

LP. 4 Culturi de celule. Diviziunea celulara. Ciclul celular. Controlul activitatii celulare.

Deși organele celulare și macromoleculele mari pot fi vizualizate prin tehnici de microscopie, înțelegerea funcțiilor acestor structuri presupune analize biochimice detaliate. Numeroase proceduri biochimice se efectuează pornind de la un număr mare de celule de același tip care sunt dezintegrate pentru a avea acces la diferite structuri. Dacă specimenul studiat este un țesut, compus din diferite tipuri de celule, un amestec heterogen de tipuri celulare participă la realizarea respectivului țesut. Pentru a obține maximum de informație despre un tip particular de celule, există metode care permit disocierea celulelor din țesuturi și separarea lor în funcție de tip. Aceste metode permit obținerea unor populații omogene de celule care vor putea fi analizate: fie direct, fie după ce au proliferat în cultură.

Prima etapă pentru separarea unui anumit tip celular dintr-un țesut îl reprezintă **disocierea celulelor**. Disocierea constă din :

- “digerarea” matricei extracelulare cu enzime proteolitice (tripsina, colagenază),
- tratamentul fragmentelor de țesut cu anumiți agenți chelatori (EDTA) care leagă ionii de calciu, de care depinde foarte mult adeziunea intercelulară.

Pentru anumite analize biochimice, proteina de interes poate fi obținută într-o cantitate suficientă fără a fi nevoie de separarea țesutului în tipurile celulare componente. Exemplu: izolarea histonelor din timus, izolarea actinei din mușchiul de iepure. În alte cazuri, izolarea proteinei de interes presupune separarea celulelor din țesut. Cele mai generale metode de separare utilizează anticorpi cuplați cu un colorant fluorescent care marchează celulele specifice. Anticorpul este ales astfel încât să se lege doar la suprafața unui anumit tip de celule. Celulele marcate pot fi apoi separate de cele nemarcate cu ajutorul *sortatorului de celule activate fluorescent (fluorescent-activated cell sorter - FACS)*. În acest aparat, celulele străbat un capilar subțire, trecând prin fața unui fascicul laser; fluorescența emisă de fiecare celulă este apoi rapid măsurată. Sunt generate mici picături de lichid, majoritatea conținând cel mult o celulă. Picăturile care conțin o celulă sunt încărcate pozitiv sau negativ, în funcție de celulă pe care o conțin (marcată sau nu fluorescent); aceste picături sunt apoi colectate în container-ul corespunzător. Picăturile care conțin mai multe celule nu sunt încărcate electric și vor fi colectate separat. Un asemenea aparat poate selecta o

singura celula activata fluorescent dintr-un amestec de 1000 de celule si poate sorta cateva mii de celule per secunda (Fig. 1).

