I microscopi

La citologia è lo studio della cellula e della sua struttura. Le dimensioni che si utilizzano sono

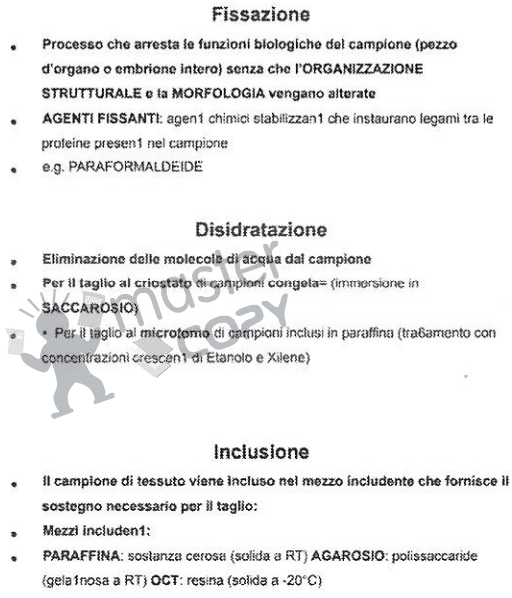
- il micrometro (μm) che corrisponde a un milionesimo di metro ed è chiamato anche micron, le cellule batteriche misurano qualche micron di diametro.
- Il nanometro (nm) per le molecole e le strutture subcellulari e corrisponde a un miliardesimo di metro.
- L'angstrom (A) per misurare proteine e DNA e corrisponde a 10^-10 metri, circa le dimensioni di un atomo di idrogeno.

Il limite di risoluzione indica quanto distanti devono essere degli oggetti affinché possano essere distinti come unità separate. Più piccolo è il limite di risoluzione, più grande è il potere di risoluzione (ossia la capacità di vedere i dettagli fini delle strutture).

I microscopi possono essere:

- Ottico: per la natura della luce, il limite teorico di risoluzione per un microscopio ottico è approssimativamente la metà della lunghezza d'onda utilizzata per illuminare un campione. Per luce visibile il limite è di circa 200-350 nm. Questo tipo di microscopia di definisce microscopia in campo luminoso perché la luce bianca attraversa direttamente il campione che può essere colorato o no e il fondo è illuminato. Una limitazione di questo approccio è che il campione deve essere fissato chimicamente (preservato), disidratato e incluso nella paraffina o in plastica per permettere il taglio in sezioni sottili e poi deve essere colorato per evidenziare le strutture di per sé trasparenti devitalizzando il campione.
    - Specializzati: la microscopia a contrasto di fase e quella a contrasto interferenziale rendono possibile una visione chiara delle cellule viventi aumentando e amplificando minime variazioni nella fase della luce trasmessa quando attraversa una struttura con densità diversa dal mezzo circostante. Quello a fluorescenza permette di evidenziare con colori fluorescenti specifiche proteine, sequenze di DNA e altre molecole grazie a un particolare fluorocromo o un anticorpo marcato con un fluorocromo. Queste sono molecole che dopo aver assorbito fotoni di una certa lunghezza d'onda esibiscono fluorescenza con una lunghezza d'onda maggiore o minore. Una limitazione della microscopia a fluorescenza è che può mettere a fuoco un piano alla volta mentre la fluorescenza illumina tutto il preparato sfocando l'immagine. Questo ostacolo viene superato dai microscopi confocali a scansione che utilizzano un raggio laser per illuminare un singolo piano del preparato alla volta.
- Elettronico: utilizza un raggio di elettroni che viene deviato e messo a fuoco da un campo elettromagnetico. Visto che la lunghezza d'onda degli elettroni è nettamente inferiore rispetto a quella della luce visibile, il limite di risoluzione risulta essere generalmente circa 1000 volte migliore rispetto al microscopio ottico. Il microscopio elettronico può essere in base al meccanismo di formazione dell'immagine:
    - TEM (a trasmissione): forma le immagini mediante gli elettroni che vengono trasmessi attraverso il campione
    - SEM (a scansione): effettua una scansione della superficie del campione e forma un'immagine attraverso gli elettroni che vengono deflessi dalla superficie esterna del campione stesso.

