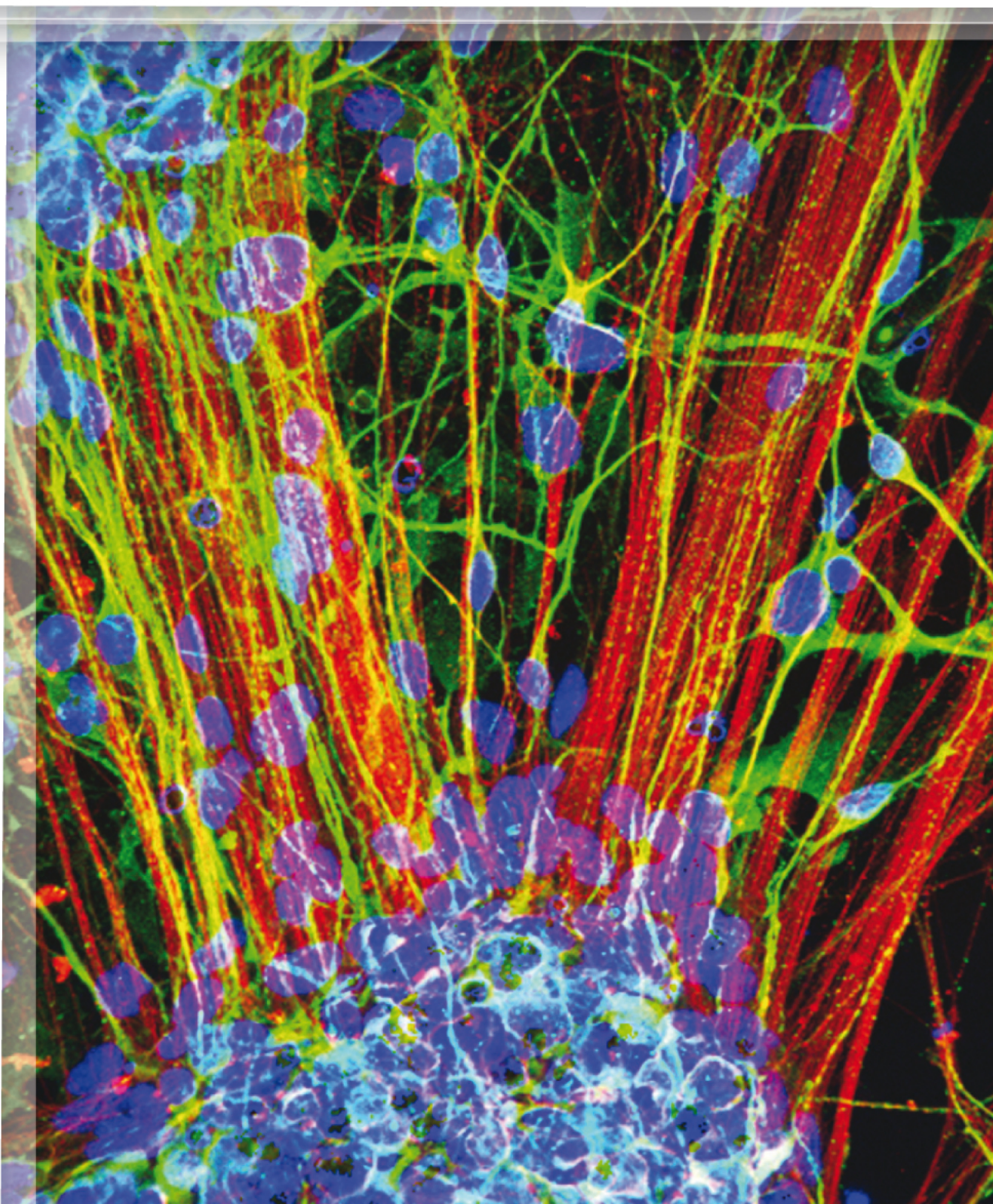


Gerald Karp

Quinta edizione

# Biologia Cellulare e Molecolare

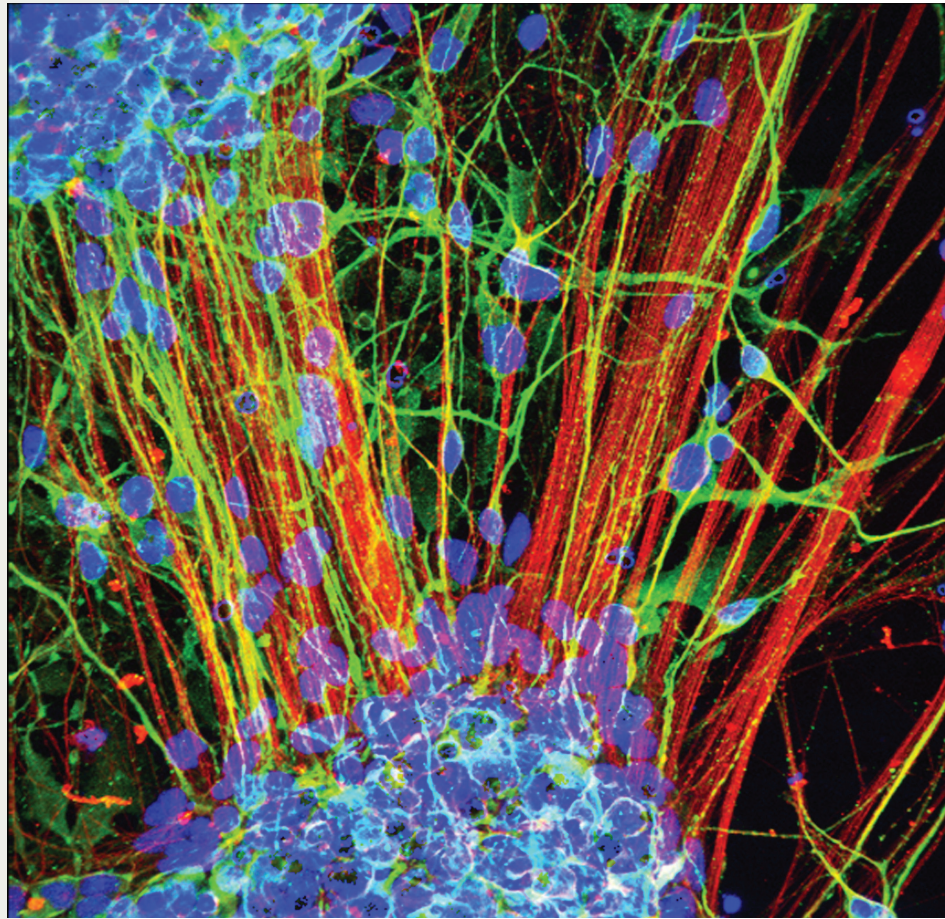
Concetti ed Esperimenti







V  
edizione



# Biologia Cellulare e Molecolare

## Concetti ed Esperimenti

**Gerald Karp**

Il Capitolo 12 è stato aggiornato in collaborazione con

**James G. Patton**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES  
VANDERBILT UNIVERSITY



Titolo originale:

GERALD KARP

Cell and Molecular Biology - Concepts and Experiments - 7th Ed.

Copyright © 2013, 2010, 2008, 2005, 2002, John Wiley & Sons, Inc.

Biologia Cellulare e Molecolare - Concetti ed Esperimenti - V Ed.

Copyright © 2015, 2012, 2008, 2004, 2000, EdiSES S.r.l. - Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

2019 2018 2017 2016 2015

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata.

*A norma di legge è vietata la riproduzione, anche parziale, del presente volume o di parte di esso con qualsiasi mezzo.*

*L'Editore*

*Stampato presso la*

Tipolitografia Sograte srl

Zona Ind. Regnano - Città di Castello (PG)

*per conto della*

EdiSES - Napoli

**www.edises.it**

**info@edises.it**

ISBN 978 88 7959 8637



## L'autore

**Gerald C. Karp** ha conseguito la laurea presso l'Università della California, Los Angeles, e un dottorato presso l'Università di Washington. Ha condotto un periodo di ricerche post-dottorato presso il Medical Center dell'Università del Colorado prima di divenire membro della facoltà all'Università della Florida. È autore di numerosi articoli di ricerca sulla biologia cellulare e molecolare dello sviluppo precoce. I suoi interessi comprendono la sintesi dell'RNA negli embrioni precoci, i movimenti delle cellule mesenchimali durante la ga-

strulazione e la determinazione cellulare nei mixomiceti. Per 13 anni ha tenuto corsi di biologia molecolare, cellulare e dello sviluppo all'Università della Florida. Durante questo periodo Karp ha pubblicato un testo di biologia dello sviluppo insieme a N. John Berrill e un testo di biologia cellulare e molecolare. Trovando impossibile essere contemporaneamente professore a tempo pieno e autore, Karp ha dato le dimissioni dal suo posto in facoltà per concentrarsi sulla revisione di questo testo ogni tre anni.

## In copertina

La micrografia presente in copertina mostra cellule nervose umane che si sono sviluppate (differenziate) in una piastra di coltura da cellule staminali indifferenziate. Le cellule staminali utilizzate in questo esperimento sono cellule pluripotenti, cioè esse sono capaci di svilupparsi in qualsiasi tipo di cellule del corpo umano. In questo esperimento le cellule staminali sono indirizzate a differenziarsi specificatamente in cellule nervose tramite l'aggiunta di un certo numero di fattori neurone-specifici al terreno di coltura in cui si stanno sviluppando. Di solito, le cellule staminali pluripotenti umane si trovano esclusivamente negli stadi precoci dello sviluppo embrionale umano; quelle utilizzate in questo esperimento non derivano da un embrione ma sono state generate sperimentalmente. Esse sono state indotte da un tipo di cellule del tessuto connettivo dette fibroblasti forzando il fibroblasto a esprimere dei geni che di solito non espri-

me. Forzando i fibroblasti adulti (o altri tipi di cellule adulte) ad esprimere questi "geni per cellule staminali" si determina la perdita della loro capacità di differenziarsi e si trasformano in *cellule staminali pluripotenti indotte (cellule iPS)*. Le cellule iPS un giorno potrebbero giocare un ruolo chiave nel sostituire cellule di organi e tessuti malati. I fibroblasti usati in questo esperimento non derivano da un individuo sano, ma da un soggetto schizofrenico. Non si conoscono le basi molecolari della schizofrenia, ma si spera che gli studi sul differenziamento delle cellule nervose di un individuo malato forniscano importanti indizi per comprendere le basi della malattia. Tali cellule potrebbero anche essere utili per selezionare potenziali farmaci per curare la malattia in studio. Per questo, le cellule iPS sono state indicate come un "paziente in una capsula Petri". (Per gent. conc. di Fred H. Gage e Kristen Brennand.)



# Autori

---

## Edizione italiana a cura di:

LAURA AMICONE  
*Università di Roma "La Sapienza"*

ELENA BATTAGLIOLI  
*Università degli Studi di Milano*

PAOLO BONALDO  
*Università degli Studi di Padova*

PATRIZIA BONFANTI  
*Università degli Studi di Milano - Bicocca*

PAOLA BRAGHETTA  
*Università degli Studi di Padova*

ANTONELLA CAMAIONI  
*Università di Roma "Tor Vergata"*

ANITA EMILIA COLOMBO  
*Università degli Studi di Milano - Bicocca*

ISABELLA DALLE DONNE  
*Università degli Studi di Milano*

STEFANO DUGA  
*Università degli Studi di Milano*

CARLO GANGITANO  
*Università Cattolica del Sacro Cuore*

CORRADO GARBI  
*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*

PATRIZIA LIMONTA  
*Università degli Studi di Milano*

MARINA MARINI  
*Università di Bologna*

ROBERTA MORETTI  
*Università degli Studi di Milano*

ANGELO POLETTI  
*Università degli Studi di Milano*

ANTONINA SIDOTI  
*Università degli Studi di Messina*

ROBERTO SITIA  
*Università Vita-Salute San Raffaele Milano*

RAFFAELE STRIPPOLI  
*Università di Roma "La Sapienza"*

FRANCESCA ZALFA  
*Università Campus Bio-Medico di Roma*

## Revisione a cura di:

ENRICO GINELLI  
*Università degli Studi di Milano*





# Prefazione

---

Prima di cominciare a lavorare alla prima edizione di questo testo, ho steso un certo numero di linee guida fondamentali sul tipo di libro che mi proponevo di scrivere.

- Desideravo un libro adatto per un corso che si svolgesse in un singolo semestre o in uno o due trimestri, ai primi anni di un corso di laurea. Mi misi, quindi, a delineare un testo di circa 800 pagine, tale da non sopraffare o scoraggiare gli studenti di quel livello.

- Desideravo un testo che insistesse su concetti fondamentali, quali le relazioni tra struttura e funzione nelle molecole, il carattere dinamico degli organelli cellulari, l'uso dell'energia chimica nello svolgimento delle attività cellulari e nell'assicurare l'accuratezza delle biosintesi macromolecolari, l'unità e la diversità ai livelli macromolecolare e cellulare e i meccanismi che regolano le attività cellulari.

- Desideravo un testo basato su di un approccio sperimentale. La biologia cellulare e quella molecolare sono scienze sperimentali e, come molti docenti, ritengo che gli studenti debbano avere una qualche conoscenza di come facciamo a sapere quello che sappiamo. Con quest'idea in mente, ho deciso di accostarmi alla natura sperimentale dell'argomento in due maniere. Nella stesura di ogni capitolo ho incluso abbastanza evidenze sperimentali da giustificare molte delle conclusioni che erano tratte e, contemporaneamente, ho descritto le caratteristiche più importanti delle tecniche sperimentali fondamentali, rimandando il lettore ad una discussione più dettagliata presente nell'ultimo capitolo sui metodi. I Capitoli 8 e 9, ad esempio, contengono sezioni introduttive sulle tecniche che si sono rivelate più importanti nell'analisi delle citomembrane e del citoscheletro, rispettivamente. Ho incluso brevi discussioni di esperimenti di particolare importanza nel corpo stesso dei capitoli, per rinforzare la base sperimentale delle nostre conoscenze. Ho aggiunto più aspetti dettagliati delle metodologie nel "capitolo sulle tecniche" conclusivo in quanto (1) non ho voluto interrompere il filo del discorso di un argomento con un lungo paragrafo secondario sulla tecnologia e (2) mi sono reso conto che diversi docenti preferiscono discutere di una particolare tecnica che sia collegata con argomenti diversi.