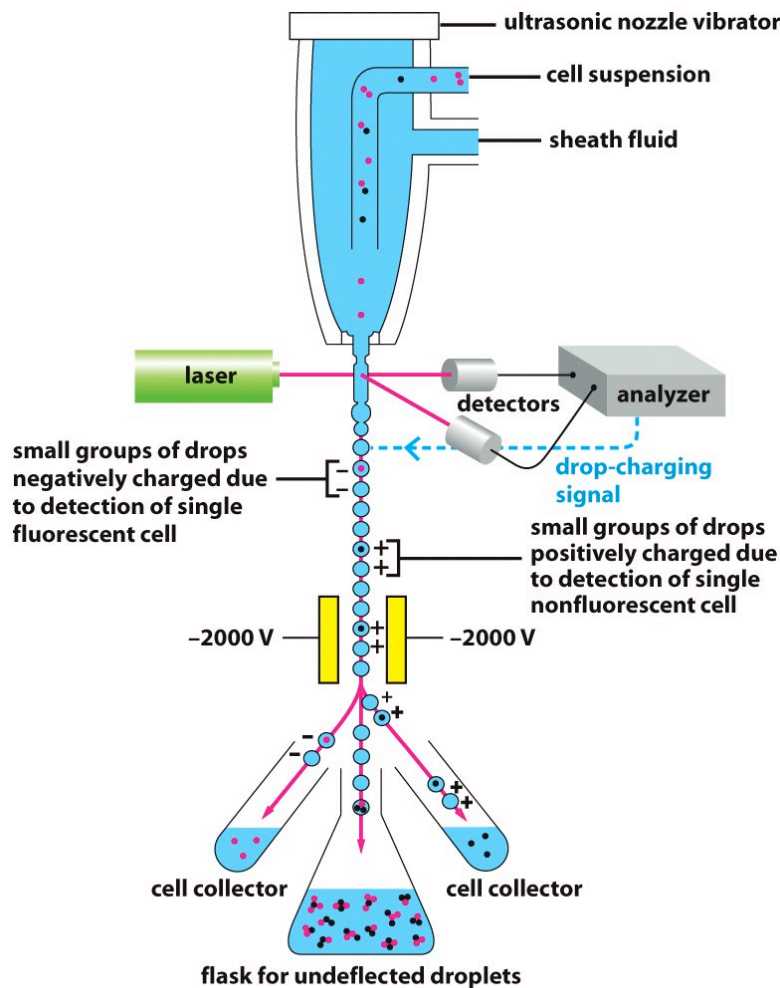


Figure 8-2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 1. Sortatorul de celule activate fluorescent.

Anumite celule pot fi obtinute prin disecarea atenta a lor de pe sectiuni de tesut preparate pentru examinarea la microscopul optic. Sectiunea de tesut este acoperita cu o pelicula foarte subtire de plastic, iar regiunea ce contine celulele de interes este iradiata cu un fascicul produs de un laser infrarosu; acest fascicul topeste un cerc mic din pelicula, celulele ramanand lipite de aceasta pelicula. Aceasta tehnica, numita *microdisectie cu laser*, poate fi utilizata pentru a analiza diferite tipuri de celule dintr-o arie tumorală, permitand compararea proprietatilor acestor celule tumorale cu celulele normale din vecinatate (Fig. 2).

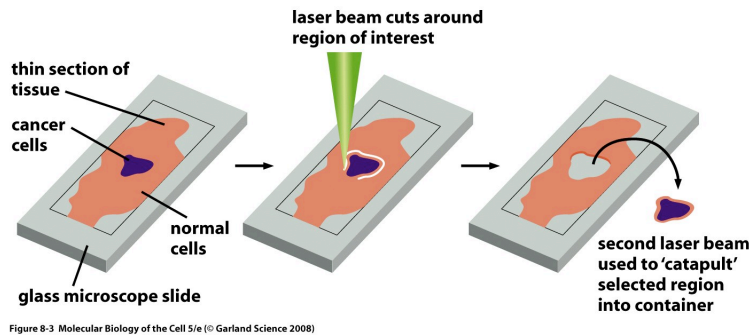


Figura 2. Microdisectia cu laser pentru a selecta anumite celule dintr-o sectiune de tesut

Multiplicarea celulelor de un anumit tip in culturi celulare

O caracteristica importanta a majoritatii celulelor este aceea ca o singura celula poate creste si se poate divide in conditii experimentale, proces numit clonare.

Celulele crescute in culturi ofera avantaje experimentale deosebite; acestea se pot constitui intr-o populatie celulara omogena din care se poate izola un anumit tip de macromolecula sau organit celular. Celulele dintr-o cultura pot fi monitorizate la microscop sau analizate biochimic; efectele adaugarii sau indepartarii unor molecule specifice, precum hormoni, factori de crestere, pot fi analizate in culturi de celule. In plus, prin cultivarea impreuna a doua tipuri celulare diferite, pot fi studiate interactiunile intre cele doua tipuri.

Primele culturi de celule se realizau din tesuturi, purtand denumirea de *explante*. Astazi, majoritatea culturilor se realizeaza din suspensii de celule. Celulele cultivate, cu originea dintr-o singura celula formeaza colonii vizibile, atasate pe suportul de cultura (sticla sau plastic), dupa 10-14 zile. Exista insa si celule care cresc in suspensie, acestea oferind avantaje experimentale considerabile.

O populatie de celule pure din punct de vedere genetic, perfect identice intre ele si care provin din diviziunea unei singure celule mama, formeaza o **clona celulara**.

Celulele animale, pentru a crește in cultura, au anumite **necesitati bine definite**:

- ☑ aminoacizii esentiali (arginina, histidina, izoleucina, lizina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofanul si valina) din mediul in care traiesc deoarece nu si-i pot sintetiza
- ☑ cisteina, glutamina si tirozina, deoarece acesti aminoacizi pot fi sintetizati doar de celule specializate din organismul animal (tirozina – ficat, glutamina – ficat si rinichi)
- ☑ vitaminele
- ☑ sarurile
- ☑ glucoza

☑ serul (componenta necelulara a sangelui, o solutie formata din diverse proteine). Rolul serului este de a suplimenta mediile nutritive cu factori proteici de crestere.

