

Biologia molecolare della cellula

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

31 dicembre 2020

Indice

1	Introduzione	7
1.1	Microscopia	7
1.1.1	Tipi di microscopi	7
1.1.2	Tecniche di microscopia	8
1.2	Tecniche di laboratorio	9
1.2.1	Reazione a catena della polimerasi PCR	9
1.2.2	Elettroforesi	10
1.2.3	Blots	10
1.2.4	Tecniche di manipolazione del DNA	11
1.2.5	Cristallografia a raggi X	12
1.2.6	Altre che non so????	13
1.3	Figure importanti e loro lavori	13
1.3.1	Miescher	13
1.3.2	Mendel	13
1.3.3	Morgan	13
1.3.4	Griffith e Avery	13
1.3.5	Hershey e Chase	13
1.3.6	Watson e Crick	14
1.3.7	Mello e Fire	14
1.4	Cellula e genomi	14
1.4.1	Caratteristiche universali delle cellule	14
1.4.2	Differenze principali tra le forme di vita	16
1.4.3	Complessità di un organismo	17
2	DNA e RNA	19
2.1	Struttura del DNA	19
2.1.1	Componenti	19
2.1.2	Polarità	20
2.1.3	Interazioni tra basi	20
2.1.4	Caratteristiche	21
2.1.5	Tipologie di strutture	21
2.1.6	Stabilizzazione della doppia elica	22
2.1.7	Sintesi	23
2.1.8	DNA superavvolto o struttura terziaria	23
2.2	Struttura del RNA	24
2.2.1	Funzioni del RNA	24

2.2.2	Struttura	24
2.2.3	Strutture secondarie	24
2.2.4	Modifiche dell'RNA	25
2.3	Organizzazione del DNA nel nucleo	25
2.3.1	Procarioti	25
2.3.2	Eucarioti	25
2.3.3	Cromatina	25
2.3.4	Regolazione della struttura cromatinica	28
2.3.5	Epigenetica	29
2.3.6	Cromatina dei centromeri	30
2.3.7	Sindrome di Rett	31
2.4	Modifiche post-traduzionali	31
2.4.1	Fosforilazione	31
2.4.2	Acetilazione	31
2.4.3	Metilazione	31
2.4.4	Glicosilazione	32
2.4.5	Ubiquitinazione	32
2.4.6	Sumoilazione	32
2.5	Metabolismo del ferro	33
2.5.1	Introduzione del ferro nella cellula	33
2.5.2	Meccanismo di regolazione	33
2.5.3	Metodo di osservazione	34
3	Replicazione e riparazione del DNA	35
3.1	Modello di replicazione	35
3.1.1	Esperimento Meselson-Stahl	35
3.2	Panoramica	36
3.2.1	Reazione di polimerizzazione	36
3.2.2	Mutazioni	36
3.2.3	DNA polimerasi	37
3.2.4	Meccanismi di correzione	37
3.2.5	Sintesi sul filamento discontinuo	37
3.2.6	Apertura della doppia elica	38
3.2.7	Mantenimento di una DNA polimerasi in movimento sul DNA	38
3.2.8	Modello a trombone	38
3.2.9	DNA topoisomerasi	39
3.3	Complesso di pre-replicazione	39
3.3.1	Formazione	39
3.3.2	Attivazione	39
3.4	Replisoma	40
3.4.1	Composizione	40
3.4.2	Tipo I	41
3.5	Processo di replicazione	41
3.5.1	Inizio della replicazione	41
3.5.2	Velocità di replicazione	42
3.5.3	Organizzazione temporale	42
3.5.4	Assemblaggio dei nucleosomi	42
3.5.5	Terminazione della replicazione	43

3.6	Riparazione del DNA	44
3.6.1	Motivi biologici della riparazione	44
3.6.2	Processi di riparazione	44
3.6.3	DNA polimerasi specializzate	45
3.6.4	Rotture a doppio filamento	45
3.6.5	Effetti del danno al DNA	45
3.6.6	Riparazione omologa	45
3.7	Mitocondrio	45
3.7.1	Teoria endosimbiontica	46
3.7.2	Numero e morfologia	46
3.7.3	DNA mitocondriale	47
4	Trascrizione	48
4.1	Panoramica	48
4.1.1	Produzione di RNA	48
4.1.2	RNA polimerasi	48
4.1.3	Inibitori di RNA polimerasi	50
4.1.4	Categorie di RNA prodotto	50
4.2	Trascrittoma	50
4.2.1	Composizione	50
4.3	Processo della trascrizione	51
4.3.1	inizio	51
4.3.2	Allungamento	53
4.3.3	Terminazione	54
4.4	Trasporto tra nucleo e citoplasma	54
4.4.1	Complessi coinvolti	55
4.4.2	Verificare la localizzazione	55
4.4.3	Processo di import ed esport	55
4.5	Meccanismi di regolazione della trascrizione e dell'espressione genica	56
4.5.1	Operoni	56
4.5.2	Induzione	56
4.5.3	Repressione	56
4.5.4	Enhancer	56
4.5.5	Esempi	57
4.6	Modifiche post-trascrizionali	58
4.6.1	Capping	58
4.6.2	Poliadenilazione	59
4.6.3	Splicing	60
4.6.4	RNA editing	63
4.6.5	Funzioni delle modifiche	64
5	Trasporto e localizzazione di RNA	65
5.1	Motivi del trasporto di RNA	65
5.1.1	Efficienza	65
5.1.2	Sicurezza	65
5.2	RNA trasportati	65
5.2.1	RNA localizzati nel compartimento dendritico	65
5.2.2	RNA localizzati nell'oocita di Drosophila	66

5.2.3	Lievito	66
5.3	Meccanismo di trasporto	66
5.3.1	Fattori coinvolti	66
6	Traduzione	68
6.1	Ribosomi	68
6.1.1	Struttura	68
6.1.2	Assemblaggio	69
6.1.3	rRNA	69
6.1.4	tRNA	70
6.2	Fasi della traduzione	71
6.2.1	Inizio	71
6.2.2	Allungamento	72
6.2.3	Terminazione	73
6.3	Inibitori della sintesi proteica	73
7	Segnalazione cellulare: trasduzione del segnale	74
7.1	Panoramica	74
7.1.1	Tipologie di risposte	74
7.2	Modelli di comunicazione delle cellule	74
7.2.1	Comunicazione contatto dipendente	74
7.2.2	Comunicazione paracrina	74
7.2.3	Comunicazione sinaptica	75
7.2.4	Comunicazione endocrina	75
7.2.5	Comunicazione tramite gap-junction	75
7.3	Trasmissione sinaptica	76
7.3.1	Acetilcolina	76
7.4	Recettori	76
7.4.1	Canali ionici	76
7.4.2	Recettori di superficie collegati a proteina <i>G</i>	77
7.4.3	Recettori di superficie collegati ad enzimi	77
7.5	Messaggeri	77
7.5.1	Ossido di azoto	77
7.5.2	Ormoni steroidei	78
7.5.3	Messaggeri secondari	78
7.6	Molecular switches	78
7.6.1	Tipologie	78
7.6.2	Proteine <i>G</i> trimeriche	79
7.7	Regolazione di un recettore	81
7.7.1	Esempio	81
7.7.2	Vie attivate da <i>cAMP</i>	82
7.8	Inositolo 3 fosfato	82
7.8.1	Sintesi	82
7.8.2	Caratteristiche	83
7.8.3	Diaglicerolo	83
7.8.4	Calcio	83
7.8.5	Recettori del sistema olfattivo	84
7.8.6	Recettori del sistema visivo	84

7.9	Recettori ad attività enzimatica intrinseca	86
7.9.1	Classificazione	86
7.9.2	Recettori tirosina chinasi <i>RTK</i>	87
7.9.3	Recettori per le citochine	87
7.9.4	Recettori con attività chinastica	87
7.10	Muscolo	88
7.10.1	Placca neuromuscolare	89
7.10.2	Organizzazione del muscolo	89
7.10.3	Contrazione muscolare	90
7.10.4	Ciclo di contrazione	91
7.10.5	Muscolo cardiaco	93
7.10.6	Muscolo liscio	93
7.10.7	Sviluppo della giunzione muscolare	94
7.11	Esempi	94
7.11.1	<i>GLI3</i>	94
8	Membrana	95
8.1	Funzioni	95
8.2	Struttura	95
8.2.1	Fase semisolida	95
8.2.2	Zattere lipidiche	95
8.2.3	Asimmetria	95
8.3	Composizione	96
8.3.1	Glicolipidi	96
8.3.2	Proteine di membrana	96
8.4	Passaggio delle sostanze	96
8.4.1	Passaggio attivo	96
8.4.2	Endocitosi	96
8.4.3	Esocitosi	96
8.4.4	Passaggio passivo	96
9	Organelli	97
9.1	Panoramica	97
9.2	Trasporto di proteine	97
9.2.1	Trafficking nucleo-citoplasma	97
9.2.2	Trasporto in plastidi e mitocondri	98
9.3	Perossisomi	99
9.3.1	Panoramica	99
9.3.2	Trasporto	100
9.3.3	Genesi dei perossisomi	100
9.3.4	Sindrome di Zellweger	100
9.4	Reticolo endoplasmatico	100
9.4.1	Funzioni	100
9.4.2	Tipologie	100
9.4.3	Traduzione e traslocazione delle proteine	100

10 Citoscheletro	101
10.1 Actina	101
10.2 Microtubuli	105
10.3 Filamenti intermedi	107
10.4 Movimento cellulare	108
11 Esperienza di laboratorio	110
11.1 Giorno 1 - esame di uno striscio di sangue	110
11.1.1 Descrizione	110
11.1.2 Allestimento di uno striscio	110
11.1.3 Qualità dello striscio	111
11.1.4 Colorazione dello striscio	111
11.1.5 Esame dei vetrini	112
11.2 Giorno 2 - estrazione di proteine e DNA	116
11.2.1 Cellule <i>Hela</i>	116
11.2.2 Estrazione di proteine	117
11.2.3 Estrazione di DNA	119
11.3 Giorno 3 - Colture cellulari	121
11.3.1 Disgregazione del tessuto	121
11.3.2 Coltura primaria	121
11.3.3 Linea cellulare	121
11.3.4 Morfologia della coltura cellulare	121
11.3.5 Età delle colture	122
11.3.6 Ottenere una coltura cellulare	122
11.3.7 Applicazioni della coltura cellulare	122
11.3.8 Ambiente cellulare - terreno di coltura	123
11.3.9 Contenitori e strumenti per le colture cellulari	123
11.3.10 Area di lavoro	124
11.3.11 Mantenimento delle cellule	126
11.3.12 Esercitazione	126
11.4 Giorno 4 - Colorazione di organelli citoplasmatici	127
11.4.1 Fluorescenza	127
11.4.2 Scopo dell'esercitazione	128
11.4.3 Reticolo endoplasmatico	128
11.4.4 Mitocondri	129
11.4.5 Membrana citoplasmatica	129
11.4.6 Citoscheletro	130
11.4.7 Nucleo	130
11.4.8 Colorazione vitale	130

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Microscopia

1.1.1 Tipi di microscopi

1.1.1.1 Microscopi ottici

I microscopi ottici utilizzano la luce e lenti ingrandenti per permettere la visualizzazione del campione. Ne esistono vari tipi:

- In base al numero di lenti ingrandenti:
 - Semplici: una sola lente.
 - Composti: più lenti, in tal caso la capacità di ingrandimento totale è data dal prodotto delle capacità di ingrandimento.
- In base alla luce che utilizzano:
 - In campo chiaro: la luce attraversa direttamente il campione.
 - A contrasto di fase: permette di distinguere caratteristiche del campione senza colorarlo basandosi sui diversi indici di rifrazione tra il campione e il mezzo circostante: la luce deviata dal campione e quella che non viene fatta convergere su una superficie in modo che abbia lunghezza d'onda e frequenza diverse rispetto alla luce incidente mettendo in evidenza i bordi.
 - A contrasto di interferenza differenziale: a differenza di quello a contrasto di fase il campione viene illuminato di lato, eliminando l'alone di diffrazione luminoso.
 - In campo scuro: simile a quello a contrasto di fase, ma solo la luce che ha attraversato il campione viene raccolta dall'obiettivo che appare pertanto chiaro in campo scuro.
 - A fluorescenza: si compone di:
 - * Lampada ad arco a vapori di mercurio: lampada che genera luce ultravioletta.
 - * Filtro di eccitazione: seleziona la lunghezza d'onda ultravioletta che si vuole generare.
 - * Condensatore a campo oscuro: aumenta il contrasto delle strutture legate dalle molecole fluorescenti in modo che lo sfondo sia nero.

- * Filtro di sbarramento: evita che residui di luce ultravioletta raggiungano gli occhi dell'operatore.

Si dividono in upright scope con l'obiettivo sopra il campione, luce bianca dal basso e fluorescente dall'alto e inverted scope con la luce dal basso e micromanipolatori in quanto sopra è libero. Vengono utilizzate molecole particolari fluorescenti come GFP, YFP e CFP (green, yellow e cyan fluorescent protein). Se la fosforescenza è un fenomeno duraturo nel tempo la fluorescenza avviene temporaneamente, solo mentre la molecola viene eccitata da una lunghezza d'onda che causa alla molecola di produrre una a lunghezza maggiore (energia minore), con uno spostamento determinato dallo spostamento di Stokes.

1.1.1.1 Risoluzione Si intende per risoluzione una misura del dettaglio che un'immagine contiene, ovvero la minor distanza tra due punti che possono essere distinti come separati. Dipende da parametri dell'utente e fisici. I parametri fisici sono il corretto allineamento del sistema ottico del microscopio, la lunghezza d'onda della luce (λ , inversamente proporzionale alla risoluzione) e l'apertura numerica (NA , direttamente proporzionale all'indice di rifrazione e alla risoluzione), ovvero 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.

1.1.1.2 Microscopi elettronici

I microscopi elettronici utilizzano fasci di elettroni direzionati da campi magnetici per superare la capacità di ingrandimento di un microscopio ottico. Non sono però in grado di compiere osservazioni in vivo. Si distinguono in:

- SEM, scanning electron microscopy: un fascio di elettroni colpisce il campione che si vuole osservare che emette diverse particelle come gli elettroni secondari che vengono rilevati da un rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. Il fascio scansiona una zona rettangolare riga per riga in sequenza.
- TEM, transmission electron microscopy: gli elettroni che costituiscono il fascio attraversano una sezione dove è stato creato il vuoto per poi passare completamente attraverso il campione. Richiede che il campione sia preparato in una "thin section" o attraverso freeze fracture (il campione viene velocemente congelato, poi rotto, replicato in modo che sia la replica ad essere osservata al microscopio).

1.1.2 Tecniche di microscopia

1.1.2.1 Microscopia in campo chiaro

1.1.2.2 Immunoistochimica

È una tecnica in cui si individuano specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extra-cellulare in base al principio di coniugazione antigene-anticorpo con sistemi di rivelazione enzimatici o fluorescenza (poste sugli anticorpi) che rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio. Avviene con cellule fissate e quindi morte.

1.1.2.3 FRET

È una tecnica utilizzata per verificare le interazioni tra proteine in una cellula: ad entrambe viene fatta esprimere una porzione a fluorescenza in modo che la lunghezza d'onda espressa dalla prima ecciti la seconda. In questo modo la seconda emetterà luce se e solo se la prima, eccitata dal microscopio, si trova in sua prossimità. Si noti come sono i fluorofori e non le proteine a dover essere vicine.

1.1.2.4 Biomolecular fluorescent complementation

È una tecnica in cui ad una proteina *A* viene fatta esprimere la parte N-terminale del fluoroforo e alla proteina *B* la parte C-terminale. Se le proteine interagiscono produrranno una lunghezza d'onda.

1.1.2.5 Photobleach

È una tecnica in cui con un laser si altera un fluoroforo in modo che non sia più capace di produrre fluorescenza. In questo modo si può osservare quanto tempo impiega la fluorescenza a tornare al livello precedente misurando pertanto la velocità di diffusione o trasporto dell'elemento che si vuole osservare.

1.1.2.6 Fotoattivazione

È una tecnica che permette di osservare la cinetica di una molecola: a questa si fa esprimere la GFP che viene eccitata solo localmente. La molecola continuerà ad emettere per un certo periodo, permettendo di osservare i suoi spostamenti.

1.2 Tecniche di laboratorio

1.2.1 Reazione a catena della polimerasi PCR

Questa tecnica consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze neucleotidiche iniziali e terminali. Ricostruisce la sintesi di un segmento di DNA a doppia elica a partire da un filamento a singola elica. Quello mancante viene ricostituito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza. Devono essere disponibili i nucleotidi da polimerizzare sotto forma di desossiribonucleosidi trifosfati (dNTP). Il DNA deve essere denaturato. Il segmento da ricostruire può essere solo prolungato e devono esserci opportune condizioni di temperatura e pH. Sono necessari alla reazione una quantità del segmento che si vuole riprodurre, nucleotidi liberi, primer a brevi sequenze di DNA complementari alle estremità 5' e 3' dei due filamenti da riprodurre, una DNA polimerasi termo-resistente (TAQ polimerasi), un tampone per stabilizzare il pH e elementi di supporto. Si trovano pertanto tre fasi:

1. Fase di denaturazione: la soluzione di DNA da replicare, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primer e TAQ polimerasi vengono portate a una temperatura tra i 94 e i 99 gradi in modo che la doppia elica si scinda e i due filamenti siano liberi in soluzione.
2. Fase di annealing: la temperatura viene abbassata tra i 40 e i 55 gradi in modo da permettere il legame dei primer alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati.
3. Fase di prolungamento: la temperatura viene alzata tra i 65 e i 72 gradi in modo da massimizzare l'azione della TAQ polimerasi in modo da allungare i primer legati utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

Il ciclo viene ripetuto tra le 30 e 40 volte. La lunghezza dei primer si aggira tra le 20 e 30 paia di basi in modo da poter mantenere la temperatura di annealing ragionevole (che dipende anche dalla composizione delle basi) e impedire la formazione di strutture secondarie.

1.2.2 Elettroforesi

Questa tecnica analitica e separativa si basa sul movimento di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso (catodo negativo e anodo positivo). Le particelle si muovono verso quello che assume carica opposta alla propria. La mobilità dipende dalla dimensione della molecola, dalla carica, natura e concentrazione del mezzo elettroforetico, dalla concentrazione delle molecole e dalla tensione applicata. Essendo che le molecole di DNA possono presentare forme diverse migrano nel gel in maniera diversa, pertanto si applica un campo alternato in cui le molecole di DNA sono sottoposte alternativamente a due campi elettrici perpendicolari in modo che le molecole più piccole si riorientino più velocemente e abbiano maggiore mobilità.

1.2.3 Blots

1.2.3.1 Southern blot

Questa tecnica viene usata per rilevare la presenza di sequenze di DNA specifiche in una miscela complessa. Un campione eterogeneo di DNA genomico viene trattato con enzimi di restrizione (classe di idrolasi che catalizzano il taglio endonucleolitico del DNA per dare frammenti a doppia elica specifici con fosfati terminali al 5') e sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio o di poliacrilammide (polimeri). Nel gel si osserverà uno smear, una striscia continua e non bande nette in quanto il DNA digerito dall'enzima di restrizione possiederà tantissimi punti di taglio e i diversi frammenti migrano con velocità diverse in base al peso molecolare. Il gel viene immerso in una soluzione alcalina per denaturare il DNA. Il gel viene coperto da un foglio di nitrocellulosa o nylon a carica positiva con sopra una pila di fogli assorbenti. Per capillarità la soluzione tende ad attraversare il gel fino ai fogli assorbenti. I sali trascinano i segmenti di DNA in verticale depositandoli sullo strato di nitrocellulosa in cui instaurano legami elettrostatici (carica negativa dei gruppi fosfato). Il foglio viene separato dal gel e vengono saturate le cariche positive con eterologo (DNA da salmone, processo di preibridazione). Il foglio viene immerso in una soluzione marcata che ibrida con sequenze di DNA complementari identificandole. Il lavaggio della nitrocellulosa elimina sonde non ibridate e si fa una lastra fotografica che mette in evidenza dove la sonda ha legato il DNA genomico.

1.2.3.2 Western blot

Assolutamente analogo al Southern blot ma viene utilizzato per visualizzare le proteine e il passaggio dal gel alla membrana di nitrocellulosa avviene grazie a una corrente elettrica e le proteine sono riconosciute attraverso anticorpi.

1.2.3.3 Northern blot

Assolutamente analogo al Southern blot ma viene utilizzato per visualizzare l'RNA che viene denaturato a 70 gradi e poi raffreddato in un bagno di ghiaccio con una piccola quantità di agente denaturante per mantenerlo privo di strutture secondarie.

1.2.4 Tecniche di manipolazione del DNA

Si intende per tecniche di manipolazione del DNA tecniche che permettono l'inserimento di geni o frammenti di geni all'interno di cellule. Viene normalmente fatto per esprimere o eliminare la produzione di una proteina.

1.2.4.1 Sequenziamento del DNA

Si intende per sequenziamento la determinazione della sequenza genomica per capire la proteina coinvolta in un meccanismo o rimuoverne una è necessario clonare il DNA, identificare le zone promotrici che controllano la trascrizione di un gene e possibili mutazioni che possono avvenire.

1.2.4.2 Clonaggio del DNA

Si intende per clonaggio del DNA un insieme di metodi sperimentali che descrive l'assemblaggio di molecole ricombinanti e una serie di tecniche per ottenere più copie di una sequenza nucleotidica. Dopo averlo clonato si usa cDNA per produrre proteine di interesse di studio.

1.2.4.3 Transfezione

Si intende per transfezione l'introduzione di DNA esogeno in cellule eucariotiche, può essere transiente o stabile a seconda del tempo in cui il DNA transfettato rimane nel citoplasma della cellula obiettivo.

1.2.4.3.1 Vettori di clonaggio I vettori di clonazione sono elementi genetici di DNA che possono essere isolati e che si replicano in maniera autonoma rispetto al cromosoma batterico. Contengono un marcatore selezionabile, un gene che consente la selezione delle cellule che hanno effettivamente inglobato il vettore. Il DNA di interesse può essere clonato nel vettore e replicato in cellule ospiti se è stato ben caratterizzato.

1.2.4.3.2 Plasmidi I plasmidi sono i vettori di clonaggio maggiormente utilizzati, sono piccoli filamenti circolari di DNA a doppio filamento in grado di duplicarsi in maniera indipendente rispetto al genoma batterico che li ospita e in grado di spostarsi tra le cellule influenzando sulla loro variabilità genetica. Il cDNA viene normalmente clonato all'interno dei plasmidi specifici per l'espressione in cellule eucariote. Le componenti principali di un plasmide sono il promotore a monte specifico per la cellula eucariote, il segnale di poliadenilazione a valle, la sequenza che contiene i siti di riconoscimento per le endonucleasi di restrizione e i geni marcatori selezionabili, sequenze necessarie per selezionare le cellule che hanno incorporato il plasmide. La trasduzione può essere transiente (il cDNA non viene integrato nel patrimonio genetico dell'ospite) e stabile (il cDNA si integra). In molti casi non è un aspetto controllabile. La tecnica del CRISPR Cas9 utilizza il gene editing per permettere di modificare il gene endogeno (già presente). Si basa su metodi fisici (elettroporazione, micropipette, microiniezione, biolistica, liposomi) o biologici (virus).

1.2.4.3.3 Elettroporazione Nell'elettroporazione viene applicata una differenza di potenziale per un lasso di tempo per introdurre DNA o RNA nelle cellule. Le condizioni di impulso sono diverse per ogni tipo di cellula. Si formano pori all'interno della membrana che permettono il passaggio e che si richiudono quando la cellula riceve il DNA. È una tecnica utilizzata in vivo.

1.2.4.3.4 Microprecipitati Si combina il DNA con il calcio cloruro e una soluzione di fosfato in modo che si trovi come micro-precipitati contenenti DNA. Questi vengono messi a contatto con le cellule. La grandezza dipende dalla qualità del DNA, dal pH della soluzione. I precipitati devono essere abbastanza piccoli in modo che possano essere endocitati e l'efficienza dipende dalla grandezza. È un metodo economico che permette il trasferimento di grandi quantità di DNA, ma non tutte le cellule vengono trasfettate in maniera efficiente e il calcio fosfato potrebbe distruggere la membrana cellulare.

1.2.4.3.5 Microiniezione Il DNA viene iniettato attraverso un apparato con capillari ultrasottili per bucare la membrana. È ottimo in cellule grandi.

1.2.4.3.6 Biolistics Viene utilizzato in cellule vegetali o organuli in quanto hanno parete spessa. Il DNA viene fissato su particelle d'oro e sparato sulla cellula. La camera di scoppio è un vetrino con microparticelle d'oro su cui viene fissato il DNA.

1.2.4.3.7 Liposomi È il metodo più usato: vescicole formate da lipidi contenenti il DNA si fondono con la membrana rilasciando il DNA presente al loro interno. Viene usata sia per la trasduzione stabile che transiente, ha alta efficienza e bassa tossicità ma presenta alti costi.

1.2.4.3.8 Virus I virus vengono utilizzati come cavalli di Troia contenenti genoma modificato e inseriscono il DNA che si vuole inserire nella cellula. Il DNA da inserire deve essere piccolo. In questo metodo influiscono la qualità del DNA, qualità dei reagenti, vitalità delle cellule, pulizia e strumentazione, livelli di CO₂ e umidità, stabilità e o tossicità della proteina ricombinante in quanto potrebbe diventare tossica per la cellula.

1.2.4.4 Immunoprecipitazione

In questo metodo si usa un anticorpo capace di far precipitare una proteina specifica attraverso TAG sequence o sostanze che vi si legano specificatamente. È un fenomeno in cui in una soluzione sono presenti antigeni e anticorpi diretti contro di essi: si possono formare aggregati multipli che se abbastanza concentrati precipitano dalla soluzione. Svolge un ruolo fondamentale la temperatura e il pH dell'ambiente e l'affinità tra antigene e anticorpo.

1.2.5 Cristallografia a raggi X

Si tratta di una tecnica che permette la visualizzazione della composizione e struttura degli atomi all'interno di un elemento che subisce un processo di cristallizzazione. Attraverso il cristallo viene fatto passare un fascio di raggi X che interagiscono con gli atomi e vanno a colpire una lastra fotografica su cui si evidenziano una serie di ombre che formano una figura che permette la ricostruzione della struttura tridimensionale attraverso diversi calcoli. Utilizzato per determinare la struttura del DNA da Watson e Crick.

1.2.6 Altre che non so????

1.3 Figure importanti e loro lavori

1.3.1 Miescher

Miescher studia a Tubinger i meccanismi per il trasferimento delle informazioni ereditarie. Per la ricerca usa cellule di pus in quanto economiche e facilmente reperibili. Queste cellule erano costituite per lo più da nuclei cellulari e reticolo endoplasmatico. Riesce pertanto a mettere a punto un metodo per estrarre e purificare le cellule senza danneggiarle e nota che riesce a ricavare più materiale durante la fase di divisione cellulare. Purifica infine una sostanza che chiama nucleina, molto acida e ricca in fosfato presente in grande quantità. Successivamente utilizza lo sperma di salmone, ricco di DNA e mitocondri in quanto deve essere veloce e deve trasmettere i geni. Intuisce pertanto che la nucleina debba essere importante durante la divisione cellulare ma non la collega alla trasmissione ereditaria.

1.3.2 Mendel

Mendel è considerato il padre della genetica. Comincia a fare ricerca sui piselli isolando linee pure (caratteristiche che permangono nel tempo) e le incrocia. Nota come alcuni caratteri non si manifestino nella progenie, ma che incrociando questa prima generazione ricompaiono in un rapporto di 3 : 1 e li chiama rispettivamente alleli recessivi e dominanti. I primi compaiono solo se sono presenti entrambi gli alleli recessivi (si studiano attraverso i quadrati di Punnet).

1.3.3 Morgan

Morgan riesce a isolare i cromosomi dalla *Drosophila* utilizzata a causa dei grandi cromosomi. Riesce pertanto a confermare che i geni sono depositati nei cromosomi del nucleo della cellula, che sono organizzati in una lunga riga nei cromosomi e che tratti dipendenti tra di loro dipendono da geni in siti vicini. Determina inoltre il fenomeno del crossover.

1.3.4 Griffith e Avery

Griffith studia lo *streptococcus pneumonia*, un batterio presente in due ceppi uno *S* (smooth) patogeno e mortale per i topi e uno *R* (rough) non patogeno. Dopo aver inattivato il ceppo *S* con il calore e iniettatolo in un topo questo non muore. Se invece al ceppo *S* inattivato si mette a contatto il ceppo *R* vivo e lo si inetta nel topo questo muore. Successivamente Avery conferma che la molecola responsabile del trasferimento genetico orizzontale è il DNA isolando prima le diverse componenti molecolari e poi iniettandole singolarmente.

1.3.5 Hershey e Chase

Hershey e Chase fecero esperimenti con i virus batteriofagi, marcando i fagi con sonde radioattive per osservare dove avviene la trasmissione genica. Marcarono un primo terreno con sonde a fosforo ^{32}P per il DNA e il secondo con zolfo ^{35}S per le proteine. In base a quale elemento viene trasmesso lo si ritroverà nelle generazioni successive. Dopo aver inoculato *escherichia coli* con i batteriofagi li si frullano e si staccano i virus dai batteri per evitare contaminazioni. Notarono come la maggior parte della marcatura era data dal fosforo radioattivo e pertanto il DNA doveva essere il responsabile della trasmissione genetica.

1.3.6 Watson e Crick

Watson e Crick riuscirono a determinare la struttura del DNA attraverso la cristallografia a raggi X e a determinare il dogma centrale della biologia molecolare: l'informazione passa dal DNA all'RNA e arriva alle proteine.

1.3.7 Mello e Fire

Mello e Fire furono in grado di evidenziare l'importanza dell'RNA e del microRNA scoprendo l'interferenza dell'RNA e la proprietà dell'RNA a doppio filamento di interferire e spegnere l'espressione genica. Si dice microRNA un RNA tra i 20 e i 22 nucleotidi a singolo filamento.

1.4 Cellula e genomi

La biologia molecolare è lo studio della cellula e dei suoi componenti in vivo. Si definisce la vita come un sistema chimico auto-sostenibile capace di subire un'evoluzione di tipo Darwiniano. Le cellule e gli organismi sono in grado di adattarsi a una grande varietà di ambienti: i batteri che vivono a temperature elevate come i solfobatteri che utilizzano lo zolfo come elemento per sopravvivere (esprimono TAQ polimerasi) e animali in grado di vivere a temperature molto basse come il pesce ghiaccio, privo di pigmentazione con branchie molto grandi. Il freddo è un problema per quanto riguarda la circolazione e questi pesci sono privi di globuli rossi e hanno adottato un sistema di trasporto dell'ossigeno diverso. I globuli rossi sono ricchi di emoglobina, una molecola costituita da due dimeri di α e β globulina con un gruppo eme. La sua funzione è quella di scambiare CO_2 con O_2 . Le modifiche subite di queste animali sono dovute in quanto i fluidi corporei aumentano la viscosità a basse temperature. I pesci riducono pertanto il numero di globuli rossi e possiedono una serie di cambiamenti che permettono al sangue di rimanere fluido a basse temperature modificando proteine che agiscono da antigelo. Si è assistito anche a modifiche nella sequenza dei microtubuli in quanto negli altri organismi diventano instabili e si polarizzano a temperature inferiori ai 10 gradi cambiando la forma cellulare e eliminando l'adesione alla superficie. La modifica della composizione amminoacidica dei microtubuli li rende più resistenti alle basse temperature. Per facilitare gli scambi i capillari e le branchie si sono ingranditi e non sono presenti scaglie.

1.4.1 Caratteristiche universali delle cellule

1.4.1.1 Dinamicità

È il primo aspetto che determina lo stato della cellula che contiene diversi organelli dinamici. Quelli più trasportati sono i mitocondri, le fabbriche di ATP che si dividono e fondono che tendono a viaggiare molto velocemente attraverso proteine motrici. Il movimento avviene lungo i microtubuli. Esiste il trasporto di vescicole e membrane. La caratteristica principale tra una cellula sana e una morta è pertanto la dinamicità.

1.4.1.2 Informazione

Le cellule contengono informazione sotto forma di DNA (3 miliardi di nucleotidi per gli esseri umani). Si può legare la quantità di informazione con la superiorità dal punto di vista evolutivo. In realtà il concetto di perfezione e quantità di informazione non vanno di pari passo: l'ameba contiene molta più informazione di una cellula umana.

1.4.1.2.1 Densità genica Si intende per densità genica la frequenza di geni codificanti nel genoma di un'individuo. Si nota come questa diminuisce per gli organismi più complessi a causa di sequenze intrageniche o di sequenze intergeniche.

1.4.1.3 Riproduzione

La riproduzione caratterizza la maggior parte delle cellule e permette alle cellule di trasmettere le informazioni contenute all'interno di DNA. Nel momento in cui il DNA si duplica il processo non è perfetto e gli errori stanno alla base delle mutazioni che stanno alla base dell'evoluzione. Il concetto di mutazione non è prettamente negativo in quanto ci sono mutazioni che tendono a migliorare l'efficienza dell'organismo in determinate condizioni.

1.4.1.4 Struttura

Tutte le cellule sono isolate dall'esterno da una membrana cellulare e a volte da una parete. Se per i procarioti non si trovano sottostrutture negli eucarioti sono presenti organelli circondati anch'essi da membrane lipidiche che si differenziano per funzione.

1.4.1.4.1 Membrana La membrana plasmatica è una barriera selettiva che permette alla cellula di concentrare i nutrienti conservando i prodotti delle sintesi ed espellere i materiali di scarto. Le proprietà della membrana sono dovute alla composizione di fosfolipidi, molecole anfipatiche con testa polare e code apolari che in ambiente acquoso tendono a disporsi come un doppio strato creando una barriera.

1.4.1.4.2 Struttura della cellula eucariote Definita da una membrana plasmatica che la isola dall'esterno, contiene un ambiente citoplasmatico in cui si trovano i suoi organelli.

1.4.1.4.2.1 Nucleo Delimitato da due strati di membrane nucleari e da una lamina interna, contiene l'informazione genica della cellula. La membrana nucleare contiene innumerevoli porine, canali che permettono il passaggio di proteine ed RNA da e verso il nucleo. Nel nucleo si può trovare un nucleolo la cui forma e posizione dipende dallo stato del ciclo cellulare, è la zona dove avviene l'assemblaggio e la trascrizione degli rRNA.

1.4.1.4.2.2 Reticolo endoplasmatico In contatto con la membrana nucleare è un sistema di cisterne a membrana che si divide in liscio e rugoso. L'ER liscio è una riserva di ioni calcio mentre quello rugoso possiede dei ribosomi che si occupano della sintesi delle proteine di membrana e quelle secrete.

1.4.1.4.2.3 Apparato di Golgi In continuità funzionale ma non fisica con l'ER si occupa di ricevere le vescicole che gli invia e di modificare le proteine in esse contenute (glicosilazione) per poi inviarle alla destinazione finale.

1.4.1.4.2.4 Mitochondri Possiedono un proprio DNA e apparato di traduzione con pochi geni: molte delle proteine necessarie sono codificate nel nucleo e trasportate successivamente. Producono efficientemente ATP in presenza di ossigeno. Possono dividersi o fondersi tra di loro. Sono circondati da due membrane invaginate in cui avviene sintesi e trasporto di ATP. Nelle cellule vegetali sono affiancati dai cloroplasti per la produzione di glucosio.

1.4.1.4.2.5 Lisosomi Sede della degradazione delle proteine.

1.4.1.4.2.6 Citoscheletro Formato da microtubuli, filamenti di actina e intermedi conferisce motilità alla cellula permettendole di esplorare l'ambiente e dandole al contempo una certa rigidità strutturale.

