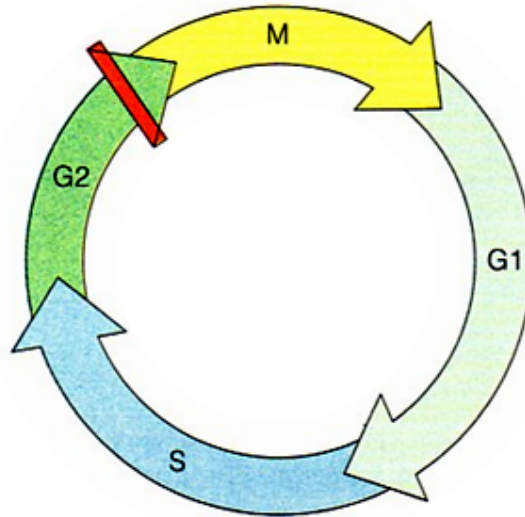




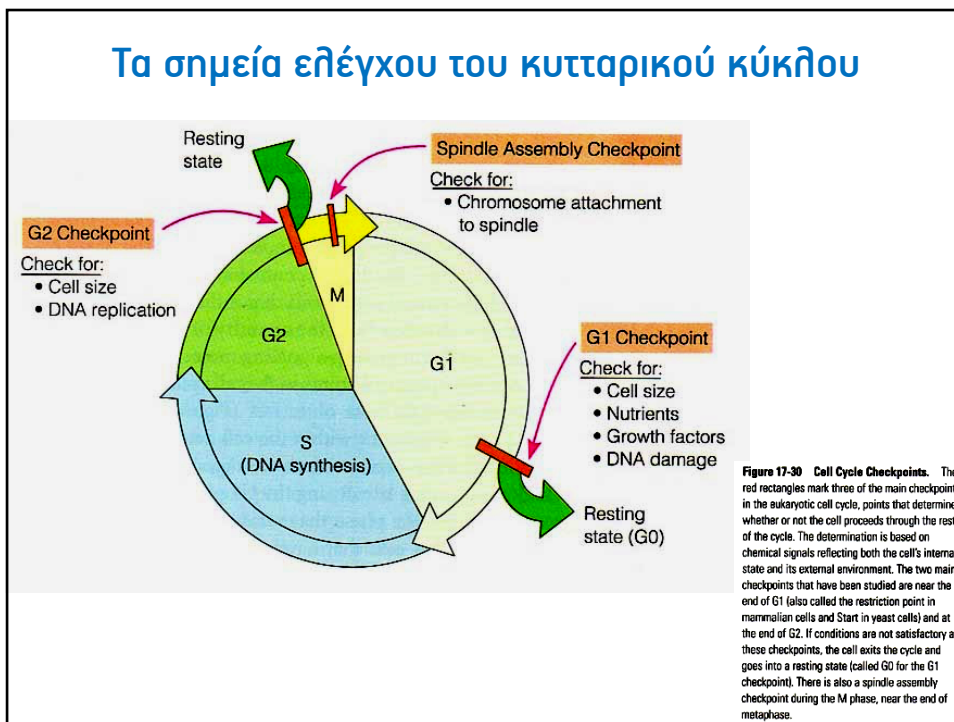
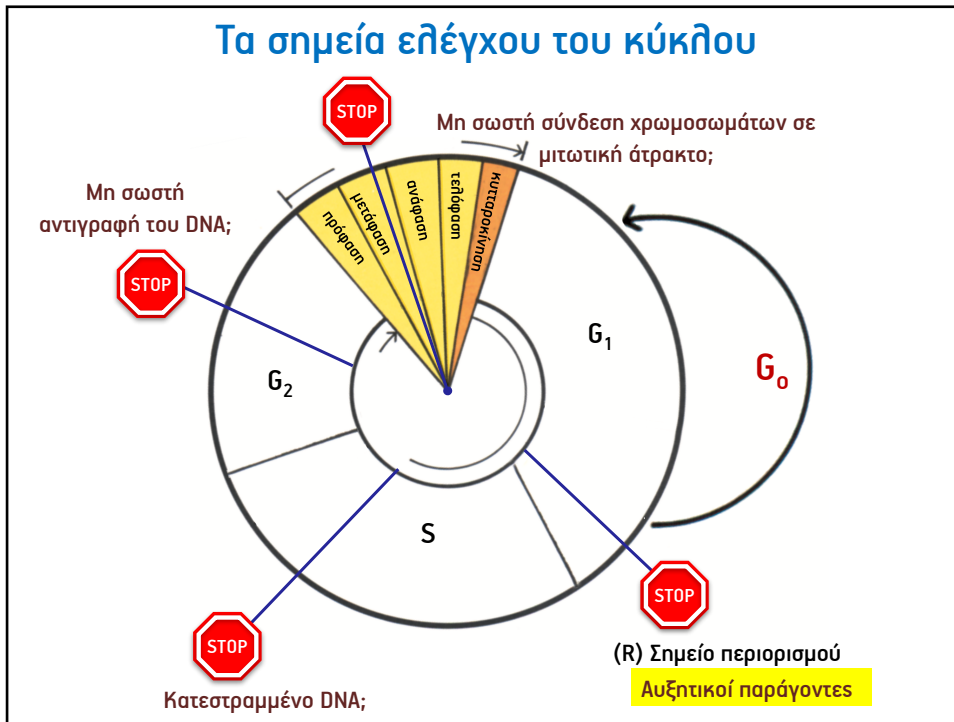
Κυτταρική διαίρεση

A large black square is centered on the page, indicating that the content of this slide is missing or redacted.