Culturile realizate direct din celule ce provin dintr-un tesut prelevat dintr-un organism poarta numele de **culturi primare**. Acestea pot fi realizate cu sau fara o etapa prealabila de separare a diferitelor tipuri celulare. In majoritatea cazurilor, aceste culturi pot fi indepartate din vasul initial de cultura si recultivate de mai multe ori, realizand asa-numitele **culturi secundare**; astfel, o cultura poate fi **subcultivata (pasata)** de mai multe ori pentru cateva saptamani sau luni. In cultura, celulele isi pot pastra unele proprietati particulare ale tesutului din care provin (Figura 3):

- fibroblastele continua sa secrete colagen,
- celulele derivate din muschiul scheletic embrionar fuzioneaza pentru a forma fibrele musculare care se contracta spontan in flacoanele de cultura,
- celulele nervoase isi extind axonii care isi pastreaza excitabilitatea electrica si intra in sinapsa cu celulele vecine;
- celulele epiteliale formeaza un strat cu proprietati similare epiteliului intact.

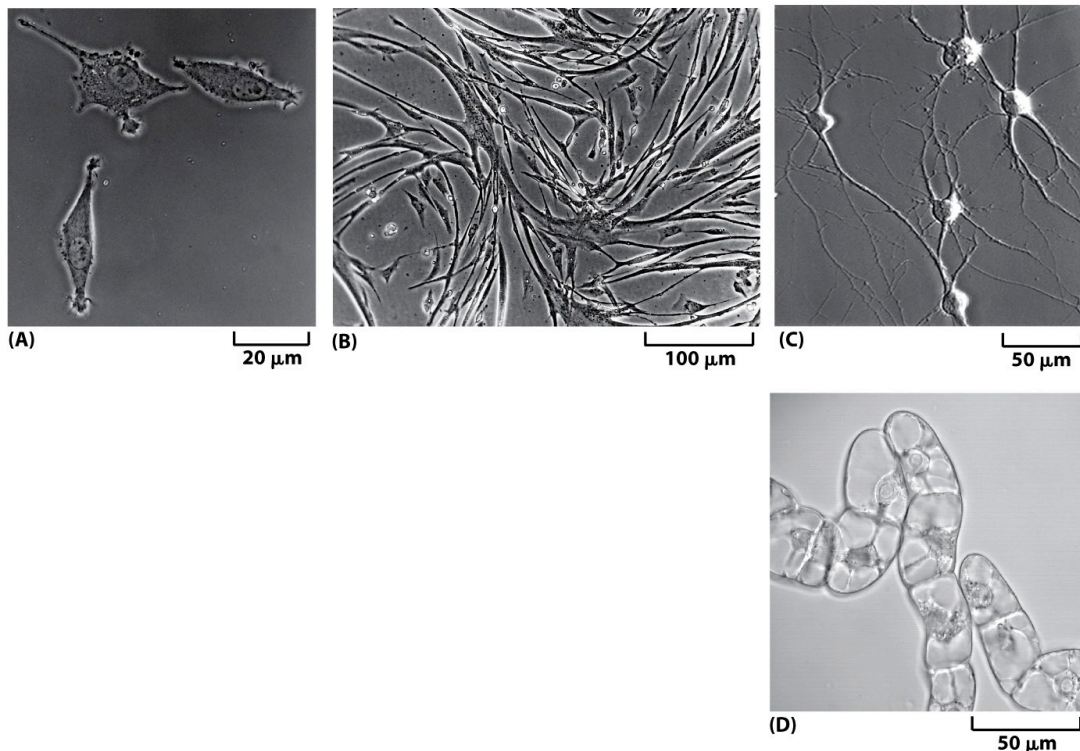


Figure 8-4 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 3. (A) Fibroblasti de soarece. (B) Mioblasti de pui fuzionand pentru a forma celule musculare multinucleate. (C) Celule nervoase purificate de sobolan. (D) Celule de tutun in cultura in suspensie

Celulele din asemenea culturi sunt predominant fibroblaste, care se găsesc în tesuturile conjunctive din orice parte a organismului. Fibroblastele produc colagen, precum și materiale care formează substanța fundamentală a țesutului conjunctiv.