Per quegli studenti, e quei docenti, che desiderino esplorare l'approccio sperimentale con maggiore approfondimento, ho aggiunto gli "Itinerari sperimentali" alla fine di ogni capitolo. Ognuno di questi descrive qualcuno dei dati sperimentali fondamentali che hanno condotto all'attuale comprensione di un particolare argomento, di speciale rilevanza per il capitolo relativo. Dato che lo scopo del resoconto è limitato, è stato possibile descrivere la progettazione degli esperimenti con un certo dettaglio. Le figure e le tabelle che sono fornite in queste sezioni sono spesso quelle stesse apparse nell'articolo di ricerca originale, fatto che permette al lettore di esaminare i dati originali e di capire che quest'analisi non è al di là delle sue possibilità. Gli Itinerari sperimentali illustrano, inoltre, la natura graduale

della ricerca scientifica, mostrando come i risultati di uno studio facciano sorgere domande che sono la base per studi successivi.

- Desideravo un testo che fosse interessante e leggibile. Per rendere il testo di maggiore interesse per studenti dei primi anni, in particolare per gli studenti dei primi anni delle facoltà mediche, ho introdotto "Prospettive per l'uomo", sezioni che illustrano come quasi tutti gli stati patologici dell'uomo siano riconducibili ad un qualche disturbo delle attività a livello cellulare e molecolare. Inoltre, queste sezioni mostrano l'importanza della ricerca di base come strada per comprendere ed eventualmente trattare la maggior parte di questi disturbi. Nel Capitolo 11, ad esempio, Prospettive per l'uomo descrive come i piccoli RNA interferenti sintetici si potrebbero rivelare un importante nuovo strumento per il trattamento delle malattie tumorali e virali, compresa l'AIDS. In questo stesso capitolo il lettore apprenderà come il meccanismo d'azione di questi RNA sia stato scoperto in studi sulle piante e sui nematodi. Da queste considerazioni risulta chiaro che nessuno è in grado di prevedere l'importanza pratica della ricerca di base in biologia cellulare e molecolare. Infine, ho cercato di includere nell'intero corpo del testo informazioni importanti sulla biologia umana e sulle applicazioni cliniche.

- Desideravo un programma illustrativo di alta qualità, che potesse aiutare gli studenti a visualizzare processi cellulari e molecolari complessi. Per raggiungere questo scopo, molte illustrazioni sono state suddivise in parti successive, in modo da frazionare l'informazione in parti più facilmente assimilabili. Gli eventi che avvengono ad ogni stadio sono descritti nella didascalia e/o nel testo corrispondente. Ho ritenuto opportuno includere anche un gran numero di micrografie, in modo da mostrare agli studenti le effettive rappresentazioni della maggior parte degli oggetti descritti. Tra le fotografie ci sono molte micrografie in fluorescenza che illustrano le proprietà dinamiche delle cellule o forniscono un mezzo per localizzare una proteina o una sequenza nucleotidica particolare. Ove possibile, ho cercato di appaiare disegni e micrografie, per aiutare lo studente a paragonare la versione schematizzata e quella effettiva di una struttura.

I cambiamenti più importanti della settima edizione possono essere elencati come segue:

- Ogni illustrazione è stata esaminata attentamente e molte immagini sono state modificate per aumentarne l'impatto visivo. È stata prestata particolare attenzione all'uniformità del colore, alla qualità delle immagini e al modo in cui strutture ed elementi vengono rappresentati in ogni figura e nel testo.

- In questa nuova edizione sono state inserite le Figure in focus, il cui scopo è mettere in evidenza un argomento chiave del capitolo. Focalizzando l'attenzione su queste figure, tramite l'utilizzo di modelli molecolari in 3D e micrografie,

## VIII

si fornisce una chiara spiegazione di uno dei concetti principali del capitolo.

- Il corpus delle informazioni in biologia cellulare e molecolare cambia continuamente e questo provoca la vivacità dell'interesse che proviamo per il campo di ricerca che abbiamo scelto. Anche se sono passati soltanto tre anni dalla pub-

blicazione della sesta edizione, quasi ogni discussione è stata modificata in misura maggiore o minore nel testo. Ciò è stato ottenuto senza allungare in modo significativo i capitoli.

- Questa nuova edizione contiene oltre 100 nuove micrografie e immagini derivanti dal computer, delle quali è sempre riportata la fonte originale.



# Agli studenti

---

Quando cominciai il college, la Biologia non era sicuramente in cima alla lista delle mie preferenze. Mi iscrissi ad un corso di antropologia per adempiere ad un requisito nel modo più semplice possibile. Durante questo corso appresi per la prima volta nozioni su cromosomi, mitosi e ricombinazione genetica e rimasi affascinato dalle intricate attività che avevano luogo in uno spazio così piccolo come quello cellulare. Il semestre successivo mi iscrissi ad un corso di Biologia introduttiva e cominciai a pensare seriamente di diventare un biologo cellulare. Racconto questa storia affinché possiate capire perché ho scritto questo libro.

Nonostante passino gli anni, considero ancora la Biologia cellulare la materia più affascinante da esplorare ed ancora mi dedico ogni giorno con amore alla lettura dei progressi raggiunti dai colleghi in questo campo. Per me, quindi, scrivere un testo di biologia cellulare fornisce una ragione e un'opportunità per mantenermi aggiornato su ciò che accade. Il mio obiettivo principale è di suscitare negli studenti interesse per le attività in cui molecole giganti e strutture minuscole del mondo cellulare sono impegnate. Un altro scopo è quello di fornire un'idea dei tipi di domande che i biologi molecolari e cellulari si pongono e degli approcci sperimentali che essi utilizzano per trovare delle risposte. Nel leggere il testo pensa come un ricercatore, considera l'evidenza che è presentata, pensa a spiegazioni alternative, pianifica esperimenti che potrebbero portare a nuove ipotesi.

Si potrebbe iniziare questo approccio osservando una delle molte micrografie elettroniche presenti nel testo. Per ottenere una fotografia del genere, dovresti stare seduto in una piccola stanza completamente buia davanti ad un grande strumento metallico costituito da una colonna che si innalza parecchi metri sopra la tua testa. Stai osservando attraverso una coppia di oculari uno schermo verde brillante. Le parti della cellula che stai esaminando appaiono scure e prive di colore contro lo sfondo verde brillante. Esse appaiono scure perché sono state colorate con atomi di metallo pesante che deflettono una frazione degli elettroni di un fascio che è stato focalizzato sullo schermo mediante grandi lenti elettromagnetiche. Gli elettroni che colpiscono lo schermo sono accelerati attraverso uno spazio sottovuoto della colonna da una forza di decine di migliaia di volt. Una delle tue mani può comandare una manopola che controlla il potere di ingrandimento dell'obiettivo. Un semplice giro di questa manopola può far slittare l'immagine da un intero campo di cellule ad una parte limitata della cellula, come pochi ribosomi o una piccola porzione di membrana cellulare. Una volta trovata una struttura di interesse, ruotando un'impugnatura, potrai allontanare lo schermo, permettendo al fascio di elettroni di colpire una porzione del film e produrre un'immagine fotografica del campione.

Poiché lo studio delle funzioni cellulari richiede l'impiego di notevoli strumenti, come il microscopio elettronico appena descritto, il ricercatore è fisicamente lontano dal soggetto in studio. In grande misura le cellule sono come piccole scatole nere: sono stati sviluppati molti metodi per testare queste scatole, ma restano ancora dei punti oscuri. Con grandi sforzi la conoscenza di strutture o processi si è ampliata, ma nascono sempre altri interrogativi. In questo modo lo studio della Biologia molecolare o cellulare può essere paragonato allo studio di un elefante da parte di sei uomini ciechi come narrato in una favola indiana. I sei uomini ciechi si recano in un luogo vicino per comprendere la natura degli elefanti. Quando arrivano, ciascuno di essi si avvicina all'elefante e comincia a toccarlo. Il primo cieco tocca lateralmente l'elefante e conclude che un elefante è liscio come una parete. Il secondo tocca il tronco e decide che un elefante è tondo come un serpente. Gli altri membri del gruppo toccano la zanna, la zampa, l'orecchio e la coda e ciascuno ricava una propria impressione dell'animale in base alla propria limitata esperienza. Similmente, i biologi cellulari sono limitati da ciò che apprendono utilizzando un particolare approccio o tecnica sperimentale. Sebbene ogni nuova informazione si aggiunga alle conoscenze preesistenti fornendo un concetto migliore dell'attività in studio, il quadro totale resta ancora incerto.

Prima di concludere questa piccola introduzione, voglio fornire al lettore qualche suggerimento: non accettare ogni cosa letta necessariamente come vera. Vi sono diverse ragioni per affermare ciò. Indubbiamente ci sono errori nel testo che possono essere dovuti all'ignoranza dell'autore o ad una cattiva interpretazione della letteratura scientifica. Ma, cosa più rilevante, dobbiamo considerare la natura della ricerca biologica. La Biologia è una scienza empirica: nulla è mai dimostrato. Noi raccogliamo dati su un particolare organello cellulare, una reazione metabolica, un movimento intracellulare e traiamo delle conclusioni. Alcune conclusioni si basano su prove più fondate rispetto ad altre. Persino se c'è un consenso comune relativo a "fatti" che riguardano un particolare fenomeno, spesso ci sono diverse possibili interpretazioni dei dati. Le ipotesi sono proposte e in genere stimolano ulteriori ricerche, portando quindi ad una rivalutazione della proposta originale. La maggior parte delle ipotesi che restano valide va incontro ad una sorta di "evoluzione".

La Biologia cellulare è un campo in continuo cambiamento e alcune delle migliori ipotesi spesso generano notevoli controversie. Anche se questo è un testo dove ci si aspetta di trovare materiale verificato, ci sono altri testi in cui sono proposte nuove idee. Queste idee in genere sono indicate come modelli. Io ho incluso alcuni modelli che presentano l'attuale pensiero, anche se sono speculativi. Essi rinforzano il concetto che i biologi cellulari operano alla frontiera della scienza, un confine tra l'ignoto e il noto.

# Per i docenti

---

I docenti che utilizzano il testo a scopo didattico possono scaricare dal sito [www.edises.it](http://www.edises.it), previa registrazione all'area docenti, le immagini del libro in formato PowerPoint.

# Indice

---

## 1 Introduzione allo studio della biologia cellulare e molecolare 1

### 1.1 Scoperta delle cellule 2

### 1.2 Proprietà fondamentali delle cellule 3

- Le cellule sono notevolmente complesse ed organizzate 3
- Le cellule possiedono un programma genetico e i mezzi per utilizzarlo 5
- Le cellule sono capaci di riprodursi 5
- Le cellule acquisiscono energia e la utilizzano 5
- Le cellule svolgono una varietà di reazioni chimiche 5
- Le cellule sono impegnate in numerose attività meccaniche 6
- Le cellule sono capaci di rispondere agli stimoli 6
- Le cellule sono capaci di auto-regolazione 6
- Le cellule evolvono 7

### 1.3 Due classi di cellule fundamentalmente diverse 7

- Le caratteristiche che distinguono le cellule procariotiche da quelle eucariotiche 8
- I tipi di cellule procariotiche 14
- I tipi di cellule eucariotiche: la specializzazione cellulare 15
- Le dimensioni delle cellule e delle loro componenti 17
- La biologia di sintesi 17
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** La prospettiva della terapia di sostituzione cellulare 20

### 1.4 Virus 23

- I viroidi 26
- **ITINERARI SPERIMENTALI:** L'origine delle cellule eucariotiche 26

## 2 Basi chimiche della vita 32

### 2.1 Legami covalenti 33

- Le molecole polari e non polari 34
- La ionizzazione 34

### 2.2 Legami non covalenti 34

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** I radicali liberi come causa dell'invecchiamento 35
- I legami ionici: attrazioni fra atomi provvisti di carica 35
- I legami idrogeno 36
- Le interazioni idrofobiche e le forze di van der Waals 36
- Le proprietà dell'acqua sono essenziali per la vita 37

### 2.3 Acidi, basi e tamponi 39

### 2.4 Natura delle molecole biologiche 40

- I gruppi funzionali 41
- Una classificazione delle molecole biologiche in base alla funzione 41

### 2.5 Quattro famiglie di molecole biologiche 42

- I carboidrati 43
- I lipidi 47
- Le proteine 50
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Un ripiegamento non corretto delle proteine può avere conseguenze mortali 66
- Gli acidi nucleici 77

## 2.6 Formazione di strutture macromolecolari complesse 79

- L'assemblaggio del virus del mosaico del tabacco e delle subunità ribosomali 79

- **ITINERARI SPERIMENTALI:** Gli chaperoni: proteine che aiutano altre proteine a ripiegarsi in maniera corretta 80

## 3 Bioenergetica, enzimi e metabolismo 86

### 3.1 Bioenergetica 87

- Le leggi della termodinamica e il concetto di entropia 87
- L'energia libera 89

### 3.2 Enzimi come catalizzatori biologici 94

- Le proprietà degli enzimi 95
- Il superamento della barriera dell'energia di attivazione 96
- Il sito attivo 97
- I meccanismi della catalisi enzimatica 99
- La cinetica enzimatica 102
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Il crescente problema della resistenza agli antibiotici 106