PRIMA DI OSSERVARE AL MICROSCOPIO??



Metodi biochimici

- Centrifugazione: mezzo per separare le strutture cellulari e le macromolecole sulla base delle loro dimensioni, della loro forma e del loro peso (frazionamento subcellulare). L'ultracentrifuga può essere di maggiore aiuto perché raggiunge velocità più alte.
- Cromatografia: una miscela di molecole in soluzione viene separata nelle singole componenti.
- Elettroforesi: utilizzo di un campo elettrico per separare le macromolecole in base alla loro mobilità attraverso un gel semisolido.

Caratteri generali a tutte le cellule

- Immagazzinare l'informazione in geni costituiti da DNA
- Il codice genetico è per tutte le cellule lo stesso eccetto qualche eccezione
- Le cellule decodificano i geni del DNA con un sistema a RNA (trascrizione) che traduce l'informazione genetica in proteine (traduzione)
- Sintetizzano proteine grazie ai ribosomi
- Le proteine svolgono un ruolo essenziale sia a livello strutturale che funzionale
- Tutte le cellule richiedono energia per mantenere l'ambiente interno e per operare la sintesi delle molecole che le costituiscono. Utilizzano quindi ATP.
- Sono delimitate dalla membrana plasmatica composta da proteine e un doppio strato lipidico

I virus

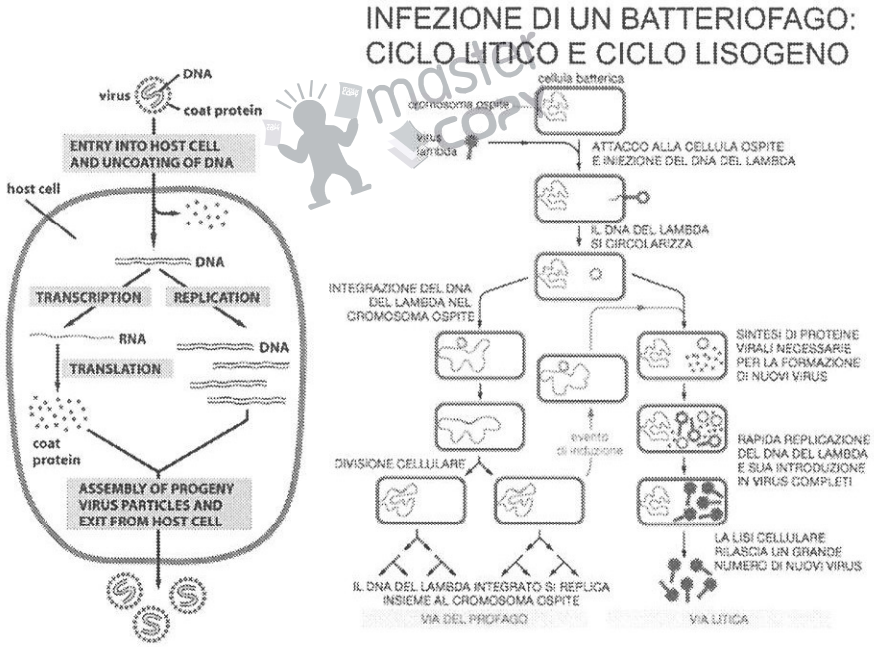
Dal latino venom (veleno). Possiedono un genoma che passano alla progenie e non hanno possibilità di duplicarsi se non dopo l'entrata in un organismo ospite(host). È grazie all'utilizzo di ultra-centrifughe che sono stati identificati come tali piuttosto che come un veleno, sono infatti parassiti intracellulari obbligati a una cellula molto specifica. Sono composti da frammenti di acido nucleico che codificano un numero piccolo di prodotti genici avvolti in un guscio protettivo di proteine o membrana. I virus si classificano un base a diversi fattori:

- Tipo di cellula infettata: batteriche, vegetali o animali
- Caratteristiche morfologiche: simmetria elicoidale, capside a forma poliedrica o forma complessa

- Materiale genetico virale: DNA o RNA entrambi a singola o doppia elica

Il ciclo virale

1. Le proteine di riconoscimento si agganciano all'ospite
2. Il virus entra nell'ospite: i virus forniti di involucro entrano nella cellula ospite fondendosi con la membrana in seguito a endocitosi. I virus sprovvisti di involucro formano un poro per trasferire il genoma virale nel citoplasma (membrana plasmatica) o rompono la membrana degli endosomi dopo l'endocitosi.
3. Disassembla il rivestimento proteico
4. Rilascia il materiale genetico



RESISTENZA AI FARMACI

1. Modifica del bersaglio molecolare del farmaco desensibilizzandosi a esso
2. Produzione di enzimi farmaco-degradanti
3. Impedimento al farmaco di accedere al bersaglio

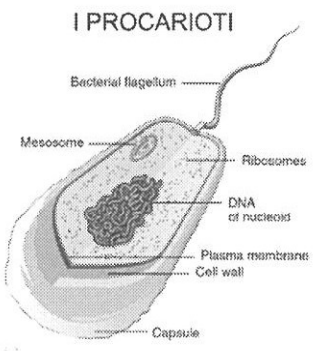
Ciclo di un retrovirus

Se nell'altro esempio avevamo un virus a DNA che si integra nel DNA dell'host, qui con l'RNA c'è bisogno di un ulteriore passaggio per l'integrazione in RNA di altre cellule: la trascrittasi inversa (che produce una doppia elica di DNA/RNA e quindi una doppia elica di DNA/DNA).

Riconoscimento di un virus: viene identificato un doppio filamento di RNA e la presenza di due citochine. Come difesa si ha lo spegnimento della sintesi di proteine e della duplicazione dell'RNA e di conseguenza la morte cellulare per apoptosi (spesso con l'aiuto di un linfocita killer).

Procarioti (batteri)

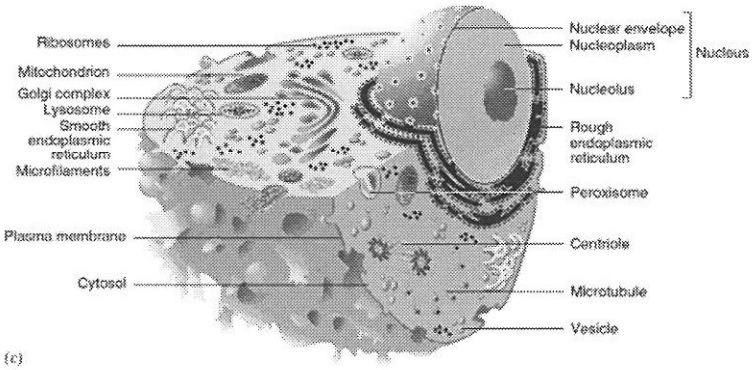
Le cellule procarioti sono in organismi che non hanno uno spazio interno delimitato e specializzato. Abbiamo una membrana plasmatica che contiene gli organelli interni e non esiste il colesterolo. Il citoplasma è privo di compartimenti specializzati. Sono distinguibili in Bacteria e Archaea (domini). I Bacteria includono la maggior parte degli organismi unicellulari privi di nucleo (come per esempio Escherichia Coli). Gli Archaea includono molte specie che sopravvivono in habitat estremi del pianeta e hanno strategie metaboliche molto differenti (come, per esempio, i metanogeni che ottengono energia dall'idrogeno mentre convertono l'anidride carbonica in metano). Gli Archaea sono