Celulele din culturile primare cresc bine când sunt plasate în flacoane de cultură, multiplicându-se timp de 50-100 de generații, după care intră în “criză”, când își încetinesc creșterea, pentru că în cele din urmă să se oprească din diviziune și să moară. Fibroblastele provenite de la organisme tinere rezistă în cultură mai multe generații decât cele provenite de la un organism adult.

Capacitatea limitată de proliferare este rezultatul unei scurtări progresive a *telomerelor* (secvențe repetitive de ADN și proteine situate la capetele cromozomilor). Celulele somatice umane diferențiate și-au pierdut capacitatea de a produce enzima *telomeraza* care menține integritatea telomerelor; din acest motiv telomerele se scurtează la fiecare diviziune celulară.

Fibroblastele pot fi adesea modificate astfel încât să prolifereze nelimitat prin introducerea unei gene care codifică subunitatea catalitică a telomazei; în acest caz, ele pot fi propagate ca și linii celulare “imortalizate”. Alte tipuri celulare nu pot fi imortalizate astfel. La acestea din urmă, deși nu se mai scurtează telomerele, diviziunile celulare încetează după un anumit interval deoarece se activează *mecanismele de control a ciclului celular (cell cycle check-point mechanisms)*. Pentru imortalizarea acestor culturi este deci necesar, pe lângă introducerea telomazei, și de inactivarea acestor mecanisme de control a ciclului celular. Acest lucru poate fi realizat prin introducerea unor oncogene, precum cele derivate din virusurile tumorale.

Liniile celulare pot fi mai ușor generate din celule canceroase; aceste culturi diferă esențial de cele generate din celule normale și sunt denumite ***culturi transformate***. Liniile celulare transformate cresc adesea fără a se atașa de suprafața vasului de cultură, și pot prolifera până la o densitate celulară superioară comparativ cu celulele normale. Proprietăți similare pot fi induse experimental într-o cultură normală prin transformarea acesteia prin adăugarea unui virus tumoral sau a unei substanțe chimice. Liniile celulare transformate pot produce tumori dacă sunt injectate la un animal de experiență susceptibil.

Atât culturile celulare primare, cât și cele transformate pot fi stocate timp nelimitat în azot lichid, la -196°C și rămân viabile atunci când sunt dezghețate, putând fi cultivate din nou.

In tabelul 1 sunt rediate liniile celulare cel mai frecvent utilizate in cercetare.

Linia celulara	Tipul celular si originea
3T3	fibroblast (soarece)
BHK21	fibroblast (hamster sirian)
MDCK	celule epiteliale (caine)
HeLa	celule epiteliale (om)
L6	mioblasti (sobolan)
COS	rinichi (maimuta)
CHO	ovar (hamster chinezesc)
H1, H9	celule stem embrionare (om)
S2	celule macrofag-like (<i>Drosophila</i>)

Culturile de celule stem

Din punct de vedere medical, cel mai promitator domeniu al culturilor de celule este acela al cultivarii celulelor stem embrionare (ES). Aceste celule, prima data recoltate din masa interna de celule a embrionului de soarece, pot prolifera nelimitat in cultura. Daca aceste celule din cultura sunt replasate in mediul embrionar, ele pot da nastere oricarui tip celular din organism, inclusiv celule ale liniei germinale (Figura 4).

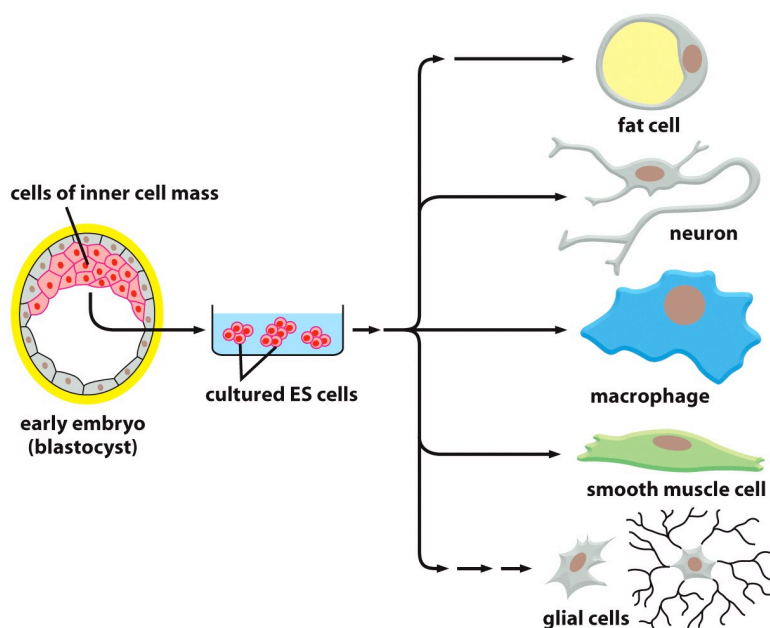


Figure 8-5 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 4. Celule stem embrionare