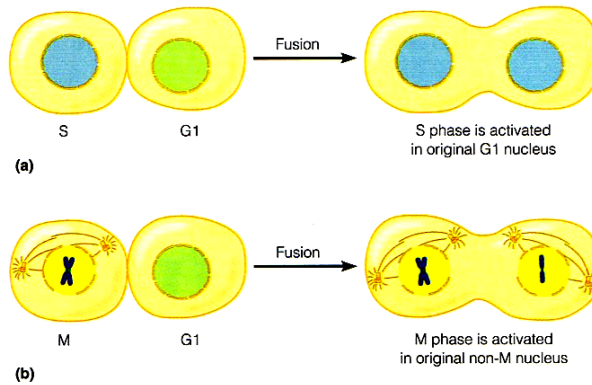
## Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ



State	Phase	Abbrev.	Description
Quiescent/ senescent	Gap 0	<b>G<sub>0</sub></b>	A resting phase where the cell has left the cycle and has stopped dividing.
Interphase	Gap 1	<b>G<sub>1</sub></b>	Cells increase in size in Gap 1. <b>G<sub>1</sub> checkpoint control mechanism:</b> ensures that everything is ready for DNA synthesis.
	Synthesis	<b>S</b>	<b>DNA replication</b>
	Gap 2	<b>G<sub>2</sub></b>	The gap between DNA synthesis and mitosis The cell continues to grow. <b>G<sub>2</sub> checkpoint control mechanism:</b> ensures that everything is ready to enter the M phase and divide
Cell division	Mitosis	<b>M</b>	Cell growth stops at this stage Cellular energy is focused on the orderly division into two daughter cells. <b>Metaphase checkpoint</b> in the middle of mitosis: ensures that the cell is ready to complete cell division



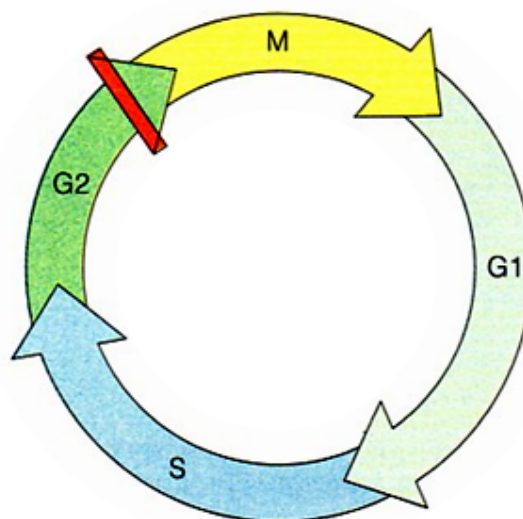
## Κυτταρική συγχώνευση, χημικά μηνύματα και ρύθμιση του κύκλου



**Figure 17-31 Cell Fusion Evidence for the Role of Cytoplasmic Chemical Signals in Cell Cycle Regulation.** Important information can be obtained from experiments in which cells at two different points in the cell cycle are induced to fuse, forming a single cell with two nuclei, a heterokaryon. Cell fusion can be brought about by any of several methods, including the addition of certain viruses or polyethylene glycol, or the application of a brief electrical pulse, which causes plasma

membranes to destabilize momentarily (electroporation). **(a)** If cells in S phase and G1 phase are fused, DNA synthesis begins in the original G1 nucleus, suggesting that a substance that activates S phase is present in the S phase cell. **(b)** If a cell in M phase is fused with one in any other phase, the latter cell immediately enters mitosis. If the cell was in G1, the condensed chromosomes that appear have not replicated and therefore are analogous to a single chromatid.

## ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ



### Η κατανομή των κυττάρων περί τον κύκλο (I)

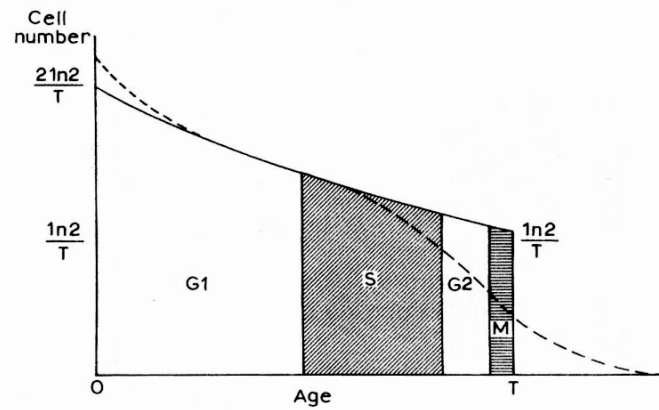


Fig. 10.5. Distribution of exponentially growing cells around the cell cycle. Cells in an exponentially growing population are theoretically distributed round the cell cycle as shown by the solid line. However, as the cell cycle time varies amongst the cells the dotted line more closely resembles the observed distribution. Cells which have just divided have an age of zero while those in the next mitosis have age T. The positions of G1, S and G2 are shown for a typical cell. (Reproduced from Cleaver, 1967, with kind permission of the author.)