considerati discendenti di un antenato comune che ha dato origine anche agli eucarioti, infatti sebbene ricordino i Bacteria in dimensioni e struttura grossolana, sono molto più simili agli eucarioti per quanto riguarda i meccanismi di replicazione del DNA, della trascrizione e del processamento dell'RNA. Le cellule si presentano in varie dimensioni e forme, nella maggior parte dei casi il fattore che limita le dimensioni di una cellula è il rapporto superficie/volume (sulla superficie avvengono gli scambi di materiale dall'interno all'esterno e viceversa, dal volume dipende la quantità di nutrienti che deve essere importata ed eliminata).
Nelle cellule procariotiche, l'informazione genetica, invece di essere custodita da una membrana, è ripiegata in una struttura compatta all'interno del citoplasma chiamata nucleoide. Di solito non contengono membrane interne e la maggior parte delle funzioni vitali avviene nel citoplasma o a livello di membrana plasmatica (però nei batteri fotosintetici chiamati cianobatteri ci sono molte membrane sito di fotosintesi). Il DNA batterico è generalmente presente nella cellula come una singola molecola circolare (cromosoma) associata a poche proteine.

Eucarioti

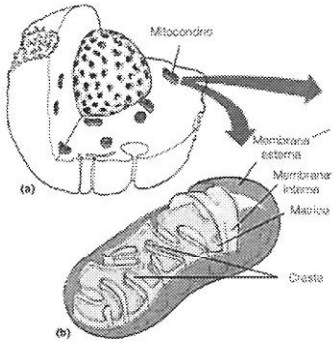
Gli eucarioti hanno una serie di strutture specializzate dedite a delimitare aree con determinate funzioni e il nucleo. Fanno uso abbondante di delle membrane interne per compartimentare specifiche funzioni e hanno spesso numerosi organelli ciascuno delimitato da una membrana singola che può essere specifica. Un'altra caratteristica degli eucarioti è la possibilità di scambiare materiale tra i propri compartimenti e con l'esterno. Questo scambio avviene per endo ed esocitosi, processi che implicano fusione tra membrane. Nell'endocitosi porzioni di membrana si introflettono e si staccano a formare delle vescicole citoplasmatiche contenenti sostanze che erano precedentemente all'esterno della cellula, l'endocitosi è il processo inverso.



Il DNA eucariota si trova all'interno della cellula come molteplici molecole lineari finemente complessate con una grande quantità di proteine (questi complessi si chiamano **cromatina**).

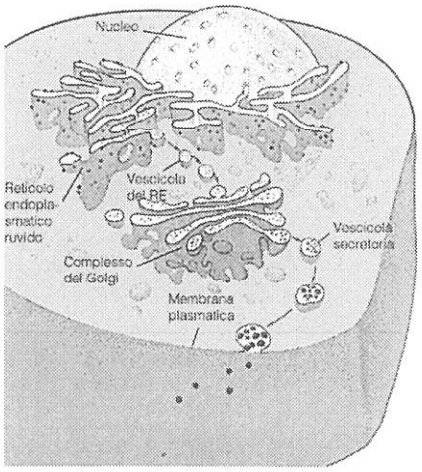
<u>Organizzazione</u>

- Nucleo: funzione di centro di informazione della cellula che contiene i cromosomi (e quindi il DNA) ed è avvolto dalla membrana nucleare interna ed esterna (il loro insieme costituisce l'involucro nucleare) caratterizzata da piccole aperture chiamate pori che servono da canali per alcune molecole idrosolubili. Questo canale è rivestito da un macchinario proteico che regola i movimenti delle molecole (complesso del poro). Il numero di cromosomi presenti all'interno del nucleo è diverso per ogni specie. Nel nucleo è anche presente il nucleolo, responsabile della sintesi dell'RNA ribosomiale e dell'avvio dell'assemblaggio delle componenti proteiche che formeranno i ribosomi.
- Mitocondrio: coinvolto nella produzione di energia permettendo l'ossidazione degli zuccheri. È la sede della respirazione aerobica ed è paragonabile in dimensioni a una cellula batterica. Possiede membrana mitocondriale interna ed esterna, la prima racchiude la matrice mitocondriale (sostanza semifluida che contiene enzimi e piccole molecole di DNA circolare che codifica RNA e proteine necessarie ai mitocondri). Sono ereditati per via materna nelle cellule animali. È all'interno di essi che si trovano enzimi metabolici e ATP. È caratterizzato da introflessioni della membrana (creste) che conservano ATP mentre nella matrice avvengono altre sequenze di



reazioni chimiche. Il numero di mitocondri nella cellula dipende dal bisogno energetico di essa.

