

# Biologia molecolare della cellula

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

Github: <https://github.com/giacThePhantom/BioMolCellula>

**25 febbraio 2020**

# Indice

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>Introduzione</b>   | <b>2</b> |
| 1.1      | Microscopia . . . . .   | 2        |
| 1.1.1    | Risoluzione . . . . .   | 2        |
| 1.1.2    | Tecniche di microscopia ottica . . . . .  | 3        |
| 1.2      | Dogma centrale della biologia molecolare . . . . .  | 3        |
| <b>2</b> | <b>Cellule e genomi</b>   | <b>4</b> |
| 2.1      | Caratteristiche universali della vita sulla Terra . . . . .   | 4        |
| 2.1.1    | Tutte le cellule conservano la loro informazione ereditaria nello stesso codice chimico lineare (DNA) . . . . . | 4        |
| 2.1.2    | Tutte le cellule replicano la loro informazione ereditaria mediante polimerizzazione su uno stampo . . . . .    | 5        |

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Microscopia

I microscopi possono essere divisi in due categorie principali: i microscopi ottici (composti, semplici o a fluorescenza) e i microscopi elettronici. Mentre i primi utilizzano la luce e lenti ingrandenti i secondi utilizzano fasci di elettroni direzionati attraverso campi magnetici. Diverse tecniche di microscopia elettronica includono trascrizione, sezione, freeze fracture e scansione. I microscopi elettronici generano immagini unicamente in bianco e nero e si rende pertanto necessario utilizzare dei falsi colori in un secondo momento, ma hanno come vantaggio una maggiore risoluzione delle immagini. Per un microscopio ottico l'ingrandimento dell'immagine è dato dall'ingrandimento dell'obiettivo moltiplicato per l'ingrandimento degli eye-pieces:

$$M_{microscope} = M_{objective} \cdot M_{eyepieces}$$

#### 1.1.1 Risoluzione

La risoluzione di un immagine è una misura del dettaglio che essa contiene e se attraverso tecniche digitali l'ingrandimento è illimitato la risoluzione no. Si indica con risoluzione la minor distanza tra due punti che possono essere distinti come separati. La risoluzione dipende da parametri dell'utente finale e da parametri fisici.

##### Parametri fisici

I parametri fisici che determinano la risoluzione sono:

- Il corretto allineamento del sistema ottico del microscopio.
- La lunghezza d'onda della luce ( $\lambda$ ): maggiore la lunghezza d'onda minore la risoluzione.
- L'apertura numerica (NA) dell'obiettivo e del condensatore. Questo parametro indica la capacità di un obiettivo di raccogliere luce e risolvere dettagli ad una distanza fissata dall'oggetto. Dipende dall'ingrandimento e dall'indice di rifrazione del medium tra microscopio e oggetto (aria, acqua, olio). Maggiore l'indice di rifrazione maggiore il numero di apertura e maggiore la risoluzione.

### 1.1.2 Tecniche di microscopia ottica

#### Microscopia a cambio di fase

Nella microscopia a cambio di fase viene sfruttato lo shift di fase della luce quando attraversa il corpo che si vuole osservare. L'interpretazione dello shift dà origine a diverse possibili considerazioni sull'oggetto.

#### Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza sfrutta il fenomeno della fluorescenza: certe molecole, quando colpite da certe lunghezze d'onda, si eccitano. Successivamente quando la molecola ritorna dallo stato eccitato a quello basale emette a sua volta un'onda luminosa di lunghezza d'onda maggiore di quella con cui era stata colpita (legge di Stokes). Per questa tecnica vengono tipicamente utilizzate delle proteine come GFP (green fluorescent protein), YFP, CFP tipicamente estratte da organismi (nel caso della GFP da una medusa) che permettono pertanto la loro codifica nel DNA della cellula. Queste proteine vengono aggiunte ad una proteina in modo da riuscire ad osservarne il comportamento. Si deve prestare attenzione al fatto che per massa o struttura questa aggiunta potrebbe creare una variazione in comportamento della proteina oggetto di studio. I fattori essenziali per la microscopia a fluorescenza sono:

- Eccitazione di alta intensità.
- Filtri di eccitazione e emissione appropriati.
- Autofluorescenza minima nell'oggetto di studio.
- Utilizzo di un olio di immersione non fluorescente.
- Antifade reagents.

Questa tecnica permette pertanto di osservare proteine in cellule vive a differenza dell'antibody staining. Un'importante applicazione è l'immunoistochimica.

**FRET** La tecnica FRET si utilizza per determinare la prossimità di due diverse proteine: si attaccano ad esse due molecole fluorescenti tali che l'emissione della prima eccita la seconda, che a sua volta emette luce. Se questo accade si è dimostrato che le due proteine sono vicine.

**Photobleach** Questa tecnica viene utilizzata per mostrare la velocità di movimento di una proteina della cellula: si trova una cellula di controllo e quella oggetto di studio entrambe con la proteina fluorescente. La seconda viene sottoposta ad un raggio ad alta potenza (photoactivation) che distrugge la parte fluorescente della proteina. Si osserva ora la velocità con cui la luminescenza torna nella zona colpita, confrontandola con la cellula di controllo e si crea il grafo di velocità di movimento della proteina.

## 1.2 Dogma centrale della biologia molecolare



## Capitolo 2

# Cellule e genomi

Tutti gli esseri viventi sono fatti di cellule e queste unità di materia vivente hanno in comune lo stesso macchinario che svolge le stesse funzioni di base. Si nota pertanto il contrappunto tra enorme differenza tra gli individui se osservati all'esterno ma una straordinaria somiglianza nei meccanismi fondamentali.