### Η κατανομή των κυττάρων περί τον κύκλο (II)

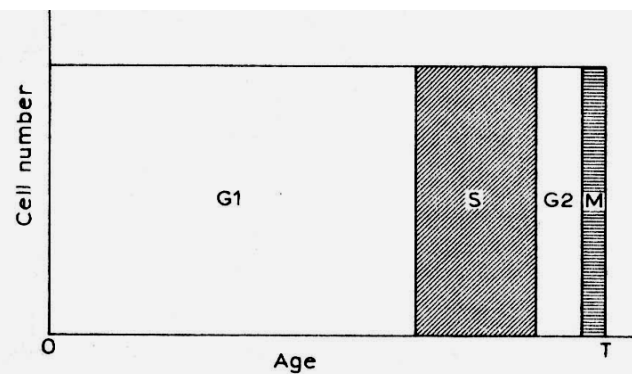
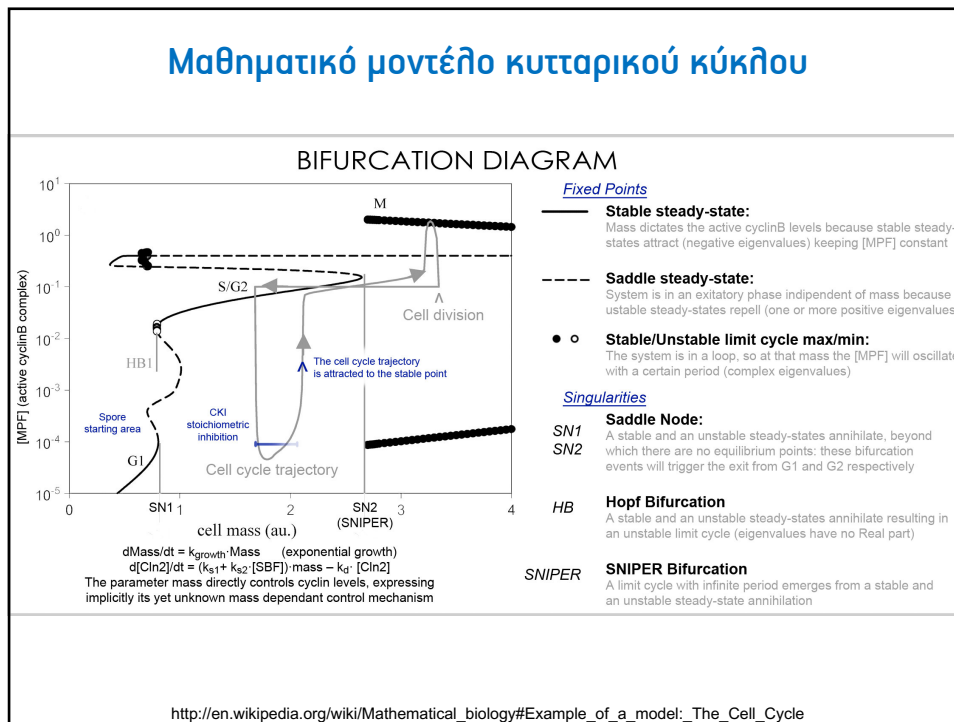


Fig. 10.6. Distribution of steady state cells around the cell cycle. In the steady state the number of cells in a particular phase is proportional to the duration of that phase.

## Μαθηματικό μοντέλο κυτταρικού κύκλου

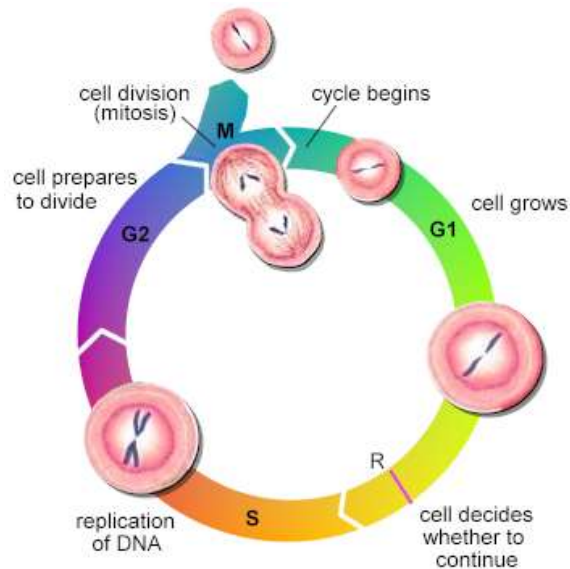


## Αρχές

Είναι δυνατό να εμποδίσουμε τα κύτταρα να αναπτύσσονται, ώστε να συσσωρευθούν σε συγκεκριμένη φάση του κύκλου. Αυτό γίνεται τόσο φυσιολογικά, όσο και χημικά.

Μπορούμε να επιλέξουμε κύτταρα σε μία συγκεκριμένη φάση. Αυτό μπορεί να γίνει στηριζόμενοι, π.χ. σε μια φυσική ιδιότητα, όπως η χαλαρή σύνδεση των μιτοτικών κυττάρων, το μέγεθος, κ.α.

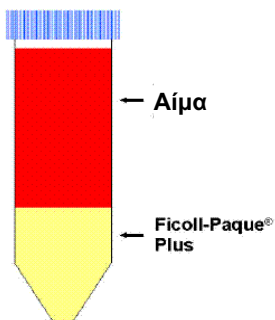
## Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων Επιλογή κυττάρων με βάση το μέγεθός τους



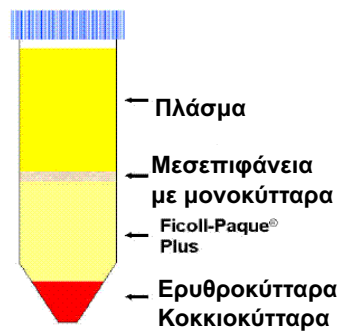
## Επιλογή κυττάρων με βάση το μέγεθός τους, Ficoll

Υδρόφιλος Πολυσακχαρίτης  
σωματίδια ακτίνας 2-7nm

Πριν φυγοκέντρηση



Μετά φυγοκέντρηση



## Επιλογή κυττάρων με βάση το μέγεθός τους

### α. Καθίζηση κατά ζώνες (zone sedimentation)

π.χ. Φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση σε Ficoll (2.7-5.5%)  
δίνει πλήρη διαχωρισμό σφαιρών που διαφέρουν κατά  
2 φορές σε όγκο.

### β. Διαχωρισμός επίπλευσης με φυγοκέντρηση (centrifugal elutriation)

Κυρίως για κύτταρα στη φάση G1.

