proviene proprio dal colorante.

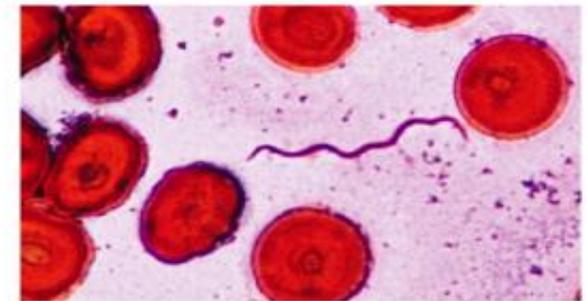
Microscopia confocale



40 μm

La **microscopia confocale** sfrutta la presenza di materiale fluorescente, ma si avvale anche di un dispositivo che consente di focalizzare sia la radiazione eccitante che quella emessa, in modo da ricavare un'immagine della cellula corrispondente a uno solo dei piani che la attraversano. Con questo accorgimento si ottiene una rappresentazione bidimensionale più definita rispetto a quella ottenuta con la semplice fluorescenza e con il microscopio ottico ordinario.

Microscopia ottica ordinaria

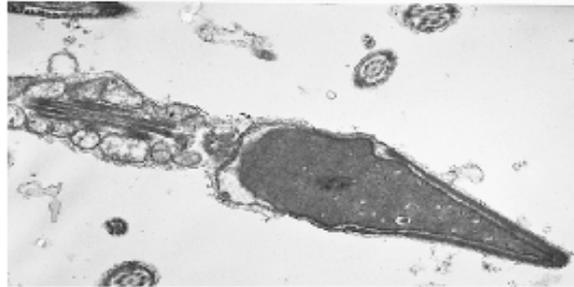


75 μm

Nella **microscopia ottica ordinaria** su materiale fissato e colorato l'impiego di composti in grado di conservare le cellule e di coloranti più o meno selettivi accentua il contrasto, e permette di individuare dettagli che altrimenti sfuggirebbero all'osservazione. I coloranti differiscono molto tra loro per natura chimica e capacità di legarsi alle sostanze presenti nelle cellule, offrendo così un'ampia possibilità di scelta.

Gli strumenti della biologia cellulare

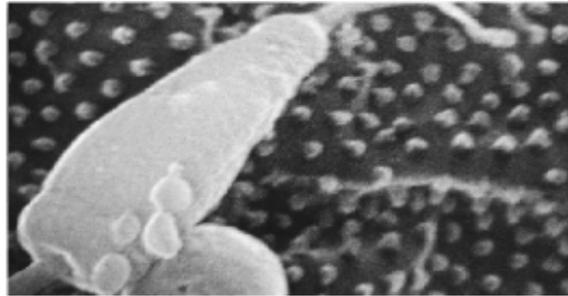
Microscopia elettronica a trasmissione



8,5 μm

Nella **microscopia elettronica a trasmissione (TEM)** un fascio di elettroni viene fatto convergere sull'oggetto in osservazione utilizzando alcuni campi magnetici. Se l'oggetto assorbe gli elettroni appare più scuro; viceversa, quando gli elettroni non vengono assorbiti, passano oltre e vengono raccolti su di uno schermo fluorescente dando campi chiari.

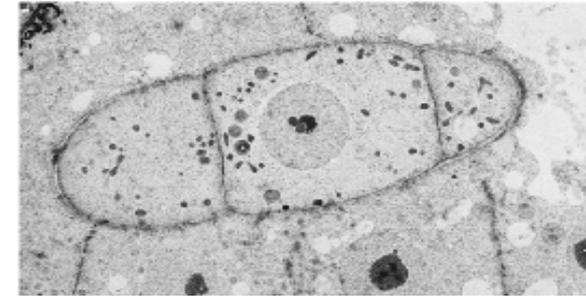
Microscopia elettronica a scansione



8 μm

Nella **microscopia elettronica a scansione (SEM)**, gli elettroni vengono proiettati a bande sulla superficie del campione in osservazione, dal quale provocano l'emissione di un secondo fascio di elettroni; questi vengono visualizzati su uno schermo, e in tal modo, viene ricostruita una rappresentazione tridimensionale dell'oggetto.

Microscopia elettronica associata alla crio-ultramicrotomia



5 μm

Nella **microscopia elettronica associata alla crio-ultramicrotomia**, si osservano campioni congelati rapidamente, al fine di ridurre gli artefatti provocati dall'utilizzo di sostanze chimiche. L'analisi computerizzata di sezioni relativamente spesse è in grado di ricostruire un'immagine caratterizzata da profondità di campo.