### 3.3 Metabolismo 108

- Una visione d'insieme del metabolismo 108
- L'ossidazione e la riduzione: una questione di elettroni 109
- La cattura e l'utilizzazione dell'energia 110
- La regolazione metabolica 115

## 4 Struttura e funzione della membrana plasmatica 120

### 4.1 Panoramica delle funzioni della membrana 121

### 4.2 Breve storia degli studi sulla struttura della membrana plasmatica 123

### 4.3 Composizione chimica delle membrane 125

- I lipidi di membrana 125
- L'asimmetria dei lipidi di membrana 128
- I carboidrati di membrana 129

### 4.4 Struttura e funzioni delle proteine di membrana 130

- Le proteine integrali di membrana 130
- Lo studio della struttura e delle proprietà delle proteine integrali di membrana 132
- Le proteine periferiche di membrana 137
- Le proteine di membrana ancorate ai lipidi 137

### 4.5 Lipidi e fluidità della membrana 138

- L'importanza della fluidità della membrana 139
- Il mantenimento della fluidità della membrana 139
- Le zattere (raft) lipidiche 139

### 4.6 Natura dinamica della membrana plasmatica 140

- La diffusione delle proteine di membrana dopo fusione cellulare 141
- Le restrizioni alla mobilità delle proteine e dei lipidi 142
- Il globulo rosso: un esempio di struttura della membrana plasmatica 145



## XII INDICE

### 4.7 Movimento di molecole attraverso le membrane cellulari 147

- L'energetica del movimento dei soluti 147
- La diffusione di sostanze attraverso le membrane 149
- La diffusione facilitata 156
- Il trasporto attivo 157

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** I difetti nei canali ionici e nei trasportatori come causa di malattie ereditarie 162

### 4.8 Potenziali di membrana e impulsi nervosi 164

- Il potenziale di riposo 164
- Il potenziale d'azione 165
- La propagazione di potenziali d'azione come un impulso 167
- La trasmissione nervosa: attraversare lo spazio sinaptico 168

- **ITINERARI SPERIMENTALI:** Il recettore dell'acetilcolina 171

## 5 Respirazione aerobica e mitocondrio 178

### 5.1 Struttura e funzione dei mitocondri 179

- Le membrane mitocondriali 180
- La matrice mitocondriale 182

### 5.2 Metabolismo ossidativo nel mitocondrio 183

- Il ciclo degli acidi tricarbossilici (ATC) 185
- L'importanza dei coenzimi ridotti nella formazione dell'ATP 186

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Il ruolo del metabolismo anaerobico e di quello aerobico nell'attività fisica 188

### 5.3 Ruolo dei mitocondri nella sintesi di ATP 189

- I potenziali di ossido-riduzione 189
- Il trasporto degli elettroni 190
- I tipi di trasportatori di elettroni 191

### 5.4 Traslocazione dei protoni e creazione di una forza motrice protonica 198

### 5.5 Macchinario per la sintesi di ATP 199

- La struttura dell'ATP sintasi 200
- Il meccanismo della formazione dell'ATP secondo la teoria del cambio di legame 201
- Altri ruoli per la forza motrice protonica oltre alla sintesi dell'ATP 205

### 5.6 Perossisomi 206

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le malattie causate da anomalie nella funzione dei mitocondri e dei perossisomi 207

## 6 Fotosintesi e cloroplasto 211

### 6.1 Struttura e funzione del cloroplasto 213

### 6.2 Panoramica del metabolismo fotosintetico 214

### 6.3 Assorbimento della luce 216

- I pigmenti fotosintetici 216

### 6.4 Unità fotosintetiche e centri di reazione 218

- La formazione dell'ossigeno: coordinazione dell'attività di due differenti sistemi fotosintetici 218
- Uccidere le erbacce inibendo il trasporto di elettroni 225

### 6.5 Fotofosforilazione 225

- La fotofosforilazione non ciclica e ciclica 226

### 6.6 Fissazione dell'anidride carbonica e sintesi di carboidrati 226

- La sintesi dei carboidrati nelle piante C<sub>3</sub> 226
- La sintesi dei carboidrati nelle piante C<sub>4</sub> 231
- La sintesi dei carboidrati nelle piante CAM 232

## 7 Interazioni tra le cellule e il loro ambiente 235

### 7.1 Spazio extracellulare 236

- La matrice extracellulare 236

### 7.2 Interazioni delle cellule con substrati extracellulari 244

- Le integrine 244
- Le adesioni focali e gli emidesmosomi:  
l'ancoraggio delle cellule al loro substrato 247

### 7.3 Interazioni delle cellule con altre cellule 250

- Le selectine 251
- La superfamiglia delle immunoglobuline 252
- Le caderine 253

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Il ruolo dell'adesione cellulare nell'infiammazione e nella metastasi 255
- Le giunzioni aderenti e i desmosomi: ancoraggio di cellule con altre cellule 257
- Il ruolo dei recettori di adesione cellulare nella trasmissione dei segnali attraverso la membrana 259

### 7.4 Giunzioni strette: barriera allo spazio extracellulare 260

### 7.5 Giunzioni comunicanti e plasmodesmi: mediatori della comunicazione intercellulare 262

- I plasmodesmi 265

### 7.6 Pareti cellulari 266

## 8 Sistemi delle membrane citoplasmatiche: struttura, funzione e traffico di membrana 270

### 8.1 Sguardo d'insieme al sistema delle endomembrane 271

### 8.2 Alcuni approcci allo studio delle endomembrane 273

- Indicazioni ottenute dall'autoradiografia 273
- Indicazioni ottenute dall'uso della proteina verde fluorescente 273
- Indicazioni ottenute dall'analisi biochimica delle frazioni subcellulari 275
- Indicazioni ottenute dall'uso di sistemi acellulari 276
- Indicazioni ottenute dallo studio di mutanti 277

### 8.3 Reticolo endoplasmatico 279

- Il reticolo endoplasmatico liscio 280
- Funzioni del reticolo endoplasmatico rugoso 280
- Dal RE al complesso di Golgi: la prima tappa del trasporto vescicolare 289

### 8.4 Complesso di Golgi 290

- La glicosilazione nel complesso di Golgi 292
- Il movimento di materiali attraverso il complesso di Golgi 292

**8.5 Tipi di vescicole di trasporto e loro funzioni 295**

- Le vescicole rivestite da COPII: trasporto delle proteine cargo dal RE al complesso di Golgi 296
- Le vescicole rivestite da COPI: trasporto retrogrado delle proteine verso il RE 298
- Il superamento del complesso di Golgi: smistamento delle proteine al TGN 298
- L'indirizzamento delle vescicole verso un particolare compartimento 300

**8.6 Lisosomi 303**

- L'autofagia 304
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le malattie che derivano da difetti nella funzione lisosomiale 306

**8.7 Vacuoli delle cellule vegetali 307****8.8 Percorso endocitico: movimento di membrane e materiali all'interno della cellula 308**

- L'endocitosi 308
- La fagocitosi 315

**8.9 Assunzione post-traduzionale di proteine da parte di perossisomi, mitocondri e cloroplasti 316**

- L'assunzione delle proteine da parte dei perossisomi 316
- L'assunzione delle proteine da parte dei mitocondri 316
- L'assunzione delle proteine da parte dei cloroplasti 318
- **ITINERARI SPERIMENTALI:** L'endocitosi mediata da recettori 319

**9 Citoscheletro e mobilità cellulare 324****9.1 Visione d'insieme delle funzioni più importanti del citoscheletro 325****9.2 Studio del citoscheletro 326**

- L'uso della microscopia a fluorescenza su cellule vive 326
- L'uso dei saggi di motilità *in vitro* su singole molecole 327
- L'uso di tecniche di imaging in fluorescenza per monitorare le dinamiche del citoscheletro 329

**9.3 Microtubuli 330**

- Struttura e composizione 330
- Le proteine associate ai microtubuli 331
- I microtubuli come supporto strutturale e come organizzatori 332
- I microtubuli come agenti della motilità intracellulare 333
- Le proteine motrici che scorrono lungo il citoscheletro microtubulare 334
- I centri di organizzazione dei microtubuli (MTOC) 339
- Le proprietà dinamiche dei microtubuli 341
- Le ciglia e i flagelli: struttura e funzione 345
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Il ruolo delle ciglia nello sviluppo e nelle malattie 349

**9.4 Filamenti intermedi 354**

- L'assemblaggio e il disassemblaggio dei filamenti intermedi 354
- I tipi di filamenti intermedi e le loro funzioni 356

**9.5 Microfilamenti 356**

- L'assemblaggio e il disassemblaggio dei microfilamenti 358
- La miosina: il motore molecolare dei filamenti di actina 360

**9.6 Contrattilità muscolare 364**

- Il modello di scorrimento dei filamenti per la contrazione muscolare 366

**9.7 Motilità non muscolare 371**

- Le proteine che legano l'actina 372
- Esempi di contrattilità e motilità non muscolari 374

**10 Natura del gene e genoma 386****10.1 Concetto di gene come unità ereditaria 387****10.2 Cromosomi: supporto fisico dei geni 388**

- La scoperta dei cromosomi 388
- I cromosomi come portatori dell'informazione genetica 389
- L'analisi genetica in *Drosophila* 390
- Il crossing over e la ricombinazione 390
- Le mutagenesi e i cromosomi giganti 392

**10.3 Natura chimica del gene 393**

- La struttura del DNA 393
- La proposta di Watson-Crick 394
- Il superavvolgimento del DNA 397

**10.4 Struttura del genoma 398**

- La complessità del genoma 399
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le malattie derivanti dall'espansione di ripetizioni di trinucleotidi 404

**10.5 Stabilità del genoma 406**

- La duplicazione dell'intero genoma (poliploidizzazione) 406
- La duplicazione e il cambiamento di sequenze di DNA 407
- "Geni che saltano" e la natura dinamica del genoma 408

**10.6 Sequenziamento dei genomi: impronte dell'evoluzione biologica 411**

- La genomica comparativa: "se è conservato, deve essere importante" 413
- La base genetica dell'"essere umani" 414
- La variabilità genetica all'interno delle popolazioni umane 416
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le applicazioni mediche dell'analisi dei genomi 417
- **ITINERARI SPERIMENTALI:** La natura chimica del gene 420

**11 Espressione genica: dalla trascrizione alla traduzione 426****11.1 La relazione tra geni, proteine e RNA 427**

- Il flusso di informazione attraverso la cellula: un quadro generale 428

**11.2 Quadro generale della trascrizione nelle cellule procariotiche ed eucariotiche 429**

- La trascrizione nei procarioti 432
- La trascrizione e la maturazione dell'RNA negli eucarioti 433

**11.3 Sintesi e maturazione degli RNA ribosomali e degli RNA transfer 435**

- La sintesi del precursore dell'rRNA 436
- La maturazione dell'rRNA precursore 437
- La sintesi e la maturazione dell'rRNA 5S 440
- Gli RNA transfer 440

**11.4 Sintesi e maturazione degli RNA messaggeri eucariotici 441**

- Il macchinario molecolare per la trascrizione dell'mRNA 441  
 I geni interrotti: una scoperta inattesa 444  
 La maturazione degli RNA messaggeri eucariotici 448  
 Le implicazioni evolutive dei geni interrotti e dello splicing dell'RNA 454  
 La creazione di nuovi ribozimi in laboratorio 454
- 11.5 Piccoli RNA non codificanti e silenziamento indotto dall'RNA 455**
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le applicazioni cliniche dell'interferenza dell'RNA 458
- I microRNA: piccoli RNA che regolano l'espressione genica 459  
 piRNA: una classe di piccoli RNA che funzionano nelle cellule germinali 460  
 Gli altri RNA non codificanti 461
- 11.6 Codificazione dell'informazione genetica 461**  
 Le proprietà del codice genetico 461
- 11.7 Decodificazione dei codoni: il ruolo degli RNA transfer 464**  
 La struttura dei tRNA 465
- 11.8 Traduzione dell'informazione genetica 468**  
 Inizio 468  
 Allungamento 471  
 Terminazione 474  
 La sorveglianza dell'mRNA ed il controllo di qualità 474  
 I poliribosomi 475
- **ITINERARI SPERIMENTALI:** Il ruolo dell'RNA come catalizzatore 477
- 12 Controllo dell'espressione genica 483**
- 12.1 Controllo dell'espressione genica nei batteri 484**  
 L'organizzazione dei genomi batterici 484  
 L'operone batterico 484  
 I riboswitch 487
- 12.2 Controllo dell'espressione genica negli eucarioti: struttura e funzione del nucleo cellulare 488**  
 L'involucro nucleare 488  
 I cromosomi e la cromatina 493
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le aberrazioni cromosomiche e le malattie umane 504
- L'epigenetica: l'ereditarietà non dipende solo dalle sequenze di DNA 509  
 Il nucleo come organello organizzato 510
- 12.3 Panoramica sulla regolazione genica negli eucarioti 512**
- 12.4 Controllo a livello della trascrizione 514**  
 Il ruolo dei fattori di trascrizione nella regolazione dell'espressione genica 517  
 La struttura dei fattori di trascrizione 519  
 Le sequenze di DNA coinvolte nel controllo della trascrizione 522  
 L'attivazione della trascrizione: il ruolo degli enhancer, dei promotori e dei coattivatori 525  
 La repressione della trascrizione 530
- 12.5 Controllo a livello della maturazione dell'RNA 533**
- 12.6 Controllo a livello della traduzione 536**  
 Inizio della traduzione 536  
 La localizzazione citoplasmatica degli mRNA 537  
 Il controllo della stabilità dell'mRNA 538  
 Il ruolo dei microRNA nel controllo a livello della traduzione 539
- 12.7 Controllo post-traduzionale: come regolare la stabilità delle proteine 541**
- 13 Replicazione e riparazione del DNA 545**
- 13.1 Replicazione del DNA 546**  
 La replicazione semiconservativa 546  
 La replicazione nelle cellule batteriche 549  
 La struttura e la funzione delle DNA polimerasi 554  
 La replicazione nelle cellule eucariotiche 558
- 13.2 Riparazione del DNA 564**  
 La riparazione per escissione nucleotidica 565  
 La riparazione per escissione di base 566  
 La riparazione degli appaiamenti errati 567  
 La riparazione delle rotture a doppio filamento 567
- 13.3 Tra replicazione e riparazione 568**
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le conseguenze dei difetti nel meccanismo di riparazione del DNA 569
- 14 Riproduzione cellulare 572**
- 14.1 Ciclo cellulare 573**  
 Il ciclo cellulare *in vivo* 574  
 Il controllo del ciclo cellulare 574
- 14.2 Fase M: mitosi e citocinesi 581**  
 La profase 583  
 La prometafase 588  
 La metafase 590  
 L'anafase 592  
 La telofase 597  
 Le proteine motrici richieste per i movimenti nella mitosi 597  
 La citocinesi 597
- 14.3 Meiosi 602**  
 Gli stadi della meiosi 603
- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** La non disgiunzione meiotica e le sue conseguenze 608
  - **ITINERARI SPERIMENTALI:** La scoperta e la caratterizzazione dell'MPF 611
- 15 Segnalazione cellulare e trasduzione del segnale: comunicazione fra le cellule 617**
- 15.1 Caratteristiche fondamentali dei sistemi di segnalazione cellulare 618**
- 15.2 Panoramica dei messaggeri extracellulari e dei loro recettori 621**
- 15.3 Recettori accoppiati a proteine G e loro secondi messaggeri 621**