### γ. FACS

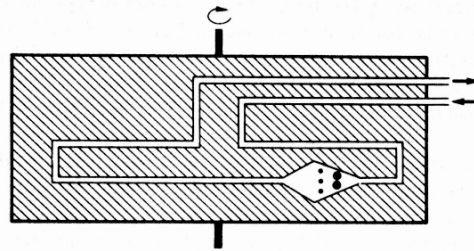
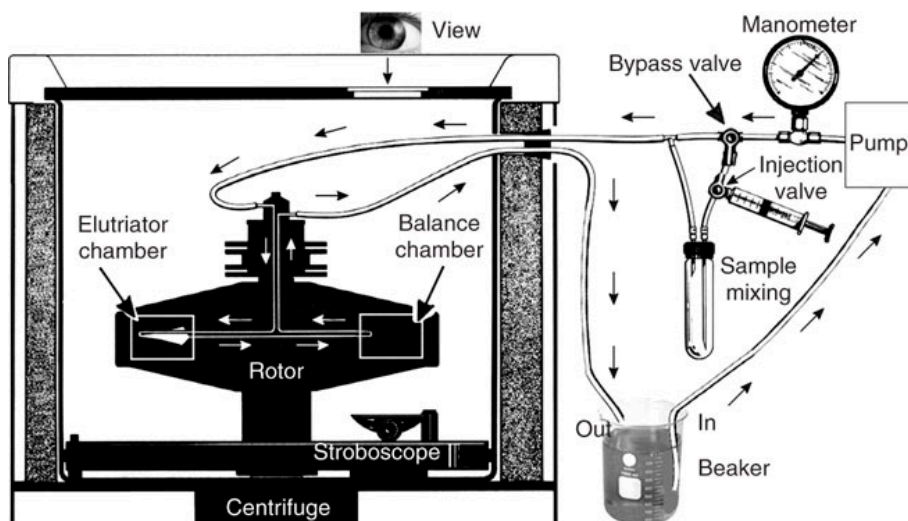


Fig. 11.2. Diagram of the elutriator rotor. The cell suspension enters at the acute point of the kite-shaped cell and as the flow rate is increased cells leave (smallest first) towards the centre of the rotor.

## Διαχωρισμός κυττάρων με βάση το μέγεθός τους



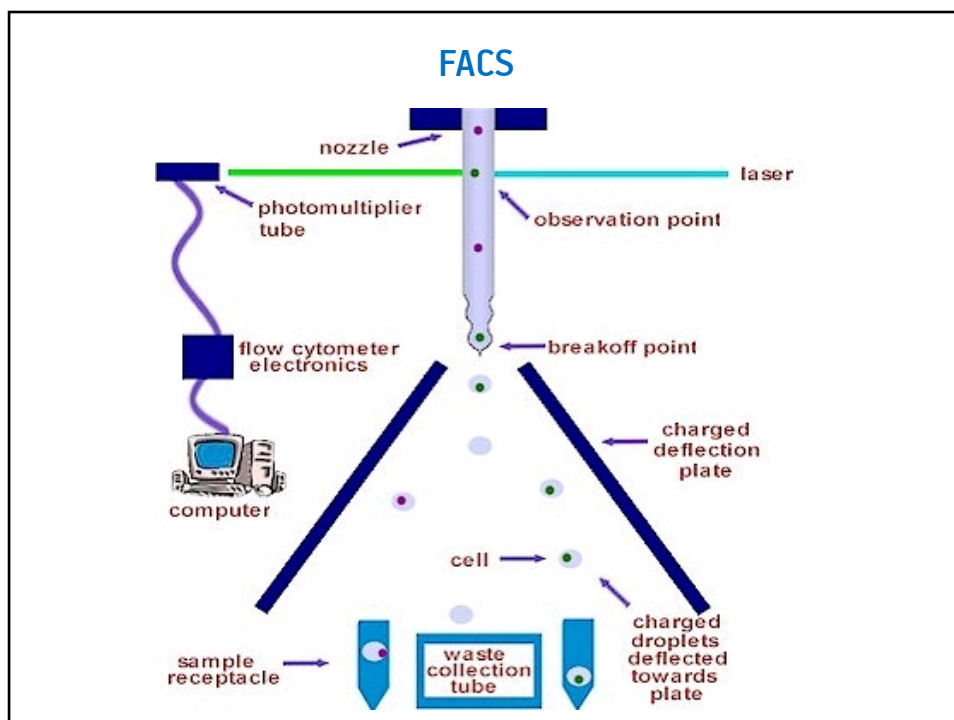
[http://www.nature.com/nprot/journal/v3/n4/fig\\_tab/nprot.2008.34\\_F2.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v3/n4/fig_tab/nprot.2008.34_F2.html)