1.4.1.5 Funzione

Tutte le cellule conservano le loro informazioni come molecole a doppio filamento di DNA, catene polimeriche accoppiate senza ramificazioni formate da quattro monomeri. La catena codifica l'informazione genica. L'ordine di lettura è determinato dalla polarità della catena e i monomeri formano legami specifici con il complementare formando un doppio filamento tenuto insieme da legami a idrogeno. La doppia catena permette la replicazione semi-conservativa e il passaggio dell'informazione nelle cellule figlie. La cellula esprime le informazioni contenute nel DNA producendo da esso RNA e proteine. Durante la trascrizione il DNA viene letto producendo catene singole di RNA che possono assumere strutture secondarie. Processi successivi alla trascrizione aumentano il grado di variabilità. Alcuni mRNA vengono poi tradotti in proteine, catene polimeriche lineari di amminoacidi che assumono complesse strutture spaziali che conferiscono loro la funzione di catalizzatori specifici delle reazioni biochimiche necessarie alla vita della cellula. Le proteine assumono inoltre funzione strutturale e di segnalazione. Si noti come tutte le cellule si possono assimilare a fabbriche biochimiche che impiegano le stesse strutture molecolari di base.

1.4.2 Differenze principali tra le forme di vita

La classificazione delle cose viventi dipende da somiglianze comuni che suggeriscono un antenato comune più recente. L'albero della vita si può dividere in tre rami principali: procarioti, classificati in termini della loro biochimica e necessità nutrizionali, archea ed eucarioti. La differenza principale tra procarioti ed eucarioti è che i secondi contengono un nucleo mentre nei primi il DNA si trova nel citoplasma attaccato alla parete cellulare (non presente negli eucarioti). Gli archea si trovano a metà strada tra eucarioti e procarioti.

1.4.2.1 Mutazioni

L'informazione genica può cambiare a seguito della replicazione o durante la vita nella cellula. Queste mutazioni possono garantirle un vantaggio rispetto alle sue simili, uno svantaggio o non cambiare nulla. Sono queste mutazioni ad aver causato la differenziazione delle forme viventi e la loro proliferazione in ambienti così diversi tra di loro. Non tutti i geni mutano con la stessa frequenza: tipicamente quelli fondamentali alla vita tendono ad essere altamente conservati. Questo in quanto l'ambiente causa alla cellula una pressione selettiva andando ad eliminare rapidamente le mutazioni svantaggiose. Si intende per gene una sequenza, un segmento di DNA che corrisponde a una proteina o a una serie di varianti di trascritti con funzione regolatoria o strutturale. Molte mutazioni possono cambiare il fenotipo dell'organismo. Le mutazioni di geni che mantengono comunque struttura o funzione simile vengono poi raggruppate in famiglie.

1.4.2.1.1 Geni ortologi Supponendo di avere un gene G di un organismo ancestrale sue mutazioni possono dare origine a due geni distinti G_a e G_b nelle due specie diverse che gli succedono.

1.4.2.1.2 Geni paraloghi Si supponga di avere un gene G di un organismo ancestrale: questo può andare incontro a duplicazione e i due possono divergere generando così due geni G_1 e G_2 paraloghi.

1.4.2.1.3 Campo di interesse delle mutazioni Le mutazioni possono essere:

- Geniche: inserzioni, delezioni o cambi puntiformi all'interno di un gene.
- Cromosomiche: riarrangiamenti di cromosomi o perdita di loro parti.
- Genomica: varia il numero di cromosomi.

1.4.2.1.4 Tipologia di mutazioni

- Sinonime o silenti: viene creato un codone diverso ma che codifica per lo stesso amminoacido.
- Di senso errato o missense: viene sostituito un codone che codifica per un altro amminoacido.
- Non senso: si forma un codone di stop che causa la creazione di una proteina trunca.
- Frameshift: delezioni o inserzioni modificano l'ordine di lettura.
- Per sequenze ripetute: cambia il numero di ripetizioni.
- Trasposoni: elementi mobili di DNA, colonizzano i genomi.

1.4.3 Complessità di un organismo

Aumentando la complessità di un organismo diminuisce il numero di geni in relazione con la lunghezza del DNA: diminuisce la densità genica:

$$DG = \frac{1}{\alpha CO}$$

1.4.3.1 Sequenze correlate ai geni

I geni e sequenze loro correlate costituiscono il DNA codificante e non codificante, frammenti di geni ed introni.

1.4.3.1.1 Pseudogeni Gli pseudogeni sono particolari sezioni di DNA codificante che hanno perso la loro attività di essere espresse.

1.4.3.2 DNA intergenico

Si intende per DNA intergenico la parte del genoma non codificante: è formato da sequenze uniche, ripetute e trasponibili o non trasponibile.

1.4.3.2.1 Centromero La regione centromerica è una sequenza intergenica che non codifica per nessun gene.

1.4.3.3 Cromosoma

Si intende per cromosoma una struttura che contiene un pezzo del genoma nucleare complessivo.

1.4.3.3.1 Cariotipo Il cariotipo è l'insieme di tutti i cromosomi di un organismo che contengono l'intero genoma nucleare.

Capitolo 2

DNA e RNA

2.1 Struttura del DNA

Il DNA si trova nel nucleo delle cellule eucarioti e ed ancorato alla membrana delle cellule procarioti. È costituita da due catene polinucleotide disposte antiparallelemente. È pertanto un polimero costituito da nucleotidi.

2.1.1 Componenti

2.1.1.1 Monomeri

2.1.1.1.1 Nucleosidi I nucleosidi sono formati dalla base azotata e uno zucchero legate da un legame β -*N*-glicosidico tra il carbonio anomerico *C*1 del ribosio e *N*9 di purine o *N*1 delle pirimidine. Sono pertanto costituiti da uno zucchero come 2'-deossiribosio.

2.1.1.1.1.1 Orientamento del legame Il legame può essere orientato in:

- *Syn.*
- *Anti*, l'orientamento principale.

2.1.1.1.2 Nucleotidi I nucleotidi sono esteri fosfato dei nucleosidi: il sito di fosforilazione è spesso l'ossidrile al 5' del ribosio. Possono essere mono, di e trifosfati. I gruppi fosfati sono legati tra di loro da legame anidridico stabile e ad alta energia.

2.1.1.1.2.1 Funzioni I nucleotidi hanno funzione di:

- Unità strutturale degli acidi nucleici.
- Mediatore di processi cellulari *cAMP*.
- Deposito di energia delle reazioni di trasferimento di fosfato come *ATP* e *GTP*.
- Parte di coenzimi: come *NADH*, *FAD*, *CoA*.

2.1.1.1.2.2 Gruppo idrossile Il gruppo idrossile in 3'-*OH* è importante per la polimerizzazione.

2.1.1.1.2.3 Base azotata I nucleotidi nel DNA contengono quattro basi diverse:

2.1. STRUTTURA DEL DNA

- Timina, una pirimidina con un unico anello.
- Guanina, una purina con due anelli.
- Citosina, una pirimidina con un unico anello.
- Adenina, una purina con due anelli.

2.1.1.2 Polimerizzazione

La posizione del gruppo idrossile in $3'-OH$ è importante in quanto è il gruppo coinvolto nella creazione di legami fosfodiesterici per la polimerizzazione. Questi legami infatti nascono tra il $3'-OH$ e il gruppo fosfato in $5'$. Si forma pertanto una catena costituita da una successione di nucleotidi in cui variano le basi azotate.

2.1.2 Polarità

Essendo il polimero lineare possiede un inizio e una fine:

- Estremità $5'$ con fosfato libero viene tenuta per convenzione in alto a sinistra.
- Estremità $3'$ con $-OH$ libero in basso a sinistra.

La polarità di questa direzionalità e nella doppia elica si nota un autoparallelismo con due filamenti con polarità opposta.

2.1.3 Interazioni tra basi

Le basi azotate nelle due catene della doppia elica interagiscono tra di loro attraverso legami a idrogeno:

- $A-T$ con due legami a idrogeno.
- $G-C$ con tre legami a idrogeno.

2.1.3.1 Movimento tra basi appaiate

2.1.3.1.1 Twist Nel twist le basi possono roteare l'una sull'altra.

2.1.3.1.2 Roll Nel roll le basi ruotano lungo l'asse maggiore.

2.1.3.1.3 Tilt Nel tilt le basi ruotano lungo l'asse minore.

2.1.3.2 Chargaff

Chargaff osservando DNA proveniente da vari organismi e nota come i residui di A e T e C e G sono in numero uguale a due a due, provando la complementarità tra le basi. Nota inoltre come il rapporto tra le basi non complementari rimane uguale in ogni tessuto di ogni organismo ma è un numero univoco che differisce tra gli organismi. Si nota come organismi che sopravvivono a temperature più elevate possiedono una percentuale maggiore di C e G . Questo avviene in quanto C e G formano un legame a idrogeno in più rispetto ad A e T rendendo la macromolecola più resistente alla denaturazione.

2.1.3.3 Temperatura di melting

La temperatura di melting viene utilizzata per determinare la percentuale di C e G all'interno del DNA in quanto più sono presenti più è difficile denaturarlo. Si usa lo spettrofotometro per osservare una provetta annotando la sua assorbanza che cambia in base allo stato di denaturazione del DNA (a doppia elica assorbe a 260nm). Grazie alla variazione del valore di assorbanza si riesce a determinare la temperatura in cui metà del DNA viene denaturato o temperatura di melting.

2.1.4 Caratteristiche

Il diametro dell'elica è di 2nm e avviene un giro ogni 10 nucleotidi. Si nota un solco maggiore di 22Å e uno minore di 12Å. Questa differenza è dovuta ai diversi angoli tra i due legami glicosidici. L'angolo meno ampio genera il solco minore. Il solco maggiore fornisce più informazioni di tipo chimico in quanto contiene più gruppi donatori ed accettori di protoni.

2.1.4.1 Lettura del codice genetico

La lettura del codice genetico da parte delle proteine si basa pertanto su:

- Accettore di legame HB (A).
- Gruppo Metilico (M).
- Donatore di legame HB (D).
- Idrogeno non polare (H).

Queste proprietà permettono alle proteine di riconoscere senza ambiguità specifiche sequenze di DNA senza che sia necessario leggere la doppia elica.

2.1.5 Tipologie di strutture

2.1.5.1 Struttura primaria

Si intende per struttura primaria la sequenza di nucleotidi che costituiscono la molecola.

2.1.5.2 Struttura secondaria

Si intende per struttura secondaria la configurazione tridimensionale stabile di una molecola di DNA. La molecola di DNA è formata da 2 catene di nucleotidi appaiate secondo la regola della complementarità. L'elica è destrorsa con due catene antiparallele. Le basi si trovano all'interno dell'elica allineate ad angolo retto.

2.1.5.2.1 Impalamento delle basi La disposizione delle basi all'interno della doppia elica è generalmente favorita. Molecole contenenti anelli aromatici tendono a disporsi impilate spontaneamente in quanto idrofobiche. Le basi si impilano disponendosi parallelamente riducendo in questo modo il contatto con l'acqua e stabilizzando la struttura.

2.1.5.3 Basi di Hoogsteen

Le basi di Hoogsteen si formano tra basi non complanari con rotazione dell'anello pirimidinico e meno stabili.

2.1.5.4 Conformazioni particolari

2.1.5.4.1 Forma A La forma *A* si forma a causa della riduzione della quantità d'acqua, presenta una struttura tarchiata con 11 basi per giro e una scanalatura principale più profonda.

2.1.5.4.2 Forma B La forma *B* è la forma canonica cristallizzata da Franklin con 10 paia di basi per giro.

2.1.5.4.3 Forma Z La forma *Z* si forma in zone particolari ricche di *C* e *G* con 12 paia di basi per giro. La scanalatura principale è poco profonda e questo rende le basi più prone alla metilazione e pertanto presente nelle zone promotrici dei geni.

2.1.5.4.4 Tripla elica Il DNA può assumere strutture a tripla elica che si formano dove esiste una sequenza particolare. Queste strutture influiscono sul processo di duplicazione e trascrizione del DNA e molto spesso rendono il DNA ancora più stabile e la capacità delle due catene di separarsi è compromessa, impedendo l'arrivo dei fattori necessari ai processi. È ricca di A e T ed è resa possibile dalle interazioni di Hogsteen.

2.1.5.4.5 Struttura cruciforme La struttura cruciforme, a stem loop o a forcina si forma dove si trovano sequenze palindromiche. È caratteristica sia di DNA ed RNA dove sono presenti sequenze ripetute seguite da una sequenza invertita. Possono essere deleterie per i processi di duplicazione e trascrizione in quanto conferiscono alla catena un'elevata stabilità impedendo la separazione delle due catene.

2.1.5.4.6 Struttura a forcina La struttura a forcina o hairpin è costituita da ripiegamenti a doppia elica con basi accoppiate e zone a loop dove non si trova complementarità.

2.1.5.4.7 DNA curvo Coppie di vasi adiacenti non perfettamente parallele portano a piccoli ripiegamenti. Se le perturbazioni sono casuali la struttura è irregolare ma dritta: le coppie diverse hanno un angolo opposto che si bilancia. Se le perturbazioni sono regolari gli angoli si sommano portando a una curvatura del DNA.

2.1.6 Stabilizzazione della doppia elica

La doppia elica è stabilizzata da interazioni non covalenti:

- Forze di Van der Waals: interazioni additive di impacchettamento tra le basi impilate.
- Legami idrogeno: interazioni tra le basi azotate appaiate di filamenti opposti.
- Effetti idrofobici: l'elusione di molecole di acqua dalle coppie rafforza i legami a idrogeno.
- Interazioni carica-carica: la repulsione elettrostatica tra le cariche negative dei gruppi fosfato è schermata da interazioni con ioni Mg^{2+} e da proteine ricche di residui basici come lisina e arginina.

2.1.7 Sintesi

La sintesi del DNA avviene attraverso la formazione del legame fosfodiesterico. La formazione di questo legame libera una molecola di acqua. Il backbone è formato da residui di zucchero e fosfato alternati. La posizione 3' viene legata alla 5' attraverso un gruppo fosfato. Le basi azotate sporgono al di fuori del backbone. I gruppi fosfato conferiscono una carica negativa al backbone. L'ordine delle basi lungo la catena è casuale.

2.1.8 DNA superavvolto o struttura terziaria

Il DNA tende a formare dei superavvolgimenti, ovvero ad assumere strutture spaziali particolari che pongono stress sulla doppia elica. I superavvolgimenti vengono descritti in termini matematici e lo studio dello stato di avvolgimento del DNA è di interesse in quanto va a influire sui meccanismi di trascrizione e replicazione. Lo stato di superavvolgimento si descrive attraverso due parametri: twist (frequenza) che indica quante volte un filamento si avvolge sull'altro e il writhe, il numero di superavvolgimenti che si vengono a formare. Un DNA lineare presenta un writhe pari a 0 e un twist n dipendente dalla sua lunghezza. Le misure di twist e writhe vengono combinate nel linking number, dove $Lk = Tw + Wr$. Il writhe può assumere un valore positivo o negativo a seconda che il superavvolgimento sia rispettivamente destrorso o sinistrorso. Il linking number tende a rimanere costante e pertanto variazioni di uno dei due parametri portano ad un bilanciamento nell'altro. Molti meccanismi (come replicazione e trascrizione) vanno a modificare il twist del DNA andando pertanto ad introdurre writhe e a stressare la molecola che tenderà a superavvolgersi per tornare ad una struttura stabile ottimale. Un aumento incontrollato del writhe rende sempre più difficoltoso il procedere di questi meccanismi che pertanto richiederanno l'aiuto di enzimi che diminuiscono i superavvolgimenti in modo da poter continuare.

2.1.8.1 Topoisomerasi

Le topoisomerasi sono proteine che intervengono per risolvere i super avvolgimenti introdotti dalle variazioni di twist rilassando la molecola. Si trovano due famiglie di topoisomerasi: la famiglia di tipo I presente in batteri, eucarioti ed archei e la famiglia di tipo II presente solo negli eucarioti. Le due famiglie differiscono per come agiscono sul DNA.

2.1.8.1.1 Topoisomerasi di tipo I Le topoisomerasi di tipo I non richiedono ATP per funzionare, possiedono un dominio di interazione con il DNA formato da α -eliche a pinze che si lega nel punto dove si trova il superavvolgimento. Uno dei due filamenti viene tagliato e viene favorito il suo passaggio da un'estremità all'altra in quanto la molecola così riduce il proprio stress. Alla fine la topoisomerasi riunisce il filamento e si stacca dal DNA. Il linking number varia di 1. Il funzionamento di queste proteine è dovuto alla presenza di una tirosina con un gruppo OH altamente reattivo che rompe il legame fosfodiesterico in un primo momento e viene poi riutilizzato per riformarlo. Molti farmaci come la camptotecina impediscono la riformazione del legame fosfodiesterico rendendo permanente il taglio. Viene utilizzata come antitumorale in quanto le cellule tumorali hanno elevati livelli di telomerasi. Questo farmaco ha effetto anche su cellule con elevato tasso di mitosi.

2.1.8.1.2 Topoisomerasi di tipo II Le topoisomerasi di tipo II rompono il doppio filamento. Sono dei dimeri con tre cancelli: N , C e uno per l'ingresso del DNA. Una volta che il doppio filamento viene tagliato un altro viene alloggiato nel cancello N che si chiude. L'idrolisi dell'ATP causa un cambio conformazionale che fa passare il filamento dal cancello N al C che lo rilascia una volta che il DNA viene risaldato. Il linking number varia di 2.

2.1.8.2 Compattazione della struttura del DNA

Mediante il DNA si trova in uno stato di supercoiling negativo. Una funzione del superavvolgimento è la compattazione della struttura del DNA. La torsione negativa favorisce la separazione delle catene e l'azione della polimerasi, mentre la positiva la impedisce. Si deve pertanto fare un compromesso tra la stabilità della doppia elica e la sua permissività delle proteine che agiscono su essa. Nel DNA dei cromosomi eucarioti la compattazione è ottenuta con un superavvolgimento di tipo solenoidale intorno alle proteine istoniche.

2.2 Struttura del RNA

L'RNA è una macromolecola con diverse funzioni: se ne classificano pertanto diversi tipi in base alla funzione.

2.2.1 Funzioni del RNA

- RNA messaggeri (mRNA): utilizzati come intermedi per la produzione delle proteine a partire dalle informazioni contenute nel DNA.
- RNA ribosomial (rRNA): fanno parte del ribosoma e vengono utilizzati per la produzione di proteine.
- RNA di trasporto (tRNA): si occupano di trasportare gli amminoacidi necessari alla sintesi di proteine.
- Micro RNA (miRNA), short interfering RNA (siRNA) e piwi-interacting RNA (piRNA): hanno funzione regolatoria.
- Piccoli RNA nucleari (snRNA): modificano tipicamente i nucleotidi e altri RNA.
- Long non coding RNA: ruolo regolatorio.

2.2.2 Struttura

L'RNA è un polimero a catena singola formato da nucleotidi. Presenta lo zucchero ribosio con in posizione 3' un gruppo fosfato su cui avviene il legame fosfodiesterico in 5' con il nucleotide successivo. La base è collegata in 1'. Il gruppo fosfato conferisce una carica negativa alla catena mentre il gruppo idrossile in 2' causa un ingombro sterico che gli fa assumere una forma A con un solco maggiore molto profondo. Le basi sono 4: due pirimidine citosina e uracile e due purine adenina e guanina.

2.2.3 Strutture secondarie

Pur essendo tipicamente a catena singola può assumere strutture secondarie particolari grazie alle interazioni tra le basi.

- A doppia elica.
- Ansa o forcina: con stelo doppia elica e un loop in testa.

Queste strutture oltre a fornire ulteriore stabilità alla molecola impedendo la rottura del legame fosfodiesterico e le permettono di essere riconosciuta da proteine importanti per la sua funzione.

2.2.4 Modifiche dell'RNA

L'RNA può andare incontro a diverse modifiche che permettono una regolazione della sua attività.

- Inosina, pseudouridina e tiouridina: basi azotate che vanno a sostituirsi alla guanina.
- Metilazione della guanina: viene formata la 7-metil guanina, avviene nel primo nucleotide di tutti gli mRNA e viene riconosciuta dalla cap-binding protein che aiuta il processo di traduzione.

2.3 Organizzazione del DNA nel nucleo

Le molecole di DNA dei vari cromosomi di una cellula sono troppo lunghe per essere contenute nel nucleo. Devono pertanto essere compattate, sia negli eucarioti che nei procarioti in modo da poter riuscire ad entrare nel nucleo. Questo compattamento va ad influenzare la capacità della sequenza di essere letta dalle proteine coinvolte in trascrizione e replicazione e deve pertanto essere necessariamente dinamica.

2.3.1 Procarioti

I procarioti contengono un cromosoma di forma circolare nel nucleotide, una regione della cellula non isolata da membrana. Il DNA è ancorato ad un punto della membrana detto mesosoma, associato a proteine che formano sotto-domini che rendono indipendenti le anse. Le proteine sono *HU*, *IHF*, *H1*, *P*.

2.3.2 Eucarioti

Negli eucarioti i cromosomi sono lineari e si trovano nel nucleo, un organello deputato alla protezione del materiale genetico. Le proteine che legano e organizzano il DNA negli eucarioti sono degli analoghi di quelle nei procarioti e sono chiamate istoni.

2.3.3 Cromatina

La cromatina è la struttura che compone i cromosomi e determina la forma che assumono durante l'interfase. È formata da nucleosomi uniti tra di loro da DNA linker lungo fino a 80 nucleotidi che conferisce al cromosoma una struttura a collana di perle. La collana di perle dei nucleosomi può essere successivamente compattata in una struttura a solenoide o a zig-zag.

2.3.3.1 Tipologie di cromatina

La cromatina si distingue in due tipologie in base al grado di impacchettamento del DNA. Queste si osservano attraverso microscopio elettronico: il DNA si presenta come zone chiare e più scure, dove l'intensità del colore è lineare con il grado di compattamento.

2.3.3.1.1 Eucromatina L'eucromatina è una forma di cromatina rilassata e si presenta chiara al microscopio elettronico. Si trova in stato eucromatico la porzione di DNA che è in stato attivo di trascrizione.

2.3.3.1.2 Eterocromatina L'eterocromatina è una forma di cromatina altamente compattata e si presenta scura al microscopio elettronico. Si trova in stato eterocromatico la porzione di DNA non attivamente trascritta. Si trova tipicamente nella periferia del nucleo ed è divisa in:

- **Costitutiva:** è sempre compatta, l'informazione genetica al suo interno non viene mai espressa e la regione di DNA assume una funzione strutturale.
- **Facoltativa:** è una regione di DNA che può essere decompattata e in determinate condizioni può avere proprietà codificanti.

2.3.3.1.3 Nucleolo Il nucleolo è una parte del nucleo molto densa e attiva in cui vengono sintetizzati gli rRNA.

2.3.3.2 Nucleosomi

Il primo livello di impacchettamento del DNA sono i nucleosomi. Sono formati da un ottamero istonico a cui si avvolgono 127 basi di DNA con due giri e mezzo. Le proteine che formano un nucleosoma si distinguono in due categorie.

2.3.3.2.1 Non core proteins Le non core proteins sono l'istone *H1*, che si occupa di collegare tra di loro diversi nucleosomi aumentando il grado di impacchettamento. Si posiziona pertanto sul DNA nucleosomico e lo piega avvicinando tra di loro i nucleosomi. Si nota come questa è la proteina istonica meno conservata.

2.3.3.2.2 Core proteins Le core proteins formano il nucleo di un nucleosoma e sono cariche positivamente in modo da attirare la carica negativa dello scheletro a deossiribosio-fosfato del DNA. Non sono proteine grandi con conservati 3 domini ad α -elica e una coda *N*-terminale.

- *H2A*.
- *H2B*.
- *H3*.
- *H4*.

2.3.3.2.2.1 Legame con il DNA Le proteine del core istonico sono formate da residui di arginina o lisina, che le conferiscono una carica positiva che neutralizza il backbone del DNA. In questo modo il loro legame con il DNA non dipende dalla specifica sequenza ma dalla presenza del backbone. Gli istoni legano tipiche regioni del DNA. Il contatto tra tetramero e DNA avviene nel solco minore e le interazioni tramite legami a idrogeno tra proteina ed ossigeno del legame fosfodiesterico. Il grande numero di legami a idrogeno fornisce l'energia necessaria alla curvatura del DNA.

2.3.3.2.2.2 Struttura Gli istoni sono proteine eterogenee che variano da tessuto a tessuto. Sono proteine piccole con un motivo strutturale comune detto ripiegamento istonico formato da 3 α -eliche connesse da due anse.

2.3.3.2.2.3 Sintesi Gli istoni vengono sintetizzati durante la fase *S* del ciclo cellulare e vengono inseriti nella cromatina attraverso lo scambio degli istoni. Questo processo viene catalizzato da complessi di rimodellamento della cromatina.

2.3.3.2.2.4 Assemblaggio degli istoni I ripiegamenti istonici si legano tra di loro formando dimeri $H3-H4$ e $H2A-H2B$. Due dimeri $H3-H4$ si legano tra di loro formando un tetramero che recluta a sua volta due dimeri $H2A-H2B$ per formare il core proteico del nucleosoma. All'ottamero si avvolge il DNA. Il processo è spontaneo. Le code N -terminali stabilizzano il complesso avvolgendosi intorno all'ottamero proteico.

2.3.3.2.2.5 Code istoniche Le code istoniche subiscono modifiche post-traduzionali in modo da modificare il grado di impacchettamento della cromatina. Le diverse modifiche creano un codice che viene letto e recluta altre proteine che influenzano lo stato cromatinico. Ogni coda è rivolta verso l'esterno del nucleosoma.

2.3.3.2.2.6 Ereditarietà Durante la replicazione l'ottamero si dissocia: un dimero $H3-H4$ rimane legato al DNA, mentre $H2A-H2B$ tornano a far parte del pool di dimeri libero nella cellula. Il pool contiene pertanto un mix di dimeri di nuova sintesi e di quelli dissociati dal DNA, che vengono casualmente ripartiti nei due filamenti.

2.3.3.2.2.7 Dinamicità Il DNA in un nucleosoma isolato si svolge 4 volte al secondo rimanendo esposto in modo da essere disponibile per il legame con altre proteine. Ulteriori allentamenti possono essere ottenuti attraverso i complessi di rimodellamento della cromatina.

2.3.3.3 Ulteriori livelli di impacchettamento

I nucleosomi sono disposti a zig-zag nel filo di perle a causa dell'istone $H1$ che crea angolature definite con le quali il DNA entra in contatto col nucleo istonico. Stabilizza inoltre la fibra cromatinica formata dalle modifiche delle code istoniche. Proteine chaperones aiutano il processo.

2.3.3.3.1 Gradi di impacchettamento

- DNA a doppia elica: 2nm.
- Fibra di cromatina ripiegata in anse: 700nm.
- Perline su fili: 11nm.
- Cromosoma mitotico intero: 1400nm.
- Zig-zag o solenoide: 30nm.

2.3.3.3.2 Anse radiali Le anse radiali impediscono la formazione di una tensione che permetterebbe il superavvolgimento del DNA. Sono bloccate alla base da una struttura proteica detta scaffold nucleare.

2.3.3.4 Collegamenti tra nucleosomi

I collegamenti nucleosoma-nucleosoma sono formati dalle code istoniche, principalmente da $H4-H1$.

2.3.3.5 Effetto di posizione

L'eterocromatina tende ad espandersi autonomamente venendo trasmessa nelle regioni adiacenti. Questo causerebbe il silenziamento di geni normalmente attivi e deve pertanto essere controllato. Barriere proteiche impediscono la diffusione incontrollata della cromatina. Si nota come una situazione eterocromatica viene ereditata stabilmente dalla progenie della cellula.

2.3.3.6 Effetto della compattazione

La compattazione del DNA è importante in:

- Replicazione.
- Trascrizione.
- Segregazione dei cromosomi.
- Ricombinazione.
- Riparazione.

2.3.4 Regolazione della struttura cromatinica

L'interazione del DNA con l'ottamero istonico è dinamica: le interazioni deboli con gli istoni possono spezzarsi nei momenti di necessità. La stabilità dell'interazione è influenzata da grossi complessi nucleici detti complessi di rimodellamento della cromatina.

2.3.4.1 Complessi di rimodellamento della cromatina

I complessi di rimodellamento della cromatina sono complessi proteici dipendenti da *ATP*. Possiedono una subunità che si lega al nucleo proteico del nucleosoma sia al DNA interno. Idrolizzano *ATP* causando un cambio conformazionale del nucleosoma liberando il DNA. Rendono pertanto dinamico lo stato cromatinico della cellula permettendole di rispondere a diversi eventi.

2.3.4.1.1 Attività

- Rimozione dei nucleosomi.
- Scorrimento dei nucleosomi.
- Scambio di istoni.

2.3.4.1.2 Facilitates chromatine transcription *FACT* è una proteina che destabilizza gli istoni, lavorano a monte della RNA polimerasi e rimuovono i dimeri *H2A-H2B*.

2.3.4.1.3 Chaperonine Le chaperonine sono proteine in grado di piegare le strutture delle altre proteine in modo da renderle più funzionali.

2.3.4.1.4 Subunità di idrolisi La subunità di idrolisi di *ATP* di questi complessi è correlata alle DNA elicasi e si lega sia al nucleo proteico che al DNA. Utilizza l'energia per spostare il DNA rispetto agli istoni allentando il legame.

2.3.4.2 Modifiche covalenti degli istoni

Le catene laterali degli amminoacidi degli istoni sono soggette a diverse modifiche che avvengono sulle code *N*-terminali. Sono create da enzimi specifici.

2.3.4.2.1 Gruppi acetile I gruppi acetile sono aggiunti da una serie di istone acetil transferasi *HAT* e rimossi da complessi di istone deacetilasi *DACH*. L'acetilazione di lisine tende ad allentare la struttura della cromatina rimuovendo la carica positiva degli istoni.

2.3.4.2.2 Gruppi metile La lisina può essere mono-, di- o tri-metilata. Ognuna di queste modifiche può avere un significato diverso per la cellula.

2.3.4.3 Varianti istoniche

La cellula può contenere varianti di istoni che vengono assemblate nei nucleosomi. Sono sintetizzate durante l'interfase e inserite in cromatine già formate attraverso cambio istonico. Questo processo è altamente specifico.

- *H2A.Z*: nel lievito limita l'espansione dell'eterocromatina, mentre nei mammiferi e in *Drosophila* promuove il silenziamento genico.
- *H2A.X*: è coinvolto nella riparazione del DNA, nella forma fosforilata appare nei nucleosomi fiancheggiando le rotture a doppio filamento.
- *macroH2A*: arricchito nei corpi di Barr e coinvolto nell'attivazione del cromosoma X.
- *H2ABbd*: riduce la componente acidica.

2.3.4.4 Sequenze barriera

Una sequenza *HS4* separa il dominio di cromatina attiva della β -globina da una regione adiacente di cromatina condensata. Viene aggiunta spesso alle estremità di un gene inserito per proteggerlo dal silenziamento dovuto a diffusione di eterocromatina.

2.3.5 Epigenetica

Si intende per epigenetica le informazioni esterne al DNA che vengono aggiunte tramite legame con gruppi senza variare la sequenza nucleotidica della cellula e che possono essere ereditate.

2.3.5.1 Modifiche delle code istoniche

Le modifiche a livello delle code istoniche vengono riconosciute da domini delle proteine.

- Bromodominio: riconosce acetilazione.
- Cromodominio: riconosce metilazione

Le proteine possono contenere diverse combinazioni dei vari domini.

2.3.5.2 Effetti delle modifiche delle code istoniche

Le modifiche post-trascrizionali influenzano l'accessibilità della cromatina e creano pertanto un codice epigenetico che viene letto dai complessi di rimodellamento della cromatina.

2.3.5.2.1 Code metilate La metilazione delle code causa uno spegnimento dell'espressione della regione interessata in quanto complessi di rimodellamento si legano sulle posizioni metilate compattando ulteriormente la struttura del cromosoma.

2.3.5.2.2 Code acetilate L'acetilazione delle code causa un'attivazione dell'espressione della regione interessata in quanto complessi di rimodellamento si legano sulle posizioni rilassando il nucleosoma.

2.3.6 Cromatina dei centromeri

I centromeri sono costituiti da cromatina costitutiva che permane per tutta l'interfase e contiene una variante di *H3 CENP-A* (centromere protein-A). Altre proteine compattano i nucleosomi in disposizioni dense e formano il cinetocore.

2.3.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Più di una dozzina di proteine diverse si assemblano sul centromero. Si forma il nucleosoma centromero-specifico formato da *CENP-A-H2A-H2B-H4*. Le proteine aggiuntive lo attaccano a un microtubulo del fuso mitotico e le sequenze *CDE-1,2,3* permettono il riconoscimento delle proteine necessarie: *Cse4p*, *CBF3*, *Ctf19*, *Mem21*, *Okp1*. Mutazioni delle sequenze portano a segregazioni errate.

2.3.6.2 Umano

I centromeri degli organismi complessi sono definiti da un complesso di proteine e non da una sequenza specifica di DNA. Sono comunque presenti brevi ripetizioni DNA satellite α non sufficienti per la formazione del centromero.

2.3.6.3 Formazione del centromero

La formazione di un nuovo centromero richiede un evento di semina che comporta la formazione di una struttura DNA-proteina contenente i nucleosomi specifici. I tetrameri *H3-H4* sono ereditati direttamente dalle eliche di DNA figlie a livello della forcella. L'intero centromero si forma in maniera binaria, suggerendo un'aggiunta altamente cooperativa di proteine dopo un evento iniziale.

2.3.6.4 Proteine centromeriche

2.3.6.4.1 *CENP-A* *CENP-A* è in grado di assemblare in vitro le particelle nucleoproteine in assenza di *H3*.

2.3.6.4.2 *Cse4* *Cse4* in *S. cerevisiae* è presente nel nucleosoma che forma il centromero puntiforme.

2.3.6.4.3 *HCP3* *HCP3* è presente in *C. elegans* lungo il cromosoma.

2.3.6.4.4 *Cid* *Cid* è presente in *Drosophila melanogaster*.

2.3.6.4.5 *CEN-H3* *CEN-H3* svolge un ruolo da impalcatura per l'assemblaggio corretto del cinetocore nella parte esterna del DNA centromerico oltre che per l'appaiamento dei due cromatidi fratelli nella regione centromerica.

2.3.6.4.6 *CENP-B* *CENP-B* localizza su centromeri umani e murini attraverso alle regioni α -satellite. Organizza il DNA satellite centromerico facendogli assumere una configurazione più stabile.

2.3.6.4.7 *CENP-C* *CENP-C* connette la cromatina centromerica e il cinetocore ed è pertanto essenziale per la segregazione.

2.3.6.4.8 CENP-H *CENP-H* è un chaperone per la corretta associazione di *CENP-A* con la regione centromerica.

2.3.7 Sindrome di Rett

2.3.7.1 Caratteristiche cliniche

Le persone affette da sindrome di Rett presentano, dopo un periodo di apparente sviluppo normale:

- Ridotte capacità motorie.
- Riduzione della grandezza del cervello.
- Ritardi nello sviluppo.

2.3.7.2 Motivazioni biologiche

La malattia è dovuta a una mutazione a carico di *MeCP2*, un repressore della trascrizione genica in regioni del DNA metilata. La mancata metilazione del gene per *NGF* nerve growth factor impedisce la differenziazione dei neuroni e una loro corretta morfologia: non formano sinapsi e dendriti in numero sufficiente.

2.4 Modifiche post-traduzionali

Le modifiche post-traduzionali è un meccanismo di regolazione rapido che produce modifiche reversibili o irreversibili, fisiologiche o patologiche. Sono modifiche che avvengono sulle proteine e ne modificano l'attività e funzione, localizzazione, inibire o aumentarne l'attività o il turnover. Le proteine vengono degradate con il tempo più o meno velocemente. Le modifiche avvengono sia nel citoplasma che nel nucleo.