Celule cu proprietati similare cu celulele ES de soarece pot fi derivate si din embrioni umani, generand o rezerva potential nelimitata de celule care pot fi utilizate pentru a repara sau inlocui tesuturi umane mature. Experimentele pe celule ES de soarece sugereaza faptul ca va fi posibila utilizarea celulelor ES pentru a genera celule specializate utilizate pentru terapie: pentru inlocuirea fibrelor musculare degenerate la pacientii cu distrofie musculara, a celulelor nervoase la pacienti cu boala Parkinson, celulelor producatoare de insulina la pacientii cu diabet zaharat de tip I, sau a miocardului la pacientii care au suferit un infarct. Celulele ES nu se transplanteaza ca atare in organismele adulte, deoarece pot produce un tip particular de tumori denumite **teratoame**.

CICLUL CELULAR. CONTROLUL ACTIVITATII CELULARE

Celulele se multiplica prin realizarea unei secvente ordonate de evenimente in care isi duplica continutul si apoi il imparte in doua parti egale. Acest ciclu de duplicatie si diviziune, denumit *ciclu celular*, este mecanismul esential prin care toate entitatile vii se reproduc. La speciile unicelulare, precum bacteriile si drojdiile, fiecare diviziune celulara produce un organism complet nou. La speciile multicelulare, sunt necesare secvente lungi si complexe de diviziuni celulare pentru a produce un nou organism. In organismul adult, diviziunile celulare sunt necesare pentru a inlocui celulele care mor. Principalele procese desfasurate in timpul ciclului celular de catre celula sunt acelea care ii permit sa isi indeplineasca functia cea mai importanta: transmiterea informatiei genetice la generatiile celulare urmatoare. Pentru a se obtine doua celule identice din punct de vedere genetic, ADN-ul din fiecare cromozom trebuie sa fie fidel replicat, iar cromozomii replicati trebuie sa fie precis distribuiti (*segregati*) in cele doua celule fiice, astfel incat fiecare celula fiica sa primeasca o copie a intregului genom (Fig. 5).

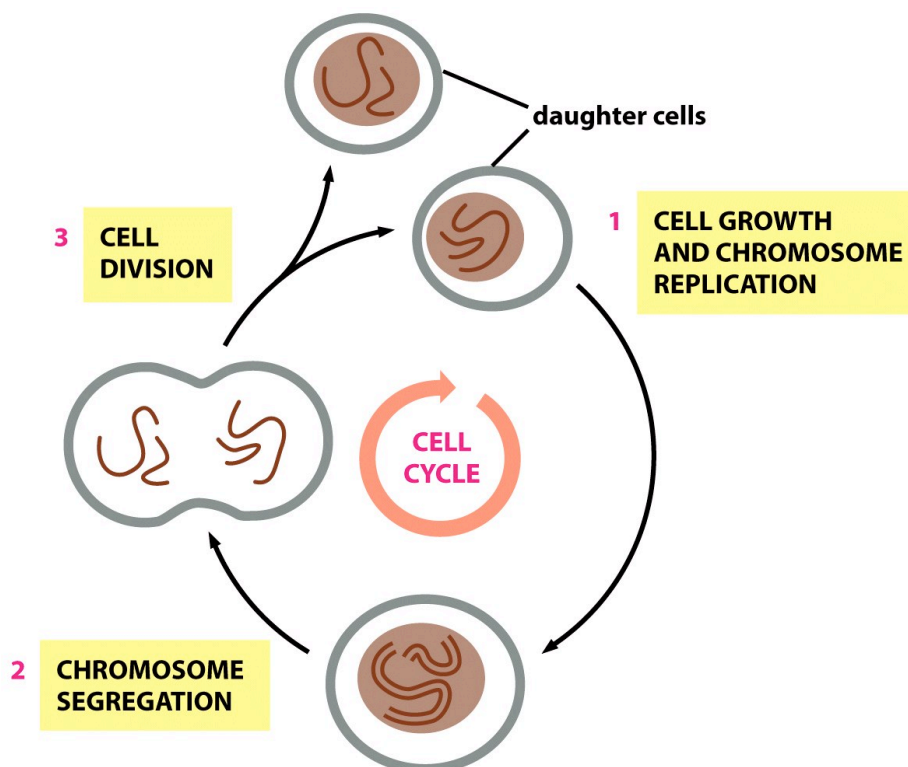


Figure 17-1 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 5. Ciclu celular