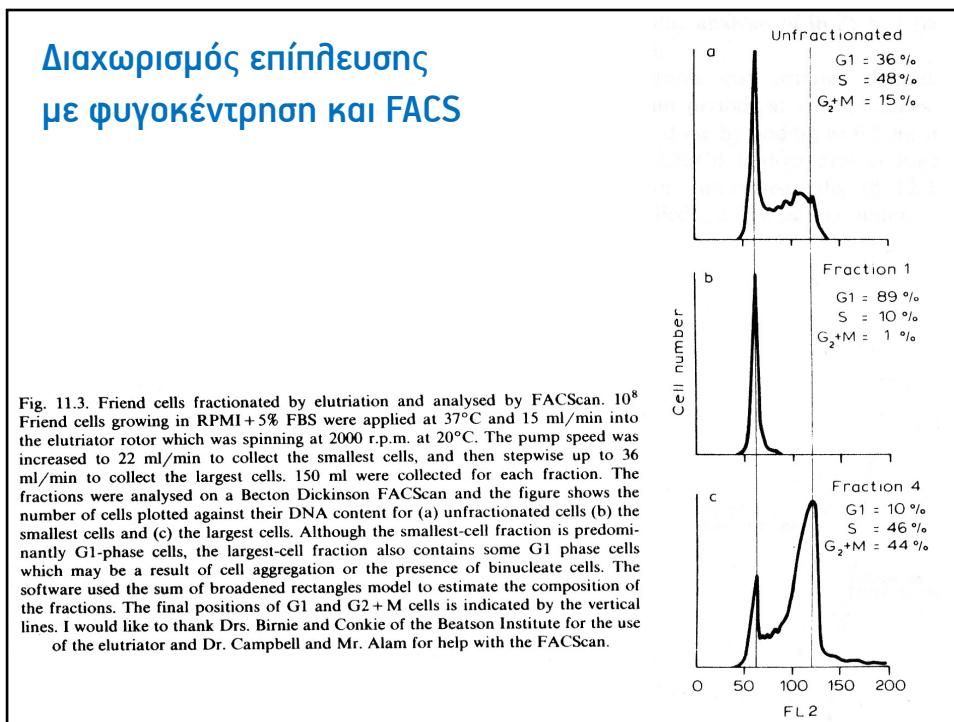
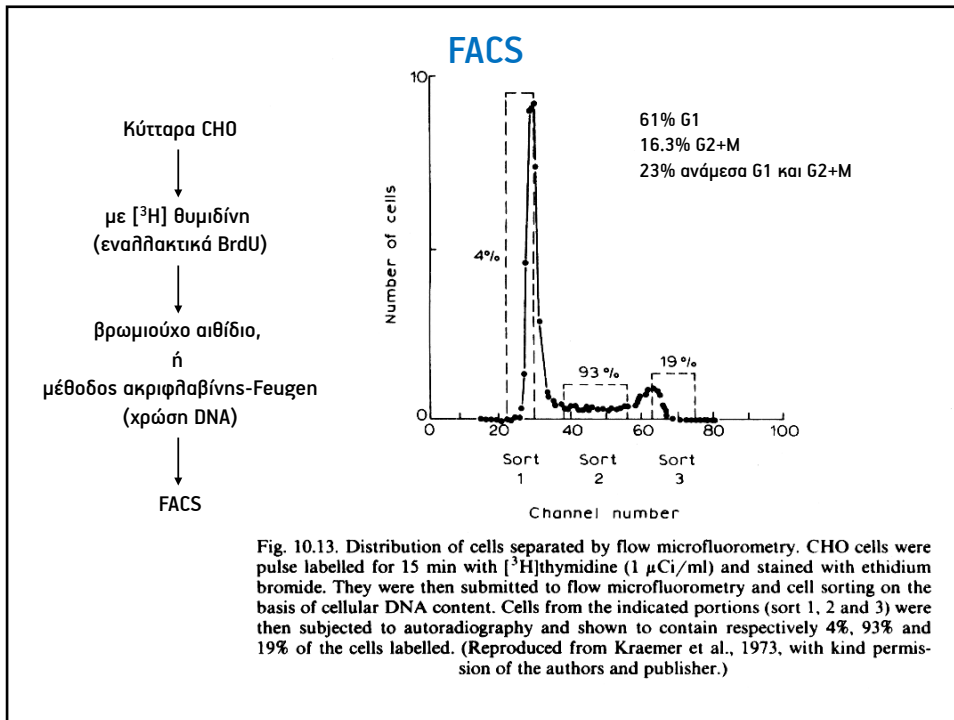


**Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου:**  
**Μικροφθορισμομετρία ροής**  
**(Flow microfluorometry, Fluorescence activated cell sorting, FACS)**

Ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων με βάση το περιεχόμενο σε DNA και πρωτεΐνες, διαστάσεις κυττάρου, κ.α.

Χρώση κυττάρων με εξειδικευμένες φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. βρωμιούχο αιθίδιο βάφει DNA απομονωμένων πυρήνων, ή χρήση διαφορετικών αντισωμάτων συζευγμένα με διαφορετικό χρωμοφόρο).





## Συγχρονισμός με ανακαλλιέργεια

Όταν η καλλιέργεια έλθει στη στάσιμη φάση και ανακαλλιεργηθεί, τότε ο κύκλος της σύνθεσης του DNA και της κυτταρικής διαίρεσης είναι μερικώς συγχρονισμένοι.

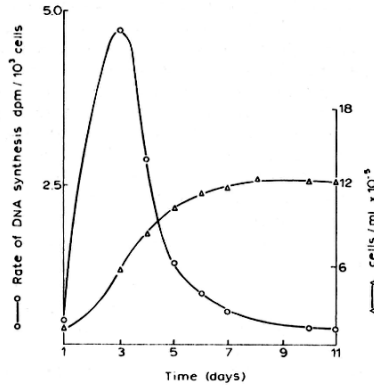
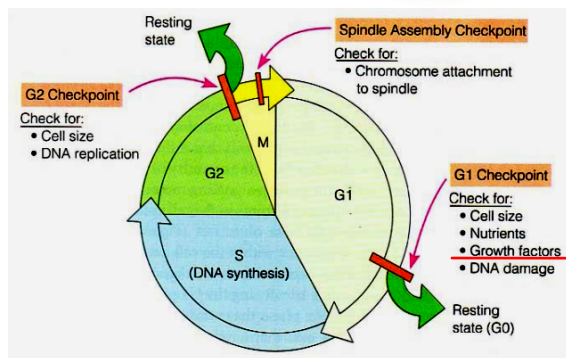
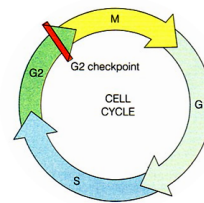


Fig. 4.2. Growth cycle of mouse L929 cells. Mouse L929 cells were inoculated into 2 oz. medical flat bottles ( $5 \times 10^5$  cells in 5 ml Eagle's Minimal Essential Medium containing 10% calf serum). The medium was changed every two days. Bottles were incubated for 60 min with  $2 \mu\text{Ci}$  ( $6\text{-}^3\text{H}$ )-thymidine ( $80 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) at a final concentration of  $5 \mu\text{M}$  after which they were harvested by trypsinisation, their number ( $\Delta$ — $\Delta$ ) estimated using a Coulter counter and the rate of DNA synthesis ( $\circ$ — $\circ$ ) estimated from the incorporation of [ $^3\text{H}$ ] thymidine (Chapter 12). Courtesy of Dr. J.G. Lindsay, 1969.