La trasduzione del segnale ad opera dei recettori accoppiati a proteine G 622

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le malattie associate ai recettori accoppiati alle proteine G 625

I secondi messaggeri 627

La specificità delle risposte associate alle proteine G 630

La regolazione dei livelli di glucosio nel sangue 631

Il ruolo dei recettori accoppiati alle proteine G nella percezione sensoriale 634

#### 15.4 Fosforilazione di proteine su residui di tirosina come meccanismo di trasduzione del segnale 636

La via di Ras-MAP chinasi 640

La segnalazione del recettore per l'insulina 644

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le vie di segnalazione intracellulari e la longevità umana 647

Le vie di segnalazione nelle piante 648

#### 15.5 Ruolo del calcio come messaggero intracellulare 648

La regolazione delle concentrazioni di calcio nelle cellule vegetali 652

#### 15.6 Convergenza, divergenza e dialogo crociato fra differenti vie di segnalazione 653

Esempi di convergenza, divergenza e dialogo crociato fra vie di segnalazione 654

#### 15.7 Ruolo dell'ossido di azoto (NO) come messaggero intracellulare 655

#### 15.8 Apoptosi (morte cellulare programmata) 656

La via estrinseca dell'apoptosi 658

La via intrinseca dell'apoptosi 659

### 16 Cancro 664

#### 16.1 Proprietà di base di una cellula cancerosa 665

#### 16.2 Cause del cancro 667

#### 16.3 Genetica del cancro 669

I geni onco-soppressori e gli oncogeni: freni e acceleratori 671

Il genoma del cancro 683

L'analisi dell'espressione genica 685

#### 16.4 Nuove strategie per combattere il cancro 687

L'immunoterapia 688

L'inibizione dell'attività delle proteine che promuovono il cancro 689

L'inibizione della formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) 692

- **ITINERARI SPERIMENTALI:** La scoperta degli oncogeni 694

### 17 Risposta immunitaria 699

#### 17.1 Panoramica della risposta immunitaria 700

Le risposte immunitarie innate 700

Le risposte immunitarie acquisite 703

#### 17.2 Teoria della selezione clonale: come si applica alle cellule B 704

La vaccinazione 706

#### 17.3 Linfociti T: attivazione e meccanismo d'azione 707

#### 17.4 Argomenti selezionati sulle basi cellulari e molecolari della risposta immunitaria 710

La struttura modulare degli anticorpi 710

Il riarrangiamento del DNA che produce geni che codificano per i recettori antigenici delle cellule B e T 713

I recettori di membrana per gli antigeni 716

Il complesso maggiore di istocompatibilità 716

La distinzione tra self e non self 721

I linfociti sono attivati da segnali della superficie cellulare 722

Le vie di trasduzione del segnale utilizzate nell'attivazione dei linfociti 723

- **PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Le malattie autoimmuni 724

- **ITINERARI SPERIMENTALI:** Il ruolo del complesso maggiore di istocompatibilità nella presentazione antigenica 727

### 18 Tecniche di biologia cellulare e molecolare 732

#### 18.1 Microscopio ottico 733

La risoluzione 733

La visibilità 734

La preparazione di campioni per la microscopia ottica 735

Il microscopio a contrasto di fase 735

La microscopia a fluorescenza (e tecniche correlate basate sulla fluorescenza) 736

La videomicroscopia e l'elaborazione dell'immagine 738

Il microscopio confocale a scansione laser 739

La microscopia a fluorescenza a super risoluzione 740

#### 18.2 Microscopio elettronico a trasmissione 740

La preparazione di campioni per la microscopia elettronica 742

#### 18.3 Microscopio elettronico a scansione e microscopio a forza atomica 746

Il microscopio a forza atomica 748

#### 18.4 Uso di radioisotopi 748

#### 18.5 Colture cellulari 749

#### 18.6 Frazionamento dei componenti cellulari per centrifugazione differenziale 752

#### 18.7 Isolamento, purificazione e frazionamento delle proteine 752

La precipitazione selettiva 752

La cromatografia liquida su colonna 753

L'elettroforesi in gel di poliaccrilammide 756

La quantificazione e l'analisi delle proteine 757

#### 18.8 Determinazione della struttura di proteine e complessi a più subunità 758

#### 18.9 Frazionamento di acidi nucleici 760

La separazione del DNA con elettroforesi su gel 760

La separazione degli acidi nucleici mediante ultracentrifugazione 760

#### 18.10 Ibridazione degli acidi nucleici 762

#### 18.11 Sintesi chimica del DNA 764

**18.12 Tecnologia del DNA ricombinante** 764

L'endonucleasi di restrizione 764

La formazione di DNA ricombinanti 766

Il clonaggio del DNA 766

**18.13 Amplificazione enzimatica del DNA con la PCR** 769

Le applicazioni della PCR 770

**18.14 Sequenziamento del DNA** 771

**18.15 Librerie di DNA** 773

Le librerie genomiche 773

Le librerie di cDNA 774

**18.16 Trasferimento di DNA in cellule eucariotiche ed in embrioni di mammifero** 775

**18.17 Determinazione della funzione di geni eucariotici mediante eliminazione genica o silenziamento** 778

Le mutagenesi *in vitro* 778

I topi knockout 778

L'interferenza da RNA (o RNA interference) 780

**18.18 Uso degli anticorpi** 780

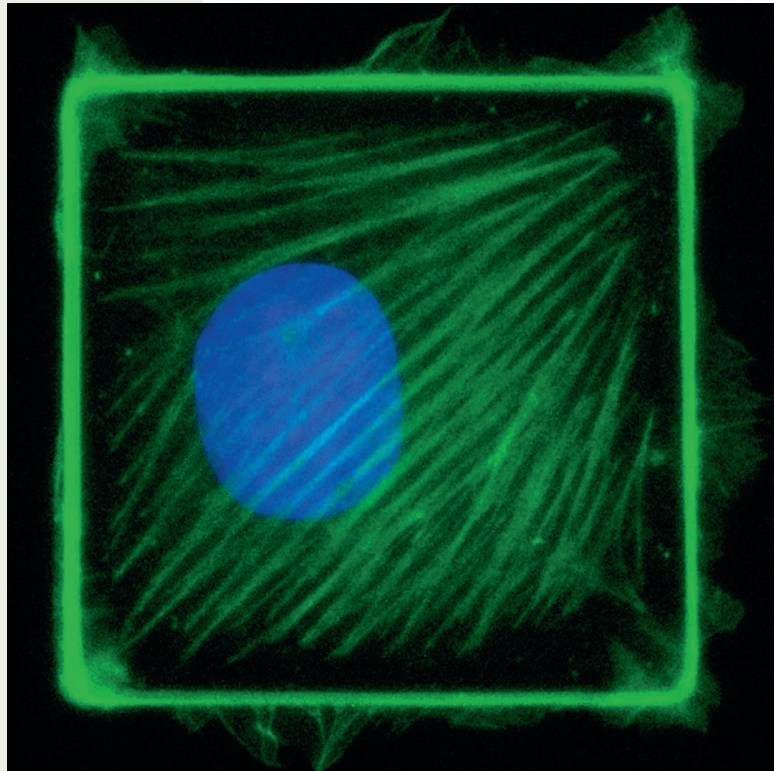
**Glossario** G-1

**Lecture consigliate** L-1

**Indice analitico** I-1



# 7



## Interazioni tra le cellule e il loro ambiente

- 7.1** Spazio extracellulare
- 7.2** Interazioni delle cellule con substrati extracellulari
- 7.3** Interazioni delle cellule con altre cellule
- 7.4** Giunzioni strette: barriera allo spazio extracellulare
- 7.5** Giunzioni comunicanti e plasmodesmi: mediatori della comunicazione intercellulare
- 7.6** Pareti cellulari

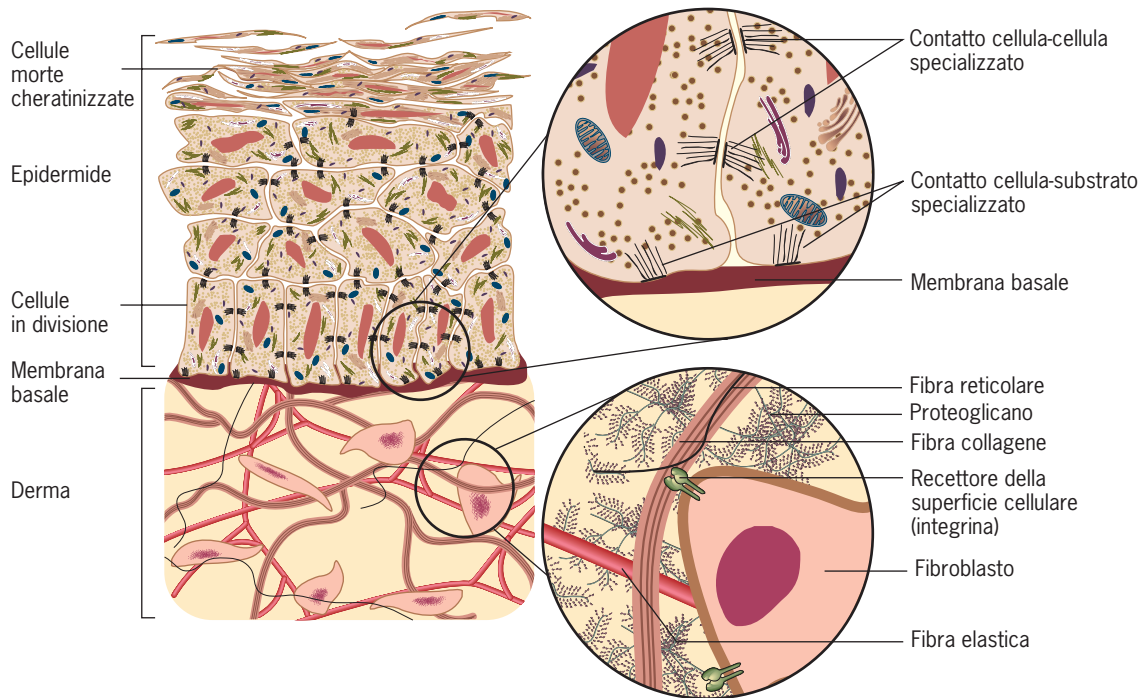
**PROSPETTIVE PER L'UOMO:** Il ruolo dell'adesione cellulare nell'infiammazione e nella metastasi

**S**ebbene la membrana plasmatica costituisca il confine fra una cellula vivente ed il suo ambiente non vivente, il materiale presente nello spazio all'esterno della membrana plasmatica ha un ruolo molto importante nella vita di una cellula. La maggior parte delle cellule di una pianta o di un animale pluricellulare è organizzata in tessuti ben definiti, nei quali le cellule mantengono relazioni precise l'una con l'altra e con il materiale extracellulare presente fra esse. Perfino le cellule che non hanno relazioni fisse all'interno di un tessuto solido, come i globuli bianchi che fungono da sentinelle del corpo, devono interagire in modo altamente specifico con le altre cellule e con il materiale extracellulare con cui vengono a contatto. Queste interazioni regolano attività molto diverse come la migrazione cellulare, la crescita ed il differenziamento cellulare, e determinano anche l'organizzazione tridimensionale dei tessuti e degli organi che si formano durante lo sviluppo embrionale.