2.4.1 Fosforilazione

La fosforilazione è l'aggiunta di un gruppo fosfato da enzimi detti chinasi che trasferiscono un gruppo fosfato da *ATP* a residui di serina, treonina e tirosina. È una modifica reversibile. L'enzima che toglie il gruppo fosfato è detto fosfatasi e sono meno specifici. Può determinare cambiamenti strutturali profondi ed è determinante in quasi tutte le vie di trasduzione di segnali, permettendo il riconoscimento tra proteine.

2.4.2 Acetilazione

L'acetilazione consiste nell'aggiunta di un gruppo acetilico attraverso acetiltransferasi che viene rimosso da deacetilasi. Il donatore del gruppo acetile è l'*acetil-CoA*. Si formano pertanto legami covalenti con residui di lisina o N-terminali. L'acetilazione intramolecolare permette la creazione di modifiche epigenetiche ereditabili a livello degli istoni.

2.4.3 Metilazione

La metilazione consiste nell'aggiunta di un gruppo metilico attraverso metiltransferasi. La *S-adenosilmetionina SAM* è il donatore di gruppi metilici. Avviene tipicamente a carico di una lisina. L'aggiunta di metile determina un aumento dell'idrofobicità. Il bersaglio molecolare sono gli istoni. La rimozione del gruppo metile o demetilazione avviene da parte di una demetilasi.

2.4.4 Glicosilazione

La glicosilazione è una modifica post-traduzionale che avviene sia durante la traduzione che successivamente. Ha un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria, nella localizzazione intracellulare, nella stabilità e nella struttura

2.4.4.1 N-glicosilazione

La *N*-glicosilazione consiste nell'aggiunta dello zucchero ad un atomo di *N* dell'asparagina.

2.4.4.2 O-glicosilazione

La *O*-glicosilazione consiste dell'aggiunta dello zucchero a un atomo di ossigeno a serina, treonina, prolina e lisina.

2.4.5 Ubiquitinazione

L'ubiquitinazione consiste nell'aggiunta di ubiquitina, una piccola proteina conservata negli eucarioti. La modifica è irreversibile e etichetta le proteine da degradare. Le proteine che non sono in grado di essere ubiquitinate sono degradate attraverso degradazione del loro mRNA. Avviene unicamente su molecole contenenti lisina circondata da una sequenza consenso specifica.

2.4.5.1 Proteosoma

Il proteosoma è un complesso proteico di grandi dimensioni 26S formato da un core, 2 cap e 2 lid. Degrada le proteine ubiquitinate. Le proteine del lid legano i substrati da distruggere. Le prtoeine del cap le svolgono e nel core vengono degradate. Tutta l'operazione richiede *ATP*. L'isoeptidasi *Ppn11* rimuove la coda di poliubiquitina.

2.4.5.2 Poliubiquitina

Una sola molecola di ubiquitina non è sufficiente per indirizzare le proteine al proteosoma, ne vengono pertanto aggiunge a catena più di 4.

2.4.6 Sumoilazione

Meccanismo analogo e simile all'ubiquitina. Regola le funzioni della proteina, il suo attacco richiede *ATP* ma il processo è reversibile. Intuisce su:

- Traffico nucleare.
- Stabilità genomica.
- Espressione genica.
- Integrità cromosomica.

2.4.6.1 Sumoilazione bilanciata

Una sumoilazione bilanciata porta a funzioni cellulari normali.

2.4.6.2 Sumoilazione deregolata

Una sumoilazione deregolata porta a tumori, malattie neurodegenerative, diabete, infezioni virali e difetti nello sviluppo.

2.5 Metabolismo del ferro

Lo ione ferro è in grado di reagire con l'ossigeno e creare radicali liberi che possono danneggiare la molecola di DNA. Si rende pertanto necessario regolare il livello del ferro.

2.5.1 Introduzione del ferro nella cellula

Il ferro viene introdotto nella cellula grazie a recettori transferrina presenti sulla membrana citoplasmatica della cellula, che lo legano quando presente nel torrente circolatorio. Dopo il legame il complesso ha un pH neutro 7.4 che causa la sua internalizzazione. Si forma così una vescicola endocitotica. Questa matura in un endosoma che si acidifica permettendo il distacco dello ione dalla transferrina. La transferrina torna in membrana.

2.5.1.1 Il ferro nella cellula

Il ferro nella cellula viene utilizzato come co-attivatore di enzimi. Il ferro in eccesso che si trova nella cellula viene disattivato dalla ferritina. Questa proteina lo lega impedendo che venga coinvolto in reazioni dannose per la cellula.

2.5.2 Meccanismo di regolazione

Si nota pertanto come per regolare i livelli di ferro si devono modulare le concentrazioni di transferrina e di ferritina. Questo avviene a livello post-trascrizionale.

2.5.2.1 Aconitasi

L'aconitasi è una proteina che lega RNA e funge da sensore per il ferro, fa parte della famiglia delle *IRP* (iron regulatory proteins). Si lega a strutture a forcina che si forma nella 5'-*UTR* del RNA per la ferritina e 3'-*UTR* del RNA per la transferrina.

2.5.2.2 Carenza di ferro

In carenza di ferro la cellula deve aumentare i livelli di transferrina e diminuire quelli di ferritina. L'aconitasi, non legata al ferro si lega alla struttura a forcina degli mRNA o *IRE* (iron responsive elements):

- Transferrina: stabilizza il suo RNA impedendone la sua degradazione.
- Ferritina: impedisce il legame dei ribosomi con il mRNA.

2.5.2.3 Eccesso di ferro

In eccesso di ferro la cellula deve diminuire i livelli di transferrina ed aumentare quelli di ferritina. L'aconitasi legata al ferro si dissocia dagli *IRE* degli mRNA di:

- Transferrina: destabilizza il mRNA causandone la degradazione.
- Ferritina: permette ai ribosomi di tradurre il mRNA.

2.5.3 Metodo di osservazione

Per osservare il processo si ingegnerizza il gene della ferritina in modo che esprima una proteina reporter *GFP*. In questo modo quando il ferro non è presente l'aconitasi si lega al RNA e blocca la traduzione impedendo alla cellula di esprimere *GFP*. Quando invece è presente avviene la traduzione e la cellula esprime *GFP*, che essendo fluorescente è facilmente osservabile.

Capitolo 3

Replicazione e riparazione del DNA

3.1 Modello di replicazione

La duplicazione delle cellule richiede la duplicazione del DNA, in modo che entrambe le cellule figlie possano ricevere una copia uguale del materiale genetico. La natura a doppia elica delle molecole di DNA permette la creazione di tre ipotesi riguardo il modello di replicazione.

- Replicazione dispersiva: la molecola di DNA dopo la replicazione è un mosaico di parti di nuova sintesi e parti di origine parentale.
- Replicazione conservativa: la catena parentale si duplica in due catene in modo che in una rimangano entrambi i filamenti parentali mentre nell'altra ci siano solo filamenti di nuova sintesi.
- Replicazione semiconservativa: la molecola di DNA dopo la replicazione è formata da un filamento di nuova sintesi e uno di origine parentale.

3.1.1 Esperimento Meselson-Stahl

L'esperimento Meselson-Stahl si propone di determinare il modello di replicazione. Viene compiuto su batteri con l'utilizzo di 2 isotopi radioattivi dell'azoto ^{15}N ^{14}N . L'isotopo dell'azoto viene incorporato dai batteri nelle molecole di DNA durante la loro crescita. Il peso diverso dei due isotopi permette di distinguere le molecole di DNA che ne contengono diversi.

3.1.1.1 Processo

Si fa crescere una generazione di batteri in coltura in presenza di ^{15}N . Questi presentano pertanto una doppia elica pesante. La prima generazione viene trasferita in condizioni normali: ^{14}N . Si compie un ulteriore ciclo di replicazione in ^{14}N . Da questa si estraggono le molecole di DNA e le si separa secondo gradiente.

3.1.1.2 Risultati

Si nota come nella seconda generazione si trovano molecole di DNA ibride, mentre in quella successiva da 2 molecole ibride se ne ottengono 2 leggere e 2 ibride. Questo esperimento determina che il modello di replicazione è semiconservativo.

3.2 Panoramica

3.2.1 Reazione di polimerizzazione

La replicazione del DNA richiede la polimerizzazione di nuove catene. La polimerizzazione avviene attraverso l'aggiunta di un deossiribonucleotide $3P$ all'estremità $3'$ di una catena polinucleotidica detta filamento primer. Si nota come il filamento può pertanto polimerizzare unicamente in direzione $5'-3'$. Questo processo viene guidato dall'accoppiamento tra le basi e un deossiribonucleotide trifosfato. Il legame causa il rilascio di pirofosfato.

3.2.1.1 Substrati

3.2.1.1.1 Deossiribonucleotidi trifosfato Quattro deossiribonucleotidi trifosfato $dNTP$ possiedono tre gruppi fosforici α , β e γ attaccati al 2'-deossiribosio tramite un legame 5'-ossidrilico. Vengono attaccati al filamento in sintesi con rilascio della molecola di pirofosfato.

- $dGTP$.
- $dCTP$.
- $dATP$.
- $dTTP$.

3.2.1.1.2 Giunzione innesco La giunzione innesco è formata da un filamento singolo di DNA che dirige l'aggiunta dei $dNTP$ complementari. L'innesco è un primer a DNA o RNA molto più corto del filamento che serve come sito di inizio dell'aggiunta dei nuovi $dNTP$ liberi. Necessario in quanto presenta un $3'-OH$ libero per l'inizio della reazione.

3.2.1.2 Crescita del filamento

Il filamento di nuova sintesi cresce allungando l'innesco al $3'$. Avviene la formazione di un legame fosfodiesterico tra innesco e $dNTP$. $-OH$ a $3'$ dell'innesco esegue un attacco nucleofilo al fosfato α del $dNTP$ creando il legame fosfodiesterico e causando l'uscita del pirofosfato con i fosfati α e β .

3.2.1.3 Energia

Pur essendo la reazione termodinamicamente sfavorevole, l'idrolisi del pirofosfato effettuata da una pirofosfatasi fornisce l'energia necessaria alla sua attivazione. Il pirofosfato rilasciato dalla reazione viene pertanto idrolizzato in due molecole di fosfato inorganico. In questo modo $\Delta G_{tot} < 0$.

3.2.2 Mutazioni

Il processo di replicazione non è perfetto: durante esso possono essere infatti introdotti errori.

3.2.2.1 Tasso di mutazione

Si nota come per un singolo gene per una proteina media lungo $1000nt$ accumula una mutazione ogni 10^6 generazioni. Avvengono pertanto 3 cambi nucleotidici per 10^{10} nucleotidi per generazione di cellule. Nell'essere umano avviene 1 mutazione ogni 10^{10} divisioni cellulari.

3.2.2.2 Tipologie di mutazioni

3.2.2.2.1 Geniche Le mutazioni geniche avvengono per singole basi:

3.2. PANORAMICA

- Sinonime o di sostituzione: viene introdotto un codone diverso che codifica per lo stesso amminoacido.
- Di senso errato: il codone viene sostituito con un altro che codifica per un amminoacido diverso.
- Non senso: viene formato un codone di stop.
- Frameshift: avviene uno spostamento dell'ordine di lettura per inserimento o delezione.
- Per sequenze ripetute.

3.2.2.2.2 Cromosomiche Le mutazioni cromosomiche consistono di traslocazioni di geni tra cromosomi.

3.2.2.2.3 Genomiche Le mutazioni genomiche consistono di perdita o aggiunta di numerosi geni.

3.2.3 DNA polimerasi

La DNA polimerasi è l'enzima responsabile della sintesi della catena di DNA. Lavora in modo processivo in direzione 3'-5'. È un oloenzima, possiede ovvero numerosi domini con funzioni diverse. Oltre all'attività polimerasica possiede un'attività esonucleasica 3'-5' che rimuove i nucleotidi erroneamente appaiati e una esonucleasica 5'-3'.

3.2.4 Meccanismi di correzione

L'alta fedeltà del meccanismo della replicazione richiede meccanismi di correzione.

3.2.4.1 DNA polimerasi

La DNA polimerasi compie essa stessa una correzione prima dell'aggiunta di un nuovo nucleotide. Il nucleotide corretto ha infatti un'affinità maggiore per la polimerasi in movimento del nucleotide non corretto.

3.2.4.2 Attività esonucleotidica

La DNA polimerasi possiede un'attività esonucleotidica. Questa viene attivata quando viene aggiunto un nucleotide scorretto: le DNA polimerasi sono selettive riguardo la catena in allungamento. Viene pertanto eliminato qualsiasi residuo non appaiato al terminale del primer. La rimozione continua all'indietro fino a che non sono stati rimossi abbastanza nucleotidi da rigenerare un -OH terminale appaiato.

3.2.5 Sintesi sul filamento discontinuo

Se al filamento principale è necessario un solo primer all'inizio della replicazione, l'attività unidirezionale della DNA polimerasi richiede un processo diverso per il filamento in ritardo. Questo filamento viene diviso in frammenti di Okazaki, corte regioni di DNA che la DNA polimerasi è in grado di sintetizzare. Ognuno di questi frammenti richiede un primer, e dopo che la DNA polimerasi completa la sintesi di uno si sposta al successivo.

3.2.5.1 DNA primasi

Il processo di produzione del primer dipende dalla DNA primasi, che usa trifosfati ribonucleici per sintetizzare corti primer a RNA sul filamento in ritardo. Il primer a RNA crea legami con il filamento in ritardo generando una doppia elica ibrida. Il primer contiene una terminazione 3'-OH e può essere allungato dalla DNA polimerasi.

3.2.5.2 Terminazione del frammento

La DNA polimerasi che allunga il primer si ferma quando incontra il primer attaccato alla terminazione 5' del frammento precedente. Il frammento è reso continuo da un sistema di riparazione del DNA, che elimina i primer e li sostituisce con DNA. Infine la DNA ligasi unisce le terminazioni dei frammenti. La rimozione del primer avviene a carico di *RNAasi H*.

3.2.6 Apertura della doppia elica

Essendo la doppia elica stabile in condizioni fisiologiche sono necessarie DNA elicasi per aprire la doppia elica. Queste proteine idrolizzano *ATP* e sono legate a un singolo filamento del DNA. Quando incontrano una regione a doppia elica continuano a muoversi lungo il proprio filamento separandolo a $1000 \frac{nt}{sec}$. Possono lavorare in entrambe le direzioni della polarità. Proteine che legano filamenti singoli di DNA o che destabilizzano l'elica si legano cooperativamente per esporre singoli filamenti senza coprire le basi. In questo modo stabilizzano la conformazione a singolo filamento e impediscono la formazione di corte eliche a forcina nel filamento in ritardo.

3.2.7 Mantenimento di una DNA polimerasi in movimento sul DNA

Le DNA polimerasi tendono a sintetizzare una piccola stringa di nucleotidi prima di separarsi dallo stampo. Questa bassa affinità con il DNA le permette di separarsi ed essere riciclata velocemente dopo la sintesi di un frammento di Okazaki. Rende però difficile la sintesi di lunghe sequenze.

3.2.7.1 Morsetto scorrevole

La proteina *PCNA* funziona come morsetto scorrevole: mantiene la polimerasi fermamente sul DNA mentre si muove e la rilascia appena incontra una regione a doppia elica. Forma un grande anelli intorno al filamento. Una faccia si lega al retro della DNA polimerasi, mentre l'anello scorre lungo il DNA. L'assemblaggio richiede idrolisi di *ATP* da parte di un complesso detto caricatore del morsetto che la pone su una giunzione primer. Sul filamento principale la DNA polimerasi rimane legata al morsetto per molto tempo, mentre su quello in ritardo si dissociano ogni volta che la polimerasi arriva sulla terminazione 5' di un frammento di Okazaki.

3.2.8 Modello a trombone

Il modello a trombone indica il processo con il quale viene replicato il DNA. Si nota come entrambi i filamenti sono sintetizzati simultaneamente. Nel modello l'elicasi si muove in direzione 5'-3'. L'oloenzima di replicazione interagisce con l'elicasi attraverso un fattore τ che lega entrambe le polimerasi. Un core della DNA polimerasi *III* sintetizza il filamento guida e l'altro quello in ritardo. Il ssDNA viene costantemente coperto da *SSB* che ne stabilizzano la struttura. Periodicamente la DNA primasi si associa all'elicasi per formare il primer sul filamento discontinuo. Quando la polimerasi di quest'ultimo completa un frammento di Okazaki viene rilasciata dalla pinza e dal DNA.

Il filamento con un innesco diventa il bersaglio dell'attività del caricatore della pinza che riconosce la giunzione innesco stampo. Questa legata dalla pinza richiama la DNA polimerasi che riparte con la sintesi del frammento di Okazaki successivo.

3.2.9 DNA topoisomerasi

Il movimento della forcina di replicazione lungo il DNA causa superavvolgimenti. Questi aumentano lo stress sulla doppia elica contrastando le elicasi. Devono pertanto intervenire topoisomerasi, nucleasi reversibili che rompono i legami fosfodiesterici nel backbone in modo da ridurre i superavvolgimenti e permettere la continuazione della polimerasi.

3.3 Complesso di pre-replicazione

3.3.1 Formazione

Il complesso di pre-replicazione si forma alle origini di replicazione.

3.3.1.1 Origine di replicazione

Un'origine di replicazione *Ori* è una sequenza specifica che contiene:

- Sito di legame per la proteina iniziatrice *ORC* (origin recognition complex).
- Tratto ricco di *A-T* per facilità di separazione.
- Sito di legame per proteine che facilitano il legame con *ORC*.

3.3.1.2 Processo di formazione

- *ORC* riconosce e si lega a *Ori*.
- *ORC* recluta *Cdt1* e *Cdc6*.
- *Cdt1* e *Cdc6* reclutano le elicasi.
- Le elicasi *MCM2-7* sono caricate sul DNA vicino a *ORC* durante la fase G_1 .
- Il complesso è ora assemblato sul DNA e rimane inattivo.

3.3.2 Attivazione

Il complesso di pre-replicazione viene attivato quando la cellula entra nella fase *S*.

3.3.2.1 Chinasi ciclina dipendente

Le chinasi ciclina dipendente *CDK* sono regolate dal ciclo cellulare: innescano la replicazione e impediscono l'assemblaggio simultaneo di nuovi complessi replicativi fino alla fase *M*. Fosforilano anche *ORC* impedendo che recluti altre elicasi.

3.3.2.2 Processo di attivazione

- *Cdk* e *Ddk* fosforilano *Cdt1* e *Cdc6* promuovendo distacco e proteolisi.
- La fosforilazione di *MCM2-7* le attiva e causa il reclutamento di altre proteine.

- Vengono reclutate le DNA polimerasi δ , ϵ , α e la DNA primasi.
- Viene reclutata la pinza e il suo caricatore *PCNA* e *RF-C*.
- Avviene il distacco della primasi.
- La DNA polimerasi δ inizia la replicazione sul filamento discontinuo.
- La DNA polimerasi ϵ inizia la replicazione sul filamento guida.
- Due forcelle di replicazione vengono attivate contemporaneamente in direzioni opposte.

3.4 Replisoma

Il replisoma è il complesso multi-enzimatico responsabile della replicazione del DNA.

3.4.1 Composizione

3.4.1.1 *MCM-7*

MCM-7 o minicromosome maintenance è un complesso proteico ad attività elicasi dipendente da *ATP*. Il suo caricamento è efficiente solo a seguito del legame sequenziale con *Cdt1* e *Cdc6*. Apre la doppia elica formando la bolla di trascrizione. Viene successivamente sostituito da un'elicasa più processiva.

3.4.1.2 DNA ligasi

La DNA ligasi unisce le estremità 3' del nuovo filamento a quella 5' del precedente.

3.4.1.3 Elicasi

Le elicasi sono enzimi che aprono la doppia elica utilizzando *ATP*. Oscillano cambiando conformazione in modo ciclico. Lavorano in entrambe le direzioni.

3.4.1.4 Single strand binding protein

Le proteine *SSB* si legano al ssDNA stabilizzandolo e impedendo la formazione di hairpins e mantenendo la catena lineare. Si staccano all'avvicinamento della DNA polimerasi.

3.4.1.5 DNA primasi

La DNA primasi sintetizza brevi primers sul filamento ritardato fornendo l'innesco alla DNA polimerasi.

3.4.1.6 DNA polimerasi

La DNA polimerasi è un enzima che sintetizza il DNA in direzione 5'-3'. Possono essere coinvolte anche nei processi di riparazione del DNA e si distinguono in:

- α : fa partire la sintesi.
- δ : più attiva nel filamento principale.
- ϵ : più attiva nel filamento discontinuo.
- γ : DNA polimerasi mitocondriale.

3.4.1.6.1 Tipologie

3.4.2 Tipo I

Le DNA polimerasi di tipo *I* hanno una struttura a mano capace di riconoscere e correggere errori. Le correzioni sono effettuate attraverso:

- Attività esonucleasica: degrada dall'esterno con $-OH$ libero.
- Attività endonucleasica: taglia il nucleotide dall'interno.

L'attività è processiva in direzione $5'-3'$ nel filamento leader, mentre non processiva nel filamento discontinuo. Nel secondo caso necessita di primer a RNA allungati in frammenti di Okazaki e riattaccati grazie a DNA ligasi. L'attività catalitica le permette di formare il legame fosfodiesterico.

3.4.2.1 Esonucleasi

Le esonucleasi sono gli enzimi deputati alla rimozione dei primer.

3.4.2.2 Complesso β o pinza scorrevole

La pinza scorrevole è formata da 2 subunità a ciambella che si posizionano sul DNA. Il complesso γ la carica sul DNA. Permette alla DNA polimerasi di rimanere attaccata al singolo filamento di DNA. Si stacca nelle regioni a doppia elica.

3.4.2.3 *CDK*

Le *CDK* hanno un'attività di fosforilazione che segue le cicline.

3.4.2.4 *TBP/TUS*

TBP/TUS o ter binding proteins rimuovono gli istoni da *OriC* e sono riconosciute da sequenze *TER*.

3.4.2.5 Complesso di pre-replicazione

ORC permette il reclutamento del replisoma.

3.4.2.6 DNA topoisomerasi

Le DNA topoisomerasi permettono la risoluzione dei superavvolgimenti.

3.5 Processo di replicazione

3.5.1 Inizio della replicazione

La replicazione inizia da regioni specifiche ricche di *A* e *T* in quanto questi nucleotidi formano meno legami a idrogeno e sono più facilmente separabili. Attraggono le proteine iniziatrici.

3.5.1.1 Procarioti

Il genoma dei procarioti è tipicamente contenuto in una molecola di DNA circolare. La replicazione inizia ad un singolo sito e le due forcelle procedono in direzioni opposte fino a che si incontrano.

3.5.1.1.1 Regolazione L'inizio è l'unico punto in cui la replicazione viene regolata. Il processo inizia quando proteine legate a *ATP* si legano in copie multiple in siti specifici del DNA avvolgendolo. Si forma un complesso che destabilizza la doppia elica vicina. Questo attrae due DNA elicasi legate a un caricatore che le mantiene inattive fino al caricamento giusto. L'elicasi una volta caricata svolge il DNA esportando i filamenti in modo che la DNA primasi sintetizzi il primer che porta all'assemblaggio delle proteine necessarie alla creazione delle due forcelle di replicazione. La proteina iniziatrice viene disattivata e l'origine di replicazione subisce un periodo refrattario causato da un ritardo nella metilazione dei nuovi nucleotidi.

3.5.1.1.2 Ori *Ori* è formata da 4 ripetizioni di 9 nucleotidi e 3 ripetizioni di 13b[a monte di esse. Viene riconosciuta dalle *DNA A* che si lega alle ripetizioni facilitando la denaturazione e recluta le elicasi *DNA C-B*.

3.5.1.2 Eucarioti

Il genoma degli eucarioti si trova tipicamente in cromosomi lineari. La replicazione inizia a diversi *Ori* e la bolla di replicazione si espande fino alla terminazione del cromosoma o fino a che si incontra un'altra forcella. Nei lieviti le *Ori* prendono il nome di *ARS* (autonomous replicating sequence).

3.5.1.3 Identificazione della regione contenente un Ori

Per identificare la regione che contiene l'origine di replicazione si sequenzia il DNA del lievito mediante enzimi di restrizione, lo si introduce nel DNA plasmidico contenente un gene per la sintesi di istidina. Il plasmide che contiene un *ARS* sarà in grado di diffondersi e creerà coltura in terreno privo di istidina. Si restringe la regione aggiunta al plasmide in modo da identificare precisamente la sequenza.

3.5.2 Velocità di replicazione

Le forcelle di replicazione eucariotiche si muovono di circa 50 nucleotidi al secondo a causa dello stato cromatinico.

3.5.3 Organizzazione temporale

Se i batteri replicano il DNA in maniera continua negli eucarioti avviene durante la fase *S*, che in una cellula mammifera dura 8 ore. Al termine della fase *S* ogni cromosoma è stato completamente replicato in due copie che rimangono unite al centromero fino alla fase *M*.

3.5.3.1 Temporizzazione delle Ori

Negli eucarioti le origini di replicazione sono attivate in cluster di 50 adiacenti. L'ordine di attivazione dipende dalla struttura cromatinica.

3.5.4 Assemblaggio dei nucleosomi

A causa della grande quantità di proteine istoniche necessarie per produrre i nuovi nucleosomi la maggior parte degli eucarioti possiede copie multiple del gene di ciascun istone. La duplicazione dei cromosomi richiede la sintesi e l'assemblaggio di nuove proteine cromosomiche sul DNA in coda alla forcella. Sono sintetizzati durante la fase *S*. Un meccanismo di feedback regola il livello degli istoni

liberi in modo che la loro quantità rimanga costante e attiva i loro geni quando vengono inclusi in massa nel DNA durante la fase *S*. Quando la forcella di replicazione passa attraverso nucleosomi un complesso di rimodellamento della cromatina destabilizza il nucleosoma permettendo la replicazione. Mentre la forcella passa gli istoni sono spostati: l'ottamero viene rotto in un tetramero $2(H3-H4)$ che rimane associato con il DNA e viene distribuito tra uno dei due figli e in due dimeri $H2A-H2B$ vengono completamente rilasciati. $2(H3-H4)$ di nuova sintesi sono usati per riempire i buchi e i dimeri sono aggiunti a caso per completare i nucleosomi. La lunghezza dei frammenti di Okazaki è determinata dal punto in cui la DNA polimerasi è bloccata dal nucleosoma.

3.5.5 Terminazione della replicazione

3.5.5.1 Procarioti

Il DNA circolare dei procarioti risolve il problema della replicazione delle terminazioni: l'incontro tra le due forcelle di replicazione causa la terminazione della replicazione.

3.5.5.2 Eucarioti

Alle terminazioni il meccanismo di replicazione del filamento in ritardo incontra problemi: il primer a RNA finale non può essere sostituito da DNA in quanto non trova un $3'-OH$ disponibile. Il problema viene risolto attraverso i telomeri.

3.5.5.2.1 Telomeri I telomeri sono sequenze specializzate contenenti ripetizioni di sequenze corte *GGGTTA* riconosciute dalla telomerasi che le rifornisce ogni volta che la cellula si divide.

3.5.5.2.1.1 Telomerasi La telomerasi riconosce la fine di un telomero e la allunga nella ripetizione usando uno stampo a RNA presente nell'enzima. Lo stampo viene utilizzato per sintetizzare nuove copie della ripetizione. Dopo l'estensione del filo genitore la replicazione del filamento discontinuo può essere completata dalla DNA polimerasi standard che usa le estensioni per sintetizzare il filamento complementare.

3.5.5.2.1.2 Funzionamento della telomerasi Il terminale $3'$ del telomero viene legato da *RNA TERC* (telomerase RNA component) creando una giunzione innesco-stampo. La giunzione viene usata dalla telomerasi *TERT* per allungare l'estremità di 6 nucleotidi. *RNA TERC* dopo essere usato come stampo si stabilizza sulla nuova estremità saltando di 6 nucleotidi e ripetendo il processo più volte. Terminata l'azione della telomerasi il filamento funziona da stampo per la sintesi del secondo filamento. La rimozione dell'ultimo innesco crea un terminale $3'$ sporgente rispetto al $5'$.

3.5.5.2.1.3 T-loop Le proteine legate al telomero oltre a regolare la telomerasi hanno un ruolo protettivo dell'estremità $3'$: impediscono che venga riconosciuta come rottura del DNA. I telomeri formano un'ansa data dall'estremità a filamento singolo che invade il doppio filamento del telomero stesso.

3.5.5.2.1.4 Lunghezza dei telomeri Essendo i processi di regolazione della sequenza telomerica bilanciati approssimativamente una fine cromosomica contiene un numero variabile di ripetizioni telomeriche. Molte cellule hanno un numero di meccanismo che mantengono il numero delle ripetizioni in un intervallo, come *POT*, *TRF1,2* che contano le sequenze aggiunte e bloccano l'enzima. Si nota come nella maggior parte delle divisioni cellulari le ripetizioni telomeriche sono

erose con il tempo. Dopo molte generazioni le cellule discendenti avranno cromosomi senza funzione telomerica e le cellule vanno incontro a senescenza. Il numero di divisioni massime viene detto limite di Hayflick. Non permettere la degradazione dell'attività della telomerasi causa tumorigenesi.

3.5.5.2.1.5 Discheratosi congenita La discheratosi congenita è una malattia genetica causata da mutazioni del gene discherina, una chinasi coinvolta nei processi di modifica di RNA ribosomiali che interagisce con la parte ad RNA della telomerasi influenzandone la stabilità. Questa causa porta a una perdita della funzione della telomerasi e causa:

- Pigmentazione anomala della pelle.
- Ingrigimento precoce.
- Distrofia ungueale (corrugamento, distruzione e perdita delle unghie).
- Cirrosi epatica.
- Disordini intestinali.

3.6 Riparazione del DNA

3.6.1 Motivi biologici della riparazione

Nonostante il DNA sia stabile è suscettibile a cambi spontanei che porterebbero a mutazioni se lasciate non riparate. Le basi del DNA possono essere danneggiate da una collisione con metaboliti reattivi o da radiazioni ultraviolette. Queste modifiche se accumulate portano alla cancellazione di basi o a sostituzioni durante la replicazione portando a conseguenze letali. Si nota come la struttura a doppia elica è adatta alla riparazione in quanto porta due copie dell'informazione genetica: danni ad un filamento possono essere riparati usando l'altro come stampo.

3.6.2 Processi di riparazione

Le cellule possiedono diversi modi di riparare il DNA. Differiscono per come il danno viene eliminato. Questo processo può essere accoppiato alla trascrizione: la RNA polimerasi infatti stalla ad errori, causando un reclutamento degli enzimi necessari alla riparazione.

3.6.2.1 Riparazione tramite asportazione della base

Il cammino di riparazione tramite asportazione della base le DNA glicosilasi riconoscono un tipo di base nel DNA e catalizzano una rimozione idrolitica. Una base alterata viene riconosciuta attraverso un flip-out del nucleotide. Il buco creato dalla DNA glicosilasi viene riconosciuto da *AP endonucleasi* che taglia il backbone riparando lo zucchero.

3.6.2.2 Asportazione del nucleotide

Il cammino di riparazione tramite asportazione del nucleotide può riparare danni causati da grandi cambi nella struttura: questa viene scansionata da un complesso multienzima che cerca distorsioni nella doppia elica. La DNA elicasi rimuove il filamento che contiene la lesione. Il gap prodotto è riparto da DNA polimerasi e ligasi.

3.6.3 DNA polimerasi specializzate

In caso di danni pesanti la replicazione del DNA viene fermata e si utilizzano DNA polimerasi diverse, versatili ma meno precise dette *rtranslesion* polimerasi per replicare attraverso il danno. Alcune possono riconoscere un danno specifico e aggiungere i nucleotidi necessari, mentre altre fanno congetture. Non possiedono proofreading e sono meno discriminanti nella scelta del nucleotide.

3.6.4 Rotture a doppio filamento

Le rotture a doppio filamento possono essere riparate attraverso unione delle terminazioni non omologa. In questo meccanismo le terminazioni rotte sono riunite attraverso DNA ligation con perdita dei nucleotidi nel sito dell'unione. Porta a mutazioni.

3.6.5 Effetti del danno al DNA

L'attività dei processi di riparazione blocca il ciclo cellulare, permettendogli pertanto di riparare a tutti i danni prima che la cellula replichi il DNA.

3.6.6 Riparazione omologa

La riparazione omologa avviene quando la forcella stala o viene rotta indipendentemente. Durante la meiosi catalizza lo scambio di informazioni genetiche tra cromosomi omologhi materni e paterni. Nel meccanismo avviene uno scambio di filamenti di DNA tra un paio di duplex omologhi della sequenza di DNA molto simili nella sequenza nucleotidica. Una rottura a doppio filamento programmata seguita da ricombinazione omologa porta al crossing-over durante la meiosi aumentando la variabilità genetica durante la riproduzione sessuata.

3.6.6.1 Meccanismo di guida

Il meccanismo avviene tra duplex di DNA con una sequenza omologa estensiva. Testano la sequenza a vicenda. L'interazione può essere limitata permettendo a una doppia elica di riformarsi dai singoli filamenti.

3.6.6.2 Capacità della riparazione omologa

La ricombinazione omologa può riparare doppi filamenti accuratamente senza perdita di informazione. Il processo avviene dopo la replicazione.

3.6.6.3 Cambio di filamenti

RecA in *E. coli* e *Rad51* negli eucarioti catalizzano lo scambio tra i filamenti legandosi cooperativamente al filamento invasore. Questo si lega al duplex allungandolo, destabilizzando e facilitando la separazione dei filamenti.

3.7 Mitocondrio

I mitocondri sono organelli citoplasmatici che si trovano tipicamente in prossimità del ER in quanto sfruttano il gradiente di Ca^{2+} in esso contenuto sequestrando lo ione in modo da agire come sua riserva. La loro funzione principale è di produrre *ATP* durante la catena di trasporto finale degli elettroni. Sono associati al citoscheletro, che ne determina distribuzione e orientamento.

3.7.1 Teoria endosimbiontica

Secondo la teoria endosimbiontica gli eucarioti si sarebbero originati dalla fusione di procarioti. Il mitocondrio e i cloroplasti corrisponderebbero ad organismi fagocitati da altre cellule in modo che ne traessero un vantaggio evolutivo.

3.7.1.1 Evidenze

- I mitocondri sono dotati di un doppio sistema di membrane.
- Il mitocondrio contiene DNA extra-nucleare.
- Il mitocondrio codifica per ribosomi 70S.
- Sono capaci di dividersi autonomamente per scissione binaria.

3.7.2 Numero e morfologia

Le cellule contengono tipicamente tra i 1000 e i 2000 mitocondri per cellula. Il numero varia in base al tipo cellulare e un elevato numero di mitocondri è indice di un'elevata richiesta energetica da parte della cellula. Nell'uovo se ne trovano 30 000. I mitocondri delle cellule epatiche contengono il 30-35% delle proteine.

3.7.2.1 Membrana esterna

La membrana esterna contiene una porina che forma un canale ed è pertanto permeabile ad un elevato numero di molecole. Il trasportatore è detto complesso *TOM*.

3.7.2.2 Spazio intermembrana

Lo spazio intermembrana contiene numerosi enzimi che direzionano e digeriscono le sostanze importanti attraverso la membrana esterna.

3.7.2.3 Membrana interna

La membrana interna è ripiegata in numerose creste e invaginazioni in modo da aumentarne la superficie. Contiene proteine per l'importo *TIM*.

3.7.2.4 Matrice

La matrice contiene una miscela altamente concentrata di enzimi. Contiene parecchie copie identiche del DNA del genoma mitocondriale, ribosomi mitocondriali e tRNA.

3.7.2.5 Variazioni morfologiche

Le creste differiscono per lunghezza, forma e numero a seconda delle richieste energetiche della cellula.

3.7.2.5.1 Cellule normali Tipicamente nelle cellule le creste si allungano per metà della matrice e sono corte in corrispondenza di bassa richiesta energetica.