## Συγχρονισμός με στέρηση ορού (serum deprivation)

Κυρίως στη φάση G1.  
Επαναπροσθήκη ορού ωθεί τα κύτταρα να προχωρήσουν στον κύκλο.

Κύτταρα Swiss 3T3. Στέρηση για 1h οδηγώσε κύτταρα στη G0 φάση και χρειάζονται ~8h για να επανέλθουν στη G1.



## Στέρση ισοθευκίνης



Κύτταρα CHO σε υλικό Ham's F10 εισέρχονται σε στατική φάση ανάπτυξης.  
 Αλληγή υλικού τα επανέφερε στον κύκλο.  
 Αυτό δεν οφείλτοταν στον ορό, αλλά στη μειωμένη ποσότητα ισοθευκίνης.  
 Τα κύτταρα βρέθηκε ότι σταματούν στη φάση G1.

Ο μηχανισμός δεν έχει να κάνει με μια απλή στέρση ενός αμινοξέος.

## Παρεμπόδιση της φάσης S



Γίνεται κυρίως μέσω της ρύθμισης της σύνθεσης ενός ή περισσότερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων, απαραίτητων για τη σύνθεση του DNA, ενώ επιτρέπουν άλλες διεργασίες, όπως τη σύνθεση RNA και πρωτεϊνών.

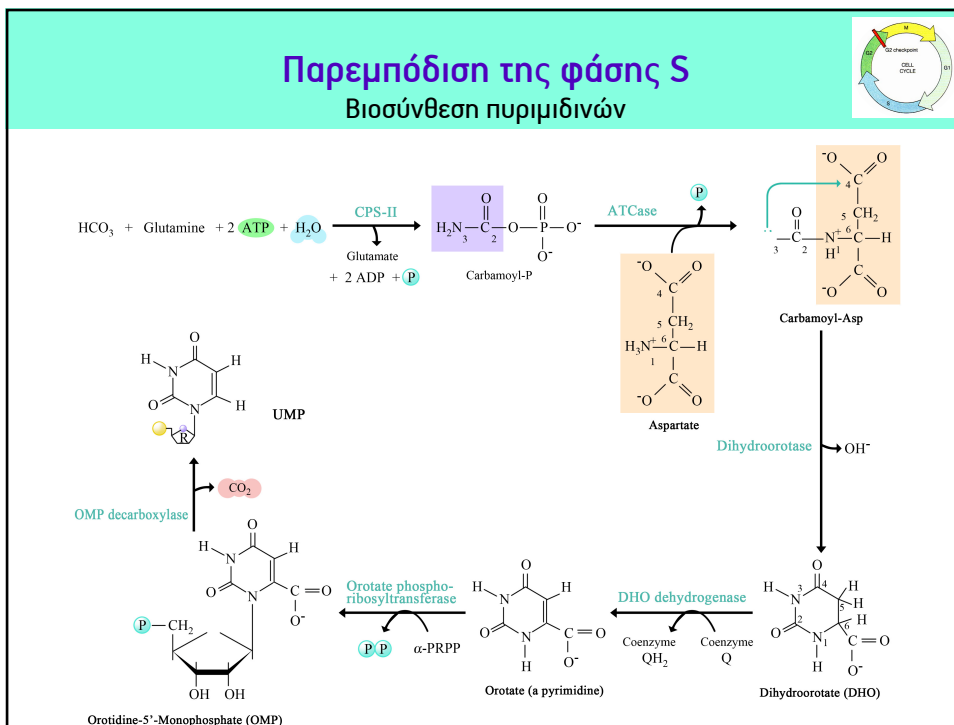
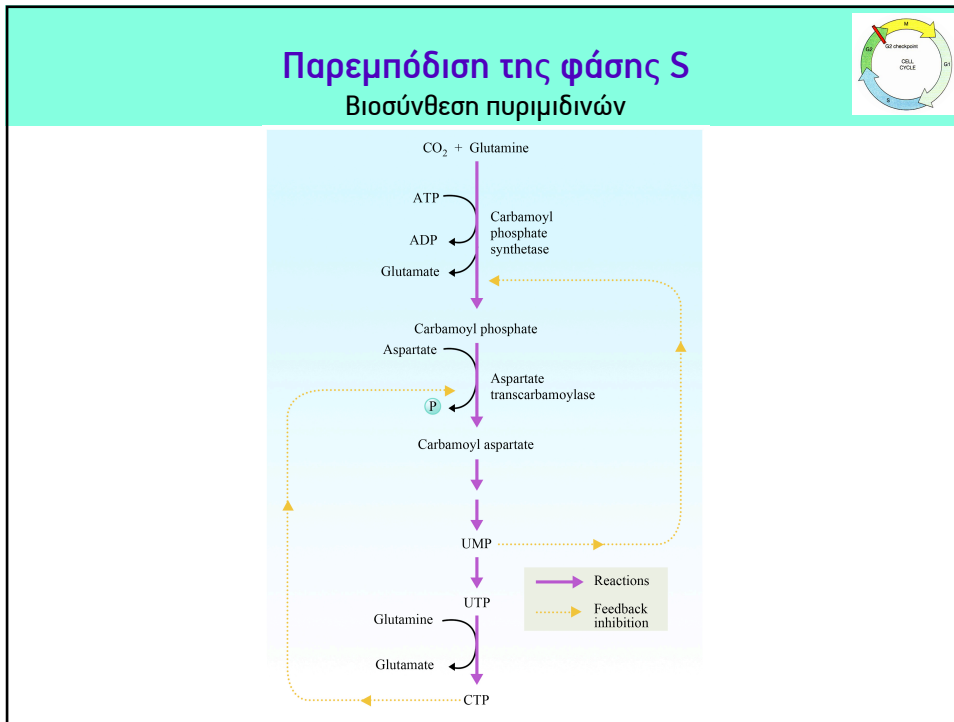
~70% των κυττάρων είναι συγχρονισμένα στη φάση S.