Etapele ciclului celular

Funcția esențială a ciclului celular este duplicarea cantității de ADN din cromozomi și apoi segregarea precisă a copiilor în cele două celule fiice identice. Aceste procese definesc cele două etape principale ale ciclului celular. Duplicarea cromozilor se produce în **faza S** (*S* de la sinteza ADN), etapa care se realizează în 10-12 ore și reprezintă aproximativ 50% din durata ciclului celular la o celulă tipică de mamifer. După faza S, segregarea cromozomilor și diviziunea celulară se realizează în **faza M** (*M* de la mitoză), care se realizează în mai puțin de o oră la celulele de mamifer. Faza M cuprinde două evenimente majore: diviziunea nucleară, sau *mitoză*, în timpul căreia cromozomii sunt distribuiți celor două celule fiice; și diviziunea citoplasmatică, sau *citokineză*, care presupune împărțirea celulei în două (Fig. 6).

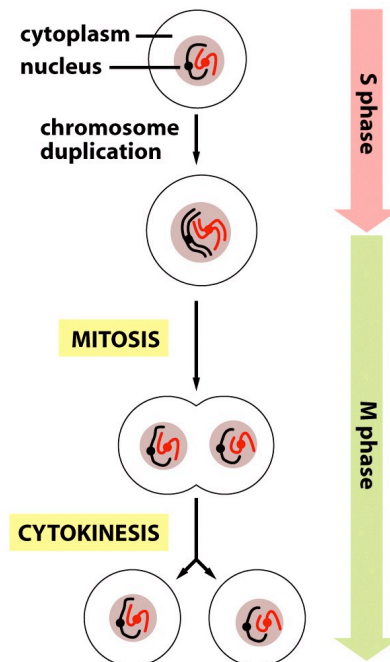


Figure 17-2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 6. Cele două etape principale ale ciclului celular: faza S și faza M

La finalul fazei S, moleculele de ADN din fiecare cromozom bicromatidian sunt intercorelate și menținute împreună prin anumite legături între proteine specializate. La începutul mitozei, în etapa numită *profaza*, moleculele de ADN sunt desfăcute și condensate în perechi de *cromatide surori*, care sunt menținute împreună printr-un fenomen de coeziune. O dată cu dezamblarea învelisului nuclear, cromatidele surori se atasează de *fusul mitotic*, un aranjament ordonat de microtubuli. Cromatidele surori sunt atasate la cei doi poli opuși ai fusului de diviziune, și în cele din urmă, toate cromatidele se atasază în regiunea ecuatorială a fusului, eveniment ce definește etapa mitozei numită *metafaza*. Îndepărtarea cromatidelor surori una de alta, în urmă

dezintegrării coeziunii dintre acestea, are loc în *anafaza*. Fusul este apoi dezansamblat, iar cromozomii segregati sunt organizati în cei doi nuclei, în *telofaza*. Apoi, în *citokineza*, celula este împartita în doua celule, astfel încât fiecare va primi unul din cei doi nuclei (Fig. 7.