In questo capitolo ci occuperemo dell'ambiente extracellulare e dei tipi di interazioni tra le cellule. La Figura 7.1 mostra una sezione schematica di pelle umana e fornisce una panoramica delle diverse componenti che saranno discusse in questo capitolo. Lo strato esterno della pelle (l'epidermide) è un tipo di **tessuto epiteliale**. Analogamente agli altri epitelii che rivestono le superfici libere e le cavità del corpo, l'epidermide è costituita in gran parte

*Micrografia in fluorescenza di una cellula endoteliale – un tipo di cellula che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni. La cellula è quadrata poiché si è appiattita sopra una sottile area quadrata di una proteina adesiva chiamata fibronectina che è stata applicata alla piastra di coltura. La cellula sembra essere montata in una cornice verde perché è stata trattata con un anticorpo fluorescente verde che si lega alla proteina citoplasmatica actina, una componente del citoscheletro. (DA CHRISTOPHER S. CHEEN, CLIFFORD BRANGWYNNE E DONALD E. INGBER, TRENDS CELL. BIOL. 9: 283, 1999; © 1999, CON L'AUTORIZZAZIONE DI ELSEVIER.)*





**Figura 7.1** Una panoramica di come le cellule sono organizzate nei tessuti e di come interagiscono tra loro e con l'ambiente extracellulare. In questa rappresentazione schematica di una sezione di pelle umana, le cellule dell'epidermide aderiscono tra loro mediante contatti specializzati. Lo strato basale delle cellule epidermiche aderisce anche

ad un sottostante strato non cellulare (la membrana basale). Il derma consiste prevalentemente di elementi extracellulari che interagiscono tra loro e con la superficie di cellule sparse (principalmente fibroblasti). Le cellule contengono recettori che interagiscono con materiali extracellulari e trasmettono i segnali all'interno.

da cellule strettamente attaccate l'una all'altra e ad uno strato acellulare sottostante mediante contatti cellulari specializzati (inserto in alto della Figura 7.1). Questi contatti forniscono alle cellule un meccanismo per aderire e comunicare tra loro. Diversamente, lo strato più profondo della pelle (il derma) è un tipo di **tessuto connettivo**. Come altri tessuti connettivi, quali quelli che formano tendini o cartilagine, il derma consiste in gran parte di materiale extracellulare, tra cui una varietà di fibre distinte che interagiscono tra loro in modi specifici. Uno sguardo ravvicinato

a una delle cellule sparse (fibroblasti) del derma mostra che la superficie esterna della membrana plasmatica contiene recettori che mediano le interazioni tra la cellula e i componenti del suo ambiente (inserto in basso della Figura 7.1). Questi recettori della superficie cellulare interagiscono non soltanto con l'esterno che li circonda, ma sono anche connessi, tramite le loro estremità interne, a varie proteine citoplasmatiche. Recettori con questo tipo di doppio attacco sono molto adatti a trasmettere messaggi tra la cellula e il suo ambiente.

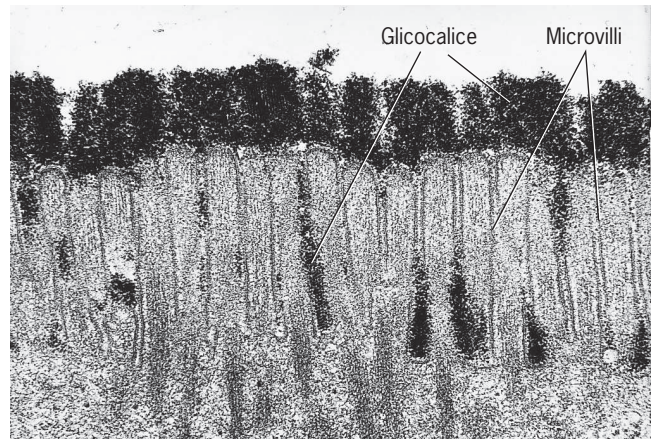
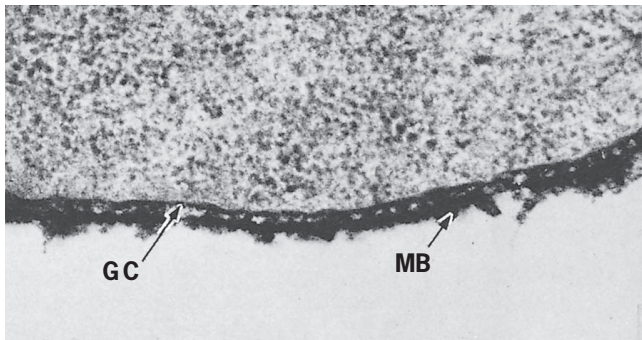
## 7.1 | Spazio extracellulare

Se ci si muove dalla membrana plasmatica verso l'esterno, si possono esaminare i vari elementi extracellulari che circondano i diversi tipi di cellule. Nel Capitolo 4 è stato affermato che praticamente tutte le proteine integrali di membrana, così come certi lipidi di membrana, contengono catene di zuccheri (oligosaccaridi) di lunghezza variabile che si estendono all'esterno della membrana plasmatica (vedi Figura 4.4c). Queste proiezioni di carboidrati formano uno strato strettamente addossato alla superficie esterna della membrana plasmatica, chiamato **glicocalice** (o *rivestimento cellulare*) (Figura 7.2a). Tale materiale extracellulare è molto abbondante in alcuni tipi di cellule, come le cellule epiteliali che rivestono il canale digerente dei mammiferi (Figura 7.2b). Il glicocalice media le interazioni cellula-cellula e cellula-substrato, fornisce protezione meccanica alle cellule, serve da barriera alle particelle che raggiungono la membrana plasmatica e lega

importanti fattori di regolazione che agiscono sulla superficie cellulare.

### La matrice extracellulare

Molti tipi di cellule animali sono avvolti da una **matrice extracellulare (MEC)**, cioè una rete organizzata di materiale extracellulare presente nelle immediate vicinanze della membrana plasmatica (Figura 7.3). La MEC non è semplicemente un materiale di protezione passivo ed inerte o un collante aspecifico che tiene insieme le cellule; essa fornisce segnali sia fisici sia biochimici che possono giocare un ruolo regolatorio chiave nel determinare la forma e le attività di una cellula. Per esempio, la digestione enzimatica della MEC che circonda le cellule cartilaginee o le cellule epiteliali di ghiandola mammaria coltivate *in vitro* causa una marcata diminuzione delle attività sintetiche e secretorie delle cellule. L'aggiunta di materiale della matrice extracellulare alla piastra di coltura ristabilisce lo stato differenziato



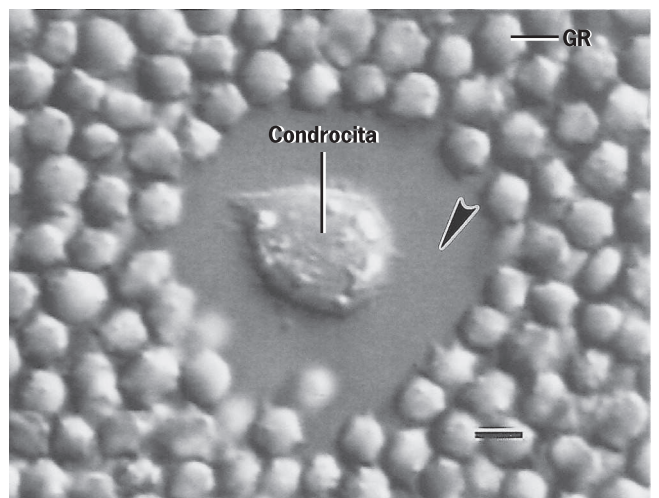
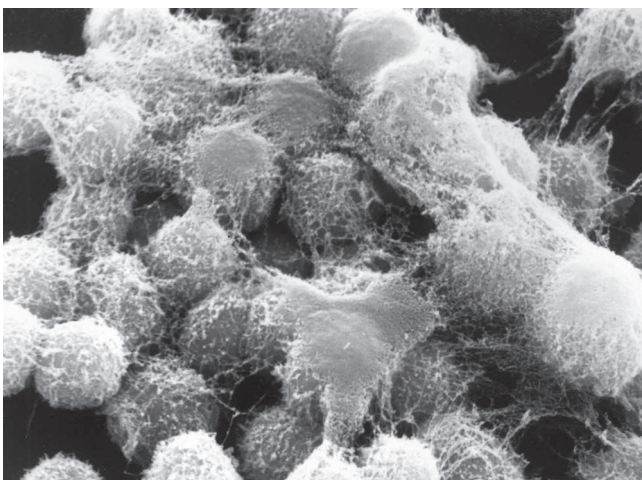
**Figura 7.2 Il glicocalice.** (a) Superficie basale di una cellula ectodermica di un embrione precoce di pollo. Strettamente addossate alla superficie esterna della cellula, si osservano due strutture distinte: un glicocalice (GC), internamente, ed una membrana basale (MB), esternamente. (b) Immagine al microscopio elettronico della super-

ficie apicale di una cellula epiteliale del canale intestinale, in cui è visibile un esteso glicocalice colorato con la proteina contenente ferro ferritina. (A: DA A. MARTINEZ-PALOMO, INT. REV. CYTOL. 29:64, 1970. © 1970, CON L'AUTORIZZAZIONE DI ELSEVIER. B: DON FAWCETT/S. ITO/PHOTO RESEARCHERS, INC.)

delle cellule e la loro capacità di produrre i loro usuali prodotti cellulari (vedi Figura 7.29).

Una delle matrici extracellulari meglio definite è la **membrana basale** (o lamina basale), uno strato continuo spesso circa 50–200 nm che: (1) circonda le fibre nervose e le cellule muscolari ed adipose, (2) è presente al di sotto della superficie basale dei tessuti epiteliali, come nell'epidermide della cute (Figure 7.1 e 7.4a), o nel rivestimento interno del canale digerente e respiratorio e (3) si trova al di sotto del rivestimento endoteliale interno dei vasi sanguigni. Le membrane basali forniscono un supporto meccanico per l'adesione cellulare, generano segnali per la sopravvivenza cellulare, servono da substrato per la migrazione cellulare, separano

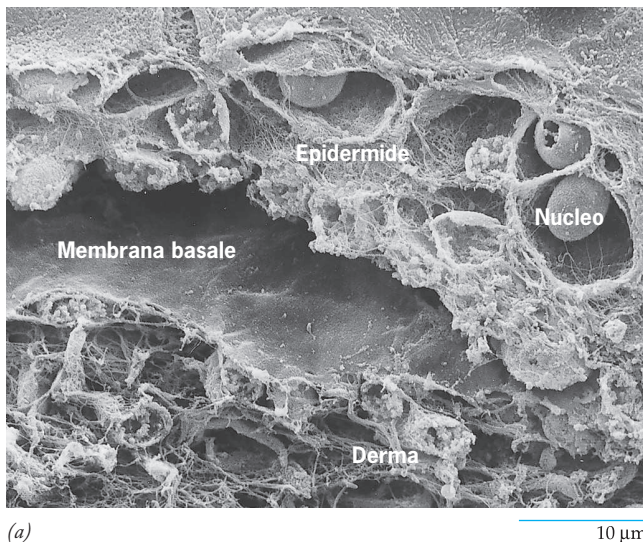
tessuti adiacenti all'interno di un organo e fungono da barriera al passaggio di macromolecole. In quest'ultimo caso, le membrane basali dei capillari hanno un ruolo importante nell'impedire il passaggio di proteine fuori dal circolo sanguigno e all'interno dei tessuti. Questo è particolarmente importante nel rene, dove il sangue viene filtrato sotto alta pressione attraverso una membrana basale a doppio strato che separa i capillari del glomerulo dalla parete dei tubuli renali (Figura 7.4b). La mancata funzionalità renale nei diabetici cronici può risultare da un ispessimento anormale delle membrane basali che circondano i glomeruli. Le membrane basali funzionano anche da barriera contro l'invasione dei tessuti da parte di cellule cancerose. L'organizzazione mole-



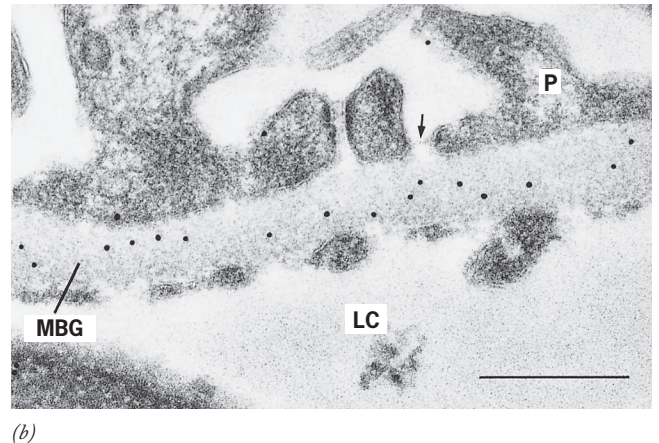
**Figura 7.3 La matrice extracellulare (MEC) delle cellule cartilaginee.** (a) Micrografia elettronica a scansione di una porzione di una colonia di cellule cartilaginee (condrociti) che mostra i materiali extracellulari secreti dalle cellule. (b) La MEC di un singolo condrocita è stata resa visibile aggiungendo una sospensione di globuli rossi

(GR). Lo spessore della MEC è valutato in base allo spazio libero non occupato dai globuli rossi (testa di freccia). La barra rappresenta 10  $\mu\text{m}$ . (A: PER GENT. CONC. DI MICHAEL SOLURSH E GERALD KARP; B: PER GENT. CONC. DI GRETA M. LEE, BRIAN JOHNSTONE, KEN JACOBSON E BRUCE CATERSON.)





**Figura 7.4** La membrana basale (lamina basale). (a) Fotografia di cute umana vista al microscopio elettronico a scansione. L'epidermide è stata staccata dalla membrana basale, visibile al di sotto delle cellule epidermiche. (b) Una membrana basale particolarmente spessa è presente nel rene fra i vasi sanguigni del glomerulo e l'estremità prossimale dei tubuli renali. Questo strato extracellulare svolge un ruolo importante nella filtrazione del fluido che viene spinto fuori dai capillari nei tubuli



renali durante la formazione dell'urina. I punti neri all'interno della membrana basale del glomerulo (MBG) sono particelle di oro coniugate ad anticorpi che si legano alle molecole di collagene di tipo IV della membrana basale (LC: lume del capillare; P: podocita del tubulo renale). La barra rappresenta 0,5  $\mu\text{m}$ . (A: PER GENT. CONC. DI KAREN. HOLBROOK; B: DA MICHAEL DESJARDINS E M. BENDAYAN, J. CELL BIOL. 113:695, 1991; FIG. 5. RIPRODOTTA CON L'AUTORIZZAZIONE DELLA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

colare delle membrane basali verrà discussa in seguito (vedi Figura 7.12). Quelle cellule che non poggiano su una membrana basale, come i fibroblasti del tessuto connettivo, sono tipicamente circondate da una MEC meno organizzata, che consiste prevalentemente di fibrille filiformi.