- Cloroplasto: sede della fotosintesi delle piante e delle alghe. Tra i 5 e i 10 μm di lunghezza. Sono circondati da membrana interna ed esterna e contengono un fitto sistema membranoso di sacche appiattite (tilacoidi) e membrane tubulari (tilacoidi stromali). I tilacoidi sono impilati a formare i grana (al singolare granum). Utilizzano energia solare e anidride carbonica per sintetizzare gli zuccheri e gli altri composti organici all'interno dello stroma semifluido (dove si trovano anche ribosomi e molecole di DNA circolare). Contengono enzimi, intermedi e pigmenti che assorbono la luce. È l'esempio più importante dei plastidi (organelli che si trovano solo nelle piante).
- Reticolo endoplasmatico (RE): significa "all'interno del plasma", costituito da membrane tubulari e sacche appiattite (cisterne) interconnesse. Lo spazio interno racchiuso dalle membrane è chiamato lume. È in continuità con la membrana esterna dell'involucro nucleare e lo spazio tra le due membrane nucleari è pertanto parte dello stesso compartimento. Può essere:
    - Rugoso: ricoperto di ribosomi sul lato della membrana rivolta verso il citosol che sintetizzano attivamente polipeptidi che si accumulano nella membrana o nello spazio interno del RE. Le proteine di secrezione e le proteine di membrana sono sintetizzate dai ribosomi sul RER e le proteine da utilizzare all'interno del citosol o da importare negli organelli sono sintetizzate dai ribosomi liberi.
    - Liscio: non possiede alcun ribosoma ed è coinvolto nella sintesi dei lipidi e degli steroidi. È responsabile della inattivazione e detossificazione dei farmaci.



- Apparato del Golgi: prende il nome da Camillo Golgi che lo ha scoperto. È costituito da vescicole appiattite (cisterne) impilate e svolge un ruolo nell'impacchettamento delle proteine di secrezione e nella sintesi di polisaccaridi complessi. Le vescicole di transizione del RE vengono trasportate al Golgi dove vengono modificate e maturate. La maggior parte delle proteine di membrana e delle proteine di secrezione sono glicoproteine (uno o più carboidrati legati covalentemente). I passaggi della glicosilazione avvengono nel lume del RER e vengono portati a termine nel Golgi (che diventa quindi una specie di stazione di maturazione). Una volta rielaborate nell'apparato del Golgi vengono inglobate in vescicole di secrezione che si spostano verso la membrana plasmatica e vengono rilasciate all'esterno per esocitosi.
- Lisosomi: o,5-1μm di diametro circondato da una sola membrana. Sono serbatoio di immagazzinamento di idrolasi (enzimi in grado di digerire specifiche molecole biologiche come proteine, carboidrati e grassi) per sequestrarli fino a quando non siano veramente necessari perché molto aggressivi. Gli enzimi lisosomiali sono sintetizzati nel RER, trasportati al Golgi, impacchettati in vescicole che divengono lisosomi. La superficie esterna è altamente glicosilata formando uno strato ricoperto da carboidrati che protegge la membrana dall'attività idrolitica. Sono in grado di degradare qualsiasi molecola biologica.
- Perossisomi: circondati da una membrana singola, si trovano nelle cellule vegetali, animali, nei funghi, protozoi e alghe. Svolgono funzioni a seconda del tipo di cellula ma in generale vanno a generare e comporre il perossido di idrogeno (sottoprodotto di reazioni metaboliche, tossico per le cellule, può essere decomposto in acqua e dall'enzima catalasi). Si pensa che possano essere coinvolti nella regolazione dei livelli di ossigeno della cellula e possano avere un ruolo nell'invecchiamento di essa. Nei perossisomi animali, gli acidi grassi fino a