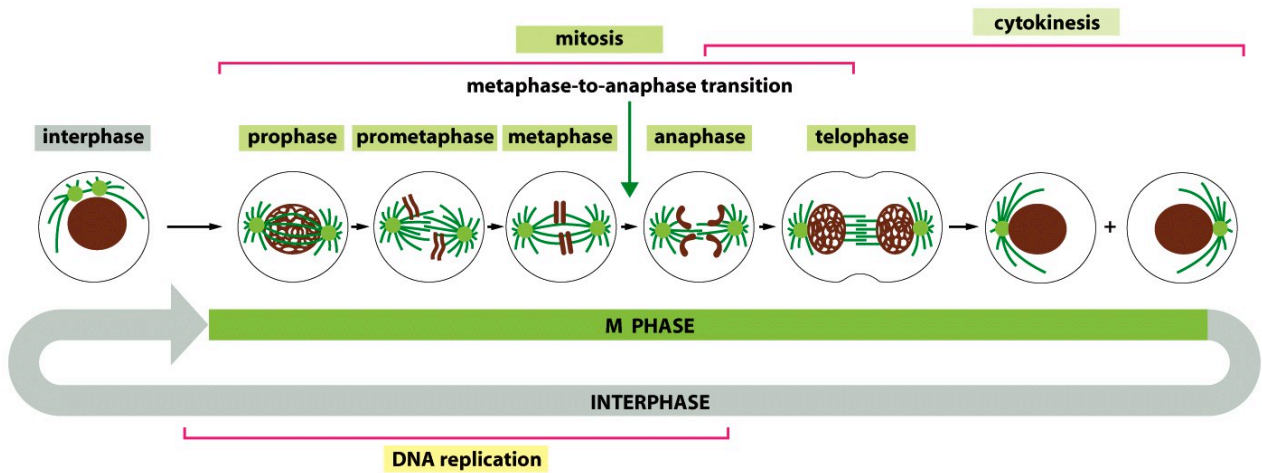


Figure 17-3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 7. Diviziunea celulara

Majoritatea celulelor au nevoie de mai mult timp pentru a crește și a-și dubla masa de proteine și organite, față de timpul de care au nevoie pentru a-și dubla informația genetică și a se divide. Pentru a asigura acest timp necesar pentru creștere, majoritatea ciclurilor celulare cuprind și două etape de *pauză (gap)* - *o fază G1*, între faza M și faza S, și o *fază G2*, între faza S și faza M. Astfel, ciclul celular pentru celulele eucariote este împartit în 4 etape: **G1, S, G2 și M**. Fazele G1, S, G2 alcătuiesc **interfaza** (Fig. 8). Într-o celulă umană tipică, în cultura de celule, interfaza durează aproximativ 23 de ore, iar faza M durează 1 oră. Creșterea celulară are loc pe toată durata ciclului celular, cu excepția mitozei.

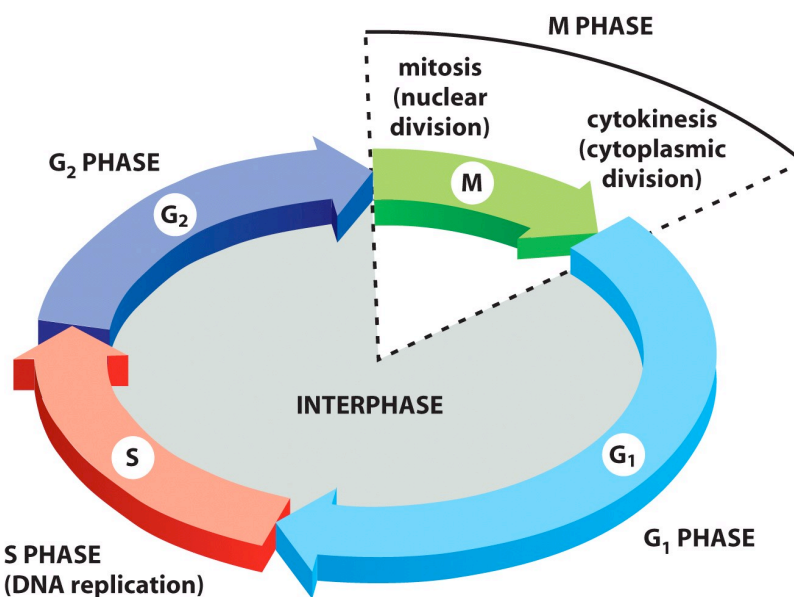


Figure 17-4 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 8. Etapele ciclului celular

Cele doua etape *gap* sunt mai mult decat etape care intarzie ciclul celular pentru a permite cresterea celulara. Aceste etape ofera de asemenea timpul necesar pentru ca celulele sa monitorizeze mediul intern si extern pentru a se asigura ca sunt intrunite conditiile inainte ca celula sa intre in faza S. Faza G1 este in mod deosebit importanta pentru acest aspect. Durata fazei G1 variaza in functie de conditiile externe si de semnalele primite de la alte celule. In cazul in care conditiile extracelulare sunt nefavorabile, celulele isi intarzie progresul prin faza G1 si pot chiar intra intr-o faza de repaus, denumita **G0**, in care pot ramane pentru zile, saptamani, sau chiar ani, inainte sa-si continue proliferarea. Numeroase celule raman in faza G0 pana in momentul in care survine moartea celulara sau moartea organismului. In cazul in care conditiile extracelulare sunt favorabile si sunt primite semnale pentru crestere si proliferare, celulele aflate la inceputul fazei G1 sau in faza G0 trec printr-un punct (aflat la finalul fazei G1) denumit **Start** (la drojdii) sau **punct de restrictie** (la celulele de mamifere). Dupa ce au trecut de acest punct, celulele vor fi directionate catre replicatia ADN, chiar daca semnalele extracelulare nu mai sunt prezente.