3.7.2.5.2 Cellule muscolari Nelle cellule muscolari le creste attraversano tutta la matrice. Sono impacchettate molto strette e si trovano in numero elevato in corrispondenza di elevata richiesta energetica.

3.7.3 DNA mitocondriale

Il genoma del mitocondrio contiene geni per la produzione di un sistema di traduzione con un codice di riconoscimento proprio. È comunque estremamente limitato: la maggior parte delle proteine viene introdotta dalla cellula dopo la traduzione. Queste proteine contengono una sequenza *MLS* (mitochondria localization element). Essendo che il DNA mitocondriale è di origine materna è possibile utilizzarlo per tracciare la matrilinearità. Ogni mitocondrio porta dieci copie del genoma mitocondriale associate in regioni nucleoidi multipli. Il DNA è circolare e a doppio filamento.

Capitolo 4

Trascrizione

4.1 Panoramica

La trascrizione è il meccanismo generale che porta alla produzione di RNA a partire dal DNA.

4.1.1 Produzione di RNA

4.1.1.1 Lettura di DNA

Il RNA viene sintetizzato trascrivendo DNA. Il processo inizia con lo svolgimento di una piccola porzione della doppia elica. Le basi così esposte su un filamento agiscono come stampo per la sintesi di RNA.

4.1.1.2 Polimerizzazione

L'accoppiamento di basi complementari determina la sequenza di nucleotidi del RNA. Quando avviene una corrispondenza il ribonucleide viene legato con la creazione di un legame fosfodiesterico.

4.1.1.3 Separazione del RNA

Il filamento di RNA viene separato nella regione a monte dell'aggiunta e viene rilasciato come filamento singolo. Le molecole di RNA sono tipicamente più corte rispetto a quelle di DNA.

4.1.2 RNA polimerasi

Le RNA polimerasi sono gli enzimi responsabili della catalizzazione dell legame fosfodiesterico tra i nucleotidi del RNA nascente. Estende la catena di RNA in direzione 5'-3' e non necessita di primer. Ha attività processiva.

4.1.2.1 Substrati

I substrati sono ribonucleoside trifosfato. La sua idrolisi fornisce l'energia necessaria alla reazione.

4.1.2.2 Temporizzazione

Il rilascio immediato del RNA vuol dire che le copie possono essere create in poco tempo, con la sintesi di molecole addizionali prima che le altre siano completate.

4.1.2.3 Tasso di errore

La RNA polimerasi compie un errore ogni 104 nucleotidi. Questo tasso di errore alto è tollerato in quanto gli RNA hanno vita breve.

4.1.2.4 Proof-reading

La RNA polimerasi possiede un'attività di proofreading: se un ribonucleotide errato viene aggiunto può indietreggiare e il sito attivo asporta attraverso la sostituzione di un pirofosfato con una molecola d'acqua. Viene rilasciata infine una molecola di monofosfato.

4.1.2.5 Struttura

La RNA polimerasi possiede domini per:

- Accogliere il DNA.
- Riconoscere la sequenza di inizio.
- Accogliere i nucleotidi.
- Far uscire il RNA.

4.1.2.5.1 Core Il core della RNA polimerasi è conservato tra eucarioti e procarioti. È pertanto un oloenzima composto da 5 subunità e un gruppo prostetico.

4.1.2.5.1.1 Subunità β β' La subunità β' è la più grande seguita da β . Sono codificate dai geni *rpoC* e *rpoB*. Formano il sito attivo per la sintesi di mRNA. Componenti creano interazioni non specifiche con DNA e RNA.

4.1.2.5.1.2 Subunità α' α'' Le subunità α' e α'' sono uguali tra di loro e contengono un dominio αNTD (dominio N terminale) e uno αCTD (dominio C terminale). Il primo permette l'assemblaggio della polimerasi, mentre il secondo reagisce con il promotore sul DNA e coi fattori di regolazione.

4.1.2.5.1.3 Subunità ω La subunità ω è la più piccola e stabilizza la RNA polimerasi assemblata.

4.1.2.5.2 Polimerasi eucariote Le RNA polimerasi eucariote contengono 9 domini in più per le interazioni con altre proteine. Ne esistono tre: RNA polimerasi *I*, *II* e *III*.

4.1.2.5.3 Solco centrale attivo Il solco centrale attivo è simile a quello della DNA polimerasi. Contiene un solo ione Mg^{2+} . Un altro viene aggiunto con un nuovo nucleotide ogni ciclo di sintesi e rilasciato con il pirofosfato.

4.1.3 Inibitori di RNA polimerasi

Gli inibitori della polimerasi sono molecole come α amanitina e actinomomicina D che impediscono la trascrizione. Sono in grado di bloccare specificatamente una delle tre polimerasi. Vengono usati per determinare l'emivita di un RNA, bloccando la sua trascrizione e osservando il graduale abbassamento di concentrazione attraverso PCR ed elettroforesi.

4.1.4 Categorie di RNA prodotto

Il prodotto finale dei geni può essere una proteina o una molecola di RNA. Nel secondo caso queste hanno funzione strutturale o catalitica. Possono regolare l'espressione genica. Si notano pertanto diverse categorie di RNA:

- mRNA: messaggero, per la produzione di componenti enzimatici strutturali e regolatori.
- tRNA: transfer, per il trasporto degli amminoacidi per la traduzione.
- rRNA: ribosomiale, per la formazione dei nuclei catalitici dei ribosomi.
- snRNA: small nuclear RNA per lo splicing (*U1,2,4,5,6*) in complesso con proteine.
- microRNA e piccoli RNA interferenti: regolano l'espressione genica.
- piRNA: proteggono le linee germinali dai trasposoni.
- Lunghi RNA non codificanti: sono impalcature o possono avere un ruolo nella regolazione.

4.2 Trascrittosoma

Si intende per trascrittosoma il complesso multienzimatico responsabile della trascrizione.

4.2.1 Composizione

4.2.1.1 Elicasi

Le elicasi aprono la doppia elica.

4.2.1.2 Fattori di trascrizione

I fattori di trascrizione o *TF* sono fattori che aiutano la trascrizione. Per esempio *TFIID* e *TFIIH* sono fattori di proofreading e di reattivazione della RNA polimerasi instabile.

4.2.1.3 RNA polimerasi

4.2.1.3.1 RNA polimerasi I La RNA polimerasi *I* si occupa della produzione degli rRNA tranne il 5S.

4.2.1.3.1.1 Reclutamento di fattori La RNA polimerasi *I* recluta:

4.3. PROCESSO DELLA TRASCRIZIONE

- *UBF*: upstream binding factor, si lega a monte del promotore piegando il DNA e avvicinando i fattori tra di loro. Agisce come tetramero.
- *SL1* o fattori *TBP* (*TATA* box binding protein), riconoscono la sequenza *TATA* box.

La formazione del tetramero tra *UBF* e i *SL1* come *TBP* e *TAF* crea un tetramero imponendo al DNA una struttura a sella che permette il corretto reclutamento della RNA polimerasi sul DNA.

4.2.1.3.2 RNA polimerasi II La RNA polimerasi *II* produce mRNA e microRNA. Si occupa pertanto della trascrizione dei geni produttori di proteine. Possiede una coda terminale strutturata con tirosina, serina e treonina. Può subire modifiche post-traduzionali per reclutare fattori coinvolti nello splicing. Durante l'allungamento la coda impedisce che la RNA polimerasi si stacchi prima della fine del gene.

4.2.1.3.2.1 Reclutamento di fattori La RNA polimerasi *II* recluta:

- *TF2D*: riconosce la *TATA* box binding protein e il complesso *TAF* (*TBP* associated factor), formando un primo complesso.
- *TF2A*: stabilizza il complesso appena formato.
- *TF2B*: recluta e posiziona RNA polimerasi in maniera corretta sul promotore.
- *TF2F*: stabilizza l'interazione della RNA polimerasi con *TBP* e *TF2B*.
- *TF2E*: attrae e regola *TF2H*.
- *TF2H*: ha attività elicastica e chinastica: fosforila infatti la coda della RNA polimerasi *II*.
- La fosforilazione della coda che rimane libera permette l'allungamento del filamento.

4.2.1.3.3 RNA polimerasi III La RNA polimerasi *III* produce tRNA e rRNA 5S.

4.2.1.3.3.1 Reclutamento di fattori La RNA polimerasi *III* recluta:

- *TFIIIC* e *TFIIIB* che riconoscono una *BoxA* a monte e una *BoxB* a valle del gene.
- *TFIIIB* e *TFIIIC* reclutano la RNA polimerasi *III*.
- La trascrizione del rRNA 5S richiede un ulteriore riconoscimento di un *BoxC* all'interno del gene.

4.3 Processo della trascrizione

4.3.1 inizio

La trascrizione accurata di un gene richiede il riconoscimento del suo inizio e fine. L'iniziazione è pertanto il processo di regolazione di quali proteine devono essere prodotte e a quale velocità.

4.3.1.1 Fattori sigma

I fattori σ sono subunità aggiuntive che si associano alla RNA polimerasi e la aiutano alla lettura del DNA batterico. Il fattore associato all'oloenzima aderisce debolmente al DNA fino a quando trova una sequenza consenso detta protomero. Riconosce sequenze a -35 e a -10 nelle zone promotrici. A quel punto si lega strettamente e dà inizio alla trascrizione.

4.3.1.1.1 Fattori basali I fattori basali sono sequenze minime nella zona promotrice che consentono l'attacco della RNA polimerasi. Vengono riconosciute dai fattori σ .

- *CAT box*: sono triplette *CAT* in posizione -35 .
- *TATA box*: sequenze ricche in *A* e *T* in posizione -25 , riconosciute dalla RNA polimerasi *II*.

4.3.1.2 Bolla di trascrizione

Dopo il legame con il protomero si apre una bolla di trascrizione di circa 10 nucleotidi. Il filamento non legato dall'oloenzima agisce come stampo.

4.3.1.3 Modelli di inizio

Dopo il riconoscimento del promotore da parte dei fattori σ la RNA polimerasi si lega al DNA. Si forma il complesso chiuso sul promotore e si svolge il DNA. Il complesso diventa aperto sul DNA svolto.

4.3.1.3.1 Passaggio transiente Nell'iniziazione a passaggio transiente la RNA polimerasi si attacca al DNA, avanza sintetizzando un filamento abortivo e torna indietro.

4.3.1.3.2 A bruco Nell'iniziazione a bruco la RNA polimerasi si attacca, cambia conformazione favorendo la formazione della bolla e trascrive un frammento.

4.3.1.3.3 Scrunching Il meccanismo di scrunching è responsabile della sintesi dei primi 10 nucleotidi. La RNA polimerasi rimane attaccata al protomero e tira il DNA nel sito attivo espandendo la bolla di trascrizione. Lo stress generato causa un rilascio delle catene e un reinizio della sintesi. Questa iniziazione abortiva viene superata e lo stress separa l'enzima dal protomero e dal fattore σ .

4.3.1.4 Iniziazione per la RNA polimerasi II

La RNA polimerasi *II* richiede un insieme di fattori di trascrizione generali affinché possa trascrivere. Questi la aiutano a posizionarsi al promotore, a separare i filamenti e ad essere rilasciata dal promotore in modo da iniziare con l'allungamento. Sono analoghi ai fattori σ procarioti.

- *TFIIA*.
- *TFIIB*.
- *TFIIC*.
- *TFIID*.

4.3.1.4.1 Processo di assemblaggio

marca il promotore come attivo.

1. *TFIID* si lega a una *TATA box* attraverso la subunità *TBP*.
2. La distorsione del DNA nella *TATA box*
3. La RNA polimerasi *II* insieme ad altri fattori formano un complesso di iniziazione.

4.3. PROCESSO DELLA TRASCRIZIONE

- | | |
|--|--|
| 4. La RNA polimerasi <i>II</i> ottiene l'accesso al filamento stampo. | una serie di cambi conformazionali che le permettono di spostarsi. |
| 5. <i>TFIIH</i> idrolizza <i>ATP</i> e svolge il DNA. | 7. Viene fosforilata la RNA polimerasi <i>II</i> da <i>TFIIH</i> . |
| 6. La RNA polimerasi <i>II</i> rimane al promotore sintetizzando corte lunghezze fino a subire | 8. I fattori di trascrizione generali si dissociano dal promotore. |

4.3.1.4.2 Regolazione

4.3.1.4.2.1 Enhancers Gli enhancers sono sequenze di DNA a cui si legano gli attivatori trascrizionali. Questi reclutano la RNA polimerasi *II* al punto di inizio.

4.3.1.4.2.2 Mediatore Il mediatore è un complesso proteico che permette alle proteine attivatrici di comunicare con la RNA polimerasi *II* e con i fattori di trascrizione generali.

4.3.1.4.2.3 Modifica della cromatina Affinchè la RNA polimerasi *II* possa trascrivere devono intervenire complessi rimodellatori della cromatina e modificatori degli istoni che decondensano la cromatina.

4.3.1.5 Fattori di trascrizione

4.3.1.6 Attivatori, mediatori e proteine per la modifica della cromatina

4.3.2 Allungamento

L'allungamento inizia quando la polimerasi ha sintetizzato un corto frammento di RNA di 10 basi. L'enzima separa i due filamenti e li riavvolge dopo il suo passaggio mentre sintetizza il RNA. Mentre la reazione prosegue stacca la catena dallo stampo. Ha una funzione di proofreading. La catena viene quindi aperta ulteriormente in modo da iniziare un processo continuativo. Nei batteri σ^4 libera il canale per la fuoriuscita di RNA. La formazione del legame fosfodiesterico causa la liberazione di pirofosfato tamponato con Mg^{2+} .

4.3.2.1 Meccanismi di correzione

4.3.2.1.1 Editing pirofosforico

4.3.2.1.2 Editing idrolitico Nell'editing idrolitico la RNA polimerasi taglia a 2 o 3 nucleotidi a monte dell'errore commesso e torna indietro.

4.3.2.2 Andamento dell'allungamento

Una volta che la RNA polimerasi ha iniziato la trascrizione si muove a scatti. Viene legata da una serie di fattori di allungamento.

4.3.2.2.1 Fattori di allungamento Si intende per fattori di allungamento quelle proteine che diminuiscono la probabilità che la RNA polimerasi si dissoci dal DNA prima di aver finito la trascrizione. Si associano ad essa dopo l'iniziazione. Possono modificare gli istoni lasciando una traccia che aiuta le trascrizioni successive e coordina l'allungamento.

4.4. TRASPORTO TRA NUCLEO E CITOPLASMA

4.3.2.2.2 Tensione superelicale La tensione superelicale formata dalla RNA polimerasi viene rilassata da DNA topoisomerasi.

4.3.2.3 Processamento del RNA

Negli eucarioti la trascrizione è accoppiata con il processamento del RNA.

4.3.2.3.1 Terminazioni La terminazione 3' viene modificata con poliadenilazione, mentre la 5' viene metilata. Le modifiche creano un meccanismo di verifica prima che il RNA lasci il nucleo

4.3.2.3.2 RNA splicing Nel processo di splicing vengono rimossi gli introni degli RNA. Splicing alternativi permettono la creazione di proteine diverse da uno stesso gene.

4.3.3 Terminazione

Durante la terminazione l'enzima rilascia il RNA prodotto e si dissocia dal DNA.

4.3.3.1 Procarioti

4.3.3.1.1 Rho indipendente La terminazione Rho indipendente consiste di regioni a forcina sul RNA che destabilizzano l'interazione tra RNA polimerasi e DNA. Non necessita di fattori proteici. Sono sequenze palindromiche ricche di *C* e *G* seguite da sequenze ricche di *A* e *T* palindromiche.

4.3.3.1.2 Rho dipendente Nella terminazione Rho dipendente la proteina Rho lega il RNA e riconosce sequenze *RUT*. Si sposta fino a incontrare la RNA polimerasi destabilizzandola e causando la sua dissociazione dal DNA. Questa sequenza si trova a valle del sito dove avviene la traduzione.

4.3.3.2 Eucarioti

4.3.3.2.1 Modello a torpedo Nel modello a torpedo una RNAasi interagisce con la RNA polimerasi ma non degrada il RNA protetto dal cap metilico. La RNA polimerasi continua la traduzione fino all'aggiunta di una sequenza poliadenilata dove la RNAasi taglia il RNA prodotto causando la destabilizzazione del complesso e la terminazione.

4.3.3.2.2 Modello allosterico Nel modello allosterico dopo il taglio del sito di poliA *AAUAAA* un cambio conformazionale porta al distacco della RNA polimerasi.

4.4 Trasporto tra nucleo e citoplasma

Le proteine vengono prodotte nel citoplasma, ma alcune devono essere poi trasportate nel nucleo per poter svolgere la loro funzione. Queste pertanto possiedono una particolare sequenza segnale *NLS*: nuclear localization sequence. Le proteine che invece dal nucleo devono esserne esportate presentano una *NES*: nuclear export sequence.

4.4.1 Complessi coinvolti

4.4.1.1 Complesso di importazione

Il complesso di importazione *Importing karyopherin* riconosce la *NLS*, una regione ricca di lisina o arginina per l'importazione nel nucleo. Trasporta la proteina dal citoplasma al nucleo.

4.4.1.2 Complesso di esportazione

Il complesso di esportazione *Exporting karyopherin* riconosce *NES*, una regione contenente leucine o isoleucine. Trasporta la proteina dal nucleo al citoplasma.

4.4.2 Verificare la localizzazione

4.4.2.1 Eterocaryon essay

L'eterocaryon essay è un processo che permette di distinguere se una proteina viene importata nel nucleo. Per farlo si fondono due cellule di specie diverse in un'unica. Questo si svolge attraverso *PEG* che permette la fusione delle membrane. Questo sistema permette di studiare se una proteina nel nucleo di una cellula si muove dal nucleo al citoplasma e viceversa. Si trasfettano le cellule umane con la proteina fusa con *GFP*. Dopo che è avvenuta la fusione se la proteina nucleare si sposta anche nel citoplasma entra nel nucleo della cellula murina.

4.4.3 Processo di importo ed esporto

Un importante fattore che dà direzionalità al trasporto è la proteina *RAN*. Questa può legare *GTP* o *GDP* in base alla regione della cellula in cui si trova.

4.4.3.1 Importazione

L'importazione nel nucleo è guidata da importine: queste si legano al cargo e passano nel nucleo. In questo momento *RanGTP* lega l'importina causandone il distacco dal cargo. L'importina scarica legata a *RanGTP* viene esportata e nel citoplasma avviene l'idrolisi in *RanGDP*, rendendo l'importina nuovamente disponibile.

4.4.3.2 Esportazione

L'esportazione dal nucleo è guidata da esportine: queste legano *RanGTP*. Il legame causa un cambio conformazionale che causa il legame con il cargo. A questo punto abbandona il nucleo e l'idrolisi in *RanGDP* permette il distacco del cargo dall'esportina.

4.4.3.3 Leptomicina B

La leptomicina *B* è una tossina di origine fungina che compete con il cargo per il legame con l'esportina. Impedisce la sua esportazione.

4.5 Meccanismi di regolazione della trascrizione e dell'espressione genica

4.5.1 Operoni

Si intendono per operoni gruppi di geni adiacenti trascritti come un'unica molecola di mRNA policistronica tradotta nei procarioti in proteine diverse.

4.5.2 Induzione

Si intende per induzione un meccanismo di controllo che viene attivato in presenza di una molecola induttore.

4.5.2.1 Induzione a controllo negativo

Nell'induzione a controllo negativo un repressore viene represso in presenza di un induttore. Questo causa una trascrizione attiva.

4.5.2.2 Induzione a controllo positivo

Nell'induzione a controllo positivo l'attivatore inattivo viene attivato dall'induttore causando una trascrizione attiva.

4.5.3 Repressione

Si intende per repressione un controllo che viene disattivato in presenza di un repressore, prodotto da una sequenza che per ingombro sterico impedisce il reclutamento della RNA polimerasi.

4.5.3.1 Repressione a controllo negativo

Nella repressione a controllo negativo l'attivazione del repressore reprime la trascrizione.

4.5.3.2 Repressione a controllo positivo

Nella repressione a controllo positivo l'attivatore viene disattivato da un repressore disattivando la trascrizione.

4.5.4 Enhancer

Negli eucarioti oltre agli elementi basali necessari per una trascrizione basale si trovano sequenze che aumentano l'efficienza del processo.

4.5.4.1 Caratteristiche

- Distanza di migliaia di basi o cromosomi diversi rispetto al gene che influenzano.
- Orientamento non specifico.
- Posizione a monte o a valle del gene.

Si legano a fattori trascrizionali con un sito di riconoscimento per il DNA e un dominio di trans-attivazione che può essere aspecifico che può reclutare altri fattori.

4.5.4.2 Domini caratteristici

4.5.4.2.1 Helix-Turn-Helix Il dominio Helix-turn-helix è composto da due α -eliche legate da un dominio flessibile. Interagiscono con il solco maggiore del DNA.

4.5.4.2.2 Domini zinc-finger I domini zinc-finger contengono un α -elica e uno ione zinco che interagisce con istidine o cisteine. Sono specifici per la sequenza.

4.5.4.2.3 Leucine zipper Le leucine zipper si trovano nei fattori trascrizionali e vengono mantenute da leucine che formano un nucleo idrofobico che permette l'interazione di due catene tra di loro.

4.5.5 Esempi

4.5.5.1 Operone *lac*

L'operone *lac* è formato da 3 geni *Z*, *Y* e *A* tradotti in β -galattosidasi, permeasi (assimilazione del lattosio) e transacetilasi. È un esempio di repressione da catabolita.

4.5.5.1.1 Repressione da catabolita L'operone *lac* presenta un esempio di repressione da catabolita: la sua trascrizione è infatti regolata dalla presenza o assenza di lattosio e *cAMP*.

4.5.5.1.1.1 Assenza di glucosio e lattosio In assenza di lattosio e glucosio i livelli di *cAMP* sono alti: *CAP* (*cAMP* receptor protein) si lega sul sito a monte del promotore. L'assenza del lattosio causa la presenza del repressore e la trascrizione dell'operone è disattiva.

4.5.5.1.1.2 Assenza di lattosio e presenza di glucosio In assenza di lattosio e presenza di glucosio il repressore è presente, *CAP* non si lega al sito in quanto *cAMP* è a bassi livelli. La trascrizione è repressa.

4.5.5.1.1.3 Presenza di glucosio e lattosio In presenza di glucosio e lattosio viene rimosso il repressore dall'operatore, ma i bassi livelli di *cAMP* causano una trascrizione basale.

4.5.5.1.1.4 Presenza di lattosio e assenza di glucosio In presenza di lattosio e assenza di glucosio il repressore viene rimosso e *CAP* si lega al sito di attacco a causa degli alti livelli di *cAMP*. La trascrizione si attiva in modo efficiente.

4.5.5.2 Operone triptofano

L'operone triptofano codifica per enzimi che portano a sintesi del triptofano. Viene attivato in sua assenza.

4.5.5.2.1 Struttura L'operone triptofano è formato in sequenza da:

- Operatore.
- Fattore di regolazione.
- Sequenza leader.
- 4 regioni trascritte.
- Coda poli-U.
- Terminazione leader.

4.6. MODIFICHE POST-TRASCRIZIONALI

La sequenza leader è un sensore per il triptofano: possiede molti codoni per la sintesi di tale amminoacido nella sua sequenza. Le 4 regioni trascritte inoltre possono interagire tra di loro.

4.5.5.2.2 Meccanismo di regolazione Questo meccanismo di regolazione sfrutta la simultaneità tra trascrizione e traduzione nei batteri. La disponibilità del triptofano infatti determina la velocità di traduzione della sequenza leader e quali delle regioni trascritte interagiscono tra di loro.

4.5.5.2.2.1 Assenza di triptofano In assenza di triptofano lo stallo del ribosoma sul peptide leader permette il reclutamento di enzimi per tradurre i geni a valle e si forma una forcina tra le regioni 2 e 3 che non è un terminatore. Gli enzimi vengono pertanto trascritti.

4.5.5.2.2.2 Presenza di triptofano In presenza di triptofano il peptide leader viene completamente tradotto e non permette l'associazione tra le regioni 2 e 3 a causa dell'ingombro sterico del ribosoma. Si forma una struttura a forcina tra 3 e 4 che forma un sito di terminazione Rho indipendente che blocca la trascrizione. Gli enzimi non vengono pertanto trascritti.

4.6 Modifiche post-trascrizionali

4.6.1 Capping

Il capping è una modifica subita da tutti gli mRNA. Avviene prima che finisca la trascrizione, dopo che la coda della RNA polimerasi II viene fosforilata. Viene aggiunta la 7-metilguanosina *m7GppM* al 5' del trascritto primario.

4.6.1.1 Funzione

- Protegge da degradazione.
- Trasporto.
- Stabilità.
- Traduzione.
- Splicing.

4.6.1.2 Processo

1. La RNA tri-fosfatasi libera il gruppo *P* al primo nucleotide del RNA.
5'.
2. La Guanilil-trasferasi: attacca *GMP* al
3. Metiltrasferasi: aggiunge un gruppo metilico alla guanosina 7.

4.6.1.3 Riconoscimento

Il riconoscimento della base metilata avviene grazie al cap-binding complex formato da *CBP20+CBP80* che si legano ad essa nel nucleo e si dissociano nel citoplasma. Nel citoplasma vengono sostituiti da *eIF4E* (eucariotic initiator factor 4E).

4.6.1.4 Assenza del cappuccio

Se dopo la terminazione della trascrizione un mRNA non possiede un cappuccio viene degradato da un'esonucleasi trasportata lungo la coda della polimerasi.

4.6.2 Poliadenilazione

La poliadenilazione al 3' *UTR* avviene ad opera dell'enzima *poliA polimerasi*. È formata da ripetizioni di *AAUAAA*.

4.6.2.1 Funzione

La lunghezza della coda influisce sulla stabilità e sull'esportazione del RNA nel citoplasma. L'alterazione delle code causa malattie alterate.

4.6.2.2 Riconoscimento

La coda poli-A viene riconosciuta da fattori che permettono il legame con *PABP1* nel nucleo e *PABC* nel citoplasma (poli-A binding protein).

4.6.2.3 Processamento del RNA

I fattori coinvolti sono:

- *CPSF*: cleavage and polyadenylation specificity factor.
- *CstF*: cleavage stimulation factor.
- *CFIm*, *CFIIm*: cleavage factor.

CstF e *CPSF* viaggiano con la coda della RNA polimerasi e sono trasferite alla terminazione 3' quando emerge. Una volta che sono trasferite si assemblano sulle sequenze riconoscimento. Il RNA viene rotto dalla polimerasi e un enzima poli-A polimerasi *PAP* aggiunge 200 nucleotidi *A* alla terminazione. Il precursore delle addizioni è *ATP*/ Le proteine che si legano ad essa si assemblano durante la sintesi della catena.

4.6.2.4 Lunghezza della coda

La lunghezza della coda è fondamentale in molti organismi. In *Xenopus* prima della fecondazione gli RNA sono in uno stato dormiente con una coda di poli-A corta. Dopo la fecondazione si assiste a un mutevole allungamento della coda e all'attivazione della traduzione.

4.6.2.4.1 PCR poliA test *PAT* Il *PAT* è un test usato per verificare le variazioni di lunghezza di poli-A. Per farlo un primer a molte *T* viene legato alla coda. Dopo migrazione su lastra d'agarosio più lunga la coda più lenta la migrazione. La lunghezza della coda va ad influire sulla stabilità della base traduzionale.

4.6.2.5 Distrofia muscolare oculo-faringea

4.6.2.5.1 Analisi clinica La distrofia muscolare oculo-faringea colpisce tra i 40 e i 60 anni e va in lenta progressione. I sintomi sono:

- Abbassamento delle palpebre.
- Debolezza muscolare.
- Difficoltà a deglutire.
- Progressiva paralisi.

4.6.2.5.2 Analisi molecolare Attraverso microscopia sono presenti accumuli di RNA in foci del nucleo. Questo è dovuto a mutazioni nella poli-A binding protein *N* che non permette un esporto corretto del mRNA.

4.6.3 Splicing

Lo splicing è un evento di processamento del RNA che dà origine alla maggiore variabilità genetica. Un RNA trascritto negli eucarioti presenta sezioni trascritte ma non tradotte.

4.6.3.1 Caratterizzazione RNA

Il RNA viene pertanto diviso in sequenze introniche ed esoniche alternate.

4.6.3.1.1 Esoni Si intende per esoni le sequenze espresse che portano a RNA codificante.

4.6.3.1.2 Introni Si intende per introni le sequenze intercalate che producono long non coding RNA. Non codificano la proteina ma producono RNA con ruolo funzionale con attività catalitica.

4.6.3.1.3 Confini Le zone di confine tra esoni ed introni sono conservate: al 5' dell'introne si trova il sito donatore *GU*, mentre al 3' il sito *AG* accettore. In queste zone avviene la rottura del legame fosfodiesterico e possono intervenire *hnRNP*, proteine ribonucleari eterogenee che svolgono le eliche a hairpin del RNA per far leggere i segnali di splicing e identificare mRNA maturo.

4.6.3.2 Nuclear speckles

Le nuclear speckles sono i luoghi del nucleo dove avviene lo splicing.

4.6.3.3 Tipologie di introni

4.6.3.3.1 Introni auto-catalitici di gruppo I Gli introni auto-catalitici di gruppo *I* sono in grado di compiere auto-splicing. Si trovano nel genoma di mitocondri, cloroplasti e nucleari. L'attacco nucleofilo avviene da parte di una guanosina esterne in trans. Dopo il taglio avviene il secondo attacco nucleofilo e il rilascio dell'introne lineare.

4.6.3.3.1.1 Homing Si intende per homing il passaggio di un introne da un allele a un altro che non lo contiene. È un evento di trasposizione: l'introne produce una endonucleasi che riconosce i siti donatori e riceventi dell'allele e crea un taglio. Questo attiva i sistemi di riparazione del DNA che creano un appaiamento dei due alleli e l'introne viene inserito per complementarità di basi.

4.6.3.3.2 Introni del gruppo *mathbf{II}* Gli introni del gruppo *I* sono presenti nel genoma di mitocondri e plastidi delle piante. Compiono due attacchi nucleofili in trans: l'adenina interna all'introne con il gruppo *OH* che attacca e l'introne viene rimosso attraverso la formazione di una struttura a cappio.

4.6.3.3.2.1 Retro-homing Il retro-homing avviene per i trasposoni, elementi mobili all'interno del genoma: l'allele passa da un donatore a un ricevente. Contiene un *ORF* (open reading frame) che codifica per un'endonucleasi e una trascrittasi inversa. Questo taglia un filamento dell'allele ricevente, inserisce RNA e con la trascrittasi inversa copia il DNA complementare.

4.6.3.4 Trans-splicing

Il trans-splicing avviene tra RNA diversi: un RNA contiene un cap, un sito donatore e una parte intronica. Il secondo non contiene il cap, ma adenina, una sequenza ricca di pirimidine e un esone. Il gruppo *OH* di *A* va ad attaccare il sito donatore creando un taglio e rimuovendo l'introne. Il secondo attacco nucleofilo rompe il legame con l'introne e crea una struttura a *Y*. Avviene una ligazione tra i due esoni. In questo modo possono essere tradotti in maniera indipendente due RNA in 2 proteine. I due cistroni hanno la coda poli-A ma non il cap. L'aggiunta del cap o sequenze diverse con questo meccanismo permette la traduzione e introduce variabilità genetica.

4.6.3.5 Splicing del tRNA

Il tRNA contiene degli introni che vengono rimossi per permettere la formazione della struttura secondaria a trifoglio.

4.6.3.6 Spliceosomi

Lo splicing avviene normalmente all'interno delle nostre cellule attraverso spliceosomi.

4.6.3.6.1 Struttura Lo spliceosoma contiene oltre a proteina degli snRNA:

- *U1.*
- *U2.*
- *U4.*
- *U5.*
- *U6.*

Lo spliceosoma è pertanto una snRNP: small nuclear ribonucleoprotein.

4.6.3.6.2 Funzioni Lo spliceosoma:

- Permette il riconoscimento della coppia di siti di splicing tra una moltitudine di siti simili.
- Permette l'avvicinamento e il corretto posizionamento nel sito catalitico per far avvenire le due transesterificazioni correttamente.
- Il complesso *snRNA* permette il riconoscimento di siti conservati.

4.6.3.6.3 Siti di splicing I siti di splicing sono i siti in cui avviene l'attacco nucleofilo, oltre al sito accettore e donatore sono riconosciuti dallo spliceosoma:

- *ESE*: exonic splicing enhancer.
- *ESS*: exonic splicing silencer.
- *SC35*, *ASF/SF2*.
- Domini *RRM* e *RS* modulari.
- *DEXH/D box*: RNA elicasi.

Il macchinario riconosce in particolare 3 porzioni principali: sito donatore, accettore e il punto di ramificazione che forma la base con il lazo. Queste informazioni sono sequenze di nucleotidi simili.

4.6.3.6.4 Fattori coinvolti

- *Snurp snRNP*.
- *RNA binding protein*: regolano lo splicing alternativo *EXE*.
- Fattori di regolazione per la rimozione di esoni.
- *DSCAM*: esportazione dal nucleolo.

4.6.3.6.5 Meccanismo di splicing Il meccanismo di splicing coinvolge la formazione di diversi complessi che operano il processo. Idrolizza *ATP* e la rimozione di un introne coinvolge due reazioni di trasferimento di fosforile o transesterificazioni sequenziali che legano gli esoni. La complessità del processo assicura uno splicing accurato e flessibile.

1. Complesso precoce early *E*: contiene:
 - *BBP*: branching binding protein e si lega ad *A*.
 - *U2AF65*: riconosce il sito accettore poli-pirimidinico.
 - *U2AF35*: riconosce la zona di passaggio tra sito accettore ed esone.
2. Complesso *A*: *U2* rimuove *BBP* attraverso appaiamenti specifici e la sostituisce.
3. Complesso *B1*: avvicinamento alla *A* reattiva, attacco nucleofilo al sito donatore mediato da *U4-U5-U6* reclutati. Rimozione di *U2A35-65*. Piegano gli introni avvicinando il sito per l'attacco nucleofilo.
4. Complesso *B2*: rimozione di *U1* e *U6* interagisce con il sito donatore.
5. Complesso *B**: rimozione di *U4* (inibitore), *U2* interagisce con *U6* e avviene l'attacco nucleofilo tra *BPP* e *G*.
6. Complesso *C1*: esone a valle e introne a cappio, si rompe il legame con introne a struttura a cappio.
7. Complesso *C2*: avviene il secondo attacco nucleofilo, si legano i due esoni e si libera l'introne.
8. RNA maturo: vengono rimossi tutti gli *U* e si aggiungono *EJC*.

4.6.3.6.6 Exon junction complex *EJC* Gli *EJC* sono complessi proteici che marcano i punti di giunzione tra i vari esoni. La traccia lasciata permette un controllo per verificare uno splicing corretto.

4.6.3.6.7 Struttura cromatinica La struttura cromatinica influenza lo splicing: i nucleosomi tendono ad essere posizionati sugli esoni. La proteina responsabile per la loro definizione ad assemblarsi al RNA quando emerge dalla polimerasi. Cambi della struttura cromatinica possono cambiare i pattern di splicing.

4.6.3.6.7.1 Tasso di movimento IL tasso di movimento della RNA polimerasi ha effetto sul tasso di splicing: minore la velocità minore il salto di esoni.

4.6.3.6.7.2 Modifiche agli istoni Specifiche modifiche agli istoni attraggono componenti dello spliceosoma che possono essere trasferiti al RNA emergente.

4.6.3.7 Splicing alternativo

La scelta di quali introni ed esoni mantenerne nel RNA finale non è fissata ma può variare in base alle necessità della cellula. In particolare le proteine *SR* funzionano da promotori di splicing, ma possono essere bypassate in presenza di altri siti di attrazione.

4.6.3.7.1 Esempi

4.6.3.7.1.1 *caMK2* *caMK2* è una chinasi attivata da concentrazioni di Ca^{2+} e può dare origine a splicing alternativi. In particolare può causare la rimozione di una *NLS* modificando la localizzazione di una proteina e la sua funzione.