### 2.1 Caratteristiche universali della vita sulla Terra

Ciascuna specie presente sulla Terra è diversa e si riproduce fedelmente producendo una progenie che appartiene alla stessa specie. L'organismo genitore passa l'informazione che specifica in modo dettagliato le caratteristiche che la progenie avrà. Questo fenomeno, detto ereditarietà è ciò che distingue la vita da altri processi. L'organismo vivente inoltre consuma energia libera per creare e mantenere la sua organizzazione che spinge un sistema complesso di processi chimici nel modo specificato dall'informazione ereditaria. Sia che l'organismo sia costituito da una singola cellula o da raggruppamenti di cellule specializzate collegati da sistemi complessi di comunicazione è stato generato da divisioni cellulari di una singola cellula. La singola cellula è perciò il veicolo dell'informazione ereditaria che definisce la specie e include il meccanismo necessario alla sua copia.

#### 2.1.1 Tutte le cellule conservano la loro informazione ereditaria nello stesso codice chimico lineare (DNA)

Tutte le cellule viventi sulla Terra conservano le loro informazioni sotto forma di molecole a doppio filamento di DNA, lunghe catene polimeriche accoppiate senza ramificazioni, formate sempre dagli stessi quattro tipi di monomeri, con nomi derivati da un alfabeto a quattro lettere (A, C, G, T). Questi monomeri sono attaccati in una lunga sequenza lineare che codifica l'informazione genica. Essendo il DNA una struttura utilizzata da tutte le cellule viventi il DNA di un essere umano è leggibile, copiabile e interpretabile da una cellula batterica (e viceversa). Utilizzando metodi chimici si può leggere la sequenza completa di monomeri in qualunque molecola di DNA e decifrare così l'informazione ereditaria contenuta in qualsiasi organismo.

### 2.1.2 Tutte le cellule replicano la loro informazione ereditaria mediante polimerizzazione su uno stampo

I meccanismi che rendono possibile la vita dipendono dalla struttura della molecola di DNA a doppio filamento. Ciascun monomero nel DNA, detto nucleotide, è composto da uno zucchero (deossiribosio) con un gruppo fosfato attaccato e una base che può essere adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T). I nucleotidi creano una catena polimerica composta da un'ossatura ripetitiva zucchero-fosfato con una serie di basi che sporgono da un lato. Essendo l'unità zucchero-fosfato asimmetrica la catena ha una polarità che determina l'ordine di lettura. Il polimero di DNA viene esteso aggiungendo monomeri ad una estremità. Essendo la base uguale per tutti in teoria qualsiasi base può essere aggiunta in qualsiasi momento. Essendo che nella cellula vivente il DNA viene sintetizzato su uno stampo formato da un filamento preesistente di DNA le basi che sporgono dal filamento esistente si legano a basi del filamento che viene sintetizzato, secondo una regola rigida definita da strutture complementari delle basi: A si lega a T e C a G. Questi accoppiamenti di basi mantengono i nuovi monomeri in posizione e controllano la scelta del nuovo monomero da aggiungere. In questo modo si crea una struttura a doppio filamento composta da due catene complementari di nucleotidi e un'ossatura con polarità inversa. I nucleotidi di ciascun filamento si uniscono tra di loro attraverso legami covalenti, mentre con i corrispettivi nell'altro con legami ad idrogeno. I due filamenti si avvolgono l'uno sull'altro formando la struttura a doppia elica. Essendo i legami tra le basi deboli i due filamenti possono separarsi in modo da fornire lo stampo per una nuova replicazione. Questo processo di replicazione del DNA avviene con ritmi, controlli e molecole ausiliarie diverse, ma le basi sono universali: il DNA è il depositario dell'informazione e la polimerizzazione a stampo è il modo con cui l'informazione viene copiata e propagata.

### 2.1.3 Tutte le cellule trascrivono porzioni della loro informazione ereditaria nella stessa forma intermedia (RNA)

Si rende necessario esprimere le informazioni del DNA in modo da guidare la sintesi di altre molecole nella cellula. Anche questo processo è universale e produce principalmente RNA e proteine. Il processo inizia con una polimerizzazione su stampo detta trascrizione, in cui segmenti del DNA sono usati come stampo per la sintesi di molecole più corte di acido-ribonucleico o RNA. In seguito durante la traduzione queste molecole dirigono la sintesi di proteine. Nell'RNA l'ossatura è formata da ribosio e la timina viene sostituita dall'uracile (U). Durante la trascrizione i monomeri dell'RNA sono allineati e scelti per la polimerizzazione su un filamento stampo di DNA. Il risultato è un polimero che rappresenta una parte dell'informazione genetica della cellula. Lo stesso segmento di DNA può essere utilizzato per la sintesi di molti trascritti identici di RNA. Si noti pertanto come se il DNA rimane unico e stabile per la cellula l'RNA è monouso e prodotto in massa. Questi trascritti sono intermedi nel trasferimento dell'informazione genetica: servono soprattutto da RNA messaggero (mRNA) che guida la sintesi di proteine secondo le istruzioni conservate nel DNA. Le molecole di RNA possiedono anche strutture caratteristiche che possono conferire capacità chimiche specializzate. Essendo a filamento singolo possono ripiegarsi all'indietro su se stesse per formare legami deboli tra le basi, situazione che avviene quando segmenti della sequenza sono localmente complementari. La forma viene pertanto dettata dalla sequenza e può permettere alla molecola di essere scelta selettivamente e di catalizzare modificazioni chimiche.