Controlul ciclului celular

Ciclul celular este controlat in mai multe puncte. In cei mai simpli termeni, sistemul de control al ciclului celular este asemenea unui timer foarte strict programat care alocă un anumit interval de timp pentru fiecare eveniment al ciclului celular. Sistemul de control este independent de evenimentele pe care le controleaza, astfel incat mecanismele de control continua sa functioneze chiar si atunci cand evenimentele controlate esueaza. Cu toate acestea, in majoritatea celulelor, sistemul de control raspunde la informatiile primite de la procele controlate. De exemplu, erorile aparute in cadrul sintezei ADN sunt inregistrate si sunt trimise semnale care controleaza intarzierea progresiei catre faza M a ciclului celular.

Sistemul de control al ciclului celular este bazat pe o serie de comutari biochimice, fiecare initiind un eveniment specific. Acest sistem de comutari poseda numeroase caracteristici care ii cresc acuratetea si siguranta progresiei ciclului celular.

La majoritatea celulelor eucariote, sistemul de control al ciclului celular dirijeaza progresia ciclului celular in 3 puncte majore de tranzitie, denumite **puncte de control (checkpoints)** (Fig. 9). Primul checkpoint este *punctul de restrictie* de la finalul fazei G1, cand celula se dedica duplicarii cromozomilor. Al doilea punct este *punctul G2/M*, unde sistemul de control dirijeaza evenimentele precece din mitoză care conduc la aranjarea cromozomilor la fusul de diviziune. Al treilea punct este *tranzitia metafaza-anafaza*, cand sistemul de control stimuleaza separarea cromatidelor surori,

conducand la finalizarea mitozei si citokinezei. Sistemul de control blocheaza progresia prin fiecare din aceste puncte daca sunt detectate probleme in interiorul sau in exteriorul celulei.

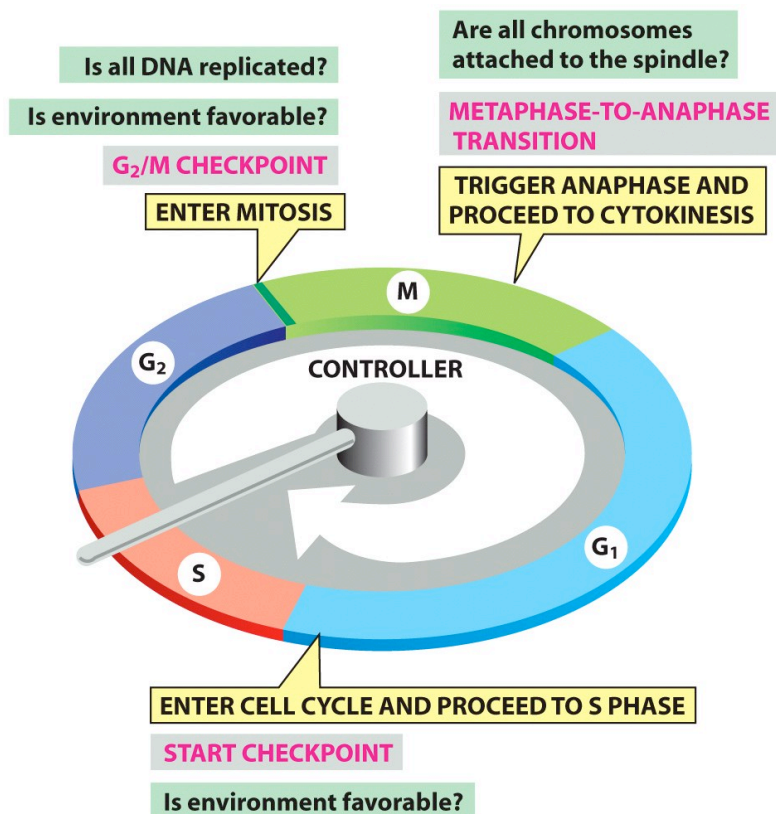


Figure 17-14 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figura 9. Controlul ciclului celular.