4.6. MODIFICHE POST-TRASCRIZIONALI

4.6.3.7.1.2 Gene fruitless Differenze nello splicing possono creare in *Drosophila* dei mutanti con un comportamento aberrante: non sono in grado infatti di riconoscere il sesso.

4.6.3.8 Minigeni

Si intende per minigene un frammento minimo di gene che include un esone e le regioni di controllo necessarie alla sua espressione. Forniscono un modello prezioso per valutare modelli di splicing. Sono usati come giunzione o vettori esone-trapping e agiscono come sonda per determinare i fattori importanti nei processi di splicing.

4.6.3.9 Determinazione del sesso in *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila* la determinazione del sesso dipende da un evento di splicing alternativo. In particolare *Sxl* (sex lethal) funge da regolatore dello splicing del suo stesso gene. Si lega a RNA per determinare uno splicing alternativo del gene dopo la fase precoce producendo una proteina funzionante in grado di interagire con il fattore *TRA*. In complesso con *TRA* regola lo splicing di *Dsx* e *TRA2*. In questo modo vengono disattivati i geni del differenziamento maschile. Nel maschio invece la proteina *Sxl* precoce non viene prodotta e il trascritto rimane tronco e non funziona.

4.6.4 RNA editing

Si intende per RNA editing l'alterazione delle sequenze nucleotidiche dei trascritti dopo la loro sintesi. In questo modo viene cambiata l'informazione che codificano tramite conversione di una base in un'altra, delezione o inserzione di nucleotidi. Viene svolto dall'editosoma.

4.6.4.1 Effetti

Il RNA editing può:

- Modificare la stabilità del RNA.
- Influenzare lo splicing.
- Modificare la sequenza degli amminoacidi o creare una proteina tronca.
- Trasporto di mRNA.
- Efficienza di traduzione.
- Appaiamento con microRNA e mRNA.
- Aumenta la variabilità dell'espressione genica.

4.6.4.2 Tipologie di editing

L'editing tipicamente consiste di inserzione o delezione di uracili, mRNA messaggero prodotto dalla trascrizione e inserzioni rispetto al trascritto primario.

4.6.4.3 Processo

1. Ancoraggio.
2. Taglio.
3. Inserzione o delezione.
4. Legatura.

La complementarità al 5' permette l'instaurazione di legami tra le basi con omologia errata. Interviene un endonucleasi che riconosce il mismatch inducendo un taglio nel mRNA. Dopo il taglio si aggiunge una *U* per ripristinare la complementarità o tagliando qualche nucleotide.

4.6. MODIFICHE POST-TRASCRIZIONALI

4.6.4.4 Editing da citosina a uracile

Per produrre uracile da citosina questa viene deamminata.

4.6.4.4.1 Esempi

4.6.4.4.1.1 *apoB* La proteina *apoB* si trova in due isoforme: 100 e 48. La prima regola il trasporto *LDL* e viene riconosciuta da recettori nel fegato. La seconda viene espressa nell'intestino e non riconosciuta dai recettori del fegato. L'editing avviene attraverso *APOBEC1*, una citidina deaminasi, che si lega al RNA grazie a *ACF1*, il fattore di complementazione.

4.6.4.4.2 Neurofibromatosi La neurofibromatosi è una mutazione da citidina a uridina che porta a un codone di stop e il gene *Nf1* (neurofibrina1) oncorepressore non inibisce *ras* causando una proliferazione cellulare. *NF1* normalmente lo disattiva aumentando l'idrolisi di *GTPb*, ma un suo editing inserisce un codone di stop impedendo la sua funzione.

4.6.4.5 Editing da adenosina a iosina

La iosina viene prodotta deamminando l'adenosina. Avviene a carico di *RNA binding protein*.

4.6.4.5.1 Esempi

4.6.4.5.1.1 ADAR *ADAR 1,2* (adenosina deaminasi editing on RNA) riconosce RNA a doppio filamento e localizzano nel citoplasma nucleo e nucleoli. Si trovano in due isoforme a 100 e 150kDa. Nell'uomo sono 3 e si distinguono nella regione N-terminale Sono formate da:

- Dominio catalitico per la rimozione di *NH2*.
- Domini per legame del doppio filamento.
- Dominio *Z* per legare DNA.

4.6.4.6 MicroRNA editing

Editando la sequenza del microRNA si modifica il mRNA che regola.

4.6.5 Funzioni delle modifiche

La sintesi e il processamento si svolgono in maniera ordinata, ma solo una piccola percentuale del pre-mRNA prodotto viene ulteriormente utilizzato: il resto, sintetizzato o processato erroneamente viene degradato in quanto inutile e dannoso. La distinzione tra mRNA maturo corretto ed aberrante la molecola di RNA mentre viene processata acquisisce e perde proteine. Quando le proteine presenti sulla molecola di mRNA segnalano che il processamento è completato questo viene esportato nel citosol dove viene tradotto. I restanti sono degradati dall'esosoma nucleare.

Capitolo 5

Trasporto e localizzazione di RNA

Molti mRNA vengono diretti verso regioni intracellulari specifiche prima che inizi la traduzione. Questo avviene in modo da permettere alla cellula di posizzionarli vicino ai siti in cui è necessaria la proteina codificata.

5.1 Motivi del trasporto di RNA

5.1.1 Efficienza

Il trasporto di un mRNA permette la traduzione locale da un'unica copia di molteplici proteine risparmiando energia.

5.1.2 Sicurezza

Il trasporto di un mRNA è più semplice del trasporto in quanto impedisce che le proteine interagiscano tra di loro o con l'ambiente erroneamente.

5.1.2.1 Velocità

Il trasporto di un mRNA consente cambiamenti rapidi nella concentrazione delle proteine locali.

5.1.2.2 Controllo della degradazione

Il trasporto del mRNA è un sistema utile per sottrarre il RNA stesso alla degradazione trasportandolo in un compartimento diverso.

5.2 RNA trasportati

5.2.1 RNA localizzati nel compartimento dendritico

- *CaMKII α* : *Ca*²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II, una chinasi che si occupa del trasporto del calcio.
- *MAP2*: microtubule-associated protein 2, una proteina associata ai microtubuli.
- *BDNF*: brain-derived neurotrophic factor.

5.3. MECCANISMO DI TRASPORTO

- *IP3R*: inositol triphosphate receptor, un recettore per l'inositolo.
- *β -actin*: localizzata in una zona ricca di recettori e sensori, nella parte anteriore del leading edge, permette l'attacco al substrato della zona più mobile.
- *Are*: activity regulated cytoskeleton-associated protein, proteine associate al citoscheletro.
- *FMRP*: fragile X mental retardation.
- *BC1*: brain cytoplasmatic RNA 1.
- *microRNA*.
- *Pum2*.
- *MBP*, myelin basic protein, mRNA negli ologodendrociti.

5.2.2 RNA localizzati nell'oocita di Drosophila

- Gurken nella parte apicale, il mutante assume una forma a cetriolo.
- Prospero.
- Oskar nella parte posteriore dell'oocita.
- Bicoid nella parte anteriore dell'embrione, il mutante non presenta testa.

5.2.3 Lievito

Nel lievito la localizzazione di *ASH1* gli permette di essere passato dalla cellula madre alla figlia.

5.3 Meccanismo di trasporto

5.3.1 Fattori coinvolti

5.3.1.1 Cis-acting elements

I cis-acting elements o zipcodes sono fattori che riconoscono sequenze specifiche nella 5'-UTR.

5.3.1.1.1 Esempi

- *DTE* dendrites targeting elements.
- *ALS* axon localization sequence.
- *MLS* mitochondria localization sequence.

5.3.1.2 Trans-acting factors

I trans-acting factors sono proteine che riconoscono li cis-acting elements.

5.3.1.2.1 Esempi

- Proteine motrici.
- *ZBP*: zipcode binding protein.
- *hnRNP*: heterogeneous nuclear ribonucleic protein.
- *RMRP*: fragile mental retardation protein.

5.3.1.2.2 Staufen Staufen è una RNA binding protein coinvolta nella localizzazione di Oskar nella parte posteriore dell'oocita di Drosophila e di bicoid nella parte anteriore della larva. Interagisce con RNA formando *RNP*.

5.3.1.2.2.1 *mStaufen1* *mStaufen1* è una proteina a $63kDa$ nei genitali e fegato nei mammiferi. Possiede 4 domini che legano RNA a doppio filamento ad affinità crescente e un dominio per legarsi ai microtubuli *TBD*. Viene espressa nei neuroni: il trasporto con i microtubuli la localizza nei dendriti. Contiene RNA.

5.3.1.2.2.2 *mStaufen2* *mStaufen2* localizza su un gene diverso, ha 5 domini e dal suo splicing si generano tre isoforme a 62, 59 e $52kDa$. Si trova in prossimità della sinapsi dove forma filopoli. Interagisce con l'actina.

5.3.1.2.3 Pumilio La famiglia pumilio opera un controllo traduzionale degli RNA. Possiede un dominio *PHD* pumilio homology domain che lega RNA. È generalmente espressa nel cervello e i suoi domini riconoscono sequenze specifiche di RNA. Nei mammiferi è presente Pumilio 1 e 2.

5.3.1.2.3.1 *Pum2* *Pum2* si trova associato a microtubuli polarizzati. Quando nelle cellule viene aggiunto un inibitore della traduzione, cambia la localizzazione e forma granuli di stress causando la degradazione di RNA nei processing bodies per mezzo di enzimi *DPC1*, *DPC2*.

5.3.1.2.3.2 Granuli di stress I granuli di stress sono strutture che si formano quando la cellula subisce stress. La cellula imprigiona in essi RNA e impedisce la loro traduzione in modo da risparmiare energie. Se lo stress dura poco i granuli vengono degradati, se permane vengono trasportati nei processing bodies per la degradazione.

5.3.1.2.3.3 Processing bodies I processing bodies sono regioni della cellula contenenti enzimi che rimuovono il cap *DCP1* e *DCP2*. Sono inoltre presenti ribosomi, fattori che legano il cap e fattori coinvolti nella stabilità del RNA.

Capitolo 6

Traduzione

La traduzione è il processo attraverso cui gli mRNA vengono tradotti in proteine funzionali alla cellula. Viene svolta dai ribosomi.

6.1 Ribosomi

I ribosomi sono complessi ribonucleoproteici formati da due subunità principali: la subunità maggiore e la subunità minore. Si trovano liberi nel citoplasma, attorno ai mitocondri o attaccati al reticolo endoplasmatico rugoso.

6.1.1 Struttura

Ogni subunità del ribosoma è divisa in proteine ribosomiali *LRP/LRS* large ribosomal protein e *SRP*, small ribonucleoprotein. Queste sono associate a RNA in base al peso molecolare a formar interazioni proteina-proteina e proteina-RNA. La subunità maggiore e minore hanno incontro a modifiche conformazionali per permettere il movimento dei ribosomi lungo il mRNA e permettere al tRNA di accedere ad esso.

6.1.1.1 Subunità minore

La subunità minore forma la base che si posiziona sul mRNA. Contiene una cresta.

6.1.1.1.1 Procarioti Nei procarioti la subunità minore è 30S, riconosce le sequenze del mRNA e contiene RNA 16S e 21 proteine.

6.1.1.1.2 Eucarioti Negli eucarioti la subunità minore è 40S e contiene RNA 18S e 33 proteine.

6.1.1.2 Subunità maggiore

La subunità maggiore è formata da una cresta, una protuberanza centrale e un peduncolo.

6.1.1.2.1 Procarioti Nei procarioti la subunità maggiore è 50S e contiene RNA 5S, 23S e 34 proteine.

6.1. RIBOSOMI

6.1.1.2.2 Eucarioti Negli eucarioti la subunità maggiore è $60S$, contiene RNA $5S$, $28S$, $5.8S$ e 34 proteine.

6.1.1.3 Subunità assemblate

Il ribosoma, una volta assemblato è:

- $80S$ negli eucarioti.
- $70S$ nei procarioti.

L'unione delle due subunità crea inoltre tre siti:

- *E*: sito di uscita per il rilascio di tRNA scarico.
- *P*: sito peptidico di sintesi del legame peptidico.
- *A*: sito accettore per l'entrata del tRNA.

6.1.2 Assemblaggio

L'assemblaggio dei ribosomi avviene nel nucleolo, una zona granulare del nucleo che contiene oltre 500 proteine. Da un unico precursore a RNA vengono prodotti gli rRNA $18S$, $5.8S$ e $28S$. Il processo di assemblaggio è altamente coordinato.

- Sintesi e modifica pre-rRNA.
- Interazione transitoria con proteine e snRNA.
- Assemblaggio subunità.

6.1.2.1 Processo

- Si forma il precursore $90S$: le due subunità sono insieme con fattori ribosomiali e non ribosomiali. Questi ultimi sono proteine che aiutano la formazione del ribosoma come *snRNP U3*.
- $40S$ e pre- $60S$. La successiva rimozione dei fattori non ribosomiali porta alla formazione di subunità mature.
- Il $90S$ si scinde formando le subunità pre- $40S$ e pre- $60S$.
- Le due subunità lasciano il nucleo nel citoplasma dove si dissociano.

6.1.3 rRNA

Gli rRNA sono la componente a RNA presente in maggior quantità nelle cellule. Nella subunità maggiore dei procarioti si trovano i $5S$ e $23S$, mentre negli eucarioti se ne trovano 3. Il $16S$ è presente invece nella minore dei ribosomi procarioti. Vengono trascritti dalla RNA polimerasi *I* tranne il $5S$ che viene trascritto dalla RNA polimerasi *III*.

6.1.3.1 Funzioni

- Possono interagire con proteine.
- Catalizzano la formazione del legame peptidico.
- Riconoscono il sito di inizio per la sintesi proteica.
- Funzione strutturale.

6.1. RIBOSOMI

6.1.3.2 Struttura

Gli rRNA hanno strutture conservate e permettono di identificare diverse specie. Le regioni con ruolo funzionale e biologico sono analoghe. Si trovano sia basi canoniche che modificate attraverso modifiche post-trascrizionali.

6.1.3.3 Sintesi

La sintesi degli rRNA avviene nel nucleolo, permettendo così l'assemblaggio con le proteine ribosomiali. I geni sono contenuti nella zona fibrillare del nucleolo.

6.1.4 tRNA

i tRNA sono le molecole di RNA che si occupano di trasportare un amminoacido permettendo così l'allungamento della catena peptidica in formazione.

6.1.4.1 Struttura

I tRNA presentano una struttura a trifoglio con una lunghezza tra i 70 e i 95nt.

- Braccio accettore: trasporta l'amminoacido, ha un *AAC* terminale dove questo si attacca.
- Braccio *D* contiene la diidrouridina.
- Braccio dell'anticodone: permette il riconoscimento del codone.
- Braccio *TYC* con pseudouridina, forma un ansa e possiede molte modifiche post-trascrizionali.

6.1.4.2 Notazione

6.1.4.2.1 tRNA scarico

$tRNA^{aa}$

6.1.4.2.2 tRNA carico

$aatRNA^{aa}$

6.1.4.3 Caricamento

Il caricamento avviene ad opera dell'enzima amminoacil-tRNA sintetasi. Questo è specifico per ogni amminoacido e possiede tre siti per il legame con:

- *ATP*.
- Amminoacido.
- tRNA.

La forma dei siti di legame stabilisce la specificità dell'interazione. L'idrolisi di *ATP* con liberazione di pirofosfato causa un trasferimento del gruppo adenilato dell'amminoacido. Si forma così l'amminoacido adenilato. Successivamente viene catalizzato il legame tra l'amminoacido adenilato e il gruppo 3' *AAC* del tRNA. Si forma pertanto un amminoacil tRNA con liberazione di *AMP*.

6.1.4.3.1 Controllo del caricamento La specificità del processo è assicurata dal fatto che l'enzima contiene due regioni selezionatrici. La selezione avviene per dimensioni, con tolleranze ridotte nella seconda. Gli amminoacidi sbagliati vengono rimossi.

6.2 Fasi della traduzione

6.2.1 Inizio

L'inizio della traduzione è la fase più lunga: avvengono i meccanismi di regolazione. Si riconosce inoltre *AUG* da parte della subunità minore grazie alle regioni di Shine Dalgarno o di Kozak. Dopo che il ribosoma ha scansionato il mRNA e trovato le sequenze inizia l'assemblamento per dare inizio al processo. La subunità 16S riconosce la sequenza complementare, assembla la subunità maggiore e permette l'inizio.

6.2.1.1 Procariori

Nei procarioti la sintesi proteica avviene in concomitanza con la trascrizione.

6.2.1.1.1 Fattori coinvolti I fattori coinvolti sono detti initiator factors come:

- *IF1*.
- *IF2*.
- *IF3*.

6.2.1.1.2 Processo

1. *IF1* e *IF3* si posizionano nella cavità *P* ed *A* impedendo un legame precoce delle subunità.
2. Sul sito *E* viene reclutato un complesso con *IF2* e *GTP*.
3. *IF2* recluta *mettRNA^{met}* e mRNA.
4. Si forma il complesso di inizio 30S formato da mRNA, subunità minore, tRNA con metionina formilata, *GTP* e *IF2*.
5. La rimozione dei fattori *IF1* e *IF3* permette il reclutamento della subunità maggiore e la formazione del ribosoma.
6. *IF2* viene rimosso attraverso idrolisi di *GTP* rilasciando il tRNA carico pronto per iniziare la traduzione.
7. Questo è il complesso 70S.

Si nota come la metionina caricata è formilata: viene aggiunto un gruppo aldeidico attraverso la metionil-tRNA trasformilasi.

6.2.1.2 Eucarioti

Si nota come negli eucarioti il mRNA possiede un cap che rende la fase di inizio più complessa.

6.2.1.2.1 Fattori coinvolti I fattori coinvolti o eucariotic initiator factor sono:

- *eIF4E*: riconoscimento del cap.
- *eIF4A*.
- *eIF4F*: composto da *4E* e *4F*.

6.2.1.2.2 Processo

1. Si forma il complesso 43S con *mettRNA^{met}*, *eIF2* e *GTP*, subunità minore, mRNA e *eIF4G/E*.
2. *eIF4B* possiede un dominio elicastico che
3. Il complesso *RNAeIF4F+eIF4B* si lega al 43S formando il complesso di inizio 48S.
4. Il complesso 48S scansiona il mRNA fino

risolve strutture secondarie nel mRNA.

6.2. FASI DELLA TRADUZIONE

alla sequenza di Kozak.

6. Si liberano i fattori *eIF3*, avviene idrolisi di *GTP* con liberazione di *eIF2*.

5. Inizia la traduzione con il riconoscimento di *ATG*.

7. Viene recitata la subunità maggiore, si forma il complesso di inizio 80S.

Il mRNA forma un loop e la coda poli-A recluta *PABP* (poli-A binding protein) che interagisce con l'estremità 5' rendendola più stabile.

6.2.1.2.3 Processamento del mRNA Il mRNA processato forma punti di legame per i fattori di inizio.

6.2.1.2.3.1 Cap Al cap si legano i fattori *eIF4A-E-G*. Il legame diretto avviene con *eIF4E* che sostituisce la cap binding protein 8020. *eIF4G* ha ruolo strutturale, mentre *eIF4A* è un elicasi con un dominio *DEAD obox* con attività elicasi. *eIF4B* attiva l'elicasi.

6.2.1.3 IRES

La sequenza *IRES* è una sequenza di inizio alternativo. Compete con le sequenze di Shine Dalgarno o Kozak per il legame del ribosoma. Può avere un'efficienza minore rispetto alla traduzione cap-dipendente e viene utilizzata da RNA virali o per risposta a condizioni di stress cellulare.

6.2.2 Allungamento

L'allungamento è la fase successiva all'inizio. In questa fase viene prodotta la catena peptidica.

6.2.2.1 Condizione di partenza

Dopo l'inizio sul ribosoma si trova *mettRNA^{met}* nel sito *P*, mentre il sito *A* ed *E* sono vuoti.

6.2.2.2 Arrivo di un tRNA

Quando arriva il tRNA successivo si forma il legame peptidico con il trasferimento del polipeptide nascente dal sito *P* al sito *A* dopo la formazione del legame mediato dal rRNA. La subunità maggiore si sposta di tre nucleotidi a causa della formazione del legame. La subunità minore invece si sposta grazie a fattori di traslocazione che idrolizzano *GTP*. Il tRNA che si trovava in *P* si trova ora in *E* e una nuova tripletta libera si trova in *A*.

6.2.2.2.1 Riconoscimento del tRNA L'amminoacido corretto viene riconosciuto dai fattori *EF1,2,3* (elongation factors) che si associano ai tRNA carico.

6.2.2.2.1.1 Appaiamento corretto Un appaiamento corretto induce idrolisi di *GTP* con il rilascio dei fattori. Il tRNA può pertanto rimanere all'interno del ribosoma. La proteina coinvolta è *EF-Tu*.

6.2.2.2.1.2 Appaiamento scorretto Se non avviene l'idrolisi si riconosce un legame scorretto e il fattore *EF*, ancora attaccato al tRNA lo fa uscire dal ribosoma.

6.3. INIBITORI DELLA SINTESI PROTEICA

6.2.2.2.2 Formazione del legame peptidico La formazione del legame peptidico comporta l'attacco del NH_2 al $COOH$ nel sito P con rilascio di H_2O . Durante questa reazione si rompe il legame tra amminoacido e tRNA.

6.2.2.3 Dopo la formazione del legame peptidico

// Dopo la formazione del legame peptidico che determina lo shift della subunità maggiore il sito peptidico è vuoto. L'idrolisi di GTP determina lo shift della subunità minore. Il processo avviene grazie a $EF-G$.

6.2.2.4 Proteina nascente

La proteina esce dal ribosoma con una struttura lineare: non assume strutture secondarie o terziarie in quanto potrebbe bloccare tutto il sistema per le sue dimensioni. Si trova un canale nella subunità maggiore del ribosoma che ne permette l'uscita.

6.2.3 Terminazione

La terminazione avviene quando il ribosoma trova sul mRNA una sequenza di stop:

- UAA .
- UAG .
- UGA .

Proteine dette fattori di rilascio che attraverso mimetismo molecolare mimano un tRNA catalizzando la rottura del legame peptidico e il rilascio del peptide neosintetizzato.

6.3 Inibitori della sintesi proteica

- $EGTA$: agente chelante ioni calcio, tende a dissociare le due subunità.
- CLicloesimide: antibiotico che stabilizza il legame tra ribosomi e RNA.
- Puromicina: antibiotico.
- Sostanze che bloccano il movimento del ribosoma durante la sintesi.

Capitolo 7

Segnalazione cellulare: trasduzione del segnale

7.1 Panoramica

Le cellule devono essere in grado di comunicare tra di loro in modo da presentare una risposta coordinata ad eventi esterni. Devono inoltre poter trasportare all'interno questi segnali in modo da produrre la risposta desiderata. L'insieme di eventi che porta una cellula a generare una risposta in base a un segnale extracellulare viene detto trasduzione del segnale.

7.1.1 Tipologie di risposte

7.1.1.1 Risposta lenta

La risposta lenta avviene quando il segnale provoca sintesi proteica o modifiche di trascrizione.

7.1.1.2 Risposta veloce

La risposta è veloce quando il segnale provoca modifiche post-traduzionali a proteine già sintetizzate.

7.2 Modelli di comunicazione delle cellule

Le cellule possono comunicare tra di loro in molti modi.

7.2.1 Comunicazione contatto dipendente

La comunicazione contatto dipendente avviene tra due cellule che si trovano in contatto fisico. Questo contatto è mediato da recettori di membrana con un meccanismo a chiave-serratura.

7.2.2 Comunicazione paracrina

La comunicazione paracrina permette la comunicazione tra cellule lontane: una cellula diffonde un segnale all'esterno. La molecola segnale rilasciata nell'ambiente viene riconosciuta da cellule con

7.2. MODELLI DI COMUNICAZIONE DELLE CELLULE

recettori specifici per il segnale. La distanza che la molecola può raggiungere dipende dalla permissività dell'ambiente, ma rimane minore rispetto alla comunicazione endocrina e maggiore rispetto alla sinaptica.

7.2.3 Comunicazione sinaptica

La comunicazione sinaptica è specifica per i neuroni. Il contatto avviene tra due cellule nervose o tra una cellula nervosa e una ghiandola o un muscolo. Il meccanismo è veloce in quanto le cellule si trovano vicine. Gli assoni permettono alle cellule nervose di entrare in contatto con cellule a grandi distanze.

7.2.4 Comunicazione endocrina

La comunicazione endocrina avviene grazie a ormoni immessi nel sistema circolatorio. Questi sono rilasciati in piccole quantità in quanto i recettori sono molto sensibili.

7.2.4.1 Confronto con comunicazione sinaptica

Tabella 7.1: Confronto tra comunicazione sinaptica ed endocrina

Comunicazione sinaptica	Comunicazione endocrina
Più veloce grazie alla distanza ridotta tra le cellule	Più lenta in quanto le ghiandole possono trovarsi a distanza notevoli
Il neurotrasmettitore è presente in concentrazioni più elevate	Gli ormoni si trovano in basse concentrazioni
Causa affaticamento a causa della grande produzione di neurotrasmettitori	Non va incontro ad affaticamento
I recettori sono poco affini alla molecola compensando la grande produzione di neurotrasmettitore	I recettori sono molto specifici e sensibili, permettendo una bassa produzione dell'ormone

7.2.5 Comunicazione tramite gap-junction

Le gap-junction sono giunzioni che mettono in comunicazione due cellule vicine in modo diretto. Ci sono proteine che creano un ponte tra le cellule che permette la condivisione di elementi citoplasmatici e piccole molecole come correnti ioniche. I gap sono delimitati da connessine.

7.2.5.1 Connexine

Le connexine sono strutture monomeriche che si associano in 6 formando un connessone.

7.2.5.1.1 Canali Due connessioni formano un canale che può essere omotipico se formato dalle stesse connessine o eterotipico, se formato da connessine eterogenee.

7.2.5.2 Chiusura del canale

Il canale può essere chiuso quando una delle due cellule va incontro ad apoptosi, andando così a impedire al fattore che ha scatenato l'evento di passare all'altra cellula. Altri fattori di chiusura del canale possono essere un abbassamento del pH o un aumento degli ioni calcio.

7.3 Trasmissione sinaptica

La trasmissione sinaptica è una delle trasmissioni che produce una risposta più velocemente. È legata al rilascio di neurotrasmettitori a livello della terminazione sinaptica. Nello spazio intersinaptico il neurotrasmettitore si lega a un recettore che attiva una risposta cellulare. Nella fibra sinaptica si formano vescicole contenenti il neurotrasmettitore. La vescicola si fonde alla membrana a causa ad un aumento dei livelli di calcio causati da un potenziale elettrico causando il rilascio del neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico. La membrana post-sinaptica contiene dei recettori per tale neurotrasmettitore che andranno ad attivare un pathway di trasduzione.

7.3.1 Acetilcolina

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore alla base di segnali che causano contrazione muscolare o il rilascio di sostanze da ghiandole.

7.3.1.1 Processo di segnalazione

1. L'enzima *acetyl CoA* aggiunge un gruppo acetile alla colina producendo acetilcolina. La colina viene introdotta nella cellula grazie ad un co-trasporto guidato dal gradiente di sodio.
2. L'acetilcolina viene pompata all'interno di vescicole.
3. Le vescicole vengono rilasciate dal neurone nell'ambiente extracellulare.
4. L'acetilcolina si lega a un recettore dando inizio alla trasduzione del segnale.
5. L'acetilcolina viene scissa in colina attraverso l'acetilcolinesterasi che viene reimportata nella cellula nervosa.

7.3.1.2 Miastenia gravis

La miastenia gravis è una malattia autoimmune in cui il sistema immunitario produce anticorpi contro i recettori dell'acetilcolina. Questo causa una contrazione debole dei muscoli o una sua assenza. Farmaci che contrastano la malattia vanno a bloccare l'acetilcolinesterasi. Questi bloccano il riciclo dell'acetilcolina che può agire per più tempo.

7.4 Recettori

I recettori sono molecole presenti sulla membrana delle cellule, tipicamente proteine, responsabili della ricezione dei segnali extracellulari. Quando ricevono il segnale vengono attivati e attivano il processo di trasduzione del segnale.

7.4.1 Canali ionici

I canali ionici o ionotropici sono canali di membrana che mediano risposte molto rapide. All'arrivo del segnale questo si lega al recettore che cambia conformazione aprendo il canale. Il canale permette l'entrata di ioni che possono cambiare il potenziale di membrana.

7.4.1.1 Esempi

7.4.1.1.1 Cervello

7.5. MESSAGGERI

- Recettore per il glutammato.
- *GABA*.
- *CNS*.

7.4.1.1.2 Muscoli

- Recettori per l'acetilcolina.
- Recettore nicotinico.

7.4.1.2 Recettore nicotinico

Il recettore nicotinico è un recettore canale che si apre o chiude permettendo un passaggio dello ione sodio. Spesso la nicotina è la molecola target.

7.4.2 Recettori di superficie collegati a proteina *G*

I recettori di superficie collegati a proteine *G* sono recettori di tipo muscarinico o legati a proteine *G* trimeriche.

7.4.2.1 Recettore muscarinico

Il recettore muscarinico non è un canale ma un recettore composto da 7 domini di membrana e una porzione citoplasmatica. Il segnale dà origine a una serie di messaggi per la trasduzione di membrana. Attiva i messaggeri metabotropici come *cAMP* e *IP3* e le proteine *G* trimeriche.

7.4.3 Recettori di superficie collegati ad enzimi

I recettori di superficie collegati ad enzimi sono recettori che quando legano la molecola specifica vanno ad attivare la loro componente enzimatica dando il via al pathway di segnalazione intracellulare.

7.5 Messaggeri

Si intende per messaggeri le molecole di segnalazione extracellulare.

7.5.1 Ossido di azoto

L'ossido di azoto è una molecola segnale che si trova nel sistema nervoso, muscolare e in altre tipologie di cellule.

7.5.1.1 Effetto sulla muscolatura

L'ossido di azoto va ad agire sulla muscolatura che riveste le cellule endoteliali che delimitano i vasi sanguigni causandone la dilatazione o contrazione.

7.5.1.1.1 Processo

1. La cellula rilascia acetilcolina.
2. L'acetilcolina si lega alla membrana della cellula endoteliale e dà origine a una serie di cascate di segnale che sintetizzano *NO*.
3. L'ossido di azoto prodotto diffonde e agisce sulle cellule muscolari.
4. *NO* nella cellula muscolare attiva un enzima che aumenta il *cGMP*.

7.6. MOLECULAR SWITCHES

5. L'aumento di *cGMP* determina il miglioramento dell'afflusso di sangue al cuore.
lassamento e la vasodilatazione favorendo

7.5.1.1.2 Viagra Il Viagra inibisce l'enzima che produce *GTP* aumentando i valori di *cGMP* causando una vasodilatazione favorendo l'afflusso di sangue. Inibisce l'enzima che degrada *cGMP*.

7.5.2 Ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei vengono prodotti a partire dal colesterolo. L'interazione dell'ormone con il recettore causa la trascrizione e traduzione di fattori specifici.

7.5.3 Messaggeri secondari

Si dicono messaggeri secondari le molecole di segnalazione intracellulari. Sono prodotti in seguito all'attivazione di una certa cascata di segnale e trasmettono i segnali ricevuti dai recettori di superficie all'interno della cellula. Vengono attivati in maniera rapida in seguito di una trasduzione del segnale. Vengono rimossi rapidamente quando il segnale viene interrotto.

7.5.3.1 Esempi

- *cAMP*.
- *cGMP*.
- *IP3*, inositolo-3-fosfato prodotto da un'epide di membrana.

7.6 Molecular switches

I molecular switches sono molecole che vengono attivate o disattivate durante la trasduzione del segnale.

7.6.1 Tipologie

7.6.1.1 Molecole sensibili alle fosforilazione

Le molecole sensibili alla fosforilazione vengono attivate tramite fosforilazione andando a trasdurre e attivare altre componenti. La disattivazione avviene attraverso defosforilazione. Le chinasi aggiungono il gruppo fosfato mentre le fosfatasi lo rimuovono. La cascata di segnale attiva una delle due, determinando il destino della molecola.

7.6.1.2 Molecole legate all'idrolisi di *GTP*

Le molecole legate all'idrolisi di *GTP* vengono dette *GTP binding proteins* Quando sono attive presentano legato *GTP*, mentre quando disattive legano *GDP*.

7.6.1.2.1 Processo di attivazione

- All'arrivo del segnale la molecola lega *GTP* e passa ad uno stato attivo.
- La molecola si disattiva quando idrolizza il *GTP* in *GDP*.

Si nota come l'idrolisi del *GTP* è molto rapida, pertanto la disattivazione è un processo molto veloce.

7.6.1.2.2 Fattori coinvolti In molti casi cofattori o proteine regolatrici regolano il legame con *GTP* e la sua idrolisi. I cofattori vengono pertanto attivati o disattivati durante una cascata di segnale, favorendo il rispettivo processo.

7.6.1.2.2.1 GEF Le proteine *GEF* o fattori di separazione del nucleotide guaninico promuovono il distacco del *GDP* e il legame con *GTP*. Velocizzano l'attivazione.

7.6.1.2.2.2 GAP Le proteine *GAP* o proteine di attivazione di *GTPasi* promuovono l'idrolisi di *GTP*. Velocizzano l'inattivazione.

7.6.1.2.3 Esempi Le molecole che legano *GTP* sono coinvolte in molti pathway chiave come mitosi o motilità. Possono determinare inoltre il grado di dinamicità della cellula e la direzione del suo spostamento.

7.6.1.2.3.1 Famiglia Rho Le proteine della famiglia *Rho* sono *GTPasi* monomeriche. Sono associate con il citoscheletro di cui regolano lunghezza e organizzazione, determinando così il movimento in una direzione specifica. I segnali extracellulari governano la loro attività determinando la direzione del movimento. I segnali si legano a diversi recettori che convergono sulle proteine *Rho* all'interno della cellula. Possiedono diversi domini di interazione per la trasduzione del segnale:

- *SH1*: domini di omologia *Src2*, steroid receptor coactivator.
- *SH3*, domini di omologia a *Scr3*.
- Domini di legame alla fosfotirosina.
- Domini *PH* di omologia alla pleckstrina.

7.6.1.2.3.2 Famiglia Ras Le proteine della famiglia *Ras* sono regolate da *GTP*. Il legame con *GTP* causa un cambio conformazionale che permette l'interazione con un'altra proteina. Le molecole *Ras-GAP* promuovono l'idrolisi del *GTP* portando le molecole in una forma inattiva.

7.6.2 Proteine G trimeriche

Le proteine *G* trimeriche sono un esempio di proteine che legano *GTP*.

7.6.2.1 Recettori

I recettori associati a proteine *G* trimeriche sono i recettori di superficie più presenti. Mediano la maggior parte dei segnali proveniente dall'ambiente extracellulare. Mediano per esempio i segnali del sistema olfattivo e visivo.

7.6.2.1.1 Struttura Sono formati da una singola catena polipeptidica che attraversa il doppio strato lipidico 7 volte formando una struttura cilindrica. Questa struttura contiene un sito di legame centrale per il ligando. La proteina *G* trasduce il segnale, che contiene una parte *N*-terminale extracellulare che viene legata dalla molecola di segnale e una parte *C*-terminale che subisce modifiche in base alla presenza di tale molecola determinando la cascata di segnale.

7.6.2.1.2 Recettore muscarinico Il recettore muscarinico possiede un dominio citoplasmatico capace di attivare le proteine *G* trimeriche a cui è associato. Mutazioni in questi siti determinano un blocco della trasduzione del segnale o una sua alterazione.

7.6.2.2 Struttura

Le proteine G trimeriche possono essere associate al recettore stabilmente o essere reclutate ad esso quando questo viene attivato. Ci sono varie tipologie specifiche per i recettori e le proteine bersaglio, ma tutte presentano una struttura simile.