La matrice extracellulare può persino assumere diverse forme nei differenti tessuti ed organismi, ma generalmente essa è composta da macromolecole simili. Al contrario della maggior parte delle proteine presenti nelle cellule, che sono compatte molecole globulari, la maggior parte delle proteine dello spazio extracellulare sono estese molecole *fibrose*. Queste proteine sono secrete nello spazio extracellulare dove sono capaci di autoassemblarsi in una rete tridimensionale interconnessa, che è mostrata nella Figura 7.5 e discussa nei paragrafi seguenti. Tra le loro diverse funzioni, le proteine della MEC servono come impalcature, travi, cemento e reti. Come evidenziato in tutta la discussione seguente, le alterazioni nella sequenza amminoacidica delle proteine extracellulari possono portare a gravi malattie. Inizieremo con una delle molecole più importanti ed ubiquitarie della MEC, la glicoproteina collagene.

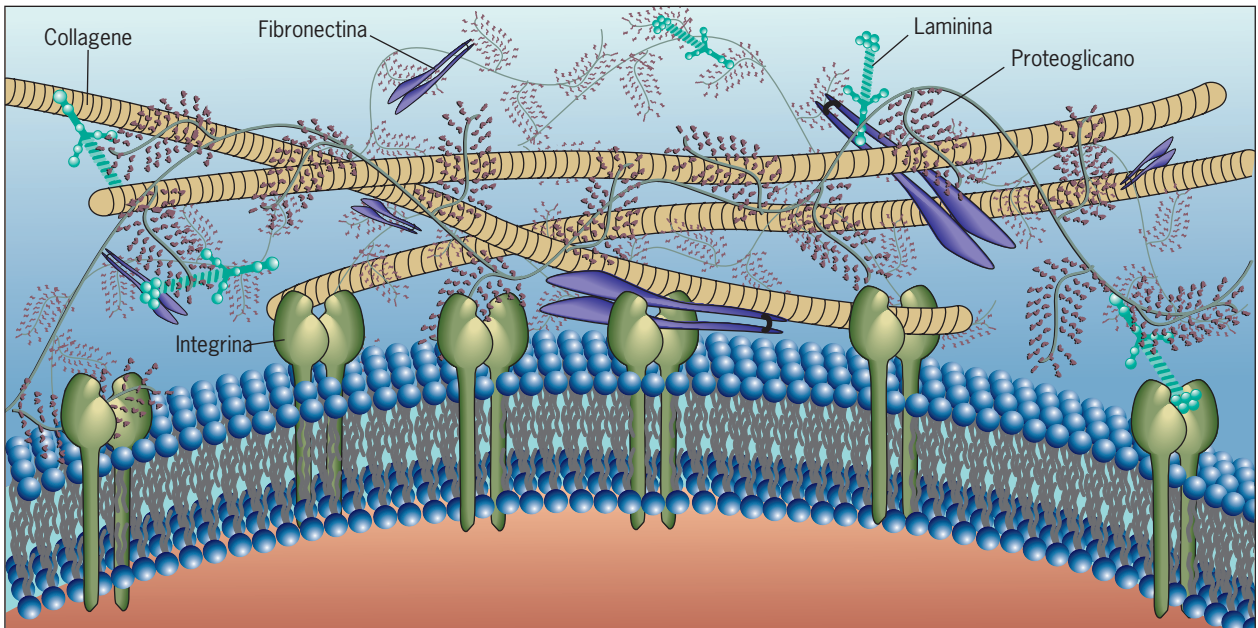
**Il collagene** I **collageni** sono una famiglia di glicoproteine fibrose presenti esclusivamente nelle matrici extracellulari. Essi si trovano in tutto il regno animale e sono caratterizzati da un'elevata resistenza alla trazione, cioè la resistenza a forze di stiramento. È stato stimato che una fibra di collagene del diametro di un millimetro sia in grado di mantenere in sospensione un peso di 10 kg (22 libbre) senza rompersi. Il collagene è il tipo di proteina più abbondante del corpo umano (costituisce più del 25% delle proteine totali) e ciò riflette l'ampia distribuzione dei materiali extracellulari.

Il collagene è prodotto principalmente dai fibroblasti, cellule presenti in vari tipi di tessuti connettivi, ma anche dalle cellule muscolari lisce ed epiteliali. Sono stati identi-

ficati più di ventisette tipi distinti di collageni umani. Ogni tipo di collagene ha una sua particolare localizzazione nel corpo, ma due o più differenti tipi sono spesso presenti insieme nella stessa MEC. Un'ulteriore complessità funzionale è fornita dalla presenza di tipi diversi di collageni all'interno della stessa fibra. Questi tipi di fibre "eterotipiche" sono l'equivalente biologico di una lega di metalli. È probabile che le diverse proprietà strutturali e meccaniche dipendano dalle differenti miscele di collageni nelle fibre. Nonostante vi siano molte differenze tra i diversi membri della famiglia dei collageni, tutti condividono almeno due importanti caratteristiche strutturali: (1) tutte le molecole di collagene sono dei trimeri formati da tre catene polipeptidiche, chiamate catene  $\alpha$ ; (2) per almeno una parte della loro lunghezza, le tre catene polipeptidiche che formano una molecola di collagene sono avvolte l'una intorno all'altra in una caratteristica tripla elica (Figura 7.6a).

Le catene  $\alpha$  delle molecole di collagene contengono grandi quantità di prolina e molti dei residui di prolina (e lisina) sono idrossilati dopo la sintesi del polipeptide. Gli amminoacidi idrossilati sono importanti per assicurare la stabilità della tripla elica mediante la formazione di legami idrogeno tra le catene componenti. La mancata idrossilazione delle catene di collagene ha serie conseguenze sulla struttura e sulla funzione dei tessuti connettivi. Ciò risulta evidente nei sintomi dello scorbuto, una malattia derivante dalla carenza di vitamina C (acido ascorbico) e caratterizzata da gengive infiammate e perdita dei denti, difficoltà di guarigione delle ferite, ossa fragili e indebolimento della parete dei vasi sanguigni, con conseguenti emorragie interne. L'acido ascorbico è richiesto come coenzima dall'enzima che aggiunge gruppi ossidrilici agli amminoacidi lisina e prolina del collagene.

Alcuni collageni, tra cui i tipi I, II e III, sono chiamati *collageni fibrillari* perché si assemblano in fibrille rigide

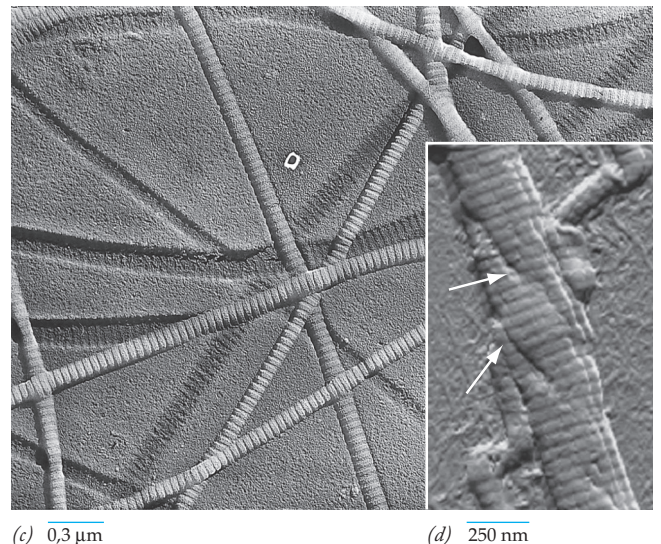
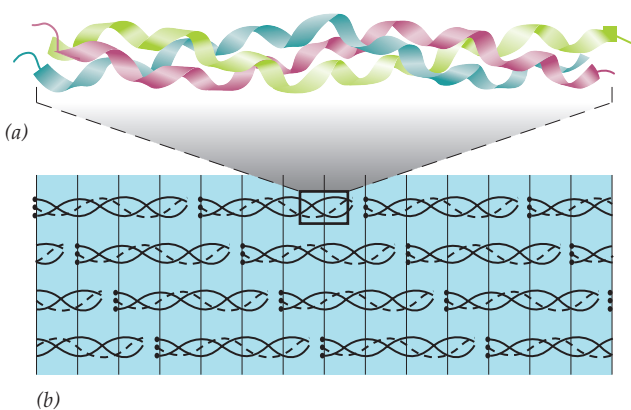


**Figura 7.5** Una panoramica dell'organizzazione macromolecolare della matrice extracellulare. Le proteine e i polisaccaridi mostrati in questa illustrazione saranno trattati nei paragrafi successivi. Le proteine rappresentate (fibronectina, collagene e laminina) contengono

siti di legame reciproco e per recettori (integrine) che sono localizzati sulla superficie delle cellule. I proteoglicani sono enormi complessi proteine-polisaccaridi che occupano la maggior parte del volume dello spazio extracellulare.

a forma di cavo, le quali a loro volta si assemblano in fibre più spesse che sono sufficientemente grandi da essere visibili al microscopio ottico. Nella Figura 7.6*b,c* è descritto l'assemblaggio laterale delle molecole di collagene I in una fibrilla collagene. Le fibrille sono ulteriormente rinforzate da legami covalenti crociati fra i residui di lisina ed idrossi-

lisina di molecole di collagene adiacenti. Questa formazione di legami covalenti crociati è un processo che deve durare per tutta la vita e può, quindi, contribuire alla diminuita ela-

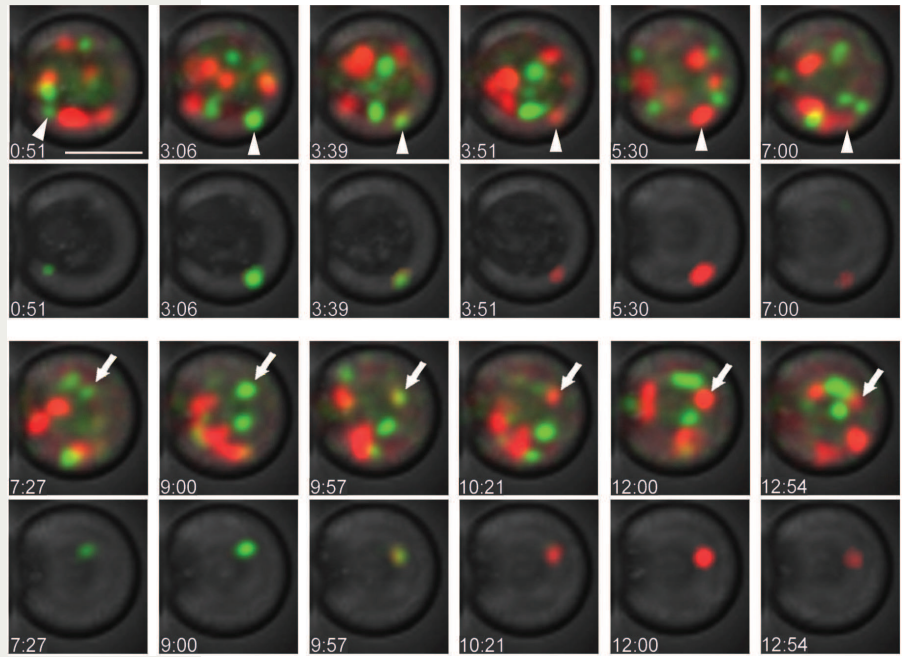


**Figura 7.6** La struttura del collagene I. Questa figura descrive alcuni livelli di organizzazione del collagene fibrillare. (a) La molecola di collagene (monomero) è una tripla elica composta da tre catene ad  $\alpha$  elica. Alcuni tipi di collagene contengono tre catene  $\alpha$  identiche e perciò sono omotrimeri, mentre altri sono eterotrimeri contenenti due o tre catene differenti. Ciascuna molecola di collagene I ha una lunghezza di 295 nm. (b) Le molecole di collagene di tipo I si allineano in file in modo tale che le molecole di una fila sono sfalsate rispetto a quelle della fila vicina. Un fascio di molecole di collagene come quello mostrato in figura costituisce una fibrilla di collagene. La disposizione sfalsata delle molecole forma bande lungo la fibrilla (linee orizzontali nere visibili nelle illustrazioni *c* e *d*) che si ripetono con

una periodicità di 67 nm (che è uguale alla lunghezza dell'intervallo tra molecole più la sovrapposizione delle stesse). (c) Fibre di collagene umano al microscopio elettronico osservate dopo ombreggiatura metallica (vedi Figura 18.15). Il bandeggio delle fibrille è evidente. (d) Micrografia con microscopio a forza atomica della superficie di una fibrilla di collagene che suggerisce come le sue subcomponenti siano avvolte a spirale attorno all'asse come in una corda. Il bandeggio rimane evidente. Le frecce indicano i punti dove la fibrilla è leggermente despiralizzata, come succederebbe se si girasse una corda nella direzione opposta all'arrotolamento. (C: PER GENT. CONC. DI JEROME GROSS E FRANCIS O. SCHMITT; D: DA LAURENT BOZEC ET AL., BIOPHYS. J. 92:71, 2007. © 2007, CON L'AUTORIZZAZIONE DI ELSEVIER.)