### Χρήση «διπλής παρεμπόδισης» (double block)


για να φτάσει ο συγχρονισμός σε ~100%:  
 Συνθήκες ώστε τα κύτταρα να είναι στη φάση G1.  
 (Στέρση ισοθευκίνης, χρήση ορού, ανακαλλιέργεια, κλπ).

### Πρακτικά γίνεται με:

- θυμιδίνη,
- αμινοπτερίνη,
- αμεθοπτερίνη,
- 5-φθοροδεόξυουριδίνη,
- υδροξουρία



### Παρεμπόδιση της φάσης S



**Ρύθμιση μονοπατιών σύνθεσης πυριμιδινών σε *E. coli* και σε ζώα**

*E. coli*

$\text{HCO}_3^- + \text{Glutamine} + 2 \text{ATP}$

→ Carbamoyl - P → Carbamoyl - aspartate → Orotate → OMP → UMP → UDP → UTP → CTP

PRPP

Regulation: + at Carbamoyl - P, + at Carbamoyl - aspartate, - at Orotate, - at OMP, - at UMP, - at UDP, - at UTP, - at CTP.

*Animals*

$\text{HCO}_3^- + \text{Glutamine} + 2 \text{ATP}$

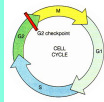
→ Carbamoyl - P → Carbamoyl - aspartate → Orotate → OMP → UMP → UDP → UTP → CTP

PRPP

Regulation: + at Carbamoyl - P, + at Carbamoyl - aspartate, - at Orotate, - at OMP, - at UMP, - at UDP, - at UTP, - at CTP.

<http://www.columbia.edu/cu/biology/courses/w3034/Larry/readings/PurineChapter/PurineChapter.html>

### Η δράση της θυμιδίνης



Χαμηλά επίπεδα ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) επάγει σύνθεση DNA.

Υψηλά επίπεδα ( $>1 \text{mM}$ ) αναστέλλει τη σύνθεση σε αρκετές σειρές.

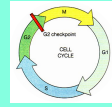
Θυμιδίνη dTTP, → αλληλοστερικός παρεμποδιστής της ριβονουκλεϊκής αναγωγής.

dTTP → Αλληλοστερικός ενεργοποιητής αναγωγής GDP. dGTP αλληλ/κος ενεργοποιητής ATP.

dTTP → Αλληλοστερικός παρεμποδιστής αναγωγής CDP, UDP

Αναστολή παρεμπόδισης ;

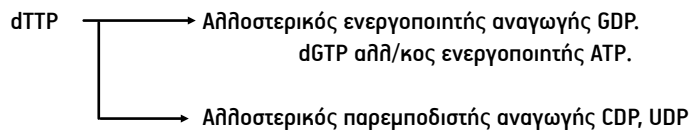
## Η δράση της θυμιδίνης



Χαμηλά επίπεδα ( $3 \times 10^{-7}M$ ) επάγει σύνθεση DNA.

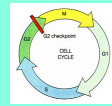
Υψηλά επίπεδα ( $>1mM$ ) αναστέλλει τη σύνθεση σε αρκετές σειρές.

Θυμιδίνη dTTP,  $\rightarrow$  αλληλοστερικός παρεμποδιστής της αναγωγάσης ριβονουκλεοτιδίων .



Αναστολή παρεμπόδισης με προσθήκη dC

## Αμινοπτερίνη και αμεθοπτερίνη (μεθοτρεξικό, methotrexate)



Αναστέλλουν τη Αναγωγή του διυδροφολικού (DHFR)

Η DHFR μετατρέπει το φολικό και το διυδροφολικό οξύ ( $FH_2$ ) σε  $FH_4$ .

Το  $FH_4$  εμπλέκεται σε μεταβολισμό:

- α. Gly και Met.
- β. Ανθράκων στις θέσεις 2 και 8 πουρινικών δακτυλίων
- γ. Μεθυλομάδας της θυμιδίνης
- δ. Έμμεσα στη σύνθεση χολίνης και ιστιδίνης.

Προσθήκη υποξανθίνης ή αδενοσίνης, Gly, Met, His και χολίνης, ώστε να επικεντρωθεί η δράση στο μεταβολισμό της θυμιδίνης.

Αναστολή δράσης με προσθήκη θυμιδίνης όταν συντίθεται dTTP από κινάσες θυμιδίνης και θυμιδιλικού.