7.6.2.2.1 Subunità

- Subunità α : lega GTP e GDP , associata alla membrana.
- Subunità γ : associata alla membrana.
- Subunità β : non associata alla membrana.

7.6.2.2.1.1 Stato non stimolato Quando la proteina non è attivata la subunità α lega GDP e la proteina è inattiva. Interagisce con la membrana attraverso le subunità α e γ .

7.6.2.2.1.2 Stato stimolato Il legame di α con GTP determina un cambio conformazionale di α che determina il rilascio della proteina G dal recettore. Il rilascio promuove la dissociazione di α da γ e β .

7.6.2.3 Attivazione

Nello stato inattivo iniziale si trova il recettore legato alla proteina G che lega il GDP . A questo punto l'acetilcolina viene rilasciata e lega il recettore. Questo determina un cambio conformazionale della porzione citoplasmatica del recettore che permette il reclutamento e l'interazione del recettore con la proteina G trimetrica. Dopo l'interazione viene favorito lo scambio di GDP con GTP . La proteina G cambia conformazione e avviene il distacco di β e γ da α , permettendo l'interazione con altre molecole. La subunità α può interagire con la proteina target effettore attivandola.

7.6.2.4 Disattivazione

La disattivazione avviene con l'idrolisi di GTP in GDP . La subunità α non è più in grado di interagire con l'effettore. Questo favorisce l'interazione tra α , β e γ e la ricostituzione della proteina G trimerica inattiva.

7.6.2.5 Effettori

Si intende per effettore la molecola che viene attivata dalla proteina G trimerica. Sono tipicamente enzimi che producono $cAMP$ o $cGMP$, rispettivamente adenilatociclasti e guanilatociclasti. In particolare GRK fosforila il recettore che legato da arrestina viene disattivato favorendo la sua endocitosi.

7.6.2.5.1 AMP ciclico cAMP La cascata di segnalazione di alcune proteine G coinvolge la produzione di $cAMP$. Questo messaggero secondario viene prodotto e degradato molto velocemente, permettendo variazioni rapide nella risposta.

7.6.2.5.1.1 Sintesi La sintesi avviene attraverso la proteina di membrana adenilato ciclasti, che trasforma ATP in $cAMP$. In particolare tutti i recettori che agiscono tramite $cAMP$ sono legati da una proteina G stimolatrice G_s .

7.7. REGOLAZIONE DI UN RECETTORE

7.6.2.5.1.2 Degradazione Tutti i segnali che riducono i livelli di *cAMP* lo fanno attivando una proteina *G* inibitrice *Gi* che inibisce l'adenilato ciclasi. La degradazione avviene attraverso l'adenilato ciclasi fosfodiesterasi che idrolizza il *cAMP* in adenosina 5' fosfato 5'-*AMP*.

7.6.2.5.1.3 *Gs* e *Gi* sono bersaglio di tossine batteriche Alcune tossine batteriche possono inibire il normale spegnimento della proteina *G* andando a bloccare la sua attività *GTPasica*. La subunità α rimane pertanto costantemente attivata, mantenendo pertanto attive le vie a valle anche in assenza del segnale esterno iper-attivando così fattori.

7.6.2.5.1.4 Colera Nelle cellule epiteliali intestinali la tossina del colera blocca la proteina *G α* legata a *GTP*, andando a bloccare la sua idrolisi. Le cellule continuano così ad avere proteine *G* attive e a produrre grandi quantità di *cAMP*. Questo causa uno squilibrio osmotico portando a il rilascio di ioni Na^+ e di acqua nell'intestino. L'organismo perde acqua e va incontro a disidratazione con squilibrio degli elettroliti.

7.6.2.6 Modulazione di un effettore

Quando un recettore è iper-stimolato vengono attivati meccanismi che permettono di bloccare la traduzione del segnale attraverso una proteina come *CRK*. Questa fosforila la parte citoplasmatica del recettore inattivandolo. Dopo la fosforilazione il recettore viene riconosciuto da una proteina *Resti* che si lega ad esso e impedisce la sua interazione con la proteina *G* trimerica che pertanto non viene attivata e non trasduce il segnale.

7.7 Regolazione di un recettore

Le cellule possono regolare la loro sensibilità al segnale in base a diversi meccanismi:

- Sequestro del recettore mediante endocitosi, l'assenza di degradazione permette un ripristino rapido della sensibilità, inoltre un recettore endocitato può continuare a inviare il segnale.
- Down-regulation: questo processo avviene attraverso degradazione.
- Inattivazione del recettore diretta.
- Inattivazione indiretta del recettore.
- Produzione di proteine inibitorie che agiscono sugli effettori.

L'adattamento ai segnali delle cellule permette ad esse di rispondere a variazioni di concentrazioni di un ligando in un ambito molto vasto di sue concentrazioni.

7.7.1 Esempio

L'ormone tiroideo stimolante, l'ormone adrenocortico tropico, l'adrenalina e il glucagone determina un'attivazione della proteina *G*.

7.7.1.1 *PKA*

cAMP si lega e attiva la chinasi *PKA*, composta da 2 subunità regolatorie e due catalitiche è una chinasi dipendente da *cAMP*. Regola l'attività di proteine bersaglio, segnali o effettori.

7.8. INOSITOLO 3 FOSFATO

7.7.1.1.1 Stato inattivo Nello stato inattivo *PKA* è formata da due subunità catalitiche e due regolatrici.

7.7.1.1.2 Stato attivo Affinchè *PKA* venga attivata ciascuna subunità regolatoria lega due *cAMP*. Questo determina un loro cambio conformazionale e il distacco delle subunità catalitiche che, attive possono fosforilare proteine nel citoplasma o andare nel nucleo fosforilando fattori trascrizionali per la trascrizione di geni specifici.

7.7.1.2 CREB

CREB è una proteina legante *CRE*, legata da *cAMP*. Il messaggero lega la sequenza *CRE* o *cAMP* responsive element. Quando fosforilata *CREB* viene legata da *CBP* (*CREB* binding protein) formando un complesso trascrizionalmente attivo. Il complesso lega agli elementi *CRE*, una sequenza promotrice attivata da *cAMP*. Si nota come è un fattore trascrizionale.

7.7.2 Vie attivate da cAMP

Una delle vie attivate da *cAMP* è quella della mobilitazione di glucosio nel sangue. Lo zucchero viene accumulato sotto forma di glicogeno e quando necessario viene scisso nel sangue.

7.7.2.1 Ormoni coinvolti

- Insulina: rimuove glucosio e favorisce la produzione di glicogeno.
- Glucagone: scinde il glicogeno rilasciando il glucosio nel sangue.

7.7.2.2 Via di segnalazione

Il glucosio e l'adrenalina portano all'attivazione della proteina *G* che determina aumenti nei livelli di *cAMP* e l'attivazione di *PKA* nel citoplasma che una volta attivata:

- Fosforila la glicogeno sintetasi che blocca la sintesi di glicogeno quando fosforilata.
- Fosforila la fosforilasi chinasi che attiva la glicogeno fosforilasi, l'enzima che degrada il glicogeno liberando glucosio.

7.8 Inositolo 3 fosfato

7.8.1 Sintesi

L'inositolo 3 fosfato *IP3* viene prodotto a partire dal fosfatidil inositolo, un lipide di membrana che subisce due fosforilazioni:

- Fosfatidil inositolo chinasi *P* che usa *ATP* producendo *Inositolo 4 fosfato*.
- Fosfatidil inositolo fosfato chinasi *PIP* che usa *ATP* producendo *inositolo 4, 5 difosfato*.

Una volta fosforilato viene tagliato ad opera della fosfolipasi *C*, che viene attivata a seguito di stimolazioni ormonali. Vengono pertanto prodotti *inositolo 1, 4, 5 trifosfato* e diaclicerolo. Vengono pertanto rilasciati due messaggeri secondari:

7.8. INOSITOLO 3 FOSFATO

- *IP3*: viene liberato nel citoplasma e agisce a livello del reticolo endoplasmatico.
- Diaglicerolo: rimane nella membrana e può reclutare fattori dal citoplasma della membrana attivandoli, attiva la proteina chinasi *C PKC*, eicosanoidi e Ca^{2+} .

7.8.2 Caratteristiche

Il *IP3* è una molecola solubile in acqua e quando lascia la membrana plasmatica si diffonde rapidamente nel citosol. Raggiunge la membrana del reticolo endoplasmatico e apre i canali del Ca^{2+} . L'aumento della concentrazione di calcio causa una propagazione del segnale che viene rapidamente inattivato mediante defosforilazione ad opera di fosfatasi. Il calcio è rapidamente riassorbito dal citoplasma.

7.8.3 Diaglicerolo

Il diaglicerolo rimane immerso nella membrana plasmatica con funzione di segnalazione. Attiva la proteina chinasi *C PKC* calcio dipendente. L'aumento di calcio nel citosol causa la traslocazione di *PKC* dal citosol alla membrana dove viene attivata e fosforila la proteina bersaglio. Il diaglicerolo può anche essere usato nella sintesi di eicosanoidi: molecole di segnalazione lipidiche che partecipano a risposte infiammatorie.

7.8.4 Calcio

Il calcio è uno dei messaggeri secondari presenti in minor quantità nella cellula $10^{-7}M$. Questo avviene in quanto è un mediatore di segnalazione molto efficace e viene accumulato nel reticolo endoplasmatico liscio, nei mitocondri e nell'ambiente extracellulare con concentrazione maggiore.

7.8.4.1 Mantenimento dei bassi livelli di calcio

La concentrazione degli ioni calcio viene mantenuta bassa attraverso sistemi sia passivi che attivi. Il calcio viene spostato verso l'esterno della cellula o in compartimenti intracellulari attraverso:

- Antiporto Na^+/Ca^{2+} : nelle cellule nervose e muscolari, dove si accoppia l'afflusso di calcio all'ingresso di sodio.
- Pompa del Ca^{2+} : canali *ATP*-dipendenti che pompano ioni calcio fuori dal citosol.

7.8.4.2 Meccanismo di compartimentazione

La cellula utilizza delle pompe per pompare il calcio nel reticolo endoplasmatico contro un gradiente molto elevato. Se si accumula tanto ione nel compartimento, quando lo si apre esce molto rapidamente, permettendo un aumento rapido di concentrazioni e un rapido sequestro.

7.8.4.3 Utilizzi

7.8.4.3.1 Fecondazione Quando lo spermatozoo raggiunge una cellula uovo si ha la fusione tra la sua membrana e la membrana della cellula uovo. Per prevenire l'ingresso di altri spermatozoi, la membrana della cellula si ispessisce in modo da impedire l'ingresso di altri spermatozoi. Questo avviene grazie al calcio: viene rilasciata un'onda di calcio che percorre l'uovo fino al sito di ingresso dello spermatozoo.

7.8. INOSITOLO 3 FOSFATO

7.8.4.3.2 Sistema nervoso La cellula neuronale sequestra e secerne ioni calcio in maniera molto rapida e coordinata.

7.8.4.4 Calmodulina

La calmodulina è una proteina che si lega al calcio per trasmettere il segnale: è un recettore intracellulare di Ca^{2+} . Si trova in tutte le cellule eucariote. Una volta attivata agisce legando altre proteine attivandole come la *CaMkII* o chinasi calcio dipendente.

7.8.4.4.1 Struttura La calmodulina è una catena polipeptidica con 4 siti di legame ad alta affinità per lo ione calcio. Viene attivata dal legame con esso subendo un cambiamento conformazionale. La conformazione attiva viene assunta dopo il legame di due ioni.

7.8.4.4.2 Legame con il calcio Quando la calmodulina si lega con il calcio la molecola attivata si lega alla proteina bersaglio cambiando conformazione. Le due estremità si avvicinano entrando in contatto. Le due subunità adiacenti sono in grado di autofosforilarsi prolungando l'attività della proteina oltre il segnale del calcio. L'enzima mantiene la sua attività fino all'intervento di una fosfatasi.

7.8.5 Recettori del sistema olfattivo

I neuroni olfattori con un unico dendrita presentano ciglia immerse in un muco. Gli odori si dissolvono in esso e glomeruli olfattori li percepiscono. La trasduzione del segnale viene attivata grazie alla presenza di una molecola che si lega ai recettori olfattivi di tipo muscarinico sulla membrana epiteliale del naso.

7.8.5.1 Funzionamento dei recettori

I recettori agiscono tramite *cAMP*.

- Quando stimolati dagli odori i recettori legano una proteina *G* specifica.
- Il cambio di conformazione dei recettori attiva la proteina *G*.
- La proteina *G* attiva l'adenilato ciclasi.
- L'aumento dei livelli di *cAMP* causa un apertura dei canali sodio.
- Il sodio entra causando un aumento del potenziale di membrana.
- La depolarizzazione della cellula causa una propagazione dell'informazione al sistema nervoso.

7.8.6 Recettori del sistema visivo

Il sistema visivo viene usato per studiare i meccanismi dell'accrescimento delle cellule nervose e di come riescano a raggiungere il loro target. Studiato negli anfibi e nei bassi vertebrati che presentano occhi molto grandi, un sistema nervoso più semplice e la capacità di rigenerare le cellule della retina.

7.8.6.1 Funzionamento dell'occhio

L'occhio funziona come una camera oscura. Davanti si trova una lente detta cristallino. Quando un'immagine attraversa il cristallino viene capovolta e il cervello la elabora attraverso un sistema di proiezioni topografiche.

7.8.6.1.1 Retina La retina può essere divisa in una sezione nasale, una temporale, una ventrale e una dorsale. L'immagine si proietta lungo la retina nelle quattro sezioni. Ogni posizione spaziale viene vista da una diversa posizione della retina, connessa mediante il nervo ottico ad una diversa posizione del tetto ottico. Le cellule della retina che si trovano nella parte ventrale inferiore si legano con la parte superiore del tetto o corteccia visiva, mentre quelle della parte superiore le trasferisce nella parte inferiore. In questo modo l'immagine viene riproiettata in maniera corretta a livello del sistema nervoso.

7.8.6.1.2 Visione stereoscopica dei mammiferi Nei mammiferi l'occhio sinistro invia informazioni sia alla parte sinistra che alla parte destra del cervello.

7.8.6.1.3 Embrione di pollo Nell'embrione del pollo l'occhio è una struttura molto grande e facilmente manipolabile. Il tetto ottico è la parte deputata a ricevere informazioni in campo visivo. È possibile evidenziare l'embrione a diversi stadi dello sviluppo e osservare il sistema nervoso.

7.8.6.1.4 Zebrafish Lo zebrafish è il modello utilizzato per lo studio della visione. È analogo agli anfibi: cellule della retina creano sinapsi con la parte controlaterale del sistema nervoso. Per studiare cosa un pesce è in grado di vedere si utilizza un approccio istologico attraverso una sezione dell'occhio o un approccio di valutazione della sua pigmentazione: i melanofori sono collegati alla vista e permette al pesce di mimetizzarsi. La presenza di una morfologia dei melanofori alterata è indice di problemi a livello visivo.

7.8.6.1.5 Mutanti della retina I mutanti della retina possono presentare:

- Mancato sviluppo del cristallino.
- Degradazione del cristallino.
- Tumori del cristallino.
- Mancanza di retina o sua traslocazione.
- Degenerazione di alcuni sottotipi di cellule della retina.

7.8.6.2 Trasduzione del segnale visivo

I sistemi di rivelazione dei segnali visivi sono sensibili ed elaborati. Sono coinvolti canali ionici regolati da nucleotidi ciclici come *cGMP*. La trasduzione è una risposta mediata da proteine *G*. Il segnale colpisce la retina e i fotorecettori e la luce stimola la loro attività che causano una diminuzione di livelli di *cGMP*.

7.8.6.2.1 Fotorecettori

7.8.6.2.1.1 Bastoncelli I bastoncelli sono deputati alla visione della luce monocromatica. Sono formati da un corpo cellulare, un segmento interno e una terminazione sinaptica. È presente un cromoforo legato alla rodopsina che cambia conformazione all'arrivo del fotone. Il segmento esterno dei bastoncelli contiene dischi con la rodopsina, un recettore muscarinico caratterizzato da diversi domini di membrana.

7.8.6.2.1.2 Coni I coni sono deputati alla visione dei colori.

7.8.6.2.1.3 Cromoforo Il cromoforo, contenuto nel recettore o 11-cis retinale/

7.8.6.2.1.4 Attivazione α .

1. All'arrivo del fotone viene colpito il 11-cis retinale che passa a una conformazione trans.
2. Si altera la rodopsina che attiva la trasducina, una proteina G_t .
3. L'attivazione della proteina G causa l'attivazione della fosfodiesterasi da parte di
4. Viene degradato il $cGMP$ ciclico che chiude i canali sodio.
5. Si nota una riduzione di rilascio del neurotrasmettitore.
6. Attivazione della guanilato ciclasi per far risalire i livelli di $cGMP$, che se rimanessero bassi causerebbero un blocco del processo.

7.8.6.2.1.5 Condizioni di buio In condizioni di buio si notano:

- Livelli di $cGMP$ alti.
- Corrente al buio: il rilascio di un neurotrasmettitore avviene quando non ci sono stimoli luminosi.
- Canali di sodio aperti che permettono il rilascio di neurotrasmettitori.

7.8.6.2.1.6 Condizioni di luce In condizione di luce si nota:

- Diminuzione dei livelli di $cGMP$.
- Terminazione del rilascio del neurotrasmettitore.
- Canali del sodio chiusi.

7.8.6.2.2 Tipologie di neurotrasmettitore Un neurotrasmettitore può essere:

- Eccitatorio: bloccandone il rilascio non si ha più eccitazione.
- Inibitorio: bloccandone il rilascio si blocca l'inibizione e si ha una risposta eccitatoria della retina all'arrivo del fotone.

7.9 Recettori ad attività enzimatica intrinseca

I recettori ad attività enzimatica intrinseca sono recettori di superficie collegati ad enzimi. Sono tipicamente proteine di membrana monopasso con un dominio catalitico. Sono tipicamente tirosine-chinasi e si legano tipicamente a fattori di crescita e ormoni.

7.9.1 Classificazione

I recettori ad attività enzimatica intrinseca possono essere divisi in classi:

- Recettori con attività tirosina chinasi. — Citochine.
- Recettori associati a tirosina chinasi per:
 - Antigene.
 - Interleuchine.
 - Integrine.
- Recettori con attività serina/treonina chinasi.
- Recettori guanilico ciclasti.
- Tirosina fosfatasi simili a recettori.

7.9.2 Recettori tirosina chinasi *RTK*

I recettori tirosina chinasi mediano molte proteine di segnalazione extracellulari. Il legame con la proteina segnale attiva il dominio tirosina chinasi che fosforila le catene laterali di tirosine creando un sito di attacco per proteine di segnale intracellulari.

7.9.3 Recettori per le citochine

Le citochine sono importanti nell'attività del sistema immunitario e sono agenti che promuovono la mitosi. Si legano ai recettori di membrana associati a tirosine chinasi specifiche dette *JAK1,2,3* e *TIC2*.

7.9.3.1 *JAK-STAT*

Il signal transducer and activators of transcription *JAK-STAT* presenta delle proteine a doppia faccia in grado di fosforilarsi e fosforilare quando vengono attivate. Normalmente il recettore è un monomero che dimerizza nel momento in cui si lega alla citochina. I due monomeri si uniscono facendo entrare in contatto le due *JAK* che si autofosforilano a vicenda e fosforilano a loro volta un recettore.

7.9.3.1.1 Fosforilazione del recettore La fosforilazione del recettore recluta e attiva membri della famiglia *STAT1,2*, regolatori trascrizionali a livello del recettore. La via di segnalazione fornisce una delle vie più dirette per la modifica trascrizionale: la fosforilazione del recettore causa fosforilazioni e reclutamento di *STAT1* e *STAT2* dalle *JAK*. Questi passaggi permettono l'attivazione sequenziale di molecole e proteine per una trasduzione corretta del segnale.

7.9.3.1.2 Processo di attivazione trascrizionale

1. La fosforilazione determina la possibilità dei monomeri *STAT1,2* di dimerizzare.
2. Il dimero entra nel nucleo e si lega ad altre proteine regolatorie.
3. Il complesso si lega nella zona promotrice di geni stimolandone la trascrizione.
4. Il processo converge in una regolazione trascrizionale specifica per geni che vengono regolati dalle citochine.

7.9.4 Recettori con attività chinasica

I recettori con attività chinasica sono recettori per fattori morfogenici o trasformanti. La trasduzione del segnale viene regolata da un fattore tumorale *TGFβ* o fattore trasformante di crescita β .

7.9.4.1 Superfamiglia del fattore *TFG* β

La superfamiglia del fattore *TFG* β consiste di un insieme di proteine che agiscono da mediatori per la regolazione di vari funzioni biologiche. Comprende le attivine *TGF* β e le e la famiglia *BMP* (proteine morfogeniche dell'osso).

7.9.4.1.1 Recettori Queste proteine agiscono tramite recettori serina-treonina chinasi. Di questi ne esistono due classi di omodimeri simili. I membri di *TGF* β legano i recettori inducendo l'avvicinamento delle due classi di recettori e la formazione di un complesso recettoriale attivo tetramerico. Questo contiene due recettori di tipo *I* e due di tipo *II* con attività di serina-treonina chinasi.

7.9.4.1.2 Trasmissione del segnale al nucleo

1. Il recettore di tipo *II* fosforila il recettore di tipo *I*.
2. La fosforilazione attiva la porzione catalitica del recettore *I* che diventa in grado di fosforilare.
3. Il recettore attivo si lega e fosforila i membri della famiglia *Smad1,3*, dei regolatori trascrizionali.
4. La fosforilazione di *Smad1,3* permette la formazione di un eterodimero con *Smad4*.
5. L'eterodimero entra nel nucleo e si associa ad altri regolatori trascrizionali e attiva la trascrizione di geni per *TGF* β .
6. I recettori attivati per *TGF* β possono determinare l'attivazione o l'inibizione della trasduzione del segnale.

7.9.4.1.3 Inibizione della trasduzione del segnale L'inibizione della trasduzione del segnale viene svolta da *Smad6,7* inibitorie. Tra i geni bersaglio attivati dai complessi *Smad* si trovano geni che codificano per le *Smad* inibitrici. Il processo è pertanto di feedback negativo.

7.9.4.1.4 Meccanismi di inibizione Le *Smad* inibitorie:

- Competono con altre *Smad* interrompendo la trasduzione del segnale a livello del recettore.
- Competono con le altre impedendo la formazione dei dimeri.

7.9.4.1.4.1 SMURF *SMURF* è un'ubiquitina che viene reclutata a livello del recettore grazie alle *Smad* inibitorie. L'ubiquitina si lega al recettore causando la sua degradazione. La trasduzione del segnale viene bloccata per molto tempo.

7.9.4.1.4.2 Fosfatasi Un altro modo per disattivare il processo è attraverso fosfatasi che rimuovono il gruppo fosfato dal recettore di tipo *I* disattivandolo.

7.10 Muscolo

La struttura fondamentale per la trasduzione del segnale per la contrazione del muscolo è la placca o giunzione neuromuscolare. Questa viene protetta dalla cellula di Schwann.

7.10.1 Placca neuromuscolare

7.10.1.1 Terminazione nervosa

La terminazione nervosa è ricca di mitocondri e vescicole che contengono acetilcolina. Le vescicole si fondono con la membrana e rilasciano il neurotrasmettitore nello spazio tra il motoneurone e il muscolo.

7.10.1.2 Membrana post-sinaptica

La membrana post-sinaptica contiene proteine che impediscono ai recettori di diffondersi nello spazio. Questo spazio presenta un gran numero di invaginazioni determinando un aumento della superficie. In quanto la comunicazione sinaptica è veloce ma meno specifica richiede un maggior numero di recettori.

7.10.2 Organizzazione del muscolo

Le fibre principali del tessuto muscolare sono fatte da fibre di actina e miosina. Le fibre muscolari si organizzano in fasci che formano il muscolo.

7.10.2.1 Sincizio

Il muscolo scheletrico è un sincizio: una fusione di cellule che si fondono tra di loro perdendo la propria individualità ma mantenendo i nuclei. Si forma un'unica struttura polinucleata.

7.10.2.2 Taglio sagittale

I nuclei non si trovano all'interno delle fibre ma in periferia. Questo è dovuto alla funzione del nucleo di contrarsi.

7.10.2.3 Taglio longitudinale

Il taglio longitudinale del muscolo presenta molte striature trasversali. Le striature sono date dalla presenza delle due proteine principali del muscolo: actina e miosina. La maggior parte del citoplasma è occupato da miofibrille formate da fasci di filamenti spessi di miosina² e filamenti sottili di actina. La fibra muscolare viene ricoperta da endomisio. Nel perimisio si trovano più fibre e più fasci costituiscono il muscolo circondato dall'epimisio.

7.10.2.4 Componenti del citoscheletro

Actina e miosina sono le componenti del citoscheletro con una struttura precisa. Sono in grado di interagire tra di loro in modo specifico.

7.10.2.4.1 Actina L'actina è una molecola filamentosa caratterizzata da una testa, un corpo mobile e un corpo.

7.10.2.4.2 Miosina 2 La miosina 2 è una proteina filamentosa caratterizzata da una testa, un collo mobile e un corpo.

- Testa: proteina globulare che interagisce con l'actina generando la contrazione. dando stabilità alla molecola.
- Corpi: i corpi interagiscono tra di loro
- Coda: la coda è una doppia elica proteica.

7.10.2.4.3 Interazione L'interazione specifica tra actina e miosina 2 è responsabile della contrazione muscolare e di altri movimenti nelle cellule non muscolari.

7.10.3 Contrazione muscolare

7.10.3.1 Sarcomeri

Ogni miofibrilla è costituita da una serie di sarcomeri. I sarcomeri sono l'unità contrattili e funzionali.

7.10.3.1.1 Linee Z Le linee Z si trovano all'estremità del sarcomero. Sono formate dalla sovrapposizione di actina.

7.10.3.1.2 Bande All'interno del sarcomero si trova un'alternanza di bande scure dove si trova la miosina e chiare dove non c'è.

7.10.3.1.3 Zona H La zona H è la zona centrale contenente unicamente i filamenti di miosina.

7.10.3.1.4 Linea M La linea M nella parte mediana del sarcomero è il punto in cui sono ancorati i filamenti di miosina. Viene determinata dai punti di giunzione delle miosine.

7.10.3.1.5 Banda A La banda A si trova tra due linee Z ed è centrale. È data dalla sovrapposizione dei filamenti di actina e miosina.

7.10.3.1.6 Movimento dei sarcomeri Quando i sarcomeri si muovono cambia la distanza tra le linee Z , la linea A rimane costante, la I diventa più piccola e la H sparisce.

7.10.3.1.7 Contrazione Durante la contrazione le linee Z si avvicinano e il sarcomero si accorcia.

7.10.3.1.8 Rilassamento Durante il rilassamento le linee Z si allontanano e il sarcomero si allunga.

7.10.3.2 Polarità dei filamenti di actina

La polarità dei filamenti di actina si inverte alla linea M in modo che l'orientamento di actina e miosina risulti identico ad entrambi i lati del sarcomero. L'attività motrice della miosina sposta le due teste verso l'actina. In questo modo i filamenti di actina scorrono verso la linea M causando un accorciamento del sarcomero e una contrazione.

7.10.3.3 Organizzazione del muscolo a livello cellulare

La membrana plasmatica forma invaginazioni che mettono in comunicazione la membrana con i tubuli T del reticolo endoplasmatico liscio o sarcoplasmatico. Questo contiene calcio.

7.10.3.3.1 Miosina 2 La miosina 2 è una proteina di grandi dimensioni costituita da una coppia di catene pesanti, una testa globulare, una coda ad α -elica e due catene leggere. Le code si avvolgono a doppia elica e le catene leggere si associano alla testa formando la molecola completa. I filamenti muscolari sono formati da molecole di miosina associate tra di loro a livello della coda e all'actina attraverso le teste. L'orientamento si inverte alla linea *M*.

7.10.4 Ciclo di contrazione

1. Il motoneurone rilascia acetilcolina che si lega ai recettori presenti nella giunzione.
2. Questo apre i canali di calcio che porta a un'onda di polimerizzazione.
3. L'onda di depolimerizzazione si trasmette attraverso i tubuli T.
4. Arriva all'interno e apre i canali di Ca^{2+} sul reticolo endoplasmatico.
5. Il calcio interagisce con la troponina causando un cambio formazionale che libera la tropomiosina.
6. Ora miosina e actina sono in grado di interagire.

7.10.4.1 Ciclo della miosina

1. La miosina è strettamente legata all'actina e dissociata da *ATP*.
2. La miosina lega *ATP* e si dissocia dall'actina.
3. L'idrolisi di *ATP* da parte della testa libera l'energia necessaria allo scorrimento dei filamenti.
4. Il cambio conformazionale della miosina permette lo scorrimento delle teste lungo i filamenti di actina.

7.10.4.2 Rilascio di calcio

La contrazione del muscolo scheletrico è attivata da impulsi nervosi che stimolano il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico. Questo rilascio nel citosol ne determina un aumento della concentrazione da 10^{-7} a $10^{-5}M$. L'aumento di concentrazione promuove la contrazione attraverso l'azione di due proteine: tropomiosina e troponina legate ai filamenti di actina. La troponina si lega alla tropomiosina e inibisce l'interazione miosina e actina. Il legame del calcio porta a una serie di cambiamenti conformazionali della troponina che muovono la tropomiosina liberando il sito del legame della miosina sull'actina.

7.10.4.3 Tropomiosina

La tropomiosina è una molecola filamentosa che sovrasta l'actina. Si adagia su di essa impedendo alle teste di miosina di interagire con l'actina in condizioni di riposo.

7.10.4.3.1 Troponina La troponina è una molecola globulare formata da:

- Una subunità sensibile al calcio.
- Una che interagisce con l'actina.
- Una che interagisce con la tropomiosina.

7.10.4.3.1.1 Funzione La troponina rimuove il blocco della tropomiosina quando viene rilasciato calcio permettendo la contrazione.

7.10. MUSCOLO

1. Il calcio viene rilasciato quando l'acetilcolina si lega al recettore attraverso un canale ionotropico.
2. Il canale si apre creando un'onda di depolimerizzazione che arriva ai tubuli T.
3. I tubuli sono in contatto con il reticolo endoplasmatico su cui si trovano canali del calcio sensibili a variazioni del potenziale di membrana.
4. Il canale del calcio percepisce la depolimerizzazione e si apre.
5. Il calcio esce e si lega alla troponina causando un cambio conformazionale legato all'idrolisi di *ATP*.

Il cambio conformazionale della troponina causa un'interruzione dell'interazione tra miosina e actina.

7.10.4.4 Energia della contrazione

ATP viene idrolizzato durante ogni ciclo di attacco, spostamento e stacco dei ponti trasversali. È fondamentale per determinare il cambio conformazionale per lo stacco della miosina dall'actina. Alimenta inoltre la pompa del calcio sulla membrana.

7.10.4.4.1 Presenza di ossigeno In presenza di ossigeno si produce *ATP* spostando un gruppo fosfato dalla creatina fosfato a *ADP*.

7.10.4.4.2 Carenza di ossigeno In carenza di ossigeno si produce *ATP* in anaerobiosi con produzione di acido lattico. L'acido lattico abbassa il *pH* e il muscolo rimane contratto.

7.10.4.4.3 Carenza di *ATP* In carenza di *ATP* il muscolo riduce l'ampiezza delle contrazioni in quanto meno teste di miosina interagiscono con l'actina. La fatica è dovuta a un consumo di *ATP* tale da non riuscire ad essere soddisfatto dal metabolismo.

7.10.4.5 Tetano muscolare

Il tetano muscolare è una malattia in cui un muscolo viene continuamente stimolato e non si rilassa causando tensione. Questo è dovuto al rilascio di calcio che rimane ad alte concentrazioni. Un'alta frequenza di contrazioni il muscolo non si rilassa.

7.10.4.6 Rapporto forza velocità

Il rapporto forza-velocità della contrazione muscolare è determinato da:

- Numero di ponti tra actina e miosina.
- Attività della *ATPasi*.
- Quantità di calcio rilasciata dal reticolo sarcoplasmatico.
- Numero di fibre reclutate.

7.10.4.6.1 Fibra ipertrofizzata Una fibra ipertrofizzata presenta più sarcomeri in parallelo, aumenta la forza generata ma non cambia la velocità di accorciamento.

7.10.4.6.2 Fibra allungata Una fibra allungata ha più sarcomeri in serie, non cambia il rapporto generato ma aumenta la velocità della contrazione.

7.10.5 Muscolo cardiaco

In una cellula muscolare cardiaca permangono le striature dovute ai sarcomeri regolari, si trovano mitocondri più numerosi e un disco intercalante. Il muscolo non è un sincizio, ma composto da cellule mononucleate, unite da desmosomi che comunicano tramite gap-junctions. Nel muscolo cardiaco queste giunzioni si dicono dischi intercalari e permettono un maggiore contatto tra le cellule. Le proteine contrattili sono allineate in modo regolare. La contrazione non è volontaria e omogenea.

7.10.5.1 Fibre miocardiche

Le fibre miocardiche non sono innervate direttamente ma si notano delle cellule pacemaker. Queste determinano il ritmo della contrazione e possono eccitare in maniera cadenzata grazie a particolari canali. Le fibre miocardiche si eccitano in relazione a potenziali d'azione che si propagano tra di loro grazie a sinapsi elettriche.

7.10.5.1.1 Comunicazione

- Quando una cellula eccitata è in fase di potenziale d'azione tutte le altre si eccitano simultaneamente.
- Si ottiene così una contrazione simultanea e ordinata che permette il corretto pompaggio del sangue.
- Il periodo di refrattarietà dura quanto la contrazione, perciò il cuore non può andare incontro a contrazioni di tipo tetanico.

7.10.5.2 Gap junctions

Le gap junctions permettono la trasmissione simultanea dello stimolo alle cellule, permettendo una contrazione simultanea del muscolo.

7.10.5.2.1 Ione sodio Nel momento in cui entra lo ione sodio questo importa cariche positive, una grande quantità modifica il potenziale di membrana, che passa a valori positivi.

7.10.5.2.2 Meccanismo tutto o nulla La frequenza determina l'informazione: maggiore frequenza maggiore informazione. La propagazione avviene nel corpo cellulare attraverso l'assone fino alle terminazioni. I canali si aprono e chiudono e una volta aperti, l'onda di depolarizzazione si propaga causando l'apertura dei canali successivi. I canali precedenti si trovano in uno stato di refrattarietà assoluta e non possono essere aperti. La modulazione della frequenza è pertanto importante per la modulazione del messaggio. Il messaggio è di tipo polarizzato e avviene da una direzione verso la periferia.

7.10.6 Muscolo liscio

I muscoli lisci subiscono una contrazione non volontaria. Le sue cellule sono fusiformi e mononucleate. Non presentano una striatura trasversale. Il controllo della contrazione è indipendente dalla volontà e possiedono meno mitocondri. La mescolatura liscia presenta una velocità di contrazione inferiore e si trova nei vasi, pelle e visceri.

7.10.6.1 Intestino

Nell'intestino la muscolatura liscia determina una contrazione seriale di porzioni dell'intestino per favorire il passaggio del cibo.

7.10.6.2 Vasi sanguigni

Nelle arterie la contrazione e decontrazione determina il diametro del vaso e il flusso del sangue. Le vene ne sono prive e più soggette a problemi di vascolarità.

7.10.6.3 Contrazione

La cellula di un muscolo liscio può solo contrarsi in parte. L'idrolisi di *ATP* è più lenta e genera contrazioni più lente, prolungate ed efficienti.

7.10.6.4 Cellule coinvolte

7.10.6.4.1 Smooth muscle cells Le smooth muscle cells *SMC* sono unità singole che si muovono in sincrono. L'attività è miogenica e spontanea. Sono innervate dal *ANS*: sistema nervoso vegetativo. Sono attivate da impulsi nervosi del *ANS*. Presentano uno stato di tensione costante che può essere modulato da ormoni e fattori di crescita.