# 18



## Tecniche di biologia cellulare e molecolare

- 18.1** Microscopio ottico
- 18.2** Microscopio elettronico a trasmissione
- 18.3** Microscopio elettronico a scansione e microscopio a forza atomica
- 18.4** Uso di radioisotopi
- 18.5** Colture cellulari
- 18.6** Frazionamento dei componenti cellulari per centrifugazione differenziale
- 18.7** Isolamento, purificazione e frazionamento delle proteine
- 18.8** Determinazione della struttura di proteine e complessi a più subunità
- 18.9** Frazionamento di acidi nucleici
- 18.10** Ibridazione degli acidi nucleici
- 18.11** Sintesi chimica del DNA
- 18.12** Tecnologia del DNA ricombinante
- 18.13** Amplificazione enzimatica del DNA con la PCR
- 18.14** Sequenziamento del DNA
- 18.15** Librerie di DNA
- 18.16** Trasferimento di DNA in cellule eucariotiche ed in embrioni di mammifero
- 18.17** Determinazione della funzione di geni eucariotici mediante eliminazione genica o silenziamento
- 18.18** Uso degli anticorpi

**A** causa delle dimensioni molto ridotte dell'oggetto di studio, la biologia cellulare e la biologia molecolare sono più dipendenti dallo sviluppo di nuovi strumenti e tecnologie che ogni altra branca della biologia. Di conseguenza, è difficile studiarle senza apprendere anche la tecnologia necessaria per raccogliere i dati. In questo capitolo esamineremo i metodi usati più comunemente in questo campo tralasciando alcuni dettagli e variazioni. Gli obiettivi

*Impiego di una duplice fluorescenza per seguire eventi dinamici all'interno di organelli cellulari in cellule vive. Le cisterne di Golgi di una cellula di lievito gemmante non sono disposte in pile distinte come nella maggior parte delle cellule eucariotiche ma sono disperse nel citoplasma. Ciascuna delle strutture ovali brillantemente colorate è una singola cisterna il cui colore dipende dalla localizzazione delle molecole proteiche marcate con fluorocromi. Una cisterna che appare verde contiene una proteina GFP-marcata (Vrg4) coinvolta in attività precoci del Golgi, mentre una cisterna che appare rossa contiene una proteina DsRed-marcata (Sec7) coinvolta in attività tardive del Golgi. Questa serie di micrografie rivela la composizione proteica di singole cisterne in un periodo di circa 13 minuti (il momento in cui è presa l'immagine è indicato in basso a sinistra). La testa di freccia bianca e la freccia individuano due di queste cisterne nel tempo. Le due cisterne sono mostrate tal quali nelle micrografie in basso. Dalle micrografie si può osservare che la composizione proteica di una cisterna varia nel tempo da una contenente proteine "precoci" (verdi) ad una contenente proteine "tar-*

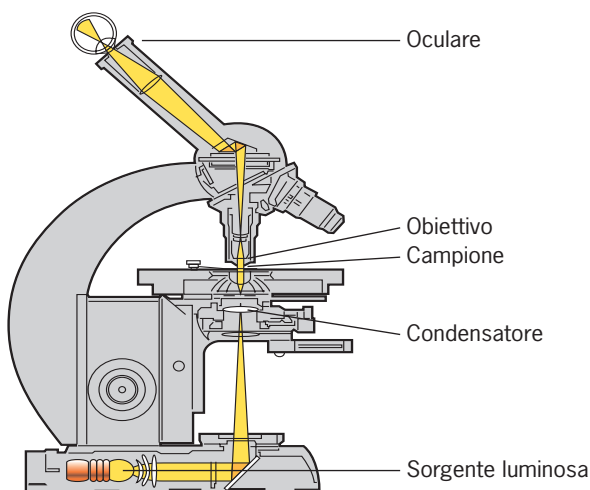
*dive* (rosse). Questi risultati forniscono un supporto visivo diretto del modello della maturazione delle cisterne illustrato a pagina 293. (PER GENT. CONC. DA EUGENE LOSEV ET AL., BENJAMIN S. GLICK; NATURE 441:1004, 2006, FIG. 3A. RISTAMPATA CON IL PERMESSO DI MACMILLAN PUBLISHERS LTD.)

di questo capitolo sono: descrivere i modi in cui sono usate le varie tecniche e dare esempi dei tipi di informazione che si possono ricavare usando queste tecniche. Inizieremo con lo strumento che

ha consentito ai biologi di scoprire l'esistenza stessa delle cellule, fornendo il punto di partenza per tutte le informazioni presentate in questo testo.

## 18.1 | Microscopio ottico

I microscopi sono strumenti che producono immagini di oggetti ingrandite. Lo schema del microscopio ottico composto in Figura 18.1 ne mostra i componenti più importanti. Una sorgente di luce, che può essere esterna al microscopio o inserita all'interno della sua base, è necessaria per illuminare il campione. Il *condensatore*, posto sotto il tavolino portaoggetto, è necessario per concentrare i raggi diffusi dalla sorgente di luce e per illuminare il campione con un piccolo cono di luce sufficientemente intensa da permettere di vedere ogni piccola parte del campione, una volta ingrandita. I raggi luminosi centrati sul campione dal condensatore sono poi raccolti dalle **lenti dell'obiettivo** del microscopio. Ora bisogna considerare due gruppi di raggi luminosi che entrano nell'obiettivo: quelli modificati dal campione e quelli non modificati (Figura 18.2). Il secondo gruppo consiste in un cono di luce proveniente dalle lenti del condensatore che passa direttamente nell'obiettivo e crea la luce di fondo del campo visivo. Il primo gruppo di raggi luminosi è quello che emana dai vari punti che compongono il campione. Questi raggi luminosi sono messi a fuoco dall'obiettivo per formare un'immagine reale e ingrandita dell'oggetto all'interno della colonna del microscopio (Figura 18.1). L'immagine formata dall'obiettivo è usata poi come oggetto da un secondo sistema di lenti, l'*oculare*, per ottenere un'immagine ingrandita virtuale. Un terzo sistema di lenti, localizzato nella parte anteriore

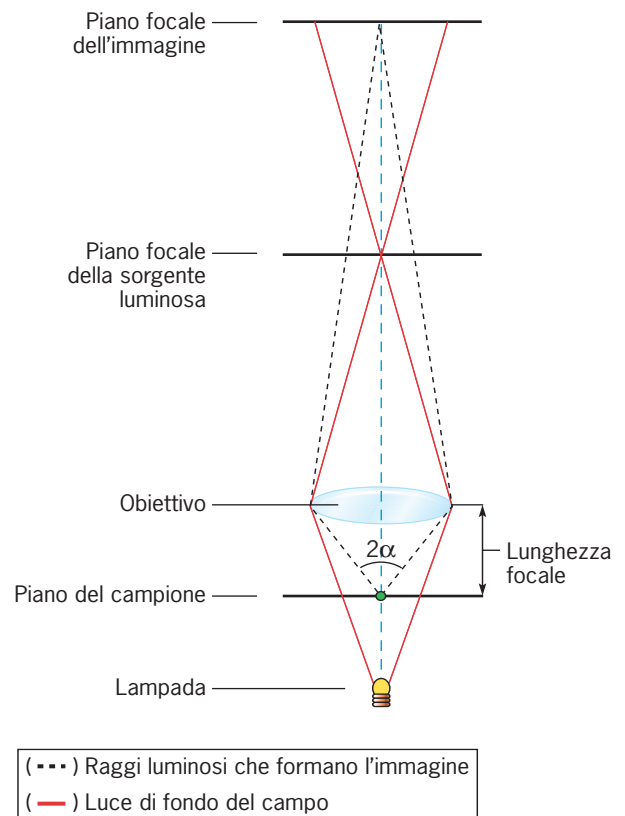


**Figura 18.1** Schema della sezione di un microscopio ottico composto; vale a dire, un microscopio provvisto di entrambe le lenti dell'obiettivo e dell'oculare.

dell'occhio, usa l'immagine virtuale prodotta dall'oculare come un oggetto per generare un'immagine reale sulla retina. Quando si ruota la manopola per la messa a fuoco del microscopio, la distanza relativa tra il campione e l'obiettivo varia, permettendo all'immagine finale di essere messa a fuoco sul piano della retina. L'ingrandimento totale ottenuto dal microscopio è il prodotto dell'ingrandimento dato dall'obiettivo moltiplicato per quello dell'oculare.

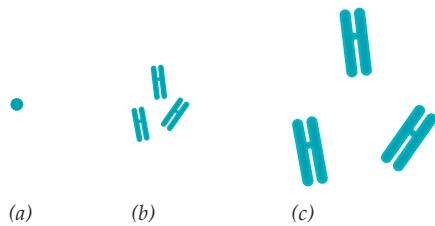
### La risoluzione

Fino a questo punto abbiamo considerato solo l'ingrandimento di un oggetto senza prestare alcuna attenzione alla qualità dell'immagine prodotta, cioè a quanto dettaglio del campione è conservato nell'immagine. Supponiamo di



**Figura 18.2** Percorsi dei raggi di luce che formano l'immagine del campione e di quelli che formano la luce di fondo del campo di osservazione. I raggi luminosi emanati dal campione si focalizzano sulla retina, mentre quelli che rimangono fuori fuoco producono uno sfondo luminoso diffuso. Come discusso nel testo, la risoluzione delle lenti dell'obiettivo è proporzionale al seno dell'angolo  $\alpha$ . Le lenti di maggiore risoluzione hanno lunghezze focali più brevi e, di conseguenza, l'obiettivo è situato più vicino al preparato messo a fuoco.

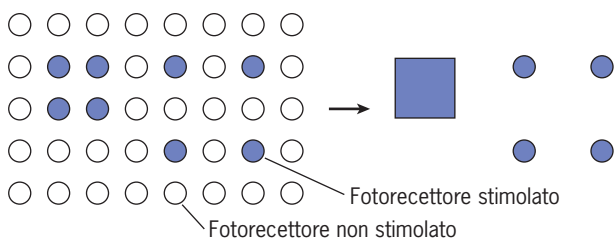




**Figura 18.3** Confronto fra ingrandimento e risoluzione. La transizione da (a) a (b) mostra cosa si ottiene aumentando ingrandimento e risoluzione, mentre la transizione da (b) e (c) mostra solo un aumento di ingrandimento (ingrandimento a vuoto). Infatti, la qualità dell'immagine peggiora quando aumenta l'ingrandimento a vuoto.

guardare una struttura al microscopio usando un obiettivo abbastanza potente (per esempio,  $63\times$ ) e oculari che ingrandiscono l'immagine dell'obiettivo di altre 5 volte (un oculare  $5\times$ ). Supponiamo che il campo sia composto di cromosomi e sia importante determinarne il numero, ma alcuni di essi sono molto ravvicinati e non sono distinguibili come strutture separate (Figura 18.3a). Una soluzione al problema potrebbe essere quella di cambiare gli oculari per aumentare le dimensioni dell'oggetto che si sta osservando. Passando da un oculare  $5\times$  ad uno  $10\times$ , con ogni probabilità aumenterete le vostre possibilità di determinare il numero dei cromosomi (Figura 18.3b), dato che avrete proiettato l'immagine dei cromosomi prodotta dalle lenti dell'obiettivo su una superficie più ampia della vostra retina. Tanti più fotorecettori sono coinvolti nel fornire informazioni sull'immagine, tanto maggiore sarà il dettaglio che potrà essere osservato (Figura 18.4). Se passate però ad un oculare  $20\times$ , è improbabile che vedrete ulteriori dettagli, anche se ciò che avevate osservato in precedenza apparirà più grande (Figura 18.3c), occuperà cioè più superficie sulla retina. La ragione per cui non aumenta la discriminazione dopo questo secondo cambio di oculari è che l'immagine prodotta dall'obiettivo non possiede ulteriori dettagli che possano essere evidenziati dalla potenza maggiore degli oculari. La seconda sostituzione dell'oculare fornisce un *ingrandimento a vuoto* (Figura 18.3c).

La qualità ottica di un obiettivo è misurata in base a quanto i più fini dettagli presenti nel campione possono essere distinti, o risolti. La **risoluzione** raggiunta da un microscopio è limitata dall'effetto di diffrazione. A causa della diffrazione la luce raccolta da un punto del campione non



**Figura 18.4** Il potere risolutivo dell'occhio. Illustrazione schematica della relazione fra la stimolazione di fotorecettori singoli (sulla sinistra) e quello che si percepisce (sulla destra). Il diagramma mostra l'importanza che l'immagine cada su di un'area sufficientemente ampia della retina.

crea mai un punto conforme nell'immagine, bensì un piccolo disco. Se i due dischi prodotti da due punti di un oggetto vicini, ma non separati da una distanza sufficiente, si sovrappongono, essi sono visti come una struttura unica, ovvero non possono essere risolti. Quindi, il potere di risoluzione di un microscopio può essere definito in termini della capacità di vedere due punti adiacenti nel campo visivo come entità distinte. La risoluzione ottenibile da un microscopio è limitata dalla lunghezza d'onda della sorgente luminosa utilizzata secondo l'equazione

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

dove  $d$  è la distanza minima dalla quale due punti del campione devono essere separati per essere risolti,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della luce (527 nm per la luce bianca),  $n$  è l'indice di rifrazione del mezzo presente tra il campione e le lenti dell'obiettivo. Alfa ( $\alpha$ ) è uguale al semiangolo del cono di luce che entra nell'obiettivo, come mostrato in Figura 18.2. Alfa è una misura della capacità della lente di raccogliere la luce ed è direttamente correlata con la sua apertura.

Il denominatore dell'equazione è chiamato *apertura numerica (A.N.)*. L'apertura numerica è una costante per ogni lente, una misura della sua capacità di ricevere la luce. Per un obiettivo che è destinato per l'uso in aria, l'A.N. massima possibile è 1,0, poiché il seno dell'angolo massimo possibile  $\alpha$ ,  $90^\circ$ , è 1, e l'indice di rifrazione dell'aria è 1,0. Per un obiettivo destinato ad essere immerso in olio, la massima A.N. è approssimativamente 1,5. Una regola pratica è che il massimo ingrandimento utile per un microscopio è di circa 500-1000 volte l'apertura numerica dell'obiettivo utilizzato. Tentare di aumentare l'ingrandimento al di sopra di questo punto porta a un ingrandimento a vuoto, e la qualità dell'immagine viene deteriorata. Una A.N. elevata è ottenuta usando lenti con una lunghezza focale breve, tale da permettere alle lenti di essere poste molto vicino al preparato.