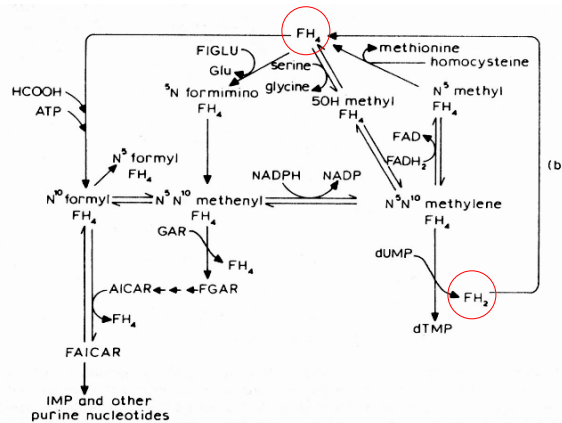


Fig. 11.6. Interconversions of tetrahydrofolate derivatives.  $FH_2$  = dihydrofolate;  $FH_4$  = tetrahydrofolate; AICAR = 5 aminoimidazole 4-carboxamide ribonucleotide; FAICAR = formyl AICAR; GAR = glycinamide ribonucleotide; FGAR = formyl GAR; Glu = glutamic acid; FIGLU = formimino glutamic acid. (Modified from Mudd and Cantoni, 1964.)





## Δράση της υδρόξυουρίας (HU)



Αναστολή σύνθεσης DNA μέσω δράσης στη M2 υπομονάδα της ριβονουκλεϊκής αναγωγάσης.

## Συγχρονισμός στη φάση G2



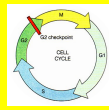
Είναι η πιο δύσκολη φάση

Αυτό γιατί αν τα κύτταρα συγχρονίζονται με επιλογή στη φάση M ή συσσώρευση στη G1/S, καθώς φτάνουν στην G2 χάνουν το συγχρονισμό.

Οι πληθυσμοί G2 είναι δεν είναι «καθαροί».

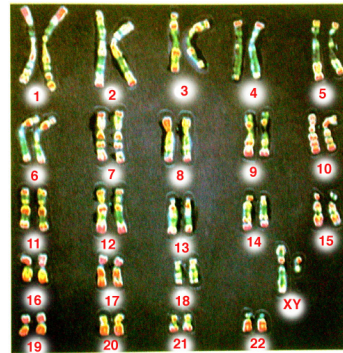
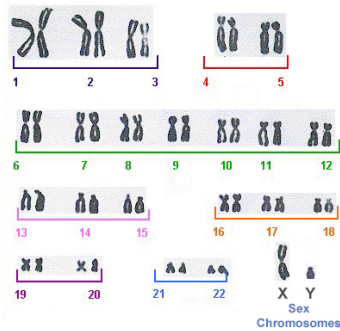
Συγχρονισμός επιτυγχάνεται με μεταλλάγματα ευαίσθητα στη θερμοκρασία.

## Επιλογή και συγχρονισμός στη φάση M

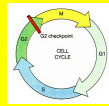


- α. Ανάδευση
- β. Θρυψίνιση (Trypsinisation)
- γ. Χημική παρεμπόδιση του κύκλου με κολσιμίδιο (colcemide), ή κυρίως με νοκαδαζόλιο (nocadazole).  
Επίσης η κολχικίνη σταματά τον κύκλο στην μετάφαση.

### Human Karyotype



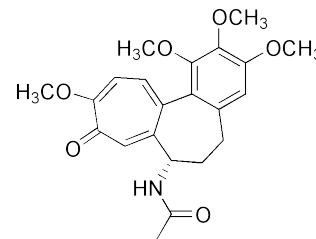
## Φάση M: ρόλος κολχικίνης, νοκαδαζόλης



**Κολχικίνη (Colchicine)**  
Αλκαλοειδές  
Απομόνωση 1820, P.S. Pelletier, J. Caventon

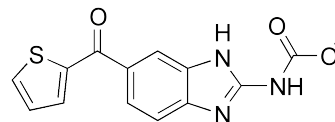
Χρήση ως καθαρτικό εντέρου  
Πιθανή αντικαρκινική χρήση

σταματά τον κύκλο στην μετάφαση.




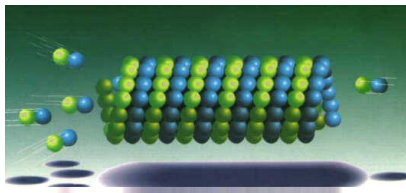
**Νοκαδαζόλη (Nocadazole)**

σταματά τον κύκλο στην μετάφαση.  
Παρεμποδίζει σχηματισμό μικροσωληνίσκων

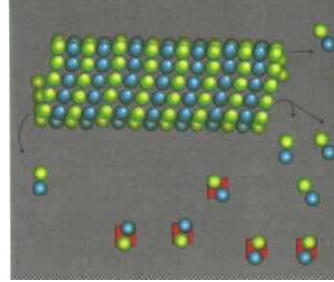


**Φάση M: ρόλος κολχικίνης, νοκαδαζόλης**







Κολχικίνη  
→  
Nocadazol  
colcemide



[http://www.cytochemistry.net/Cellbiology/microtubule\\_structure.htm](http://www.cytochemistry.net/Cellbiology/microtubule_structure.htm)

**Φάση M: Μικροσωληνίσκοι, ΜΤ**





Microtubule  
24 nm

Cross  
section  
5 nm

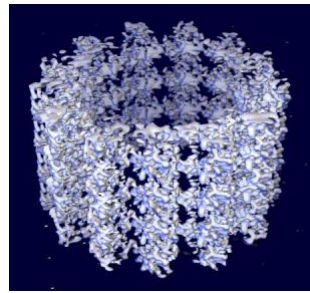
Subunits as seen in  
negative stain preparations

Longitudinal  
section  
(+) end

Tubulin dimers  
(heterodimers)  
alpha  
tubulin  
beta  
tubulin

Tubulin (α,β), GTP, Mg<sup>2+</sup>, 37°C

Σχηματισμός ΜΤ  
Nucleation  
Elongation



[http://www.cytochemistry.net/Cellbiology/microtubule\\_structure.htm](http://www.cytochemistry.net/Cellbiology/microtubule_structure.htm)