7.10.7 Sviluppo della giunzione muscolare

La giunzione muscolare forma connessioni specializzate tra motoneuroni e cellule muscolari scheletriche. Il sincizio presenta diversi nuclei che trascrivono in maniera diversa a seconda della distanza della giunzione neuromuscolare. Minore la distanza maggiore la produzione di RNA recettori per l'acetilcolina.

7.10.7.1 Localizzazione degli RNA del recettore

Gli RNA vengono trasportati e tradotti in corrispondenza della placca neuromuscolare. Alla formazione del sincizio il motoneurone non è ancora stato attaccato e i recettori sono sparsi. Durante l'innervamento l'agrina porta un segnale che dà origine a una serie di cascati di eventi della trasduzione del segnale che porta i recettori ad avvicinarsi e clusterizzare in prossimità della giunzione neuromuscolare. La chinasi *MuSK* viene attivata permettendo questo processo.

7.11 Esempi

7.11.1 *GLI3*

La proteina *GLI3* è una proteina zinc finger e la sua mutazione causa la sindrome della cefalopolisindattia di Greig. È un attivatore o un repressore di bersagli a valle della via di segnalazione mediata da *Shh* Sonic hedgehog, mutante di *Drosophila* che presenta spine durante lo sviluppo. La sua presenza legata a un recettore causa una serie di segnalazioni che confluiscono sul *GLI* o glioblastoma. A seguito dell'interazione questa può essere attivata o disattivata: se *Shh* è presente attiva *GLI* che promuove la trascrizione nel nucleo. Se non presente alcuni membri del complesso vengono tagliati producendo una forma tronca che entra nel nucleo e inibisce la trascrizione.

Capitolo 8

Membrana

8.1 Funzioni

La membrana plasmatica funge da involucro della cellula ed è coinvolta negli scambi di sostanze. Contiene infatti una grande varietà di trasportatori, proteine che attraversano la membrana trasportando sostanze nutrienti all'interno e prodotti di scarto all'esterno.

8.2 Struttura

La membrana si può considerare come un foglietto continuo di molecole e strutture fosfolipidiche spesso tra i 4 e i 5nm che incorpora diverse proteine. È estremamente fluide e i lipidi sono in grado di diffondersi nella membrana.

8.2.1 Fase semisolida

A una certa temperatura la membrana assume uno stato di gel o fase semisolida. La temperatura varia in base alla composizione. Il colesterolo rende le membrane meno fluide.

8.2.2 Zattere lipidiche

Le zattere lipidiche hanno un ruolo funzionale in quanto permettono l'aggregazione di proteine e la creazione di domini con funzioni specifiche. Per esempio nell'epitelio la composizione proteica cambia tra la porzione apicale o baso-laterale. Giunzioni strette tra le cellule impediscono la diffusione delle proteine.

8.2.3 Asimmetria

Il doppio strato non è omogeneo: si trova asimmetria rispetto ai lipidi del monostrato interno ed esterno. Questo può variare in diverse condizioni grazie a flippasi.

8.2.3.1 Apoptosi

Durante l'apoptosi la fosfatidilserina viene spostata verso l'esterno causando il richiamo di macrofagi.

8.3 Composizione

8.3.1 Glicolipidi

I glicolipidi si trovano nel monostrato non citosolico e costituiscono il 5% della membrana.

8.3.1.1 Gangliosidi

I gangliosidi sono oligosaccaridi con residui di acido ossalico. Il ganglioside *Gm1* permette l'ingresso della tossina del colera.

8.3.2 Proteine di membrana

Le proteine di membrana presentano domini ad α elica che attraversano la membrana. Possono inoltre non attraversarla ma possedere domini ancorati ad essa mediante legami specifici con il glicosifosfatidilinositolo o ancora *GPI*. I domini transmembrana presentano amminoacidi idrofobici. Le acquaprine sono canali che permettono il passaggio di acqua. La rodopsina permette la trasformazione di luce in *ATP* attraverso un cromoforo. Possiedono tipicamente siti specifici che legano molecole di segnale extracellulare agendo come amplificatori per esso.

8.4 Passaggio delle sostanze

8.4.1 Passaggio attivo

Il passaggio attivo è un tipo di trasporto selettivo che consuma *ATP*, un esempio sono le pompe che lavorano contro gradiente di concentrazione.

8.4.2 Endocitosi

Nell'endocitosi una regione della membrana plasmatica si invagina, racchiudendo al suo interno un piccolo volume di liquido esterno. L'invaginazione si chiude su sè stessa formando una vescicola nella cellula.

8.4.2.1 Fagocitosi

La fagocitosi è un caso particolare dell'endocitosi in cui il materiale trasportato all'interno della cellula viene particolato.

8.4.3 Esocitosi

L'esocitosi è il processo inverso all'endocitosi: le vescicole si muovono dal citoplasma verso la faccia interna della membrana plasmatica a cui si fondono. Il materiale contenuto nella vescicola viene rilasciato all'esterno.

8.4.4 Passaggio passivo

Il passaggio passivo si verifica per diffusione secondo gradiente di concentrazione. È tipicamente più lento di quello attivo.

Capitolo 9

Organelli

9.1 Panoramica

Si intende per organello un qualsiasi compartimento della cellula eucariote circondato da membrana. Il sistema di membrane si trova alla base del loro sviluppo evolutivo.

9.2 Trasporto di proteine

I diversi organelli rendono necessari diversi sistemi per permettere il trasporto delle proteine prodotte per la maggior parte nel citoplasma negli organelli in cui dovranno svolgere la loro funzione.

9.2.1 Trafficking nucleo-citoplasma

9.2.1.1 Membrane del nucleo

9.2.1.1.1 Involucro nucleare Il nucleo è circondato da un involucro nucleare formato da due membrane. La membrana esterna è in continuità con il reticolo endoplasmatico pur avendo una composizione diversa.

9.2.1.1.2 Lamina nucleare La lamina nucleare è un reticolo fibroso con funzione strutturale. Mette in contatto componenti che si associano al DNA e proteine associate alla membrana interna.

9.2.1.1.3 Funzione La membrana isola e protegge il materiale genetico, ma è sede di numerosi trasporti.

9.2.1.1.3.1 Pori nucleari I pori nucleari *NPC* sono formati da 30 nucleoporine. Il numero varia in base al tipo cellulare. Permettono un trasporto molto veloce. La parte interna presenta una struttura a cono, mentre l'esterna ha una struttura filiforme. Possiede proteine che la ancorano alla membrana, proteine strutturali e che delimitano il canale. La parte interna funge da filtro con una struttura ben definita.

9.2. TRASPORTO DI PROTEINE

9.2.1.2 Trasporto

Affinchè avvenga il trasporto una proteina deve possedere la sequenza segnale. La proteina interagisce con la parte fibrillare, viene inserita nel centro del poro dove si completa il trasporto.

9.2.1.2.1 Importine Le importine mediano l'entrata nel nucleo grazie al *NLS*.

9.2.1.2.2 Proteina cargo Si intende per proteina cargo una proteina adattatrice che espone *NLS* quando cambia conformazione e viene riconosciuta dall'importina.

9.2.1.2.3 Importo della proteina Per importare una proteina con *NLS* forma un complesso con l'importina. Questo interagisce con la parte fibrillare del poro nucleare. L'importina interagisce con la matrice creando uno spazio di passaggio spezzando legami: l'importina si lega a *Ran-GTP* cambiando conformazione. Il complesso entra nel nucleo. Avviene un'idrolisi in *Ran-GDP* che causa il rilascio dell'importina che viene esportata dal nucleo.

9.2.1.2.4 Esporto Per esportare una proteina dal nucleo l'esportina lega *Ran-GTP* e il cargo causando l'uscita del complesso. L'idrolisi in *Ran-GDP* causa un cambio conformazionale dell'esportina rilasciando la proteina nel cargo.

9.2.1.2.5 Gradiente di *Ran* Si nota un gradiente di *Ran-GTP*: questa è determinata da *Ran-GAP* che interagiscono con la parte fibrillare delle nucleoporine. Questo garantisce una direzionalità del trasporto in concomitanza con *Ran-GEF*.

9.2.1.2.6 Mascheramento di *NLS* Una proteina con *NLS* che non localizza nel nucleo possiede modifiche alla sequenza segnale come fosforilazioni.

9.2.1.2.6.1 Sintesi del colesterolo La molecola *NF-AT* fosforilata è disattiva e maschera il *NLS*. Un aumento di calcio attiva la calcineurina, una fosfatasi che rende di nuovo accessibile il *NLS*. Viene portata nel nucleo una *SREBP*, una proteina coinvolta nella sintesi del colesterolo come fattore trascrizionale. Il colesterolo quando presente interagisce con *SCAP*, una proteina legata a *SREBP*. Il complesso in assenza di colesterolo si localizza al Golgi. Qui proteasi tagliano *SREB* liberando un frammento che va ad attivare la trascrizione di geni coinvolti nella sintesi del colesterolo.

9.2.2 Trasporto in plastidi e mitocondri

Affinchè le proteine possano essere riconosciute dai recettori ed importate nei mitocondri devono essere completamente tradotti.

9.2.2.1 Peptide segnale

Il peptide segnale è formato da 18 amminocidi polari e non polari che formano una struttura ad α -elica asimmetrica.

9.2.2.2 Traslocazione nel mitocondrio

La traslocazione di una proteina nel mitocondrio richiede due complessi: il complesso *TOM* che media il trasporto dal citoplasma nello spazio tra le membrane e il complesso *TIM* che completa il trasporto nella membrana interna. La proteina possiede il peptide segnale e viene riconosciuta dalla porzione recettoriale del complesso *TOM* e viene forzata ad entrare. Qui incontra il complesso *TIM* che la porta attraverso la membrana interna assieme alla chaperonina *HSP70* (impedisce la formazione di strutture secondarie. In questo secondo passaggio avviene il taglio del peptide segnale. I due complessi possono lavorare in modo indipendente.

9.2.2.2.1 Energia necessaria L'energia necessaria alla traslocazione viene fornita da:

- Idrolisi di *ATP* da parte di *TOM*.
- Gradiente elettrochimico su *TIM*.

9.2.2.3 Inserimento di una proteina nella matrice tra le membrane

Una proteina che deve rimanere nello spazio tra le due membrane possiede il peptide segnale e una sequenza di stop del trasferimento che blocca il passaggio della proteina verso il citoplasma.

9.2.2.4 Complesso *Oxa*

Il complesso *Oxa* media l'inserzione di proteine nella membrana interna. La proteina attraversa *TIM* dove le viene rimosso il peptide segnale, ma ne contiene un secondo che la indirizza verso il complesso *Oxa*. Questo permette l'ancoraggio della proteina all'interno della membrana interna del mitocondrio.

9.3 Perossisomi

9.3.1 Panoramica

I perossisomi sono vestigia di antichi organelli che svolgevano funzioni nel metabolismo dell'ossigeno.

9.3.1.1 Struttura

I perossisomi sono delimitati da membrana, presentano una forma tondeggiante e inclusioni paracrystalline. Contengono diversi enzimi.

9.3.1.2 Funzione

Gli enzimi nei perossisomi permettono:

- Rimozione di *H* da substrati organici specifici con liberazione di acqua ossigenata trasformata in acqua dalla catalasi.
- Catalizzano le prime reazioni nella formazione dei plasmalogeni, che formano una guaina che riveste gli assoni.
- Demolizione degli acidi grassi attraverso β -ossidazione in acetil *CoA*.
- Sono presenti nelle cellule vegetali e coinvolti nel ciclo del glicosilato per la conversione degli acidi grassi in zuccheri.

9.3.2 Trasporto

I perossisomi non presentano DNA e pertanto tutte le proteine necessarie al loro comportamento devono essere importate. Il meccanismo di trasporto è simile a quello dei mitocondri.

9.3.2.1 Sequenza target

La sequenza target si dice *PLS* ed è costituita da *Ser-Lys-Leu* N o C terminale.

9.3.2.2 Riconoscimento della sequenza target

La sequenza target viene riconosciuta dalle perossine o *Pex*. Queste partecipano al processo di importazione.

- *Pex5*: riconosce una *PLS* C terminale insieme a *Pex1* e la *ATPasi Pex6*.
- *Pex7*: riconosce una *PLS* N terminale.

9.3.3 Genesi dei perossisomi

I perossisomi si formano da gemmazioni del reticolo endoplasmatico. Questo forma una struttura vescicolare con *Pex3* come proteina transmembrana e *Pex19* ad essa associato. Questi vengono detti protoperossisomi e vengono arricchiti da componenti che causano un loro accrescimento. Possono inoltre andare incontro a fissione.

9.3.4 Sindrome di Zellweger

La sindrome di Zellweger presenta anomalie cerebrali, del fegato e reni. Queste sono causate da mutazioni a carico di *Pex5*, non si trova un importo di enzimi con funzioni ossidative.

9.4 Reticolo endoplasmatico

9.4.1 Funzioni

9.4.2 Tipologie

9.4.3 Traduzione e traslocazione delle proteine

Capitolo 10

Citoscheletro

Il citoscheletro è importante per diverse funzioni. Il citoscheletro è importante per il mantenimento della forma della cellula, fornisce resistenza agli stress, mantiene la forma del nucleo e permette il movimento alla cellula di aderire al substrato e di muoversi, se è alterato e impedisce alla cellula di aderire al substrato, estremamente importante per il movimento cellulare e per il differenziamento della cellula. Il citoscheletro è importante in quanto fornisce i binari per il movimento di organelli e proteine. Permettono la segregazione dei cromosomi nelle cellule figlie. È costituito da tre elementi: i filamenti di actina, i microtubuli e i filamenti intermedi con funzioni diverse e disparate. I filamenti di actina o microfilamenti sono costituiti da delle subunità globulari di actina G e i monomeri si uniscono tra di loro formando filamenti flessibili dal diametro di 8 nanometri che tendono ad avvolgersi l'uno sull'altro. La si trova in tutte le cellule dove è organizzata in maniera diversa. Forma le stress fibers e forma la struttura ordinata nel muscolo che ne garantisce la funzionalità e ne permette la contrazione. I microtubuli formano dei tubi cavi costituiti da monomeri di due forme di tubulina, hanno una lunghezza notevole rispetto alla dimensione della cellula e sono liberi ad un'estremità mentre all'altra sono attaccati al microtubule organizing center o centrosoma (MTOC) da cui si originano i microtubuli con cui rimane in contatto. Una particolare organizzazione si trova nelle ciglia che hanno un ruolo importante. I filamenti intermedi che hanno dimensioni e funzionalità diverse, resistenza agli stress e si trovano presenti alle cellule epiteliali e formano l'impalcatura al di sotto della membrana nucleare (lamina) vanno incontro a dei rimaneggiamenti durante particolari fasi della membrana nucleare: la lamina durante la divisione deve essere disassemblata. La plasticità degli elementi del citoscheletro è notevole. Il citoscheletro di filamenti intermedio, i microtubuli e i filamenti di actina, i microtubuli permettono le adesioni cellula-cellula e con la lamina basale (ancoramento al substrato).

10.1 Actina

I filamenti di actina sono costituiti da actina globulare una proteina di 375 amminoacidi molto conservata presente in tutte le cellule e può essere considerata come gene housekeeping e permette la cura e il mantenimento della casa, permette alla cellula di funzionare in maniera corretta. I monomeri di actina sono in grado di legare ATP e ADP, importante nel processo di formazione e disassemblamento di actina, molto conservata nell'evoluzione ed esistono tre isoforme di actina α , β e γ , la prima solo nelle cellule muscolari. L'actina ha una struttura globulare con una polarità, una porzione più e una meno e il dominio che lega ATP o ADP si trova verso la porzione meno, questo nel momento in cui si assemblano formando il filamento si distingue una terminazione più e

una meno. L'assemblamento dei monomeri avviene nel momento in cui il monomero lega AATP e si assemblano in entrambe le direzioni, la crescita in direzione più e meno può avvenire solo che la crescita in direzione più è più rapida rispetto all'altra direzione. Questo è importante nel contesto della cinetica e la formazione dei filamenti di actina. I monomeri di actina G si possono identificare due polarità, una a spina (più) e una a barbiglio (meno). I monomeri si associano secondo una costante k_{on} e si disassociano secondo una costante k_{off} . I filamenti di actina, se si prendono i monomeri in un tubo di reazione l'actina può formare in maniera spontanea dei filamenti se si formano oligomeri tre subunità di actina si uniscono tra di loro e creano un nucleo. Importante per dare origine al processo di polimerizzazione e aggiunta di successive subunità di actina per la formazione del filamento. La reazione è molto lenta e quando si forma il complesso di nucleazione la velocità con cui il filamento polimerizza aumenta con velocità esponenziale fino a quando si raggiunge un equilibrio e le subunità si riducono in concentrazione e si raggiunge uno stato di equilibrio in cui la velocità con cui vengono introdotte nuove subunità è uguale alla velocità con cui le subunità lasciano il filamento e la lunghezza rimane costante. Diventa limitante quando il processo rallenta. Per l'importanza della nucleazione e della formazione del trimero fornendo un trimero all'inizio e promuovendo la sua formazione di fatto non si ha la fase iniziale lenta ma parte il meccanismo di polimerizzazione. All'interno della cellula ci sono proteine accessorie dell'actina che favoriscono la formazione di nuclei e sono importanti in quanto velocizzano molto la fase di inizio. Un fenomeno legato alle proprietà dei monomeri di legare e idrolizzare ATP in ADP è il treadmilling che consiste nel meccanismo in cui monomeri di che legano ATP si uniscono promuovendo polimerizzazione e i monomeri già introdotti idrolizzano ADP e a un'estremità tendono a staccarsi e trovano ATO si legano ad esso e possono essere riutilizzati e reintrodotti, se il neointrodotta mano a mano che si aggiungono altri monomeri questo tende a spostarsi a idrolizzare ATP e a trovarsi in fondo dove si stacca e può essere utilizzato che consente all'equilibrio di mantenere costante la lunghezza e i monomeri vanno incontro a un processo di distacco e reinserimento. Viene utilizzato per le proprietà dei filamenti di actina. Ci sono fattori cellulari che bloccano un'estremità, altri fattori possono legarsi ad una g protein e promuovono l'allungamento in un'altra direzione creando una rete di filamenti di actina che si intrecciano tra di loro. Si trovano proteine che alterano queste proprietà. Il citoscheletro va incontro a profondi riarrangiamenti durante la fase di divisione cellulare. Questo è importante per gli organelli che vengono mantenuti tali grazie alla presenza dei microtubuli che permettono la compattazione di ER e Golgi e forniscono il substrato per i movimenti delle proteine e delle vescicole. Durante il processo mitotico gli organelli si disgregano insieme al citoscheletro sia a livello nucleare fino a tutti i microtubuli, non tutti disassemblati in questa fase in quanto il fuso mitotico viene costruito in modo tale da poter connettersi con i cromosomi e permettere la loro segregazione. L'actina è costituita da monomeri di proteina actina G globulare che vanno incontro a un processo di polimerizzazione e depolimerizzazione diversi in base alla polarità. Sono costituite da due estremità una a punta e una a barbigli che si uniscono tra di loro accrescendo il filamento in maniera diversa rispetto alla direzione della polimerizzazione, la struttura asimmetrica determina una polarità più all'estremità a punta e una polarità meno per i barbigli. La quale contiene il sito di legame per l'ATP. Le portine G leganti ATP vengono incorporate in direzione Più e meno ma l'accrescimento nella direzione più rispetto a quella della polimerizzazione meno legato alla struttura dei monomeri. Una volta che è stata incorporata avviene l'idrolisi di ATP e ADP che determina una minor stabilità dei monomeri che sono più propensi a lasciare il filamento che possono rilegare ATP e reintrodotti in una delle due polarità, la velocità di associazione e dissociazione è legata alle costanti la cui velocità è diversa. Il processo di nucleazione è importante in modo che possa esserci polimerizzazione occorre che si crei un nucleo costituito da oligomeri, tre subunità di actina che dopo la formazione l'incorporazione delle subunità delle portiere globulari nei filamenti aumenta in maniera esponenziale fino alla condizione di equilibrio. Se si forniscono gli oligomeri in vitro

L'organismo di polimerizzazione avviene istantaneamente, la velocità in vitro è diversa da quella in vivo in quanto in vivo sono presenti delle proteine che aiutano promuovendo la formazione dei centri di nucleazione dei trimeri di actina che danno il via alla polimerizzazione e molecole che si legano ai filamenti di actina e altri che si legano ai filamenti promuovendo la polimerizzazione e altre che promuovono la depolimerizzazione dei filamenti di actina. Il cambiamento di percorso è determinato dalla formazione di citoscheletro in un'altra parte e occorre che ci sia depolimerizzazione da un'altra in modo che l'asimmetria crei un cambiamento di direzione. Il processo di polimerizzazione e depolimerizzazione è controllato da fattori presenti nella cellula. Vi sono delle sostanze che vengono prodotti da organismi vegetali che producono molti alcaloidi, sostanze che agiscono sul citoscheletro, sui filamenti di actina e microtubuli e vengono utilizzate come agenti chemioterapici in quanto possono destabilizzare il citoscheletro in momenti chiave come la divisione. Queste sostanze come nel caso dell'actina possono essere per l'actina la latruncolina che depolimerizza i filamenti di actina con il rilascio di monomeri che si lega alle subunità e destabilizza le subunità che vengono rilasciate, la citocalasina B con attivazione depolarizzante e tende a legarsi alle estremità più dei filamenti la falloidina invece estratta dall'amanite falloide stabilizza i filamenti di actina e può essere deleterio per la cellula. Sono state utilizzate per studiare le proprietà del citoscheletro dell'actina la falloidina resa fluorescente può essere usata per colorare il citoscheletro di actina e può essere utilizzata per marcare il citoscheletro. Per i meccanismi di trasporto legati all'actina si può utilizzare la latruncolina o la citocalasina B per destabilizzare i filamenti e verificare se il trasporto avviene o no. Il tassolo estratto dal tasso stabilizza i microtubuli, il nocodazolo e la colchicina favoriscono la depolimerizzazione dei microtubuli, sono utilizzati come antitumorali in quanto vanno a destabilizzare i microtubuli del fuso mitotico durante il processo di divisione cellulare. Molecole che svolgono ruoli nel promuovere la polimerizzazione o la depolimerizzazione dei filamenti di actina. La timosina e la profilina si tratta di proteine che legano i monomeri di actina con funzione opposta: la timosina lega il monomero di actina e lo rende indisponibile per la formazione del filamento la profilina favorisce l'incorporazione dei filamenti favorendo la polimerizzazione e competono con i monomeri di actina, se la cellula esprime la timosina il pool di proteine G disponibile per l'incorporazione è minore per la cellula con espressione di profilina. La profilina può essere modificata con fosforilazione e dopo l'affinità della profilina per i monomeri si riduce e la sua attività di promotore viene inibita. In condizioni del ciclo cellulare o in altre condizioni fisiologiche perde affinità per i monomeri favorendo il legame della timosina con i monomeri riducendo l'attività di polimerizzazione. Altri fattori sono Arp 2/3 (actine related protein) e la formina. Questi due complessi favoriscono la formazione dei nuclei per promuovere la sintesi dei filamenti di actina. Lavorano in maniera diversa in quanto Arp 2/3 è costituito da due molecole Arp2 e Arp3 con struttura simile a quella dell'actina, la funzione del complesso è quella di favorire la crescita di filamenti di actina partendo dall'estremità meno, si legano grazie all'interazione con altre proteine accessorio li rendono capaci di interagire con i monomeri di actina e promuovere la formazione dei nuclei da cui prende il via la formazione dei filamenti di actina. Si noti come Arp2/3 permettono la formazione di ramificazioni di branching e la formazione di filamenti partendo da uno preesistente, questi fattori possono legare anche delle subunità di actina già incorporate nel filamento e interagendo con essi creano un centro di nucleazione in una posizione del filamento preesistente con la formazione di filamenti laterali con un angolo di 70 gradi con una rete di filamenti di actina. La formina invece promuove la formazione di centri di nucleazione ma la formina lo fa ma non è in grado di produrre e di attaccarsi a monomeri all'interno di un filamento preesistente e creare le strutture a rete, la formina è un dimero che favorisce l'interazione di monomeri di actina tra di loro dando il via alla polimerizzazione e alla formazione dei filamenti di actina. Alcuni membri delle formine presentano dei domini baffi che hanno la funzione di reclutare altri fattori che promuovono l'incorporazione di monomeri di actina all'interno del filamento di actina come profilina che favorisce il reclutamento dei monomeri di actina. Vi sono poi altre molecole

che vanno a regolare le proprietà dei filamenti di actina. Vi sono molecole che hanno un ruolo nella stabilizzazione e nell'inibizione nella formazione dei filamenti di actina come la tropomiosina nel muscolo che si posiziona sopra i siti di attacco della actina con la miosina andando a bloccare l'interazione tra le teste di miosina e actina impedendo la loro interazione e la contrazione del muscolo, rimossa dalla troponina. La tropomiosina oltre a inibire i siti di reazione e rende rigido il filamento di actina. Un'altra proteina nel muscolo è CapZ che localizza ed è la responsabile della formazione della banda Z del muscolo. Un'altra proteina accessoria legata ai filamenti di actina che va a stabilizzare il filamento di actina in un'estremità rendendola inattiva. Di fatto la presenza di CapZ a un'estremità impedisce la crescita e la polimerizzazione dei filamenti di actina in quanto blocca un'estremità che viene bloccata. La polimerizzazione può avvenire in un'unica direzione e si localizza nelle zone che delimitano il sarcomero. La tropomodulina ha la funzione di rivestire e incapsulare le cellule muscolari e i filamenti di actina legandoli tra di loro importante per mantenere la funzionalità, struttura e resistenza. Vi sono molecole che regolano e promuovono la depolimerizzazione dei filamenti di actina come la gelsolina, membro della superfamiglia che viene attivata a seguito del rilascio di calcio all'interno della cellula che la attivano e va a destabilizzare il filamento di actina promuovendo la depolimerizzazione in maniera analoga funziona la cofilina che va a forzare il filamento di actina a compattarsi e il compattamento ulteriore lo va a stressare e lo stress rende instabile il filamento stesso promuovendo il distacco dei monomeri in particolare di quelli che legano ADP che tendono già a staccarsi e la presenza della cofilina favorisce ulteriormente il distacco di questi monomeri e di fatto sembra essere importante per rinnovare i filamenti di actina per cambiare i monomeri che legano ADP in quelli che legano ATP. Queste proteine sono importanti per permettere ai filamenti di actina per formare complessi di ordine superiore: le reti dendritiche, i fasci e le strutture a rete. Le strutture parallele più o meno compatte nei filopodi, estroflessioni sensoriali della membrana che permette alla cellula di muoversi in una direzione, ci sono strutture a rete caratteristiche e fungono da impalcatura per i lamellipodi, la pelle tra le dita sono ricche espansioni della membrana plasmatica molto mobili. Le stress fibers sono importanti per l'interazione della cellula con il substrato dove si trova una conformazione parallela simile a quella dei muscoli anche con orientamento diverso e la compattezza di queste strutture è inferiore di quella dei filopodi, si trova una struttura più disordinata che crea una rete a gel. Tutte queste strutture si formano grazie alla presenza delle proteine viste in precedenza. Si trovano altri fattori che influenzano stabilità e dinamicità delle strutture come la fimbrina che lavora come monomero e si lega a due monomeri di actina, l' α actinina lavora come dimero e ciascuna lega un unico monomero di actina. La spectrina è la componente importante del citoscheletro al di sotto della membrana dei globuli rossi, cellule prive di nucleo e la spectrina conferisce la resistenza alla membrana in quanto soggetto a stress notevole e una certa elasticità alla membrana in quando deve poter deformarsi per passare nei capillari per poi tornare nella forma iniziale. Proteina molto lunga costituita da due subunità α e due β e solo la prima lega l'actina. Fungono inoltre da ponte tra citoscheletro e altre proteine che interagiscono con la membrana o citoplasmatiche che vengono ancorate al citoscheletro. La filamina responsabile della formazione di strutture a croce, un dimero che presenta in cui ciascun monomero lega una subunità di actina è molto elastica e la struttura a V permette di rendere stabile le strutture a X a rete caratteristiche di alcuni tipi cellulari e di alcune zone della cellula. Mutazioni della filamina sono responsabili di patologie che danno ripercussioni sulla migrazione di neuroni dalle zone ventricolari dove ci sono i precursori dei neuroni che migrano verso le zone apicali differenziandosi, questo movimento dalla parte ventricolare viene compromesso a seguito di mutazioni a carico della filamina in cui i neuroni non si muovono e rimangono in blocco. Creando la rete favorisce la migrazione delle cellule precursori dei neuroni probabilmente. La fimbrina funziona come monomero e la si trova dove i filamenti di actina formano strutture a fasci legate in maniera stretta e legando diversi fasci di filamenti di actina li lega in maniera più stretta rispetto all' α actinina con ingombro maggiore

rispetto alla fimbrina e si trova nei muscoli dove permette contrazioni mantenendoli ordinati e stabili strutturalmente paralleli. La miosina è una famiglia di proteina costituite da due catene con un dominio elicoidale importante per la formazione del dimero, un collo e una testa che interagisce con i monomeri di actina, ci sono due catene pesanti e due leggere, la parte N terminale interagisce con l'actina o altri interattori, non esiste solo questa proteina quella muscolare è la miosina due, ci sono altri tipi di miosina che sono caratterizzata da un dominio motore e dette proteine motrici insieme a chinesine e dineine e hanno altri domini per interazioni per formare dimeri o assumere strutture peculiari, altri tipi di miosina come I, III che lavorano come monomeri, V dove possono interagire da un lato con citoscheletro e regioni che possono interagire con vescicole o organelli ed essere coinvolto nel trasporto di altri filamenti del citoscheletro come filamenti intermedi, fungere da ponte tra componenti citoscheletriche diverse o il trasporto di vescicole, il dominio motrice con il filamento e altre porzioni interagisce specificatamente con un cargo come vescicola o altro filamento. La miosina V usa i filamenti di actina per muovere mitocondri dalla cellula madre alla figlia durante il processo di gemmazione del lievito.

10.2 Microtubuli

I microtubuli sono dei polimeri costituiti da una proteina detta tubulina. La tubulina è di due tipi si trova l' α e β tubulina che si associano non covalentemente per formare dimeri, come l'actina legano un GTP di questi l'attività GTPasica avviene a carico della β tubulina. Si uniscono insieme formando il protofilamento. Il microtubulo è formato dall'interazione di 13 protofilamenti che formano un microtubulo con una struttura cava che garantisce una certa robustezza e una certa elasticità. Si possono piegare permettendo il movimento di ciglia e flagelli la cui anima è costituita da microtubuli, sono strutture resistenti ma flessibili. I protofilamenti interagiscono tra i monomeri della stessa specie. Questo crea un andamento e struttura elicoidale del microtubulo. Inoltre si può distinguere una polarità negativa rivolta alla base che presenta la subunità α e una polarità positiva rivolta verso la subunità β . La formazione dei microtubuli si forma in maniera analoga ai filamenti di actina con una rapida crescita verso più el'assemblaggio del protofilamento avviene con l'incorporazione dei dimeri, poi la subunità β idrolizza il GTP favorendo il processo di depolarizzazione ora il monomero β può tornare a legare GTP e essere riutilizzato. Fino a che si trova il cappuccio e viene mantenuta una estremità contenente un certo numero di dimeri contenenti leganti GTP il processo di polimerizzazione può avvenire, quando la maggior parte dei dimeri è legata a GDP avviene una destabilizzazione con il disassemblamento delle subunità, processo catastrofico che porta un'instabilità del microtubulo con il rilascio delle varie subunità. Ci sono sostanze agenti antitumorali che stabilizzano o destabilizzano i microtubuli come taxolo, nocodazolo o la colchicina. I microtubuli sono strutture altamente dinamiche e si possono formare in maniera rapida. La dinamicità è garantita da fattori specifici e svolgono il ruolo analogo dei filamenti di actina. I microtubuli si formano grazie alla creazione di un nucleo ad opera di un terzo tipo di tubulina, la tubulina γ è un componente importante del centro organizzatore dei microtubuli, il centro dove si creano (MTOC, centro organizzatore dei microtubuli). Questo centro è costituito da tubulina γ e proteine accessorie che formano il complesso γ -TUSC, struttura importante in quanto contribuisce a creare il centro di nucleazione da cui vengono prodotti i microtubuli. Il centro organizzatore dei microtubuli in molte cellule animali viene detto centrosoma, costituito da siti di nucleazione dove parte la polimerizzazione con γ -Tusc e al suo interno presenta due centrioli. I centrioli sono costituiti da microtubuli particolari che formano dei trimeri e sono uniti tra di loro formando un centriolo formato da 9 trimeri. Questa struttura è importante e viene duplicata poco prima della divisione ed è importante in quanto da lì si origina il fuso mitotico da dove si formano i microtubuli che si attaccano ai centromeri che permettono la

segregazione dei cromosomi. Il centrosoma con i centrioli e i microtubuli con la polarità positiva verso la periferia della cellula e quella negativa verso il centrosoma, vale in generale e nel caso delle cellule neuronali la polarità può essere diversa. Questa polarità è importante in quanto può essere riconosciuta da dineine (trasporto (più meno) e chinesine (deputate al trasporto meno più). Per trasporto verso periferia usano dineine e quello in senso opposto chinesine. Vi sono proteine e fattori che permettono e stabilizzano e destabilizzano i microtubuli consentendo un certo turnover come le proteine associate ai microtubuli o MAP. Due sono importanti nel contesto delle cellule nervose e sono MAP2 e la proteina tau, interessanti in quanto MAP2 la si trova nei dendriti delle cellule neuronali, mentre tau localizza nell'assone. La funzione di queste proteine è di associarsi ai microtubuli interagendo con i protofilamenti e legano tra di loro protofilamenti, MAP2 ha un dominio molto più lungo e consente un compattamento più lasso rispetto a tau dove il dominio è corto e permette un compattamento maggiore. Il compattamento è importante per garantire una certa rigidità alla struttura e mutazioni di tau possono avere ripercussioni importanti nei trasporti, molte neuropatie comportano delle ripercussioni sul funzionamento della cellula nervosa con gravi compromissioni, MAP2 e tau possono essere utilizzati come marcatori specifici di un compartimento. Ci sono altre componenti importanti dei microtubuli ci sono altri fattori che promuovono la stabilità e la formazione di microtubuli e altri che destabilizzano la struttura e promuovono la depolarizzazione, XMAP11 promuove la stabilità e la chinesina13 è un fattore catastrofico in quanto destabilizza il cappuccio e rimuovendolo e destabilizzandolo promuove l'evento catastrofico, XMAP11 compete con la chinesina13 stabilizzando il CAP promuovendo la formazione dei microtubuli, ce ne sono altre che si attaccano a un'estremità come + TIP che si legano in maniera specifica all'estremità più del microtubulo e altre proteine come EB1 che viaggia lungo il microtubulo e si posiziona sulla polarità più e recluta altri fattori che poi possono essere coinvolti nella stabilizzazione o destabilizzazione. Ci sono fattori che destabilizzano i microtubuli come sostanze alcaloidi estratte da funghi, in questo caso prodotte dalla cellula e attivate in condizioni come la statmina che legandosi a due dimeri di tubulina impedisce che questi vengano incorporati nel protofilamento. Due proteine interagiscono con i microtubuli e hanno ruolo di trasporto: sono due tipi di proteine e utilizzano i microtubuli come binari e sono importanti per il trasporto di vescicole e proteine, sono le chinesine e le dineine, proteine motrici con un dominio che interagisce con i microtubuli, il dominio motore che è presente nella porzione N terminale e in altri può essere presente nella porzione C terminale nel caso della chinesina13 o della chinesina14, hanno tutte un dominio motore e sono simili alla miosina e formano dimeri caratterizzati da catene pesanti e catene leggere, quello delle catene leggere è poco chiaro ma sembra siano importanti per interagire con il cargo specifico. Il dominio motore è un dominio ATPasico e l'ATP ha un ruolo importante in quanto il legame di ATP con il dominio determina dei cambi conformazionali che permette alla proteina motrice di muoversi lungo il microtubuli, ne presentano due in quanto permette loro di camminare lungo il microtubulo alternando lo stato di legame ATP e ADP. Una subunità legata a ADP e l'altra da ATP, l'idrolisi determina il cambio conformazionale che porta la subunità che ha subito l'idrolisi di avanzare e porsi di fianco rispetto alla subunità che in precedenza legava ADP. La velocità di movimento di alcuni cargo è notevole. Si mette in risalto oltre alle teste anche il ruolo della struttura di collo che permettono alle teste di spostarsi e alla chinesina di muoversi lungo il microtubulo. L'altra famiglia di proteine motrici sono le dineine, più complesse e molto più grandi, oltre alle catene pesanti e leggere presentano delle catene intermedie, hanno un dominio motore con attività ATPasica e un dominio che riconosce i microtubuli, le dineine possono essere citoplasmatiche e associate all'assonema e sono nel contesto di ciglia e flagelli con ruolo nel movimento di microtubuli che determina il movimento ondulatorio dei flagelli e quello a frusta delle ciglia. Un cargo viene mosso in una direzione può essere legato non da un'unica chinesina o da un'unica dineina ma da multiple e il rapporto da chinesine a dineine dà la direzionalità del trasporto. Se prevale chinesine verso più (centro verso periferia) se prevale dineina

verso meno (da periferia verso il centro), le dineine sono importanti per riscostituire l'apparato del Golgi e ER dopo la mitosi. Il centrosoma è il centro di organizzazione dei microtubuli con i centrioli perpendicolari, sono costituiti da 9 triplette di microtubuli di cui uno è completo mentre gli altri due hanno forma simile a mezzaluna, questi tre uniti tra di loro da proteine accessorie costituiscono i centrioli che hanno un ruolo importante nel mantenimento del ciglio. La katanina il cui nome deriva dalla katana che va a tagliare e a scindere i microtubuli, se la statmina impedisce il reclutamento la katanina va a rompere il legame tra monomeri nei microtubuli. La portiene EB1 va a localizzare nell'estremità in fase di accrescimento e i microtubuli sono estremamente dinamici, si lega al cap ricco di dimeri legati a GTP. Il citoscheletro oltre a garantire certa rigidità è un componente estremamente dinamico. IL movimento avviene utilizzando microtubuli e proteine motrici con movimento bidirezionale che avviene grazie a chinesine e dineine. Poiché i microtubuli hanno polarità le proteine motrici la riconoscono e mediano il trasporto in una direzione, chinesine estremità più e dineine estremità meno. Le chinesine sono quelle che mediano il trasporto da centro a periferia mentre dineine opposto. Il movimento netto è dato dalla quantità di chinesine e dineine attaccate in rapporto tra di loro. Le dineine si trattano di portiene motrici molto grandi con catene pesanti e leggere ma presentano altri componenti che costituiscono le catene intermedie, hanno domini motori che tramite idrolisi dell'ATP di cambiare conformazione alla base della capacità di muoversi lungo i microtubuli. Lo spostamento di una dineina è notevole, sono in grado di effettuare spostamenti notevoli (8 nm) e sono quelle coinvolte nel funzionamento e nel movimento di due strutture specializzate che sono ciglia e flagelli. Il flagello caratteristico di batteri e di spermatozoi è un movimento ondulatorio mentre le ciglia a frusta, sono coinvolte dineine assonemiche mentre quelle coinvolte nel trasporto sono dineine citoplasmatiche. Nel caso di cellule che hanno una struttura particolare come i neuroni il sistema costituito dai microtubuli è complesso: nell'assone si trova una polarità negativa verso il corpo cellulare e positiva verso la periferia, nei dendriti ci sono microtubuli più corti con polarità mista. Nei dendriti i microtubuli sono più corti e con polarità diversa rispetto all'assone, tendono a sovrapporsi tra di loro e il trasporto nei dendriti è di tipo saltatorio in quanto il carico viene trasportato, si blocca quando arriva all'estremità e va a saltare nel microtubulo adiacente. Andando a vedere alcune strutture come ciglia e flagelli sono strutture costituite e presentano al loro interno microtubuli arrangiati in un particolare modo. Hanno struttura simile caratterizzato da 9 dimeri di microtubuli, uno completo mentre l'altro a forma di mezzaluna come nel centriolo, costituiscono l'anello più esterno e all'interno si trova una coppia di microtubuli completi uniti mediante proteine accessorie circondati da una guaina. I vari microtubuli sono uniti tra di loro mediante nessina che unisce tra di loro i dimeri di microtubuli. L'altra componente importante è costituita dalla dineina con due estremità con un braccio interno e uno esterno, l'interazione di dineine con microtubuli adiacenti permette il movimento di flagello e ciglio, il sistema funziona in quanto i microtubuli sono uniti tra di loro e la dineina non può spostare i microtubuli e l'idrolisi dell'ATP si traduce in un spostamento a frusta o ondulatorio dei microtubuli, alla base del funzionamento è le dineine e come interagiscono con i microtubuli e come questi interagiscono tra di loro, rompendo i legami tra i microtubuli questi sono in grado di scorrere tra di loro grazie alle dineine, quando rimangono legati la dineina causa una flessione alla base dell'attività ondulatoria o a frusta. Il ciglio è simile al flagello ma alla base presenta un centriolo che permette di interagire con il citoscheletro circostante.