Se poniamo nell'equazione il minimo possibile della lunghezza d'onda e l'apertura numerica massima possibile, possiamo determinare il **limite di risoluzione** del microscopio ottico. Si ottiene così un valore leggermente inferiore a 0,2  $\mu\text{m}$  (o 200 nm), che è sufficiente per risolvere gli organelli cellulari più grandi, come nuclei e mitocondri. Per intenderci, il limite di risoluzione dell'occhio nudo, che ha una apertura numerica di circa 0,004, è approssimativamente di 0,1 mm.

In aggiunta a questi fattori teorici, vari difetti o *aberrazioni* delle lenti possono influire marcatamente sul potere di risoluzione. Ci sono sette importanti aberrazioni di cui i produttori di lenti devono tener conto per produrre obiettivi con potere risolutivo vicino al limite teorico. Per eliminare queste aberrazioni gli obiettivi sono fabbricati con una serie complessa di lenti piuttosto che una singola lente convergente. Tipicamente una lente serve per l'ingrandimento, mentre le altre compensano gli errori della prima lente, per ottenere un'immagine corretta.

### La visibilità

In microscopia, un punto di vista più pratico di quello della risoluzione è il concetto di *visibilità*, che riguarda i fattori che permettono ad un oggetto di essere effettivamente osservato. Potrebbe sembrare ovvio che se un oggetto c'è,

dovrebbe essere possibile vederlo. Consideriamo il caso di una pallina di vetro. Nella maggioranza dei casi, cioè, sulla maggior parte degli sfondi, la pallina è visibile chiaramente. Se, invece, questa pallina è lasciata cadere in un recipiente di olio da immersione con lo stesso indice di rifrazione del vetro, la pallina sparisce alla vista; essa non influisce più sulla luce se non nello stesso modo del fluido che la circonda. Chiunque abbia speso il suo tempo a cercare un'ameba si sarà reso conto del problema della visibilità nell'uso del microscopio ottico.

Le cose che vediamo, attraverso una finestra o attraverso un microscopio, sono quegli oggetti che influiscono sulla luce in maniera diversa rispetto al loro sfondo. Un altro termine per definire la visibilità, in questo senso del termine, è **contrasto**, ovvero la differenza di aspetto fra parti adiacenti di un oggetto o fra l'oggetto e il suo sfondo. L'importanza del contrasto può essere facilmente compresa se consideriamo le stelle. Mentre il cielo notturno sereno è pieno di stelle luminose, lo stesso cielo diurno sembra privo di corpi celesti. Le stelle difatti si sono sottratte alla vista, ma non sono sparite dal cielo. Esse semplicemente non sono più visibili sullo sfondo molto più luminoso.

Nel mondo macroscopico, noi esaminiamo gli oggetti facendo cadere su di essi la luce e poi osserviamo la luce che torna riflessa verso i nostri occhi. Al contrario, quando usiamo un microscopio poniamo l'oggetto tra la sorgente luminosa e i nostri occhi e osserviamo la luce che viene trasmessa attraverso l'oggetto (o più precisamente, diffratta dall'oggetto). Se si prende un oggetto e lo si porta in una stanza con un'unica sorgente di luce tenendolo tra la sorgente di luce e l'occhio, ci si può rendere conto in parte della difficoltà di una tale illuminazione; essa richiede che l'oggetto da esaminare sia quasi trasparente, cioè, traslucido. In questo risiede un altro aspetto del problema: gli oggetti che sono "quasi trasparenti" possono essere difficili da vedere.

Uno dei metodi migliori per rendere visibile un campione sottile e traslucido al microscopio è quello di trattarlo con un colorante, che assorba solo certe lunghezze d'onda all'interno dello spettro visibile. Le lunghezze d'onda che non sono assorbite sono trasmesse all'occhio, facendo in modo che l'oggetto trattato appaia colorato. Coloranti diversi si legano a differenti tipi di molecole biologiche e, perciò, questi procedimenti non solo rendono il campione maggiormente visibile, ma possono anche indicare, nelle cellule o nei tessuti, dove si trovano diversi tipi di sostanze. Un buon esempio è la colorazione di Feulgen, che è specifica per il DNA, e fa sì che i cromosomi appaiano colorati al microscopio (Figura 18.5). Uno dei maggiori problemi creati dai coloranti è che essi di solito non possono essere usati con cellule vive; spesso sono tossici, o le condizioni per la colorazione sono tossiche, oppure non sono in grado di penetrare la membrana plasmatica. La colorazione di Feulgen, per esempio, richiede che il tessuto sia idrolizzato in acido prima dell'applicazione del colorante.

Differenti tipi di microscopi ottici impiegano diversi tipi di illuminazione. In un **microscopio a campo chiaro**, il cono di luce illuminante appare come uno sfondo luminoso sul quale l'immagine del preparato deve avere contrasto. La microscopia a campo chiaro è adatta particolarmente per campioni ad alto contrasto, come sezioni colorate di tessuti, ma non darebbe una visibilità ottimale per altri campioni. Nei paragrafi seguenti considereremo metodi alternativi per rendere i campioni più visibili al microscopio ottico.



**Figura 18.5** La colorazione di Feulgen. Questo metodo di colorazione è altamente specifico per il DNA, come dimostrato dalla localizzazione del colorante sui cromosomi di questa cellula di apice radicale di cipolla che era in metafase mitotica al momento della fissazione. (DA ED RESCHKE.)

### Preparazione di campioni per la microscopia ottica

I campioni da osservare con il microscopio ottico possono essere divisi generalmente in due categorie: preparati in toto o sezioni. **In toto** è riferito ad un oggetto intatto, vivo o morto, che può essere un intero microrganismo, come un protozoo, oppure una piccola parte di un organismo più grande. La maggior parte dei tessuti di piante e animali è fin troppo opaca per un'analisi microscopica che non sia fatta con fette molto sottili, o **sezioni**. La prima fase del processo è l'uccisione delle cellule mediante immersione del tessuto in una soluzione chimica, detta **fissativo**. Un buon fissativo è in grado di penetrare rapidamente la membrana cellulare e di immobilizzare tutto il materiale macromolecolare in modo tale che la struttura della cellula si mantenga il più possibile vicino allo stato vivente. I fissativi più comuni per il microscopio ottico sono soluzioni di formaldeide, alcol o acido acetico.

Dopo la fissazione, il tessuto è disidratato mediante trasferimento attraverso una serie di alcoli e incluso in paraffina (cera), che dà il supporto meccanico durante il sezionamento. Uno dei grandi vantaggi della paraffina, come mezzo di inclusione, è la facilità con cui essa può essere disciolta in vari solventi organici. I vetrini contenenti queste sezioni in paraffina sono semplicemente immersi in toluene per rimuovere la paraffina, lasciando sottili sezioni di tessuto attaccate al vetrino, dove possono essere colorate o trattate con enzimi, anticorpi o altri agenti. Dopo la procedura di colorazione, si monta un vetrino coprioggetto sul tessuto usando un mezzo di montaggio con lo stesso indice di rifrazione del portaoggetto e del coprioggetto.

### Il microscopio a contrasto di fase

Piccoli campioni non colorati, come le cellule viventi, possono essere molto difficili da distinguere con un microscopio a campo chiaro (Figura 18.6a). Il **microscopio a contrasto**





(a)



(b)



(c)

**Figura 18.6** Confronto tra cellule viste con differenti tipi di microscopi ottici. Foto al microscopio ottico di un protista ciliato osservato in campo chiaro (a), contrasto di fase (b) e contrasto interferenziale differenziale (DIC) (o Nomarski) (c). Il microorganismo è praticamente invisibile con l'illuminazione in campo chiaro, ma chiaramente visibile in contrasto di fase e con microscopia DIC. (MICROGRAFIA DI M. I. WALKER/PHOTO RESEARCHERS, INC.)

**di fase** aggira questa difficoltà, rendendo più visibili oggetti altamente trasparenti (Figura 18.6b). La possibilità di vedere le diverse parti di uno stesso oggetto dipende dalla loro capacità di interagire con la luce in maniera diversa l'una dall'altra. Alla base di queste differenze troviamo l'indice di rifrazione. Gli organelli cellulari sono composti da diverse proporzioni di varie molecole: DNA, RNA, proteine, lipidi, carboidrati, sali e acqua. Regioni a composizione diversa dovrebbero avere differenti indici di rifrazione. Normalmente, però, tali differenze non possono essere percepite dai nostri occhi. Il microscopio a contrasto di fase converte le differenze di indice di rifrazione in differenze di intensità (luminosità e oscurità relative), che sono quindi visibili all'occhio. Il microscopio a contrasto di fase raggiunge questo risultato

(1) separando la luce diretta dalla luce diffratta dall'oggetto e (2) facendo sì che i raggi di luce da queste due sorgenti *interferiscano* tra di loro. La luminosità o oscurità relativa di ogni parte dell'immagine riflette il modo in cui la luce proveniente da quella parte del campione interferisce con la luce diretta.

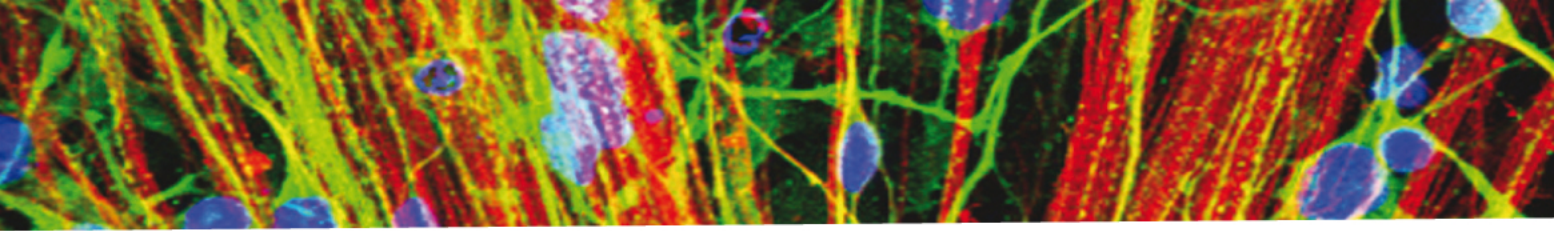
I microscopi a contrasto di fase sono particolarmente utili nell'esame di componenti intracellulari di cellule vive ad una risoluzione relativamente alta. Per esempio, la mobilità dinamica dei mitocondri, dei cromosomi mitotici e dei vacuoli può essere osservata e filmata con questa ottica. Il semplice fatto di osservare il modo in cui piccole particelle e vacuoli nelle cellule sono spinti in giro in maniera casuale produce una eccitante immagine dello stato vitale, non ottenibile con l'osservazione di cellule morte colorate. Il maggiore vantaggio derivato dall'invenzione del microscopio a contrasto di fase non è stata la scoperta di nuove strutture, ma il suo uso quotidiano, nella ricerca e nei laboratori didattici, per l'osservazione di cellule in un modo più dimostrativo.

Il microscopio a contrasto di fase presenta difetti ottici che portano alla perdita di risoluzione e a vari tipi di aloni di interferenza e ombre ai margini dove avvengono netti cambiamenti nell'indice di rifrazione. Il microscopio a contrasto di fase è un tipo di *microscopio a interferenza*. Sono stati costruiti altri tipi di microscopi interferenziali che minimizzano questi artefatti ottici, ottenendo una completa separazione dei raggi diretti e diffratti con l'uso di complessi percorsi di luce e prismi. Un altro tipo di ottica ad interferenza, detta *contrasto interferenziale differenziale (DIC)*, o a volte *interferenza Nomarski*, dal nome del suo progettista, dà un'immagine che ha un'apparente qualità tridimensionale (Figura 18.6c). Il contrasto nella microscopia DIC dipende dal grado di cambiamento dell'indice di rifrazione attraverso il campione. Di conseguenza, i margini delle strutture, dove l'indice di rifrazione varia in modo marcato su una breve distanza, si vedono con un contrasto particolarmente efficace.

### La microscopia a fluorescenza (e tecniche correlate basate sulla fluorescenza)

Nel corso dell'ultimo ventennio il microscopio ottico si è trasformato da uno strumento atto principalmente ad esaminare sezioni di tessuto fissato ad uno strumento che permette l'osservazione di eventi dinamici che si verificano a livello molecolare nelle cellule viventi. Questi avanzamenti si sono realizzati grazie agli sviluppi nel campo della *microscopia a fluorescenza*. Il microscopio a fluorescenza permette di osservare la localizzazione di certe molecole (dette *fluorocromi* o *fluorofori*). I fluorofori assorbono radiazioni di lunghezza d'onda ultravioletta, invisibile, e rilasciano parte dell'energia in forma di luce visibile con lunghezza d'onda maggiore, un fenomeno chiamato *fluorescenza*. Una sorgente di luce del microscopio produce un fascio di luce ultravioletta che passa attraverso un particolare sistema di filtri che impediscono il passaggio a tutte le lunghezze d'onda tranne quelle che eccitano un fluorocromo specifico. Il raggio di luce monocromatica viene quindi focalizzato sul campione contenente il fluorocromo, che diventa eccitato ed emette luce visibile che viene raccolta dalle lenti dell'obiettivo e la focalizzano in un'immagine che si può osservare. Poiché la luce della sorgente del microscopio a fluorescenza è ultravioletta, ossia nera, oggetti colorati con fluorocromi brillano su uno sfondo scuro e l'intera immagine si presenta di intenso contrasto.





G. KARP

# Biologia Cellulare e Molecolare

Concetti ed Esperimenti



[www.edises.it](http://www.edises.it)



€ 59,00