10.3 Filamenti intermedi

I filamenti intermedi a differenza di actina e tubulina sono assenti negli animali con scheletri rigidi costituita da chitina ma si trovano nelle cellule di organismi senza questa struttura. La funzione dei filamenti è di conferire resistenza agli stress meccanici alle cellule in particolare epiteliali. Che sono

unite tra di loro utilizzando desmosomi giunzioni molto strette che permette alle cellule di unirsi tra di loro e i filamenti intermedi sono componente importanti dei desmosomi in modo che a stress meccanico non si dissocino tra di loro. Sono ancorate alla base con emidesmosomi e i filamenti intermedi permettono alle cellule di ancorarsi. La funzione dei filamenti è una funzione legata a rendere le cellule resistenti agli stress meccanici. Si trovano anche nel nucleo dove formano la lamina nucleare, la rete sotto la membrana nucleare e sono costituiti da lamina A, B e C. Alcune proteine che formano i filamenti intermedi si trovano nel muscolo come desmine, origine mesenchimale come vimentina e in particolare la componente espressa dalle cellule epiteliali sono le cheratine che resistono e vengono mantenute quando le cellule muoiono e costituiscono unghie e capelli. I microfilamenti sono otto tetrameri che sono costituiti a loro volta dai monomeri di una proteina filamentosa con struttura ad α elica nella struttura centrale, una porzione N e C terminale e all'interno dell' α elica ci possono essere ripetizioni fino a 40 volte di amminoacidi che permette di formare un dimero, i dimeri si uniscono tra di loro, interazione favorita da caratteri idrofobici e a differenza di microtubuli e filamenti di actina non hanno polarità, la porzione N e C terminale si associa in maniera antiparallela rispetto ad un altro dimero. I filamenti intermedi non hanno polarità. La funzione dei filamenti intermedi è importante e mutazioni a carico dei geni delle cheratine possono dare origine a patologia come l'epidermolisi bollosa semplice in cui mutazione a carico della cheratina determina la formazione di vesciche a causa della scarsa resistenza a stress meccanici con ulcerazioni a carico di epidermide e mucose. Come nel caso dei filamenti di actina e microtubuli ci sono delle proteine associate ai filamenti intermedi che svolgono un ruolo di unire tra di loro i filamenti intermedi e metterli a contatto con altri componenti come i membri della famiglia delle placchine che si tratta di proteine che interagiscono e legano i filamenti intermedi con i microtubuli. Membri di questa famiglia possono anche permettere l'interazione tra elementi citoscheletrici e componenti nucleari attraverso l'interazione con proteine nella membrana esterna e interna nel nucleo le proteine KASH e SUN transmembrana in cui KASH verso il citoplasma e SUN verso il lume del nucleo, queste proteine permettono di comunicare tra l'ambiente nucleare e l'ambiente esterno, comunicazione mediata dai filamenti intermedi della lamina nucleare e dalle placchine che interagiscono con i componenti citoscheletrici del citoplasma. Anche il nucleo può essere deformato e informazioni nel nucleo vengono tradotte e inviate alle componenti del citoplasma. La lamina nucleare ha funzione meccanica ma permette l'aggancio e inserimento tra DNA e altre componenti con la membrana nucleare (ancoraggio). Nelle cellule nervose si trovano i neurofilamenti N, L e H e sono importanti in quanto forniscono un substrato, un sostegno alle strutture citoscheletriche all'assone e permette il mantenimento strutturale e le malattie di l'herig o SLA (sclerosi laterale neurotrofica), associata con accumulo e assemblaggio anomalo di neurofilamenti e l'accumulo di queste proteine ha ripercussioni sul trasporto di sostanze e organelli che porta alla degenerazione del neurone e non si attua più la trasmissione e si perdono le capacità motorie.

10.4 Movimento cellulare

Il movimento cellulare avviene in tre passi: protrusione di una parte della membrana plasmatica che viene estroflessa, attacco e interazione tra membrana plasmatica e citoscheletro con substrato e la trazione in cui la parte citoplasmatica che si trova dietro viene portata in avanti. Questo meccanismo comporta riarrangiamenti del citoscheletro, in particolare la protrusione può avvenire grazie alla formazione di filopodi, lamellipodi o invadopodi, i filopodi è costituito da strutture simili a dita prodotti dalla polimerizzazione di actina che forma fasci molto stretti paralleli. I lamellipodi hanno alla base uno scheletro di actina che si dispone a rete a maglie e gli invadopodi o podosomi che costituiscono un terzo tipo di protrusione ricchi di actina. Gli invadopodi o podosomi avvengono

nelle tre direzioni e sta alla base in cellule cancerogene che invadono altri tessuti con alta mobilità e invadere tessuti legate alla produzione di metallo proteasi e altre sostanze che degradano la matrice extracellulare permettendo alla cellula di muoversi. Le proteine appartenenti alla famiglia Rho, Rac e Cdc42 sono GTPasi monomeriche proteine che legano GTP e passano da attive in inattive se legano GTP o GDP. Sono state viste nella trasduzione del segnale, la funzione di questi fattori è di agire al livello del citoscheletro, attivazione di Cdc42 comporta la formazione di tanti filopodi, in quanto viene attivata la formazione di filamenti di actina che di fatto va ad attivare la proteina WASP (Wiskott-Aldrich syndrome legata a sue mutazioni e va ad agire a carico della popolazione del sistema immunitario con elevata mobilità e cellule hanno scarsa mobilità e in cellule che cercano agenti estranei causa problemi) che promuove la nucleazione dell'actina promuovendo la formazione di filamenti di actina. L'attivazione di Rac, una GTPasi monomerica porta alla formazione di strutture lamellipodiali. Rho porta alla formazione di filamenti di actina che permettono l'ancoraggio molto forte tra cellula e substrato (fibre di stress) importanti per una forte interazione e ancoraggio con il substrato. Importante in quanto l'attivazione di filopodi o lamellipodi può creare un movimento in una direzione. Specialmente negli anticorpi il riconoscimento di batteri l'arrivo del segnale si ha attivazione di molecole che permettono la formazione di lamellipodi o filopodi in una parte e disattivazione nell'altra. Le sostanze chemiorepellenti invece tendono a depolimerizzare l'actina e promuovere la formazione di filopodi in un'altra zona della cellula permettendole di allontanarsi. Le cellule molto mobili sono molto ricche in filopodi e lamellipodi, strutture molto sensibili che promuovono la crescita e il movimento in un'altra direzione quando trovano sostanze chemiorepellenti, regolate da membri di famiglia Rac, Rho e Cdc42. Dopo l'attivazione di Rho vengono attivate altre vie dei filamenti di actina su cui miosina va ad agire portando alla contrazione della cellula verso i filopodi.

Capitolo 11

Esperienza di laboratorio

11.1 Giorno 1 - esame di uno striscio di sangue

11.1.1 Descrizione

Lo striscio di sangue periferico è un esame di laboratorio che serve a ottenere uno stato istantaneo della popolazione cellulare presente in una goccia di sangue. L'esame si esegue strisciando una goccia di sangue sul vetrino.

11.1.1.1 Dati raccolti

Lo striscio di sangue permette di valutare:

- Globuli rossi (eritrociti): trasportano l'ossigeno ai tessuti.
- Piastrine (trombociti): piccoli frammenti cellulari importanti per la formazione del coagulo.
- Globuli bianchi (leucociti): intervengono nella risposta immunitaria.

11.1.1.2 Risvolti clinici

Esistono condizioni patologiche che influiscono sul numero, morfologia, funzionalità e vita delle cellule del sangue. Lo striscio di sangue periferico è ritenuto il miglior test per valutare e identificare in modo corretto anomalie e immaturità delle cellule del sangue. Nel caso vengano evidenziate cellule anomale in modo significativo è possibile che il paziente sia affetto da una patologia e diventa necessario eseguire esami di approfondimento.

11.1.2 Allestimento di uno striscio

Per preparare uno striscio di sangue si agita la provetta contenente il sangue (e un anticoagulante per riuscire a mantenerlo stabile per una settimana) per sospendere la frazione corpuscolata in quella liquida e si prelevano 20mL di campione con una pipetta. Successivamente si deposita una piccola goccia in prossimità della banda sabbiata di un vetrino pulito con etanolo 70%. Si appoggia un secondo vetrino (pulito allo stesso modo) sulla goccia, lo si inclina di 45° e si striscia, formando così una striscia uniforme. Infine si lascia fissare lo striscio all'aria sotto cappa per qualche minuto prima di essere colorato. Il sangue rimanente viene smaltito nei rifiuti biologici, taniche grigie sotto cappa contenenti un volume di candeggina al 10%.

11.1.3 Qualità dello striscio

La qualità di uno striscio viene valutata in base a tre caratteristiche:

- È necessaria una distribuzione cellulare uniforme.
- Le cellule devono mantenere le proprie caratteristiche il più possibile, anche se su monostrato.
- Non devono esserci artefatti (corpi esterni).

11.1.4 Colorazione dello striscio

Lo striscio va colorato in modo da riuscire a distinguere le diverse cellule del sangue e i globuli bianchi tra di loro. Il Diff-Quik è una colorazione citologica utile per raggiungere questo scopo. È composto da tre soluzioni:

- Fissativo a base di metanolo di colore verde chiaro.
- Soluzione *I*: eosina in tampone fosfato di colore rosso.
- Soluzione *II*: tiazina in tampone fosfato di colore blu.

11.1.4.1 Eosina

L'eosina è una molecola acida con alta affinità per costituenti cellulari con reazione basica. Ha come target in questo caso le proteine del citosol. Una porzione colorata di una sfumatura del rosso viene detta acidofila o eosinofila.

11.1.4.2 Coloranti tiazinici

I coloranti tiazinici sono molecole basiche con alta affinità per costituenti cellulari con reazione acida. Hanno come target in questo caso nucleo, ribosomi ricchi di acidi nucleici, ER rugoso e la matrice cartilaginea.

11.1.4.3 Procedimento

Dopo aver fatto fissare lo striscio sotto cappa:

1. Lo si immerge nella soluzione fissativa per 30 secondi, lo si sciacqua e lo si asciuga (appoggiando i bordi esterni del vetrino).
2. Lo si immerge nella soluzione 1 (eosina) per 1 secondo 5 volte, si sciacqua e si asciuga.
3. Lo si immerge nella soluzione 2 (tiazina) per 1 secondo 5 volte, si sciacqua, si tampona e si monta il vetrino.

11.1.4.3.1 Montare il vetrino Con montare il vetrino si intende appoggiare un vetrino copri-oggetto su di esso in modo da proteggere il preparato. Il vetrino copri-oggetto si fissa nei bordi e si fissa con smalto trasparente.

11.1.5 Esame dei vetrini

Si inizia con osservare lo striscio con un piccolo ingrandimento in modo da valutare l'adeguatezza della distribuzione cellulare e della colorazione. Inoltre si osserva l'intero vetrino in modo da assicurarsi di non perdere popolazioni cellulari che si potrebbero concentrare ai margini. Si effettuano poi esami morfologici e conte delle cellule usando un ingrandimento maggiore a $100\times$.

11.1.5.1 Globuli rossi

Gli eritrociti o emazie sono le cellule più abbondanti nel sangue e sono specializzate nel trasporto dei gas respiratori. Sono eosinofili a causa della presenza di emoglobina basica e sono valutati in base a forma, grandezza e colore (contenuto emoglobinico)

11.1.5.1.1 Tipologie di globuli rossi

- Mammiferi: anucleati, discoidali e biconcavi.
- Altri: nucleati, ellissoidali e biconvessi.

11.1.5.1.2 Anemia falciforme Un esempio di patologia osservabile direttamente con lo striscio di sangue è l'anemia falciforme. Questa patologia causa un'alterazione della forma dei globuli rossi, che passano da essere biconcavi ad avere una forma simile a una falce. La malattia è dovuta ad un difetto genetico: una mutazione puntiforme da *GAG* in *GUG* sostituisce un acido glutammico con una valina. La diffusione di questa malattia nelle popolazioni africane è dovuta alla resistenza che conferisce contro la malaria.

11.1.5.1.2.1 Sintomi

- Anemia: emolisi più agevole, carenza cronica di globuli rossi. Il paziente prova stanchezza, debolezza, mancanza di fiato, pallore, cefalea e difficoltà visive.
- Crisi dolorose: insorgono repentinamente e con durata variabile. Sono causate dalle occlusioni provocate dall'aggregazione dei globuli anomali che impediscono il flusso del sangue. I dolori sono al torace, addome o articolazione con alta frequenza.
- Sindrome mani-piede: estremità degli arti gonfie: uno dei primi segnali dell'anemia falciforme nei bambini.
- Infezioni: dovute alle lesioni della milza dei globuli anomali.
- Ritardo dello sviluppo.
- Problemi della vista.
- Pelle fredda e gonfiore (edemi) di mani e piedi.
- Ittero.

11.1.5.2 Piastrine

Le piastrine (trombociti nei non mammiferi) sono frammenti cellulari derivanti dai megacariociti. Sono privi di nucleo ma dotati di membrana plasmatica. Partecipano all'emostasi (chiusura delle lesioni formatesi nella parete dei vasi sanguigni) e alla coagulazione (formazione del coagulo o tappo piastrinico). Hanno una forma sferica o ellissoidale e presentano una zona centrale intensamente colorata di blu o violetto. Delle piastrine si può valutare il numero e l'aspetto.

11.1.5.2.1 Trombocitopenia Si intende per trombocitopenia una carenza di piastrine nel sangue che aumenta il rischio di sanguinamento. Si verifica quando il midollo osseo produce una quantità insufficiente di piastrine, quando ne viene distrutto un numero eccessivo o quando si accumulano nella milza ingrossata.

11.1.5.3 Globuli bianchi

I leucociti sono cellule coinvolte nella risposta immunitaria. Sono facilmente osservabili e possono essere stimati il numero e tipo di cellule presenti. Dei globuli bianchi si osserva forma, grandezza e aspetto generale. Vengono classificati in cinque diversi tipi e se ne determina la percentuale relativa o conta differenziale.

11.1.5.3.1 Conta differenziale La conta differenziale misura il numero di ogni tipo di globulo bianco determinando se le cellule sono presenti o meno in proporzione normale tra loro o se sono presenti cellule immature.

11.1.5.3.1.1 Formula leucocitaria Si intende per formula leucocitaria la determinazione percentuale dei vari tipi cellulari di leucociti presenti nello striscio di sangue periferico.

Formula leucocitaria valori normali nell'adulto	Percentuali	Assoluti
Neutrofili	40-70%	2000-8000mm ³
Linfociti <i>B</i> e <i>T</i>	25-55%	1500-5000mm ³
Monociti	2-10%	100-900mm ³
Eosinofili	0.5-6%	20-600mm ³
Basofili	0-2%	2-150mm ³

11.1.5.3.1.2 Informazioni ottenibili La conta differenziale viene usata come parte della conta completa delle cellule del sangue e del check-up generale. Può essere utilizzata per diagnosticare e monitorare patologie e condizioni che colpiscono uno o più tipi di globuli bianchi. È un supporto nella diagnosi di patologie che colpiscono la produzione di certi tipi di globuli bianchi, informando su quale tipo sia basso o alto. Può fornire indizi sulla causa specifica di una risposta immunitaria, aiutando a determinare se l'infezione è causata da batteri o virus.

11.1.5.3.2 Agranulociti - linfociti I linfociti rappresentano il 20-30% dei leucociti. Sono i globuli bianchi di dimensione inferiore e svolgono le principali funzioni effettrici. Si dividono in linfociti *B*, *T* e *NK*, ma le loro differenze non sono apprezzabili al microscopio. Il nucleo è sferico e ben evidente: occupa la maggior parte del volume cellulare. Il citoplasma circonda il nucleo in un sottile alone leggermente basofilo e con rare granulazioni azzurrofile.

11.1.5.3.2.1 Linfocitopenia La linfocitopenia è la diminuzione patologica del numero di linfociti nel sangue. Può essere:

- Linfocitopenia acuta: il numero di linfociti può diminuire temporaneamente durante:
 - Infezioni virali.
 - Digiuno.
 - Periodi di grave stress fisico.
 - Uso di corticosteroidi (prednisone).
 - Chemioterapia e radioterapia per un tumore.
- Linfocitopenia cronica: il numero di linfociti può restare basso per un lungo periodo quando un soggetto è affetto da:
 - Patologie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico o l'artrite reumatoide.
 - Infezioni croniche come AIDS e tubercolosi miliare.
 - Tumori come leucemie e linfomi.

11.1.5.3.2.2 Leucocitosi linfocitica La leucocitosi linfocitica è l'aumento patologico del numero dei linfociti nel sangue. La sua causa più comune è un'infezione virale. Quando si rileva un loro aumento, si esamina un campione al microscopio per determinare se i linfociti:

- Si presentano in forma attivata (infezioni virali).
- Appaiono immaturi o alterati (leucemie o linfomi).

11.1.5.3.3 Agranulociti - monociti I monociti rappresentano il 3-8% dei leucociti. Quelli che circolano nel sangue periferico sono i precursori dei macrofagi tissutali o fagociti mononucleati. Sono i globuli bianchi più voluminosi:

- Il nucleo in posizione eccentrica è voluminoso e reniforme.
- Nel citoplasma sono visibili granuli azzurrofilo di piccole dimensioni.

11.1.5.3.3.1 Monocitosi Si intende per monocitosi un'elevata concentrazione dei monociti nel sangue. Si verifica in caso di:

- Infezioni.
- Malattie ematologiche.
- Patologie autoimmuni.
- Condizioni particolari come splenectomia.

11.1.5.3.4 Granulociti - neutrofili I neutrofili sono la componente cellulare più abbondante dei leucociti 50-70%. Presentano attività fagocitaria essendo fagociti polimorfonucleati. Il nucleo è multilobato e ben visibile, mentre nel citoplasma si possono osservare numerosi granuli di piccole dimensioni con scarsa affinità per i coloranti. Aumentano di numero in presenza di infezioni batteriche o disturbi infiammatori.

11.1.5.3.4.1 Formula leucocitaria invertita L'inversione della formula leucocitaria è la riduzione dei neutrofili associata all'aumento dei linfociti. A volte è costituzionale ma può anche essere causata da:

- Infezioni virali.
- Neoplasie.
- Disordini immunitari.
- Assunzione di alcuni farmaci.

11.1.5.3.4.2 Leucocitosi neutrofila La leucocitosi neutrofila è l'aumento del numero di neutrofili. La sua causa più comune è la normale risposta dell'organismo a un'infezione: i neutrofili sono i primi a rispondere in caso di infezioni batteriche, funghi (micosi) e protozoi. Può essere anche dovuta a:

- Lesioni.
- Disturbi infiammatori.
- Determinati farmaci.
- Alcune leucemie.

11.1.5.3.4.3 Neutropenia La neutropenia è caratterizzata da un numero patologicamente basso di neutrofili nel sangue. Se grave aumenta il rischio di contrarre un'infezione potenzialmente fatale e compare spesso come effetto collaterale di chemioterapia o radioterapia.

11.1.5.3.5 Granulociti: basofili I basofili rappresentano lo 0.5-1% dei leucociti. Hanno un nucleo bilobato o reniforme e nel citoplasma sono presenti granuli molto grandi con intensa colorazione basofila e metacromatica. Rilasciano mediatori come istamina, bradichina e serotonina in caso di infortunio o infezione, aumentando la permeabilità capillare e il flusso di sangue nella zona interessata, favorendo l'arrivo delle altre molecole e cellule coinvolte. Sono inoltre coinvolti nelle reazioni allergiche e nei fenomeni di ipersensibilità oltre a produrre eparina, sostanza fondamentale nel processo finale di coagulazione del sangue.

11.1.5.3.5.1 Basofilia L'incremento del numero di basofili o basofilia si manifesta nei soggetti con ipotiroidismo e nelle malattie mieloproliferative. Un esempio è la mielofibrosi, una malattia che fa sì che le cellule progenitrici delle cellule del sangue diventino cellule fibrose.

11.1.5.3.5.2 Basopenia La diminuzione del numero di basofili o basopenia si manifesta nelle reazioni acute da ipersensibilità e nelle infezioni.

11.1.5.3.6 Granulociti: eosinofili Gli eosinofili sono il 2-4% dei leucociti, di cui meno del 1% circola nel sangue, mentre la parte restante localizza nel midollo osseo rosso e nei tessuti. Il nucleo è generalmente bilobato con i lobi collegati da un sottile segmento di cromatina e il citoplasma è ricco di grossi granuli acidofili evidenziati dall'eosina.

11.2. GIORNO 2 - ESTRAZIONE DI PROTEINE E DNA

11.1.5.3.6.1 Eosinopenia La carenza del numero di eosinofili o eosinopenia si manifesta nella sindrome di Cushing, nelle infezioni del torrente ematico (sepsi) e durante il trattamento con corticosteroidi. Generalmente non causa problemi in quanto altre parti del sistema immunitario la compensano adeguatamente.

11.1.5.3.6.2 Eosinofilia Un aumento del numero di eosinofili o eosinofilia si manifesta nei disturbi allergici o nelle infezioni parassitarie. Anche alcuni tumori come il linfoma di Hodgkin e leucemia e malattie mieloproliferative possono causare eosinofilia.

11.1.5.4 Distinguere le cellule presenti nel sangue

Corpuscolo	Colore
Globuli rossi	Rosa, rosso, giallognolo
Piastrine	Viola, granuli blu
Neutrofili	Nuclei blu, citoplasma rosa, granuli violetti
Eosinofili	Nuclei blu, citoplasma blu, granuli rossi
Basofili	Nuclei viola o blu scuro, granuli violetti
Monociti	Nuclei viola, citoplasma blu chiaro
Linfociti	Nuclei viola, citoplasma blu chiaro

11.2 Giorno 2 - estrazione di proteine e DNA

11.2.1 Cellule *Hela*

Le cellule *Hela* sono parte della prima linea cellulare creata. Sono cellule immortalizzate raccolte nel 1951 dai tessuti di un cancro alla cervice uterina di Henrietta Lacks. Queste cellule possono osservarsi ad alta densità o a bassa densità in base alla risoluzione necessaria all'esperimento.

11.2.1.1 Cellule immortalizzate

Si intende per cellule immortalizzate cellule che, se vengono mantenute nell'ambiente appropriato *in vitro* possono dividersi un indefinito numero di volte. Le cellule normali, invece hanno un numero massimo di divisioni possibili.

11.2.1.2 Stato di salute delle cellule

Prima di compiere degli esperimenti su di esse ci si deve assicurare del loro stato di salute. Questo si controlla osservando la loro forma: ogni cellula in adesione alle piastre ha una forma particolare. Le cellule *Hela* in particolare assumono forma trapezoidale e altre conformazioni indicano uno stato di stress. Per esempio in caso di infezione batterica le cellule si arrotondano e si osservano pallini neri che viaggiano per il terreno.

11.2.1.3 Confluenza

Si intende per confluenza delle cellule quanto queste si trovano vicine tra loro. Con il tempo questo valore aumenta in quanto le cellule si dividono e riempiono la superficie della piastra. Si può passare in un giorno dal 10% al 90% di confluenza. Un valore di confluenza ottimale si pone al 80% in quanto le cellule sono confluenti ma non ammassate. È importante durante i controlli osservare tutta la piastra.

11.2.2 Estrazione di proteine

11.2.2.1 Protocollo

1. Osservazione delle cellule *HeLa* al microscopio ottico (obiettivo 10×).
2. Eliminazione del terreno della piastra con le cellule *HeLa*, versandolo nel becker di vetro e lavando con 5ml di *PBS* utilizzando pipetta pasteur.
3. Aspirazione del resto di *PBS* con pipetta *P1000* mantenendo la piastra inclinata di 45°.
4. Aggiunta di 500µl di protein lysis buffer mantenendo la piastra sul ghiaccio.
5. Stacco delle cellule con lo scraper e raccolta della sospensione con la *P1000* trasferendola in una delle eppendorf.
6. Centrifuga a 13 000 *rpm* per 10 minuti a 4°.
7. Preparazione di una provetta eppendorf mettendola in ghiaccio.
8. Trasferimento del surnatante (lisato proteico) nella provetta eppendorf in ghiaccio, senza toccare il pellet.
9. Eliminazione della provetta eppendorf con il pellet.

11.2.2.2 Tampone di lisi - *RIPA buffer*

Il *RIPA* buffer è una soluzione tampone che viene utilizzata per l'estrazione di proteine da cellule di mammifero.

11.2.2.2.1 Composizione

- 50mM *Tris-HCl*, pH 7.4: tampone per prevenire la denaturazione delle proteine.
- 150mM *NaCl*: impedisce l'aggregazione proteica non specifica.
- 1% *NP-40*: detergente non ionico per estrarre le proteine, distruzione delle membrane.
- 0.1% *SDS*: detergente ionico per solubilizzare le proteine.

Si aggiungono inoltre cocktail inibitori contenenti:

- Inibitori delle proteasi: leupeptina o pepsatina
- DNAasi.
- RNAasi.

11.2.2.3 Cell scraping

Il cell scraping è il processo di rimozione delle cellule dalla piastra. Per farlo si utilizza una sorta di spazzolino con setole di plastica semirigida che grattano via le cellule dalla superficie della piastra.

11.2.2.4 Protocollo di quantificazione

1. Aggiunta di 20 μ l di lisato proteico in una cuvetta.
2. Trasferimento della cuvetta sotto cappa e aggiunta di 1mL di reagente di Bradford, chiudere con “parafilm” e mescolare la soluzione.
3. Attesa di 2 minuti.
4. Impostazione dello spettrofotometro con standard method/single λ .
5. Lettura dell’assorbanza dei campioni a 595nm:
 - (a) Misurazione del bianco composto da 20 μ l di buffer di estrazione e 1mL di reagente di Bradford. Elimina il segnale di fondo.
 - (b) Misurazione del campione.
6. Eliminazione della cuvetta.

11.2.2.4.1 Bradford - metodi colorimetrici Essendo che proteine e DNA non assorbono nel visibile si rende necessario utilizzare metodi colorimetrici. Il saggio Bradford è basato sull’utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue *G-250*. Il meccanismo di base è il legame del colorante a *pH* acido con i residui basici di arginina, istidina, fenilalanina, triptofano e tirosina (a *pH* basico)

11.2.2.4.1.1 Colorante libero Il colorante libero in forma cationica presenta un massimo di assorbimento a 465nm e un colore rosso.

11.2.2.4.1.2 Legato a proteine Dopo il legame con le proteine si osserva uno spostamento del massimo di assorbimento a 595nm a causa della stabilizzazione della forma anionica del colorante. Questo ora presenta un colore blu.

11.2.2.4.1.3 Vantaggi e svantaggi

Vantaggi:

- Semplice da preparare.
- Immediato sviluppo del colore.
- Complesso stabile (osservazione possibile fino a 2 ore dopo la creazione della soluzione).
- Sensibilità elevata (fino a 22 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$).
- Compatibilità con la maggior parte di tamponi comuni, agenti denaturanti come guanidina *HCl* 6*M* e urea 8*M* e preservanti come sodio azide.

Svantaggi:

- Il reagente colora le cuvette ed è difficile da rimuovere.
- La quantità di colorante che si lega alle proteine dipende dal contenuto di amminoacidi standard, rendendo difficile la scelta di uno standard.
- Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida.

11.2.2.4.2 Curva standard La curva standard per la concentrazione proteica viene ottenuta utilizzando concentrazioni già note di albumina sierica bovina *BSA*, proteina sierica che trasporta acidi grassi e importante per il mantenimento del *pH* del plasma. La *BSA* ha pertanto il ruolo di proteina di riferimento.

11.2.2.4.2.1 Creazione Per creare una curva standard si misura l'assorbanza a concentrazioni crescenti sulla proteina di riferimento *BSA* e si misura il bianco. Occorrono numerosi punti di osservazione (almeno 5) e misure ripetute in doppio o triplo. Inoltre si nota come il bianco deve contenere tutti i reagenti tranne la sostanza da determinare.

1. Incubazione la soluzione per 5 minuti.
2. Lettura dell'assorbanza a 595nm.
3. Costruzione della retta di taratura.

11.2.2.4.3 Retta di taratura Si costruisce la retta di taratura mettendo i valori di assorbanza sull'asse delle *Y* e i valori crescenti di concentrazione di *BSA* sull'asse delle *X*. Si ottiene pertanto una retta che mette in relazione concentrazione proteica e assorbanza.

11.2.2.4.4 Quantificazione Usando l'equazione fornita dalla retta di taratura ottenuta si può ricavare la concentrazione del campione incognito:

$$y = a + bx$$

Dove:

- *y* è il valore di assorbanza letto.
- *x* è l'incognita, concentrazione delle proteine.

La concentrazione delle proteine del campione sarà pertanto:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

11.2.2.4.5 Range di lettura È importante per avere letture precise rimanere in un certo range di concentrazione, ottimale da 0.1 a 0.7: se il blu è troppo brillante o troppo poco lo spettrofotometro non riesce ad essere preciso. Per ovviare a questo problema in caso di eccesso si fanno diluizioni del campione, prima 1 : 10, poi 1 : 50 e infine 1 : 100. Queste concentrazioni andranno poi tenute in considerazione nel calcolo della concentrazione finale.

11.2.3 Estrazione di DNA

11.2.3.1 Protocollo

1. Osservazione delle cellule *HeLa* al microscopio ottico (obiettivo 10×).
2. Eliminazione del terreno della piastra con le cellule *HeLa*, versandolo nel becker di vetro e lavando con 5ml di *PBS* utilizzando pipetta pasteur.
3. Aspirazione del resto di *PBS* con pipetta *P1000* mantenendo la piastra inclinata di 45°.

11.2. GIORNO 2 - ESTRAZIONE DI PROTEINE E DNA

4. Aggiunta di 1ml di lysis buffer.
5. Stacco delle cellule con lo scraper e raccolta della sospensione con la *P1000* trasferendola nel tubo con 3mL di acqua bidistillata.
6. Aggiunta del restante 1ml di lysis buffer.
7. Capovolgere il tubo 5 volte, facendo attenzione e non agitare con forza.
8. Aggiungere 300 μ l di proteasi *K* al tubo.
9. Capovolgere il tubo 5 volte, facendo attenzione e non agitare con forza.
10. Incubare il tubo a 50° per 10 minuti nel bagnetto.
11. Versare lentamente nel tubo 10mL di isopropanolo freddo mantenendo il tubo inclinato a 45°.
12. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
13. Capovolgere il tubo 5 volte, facendo attenzione e non agitare con forza.

11.2.3.2 Tampone di lisi *DNA*

Il tampone di lisi contiene un detergente capace di rompere la membrana cellulare fosfolipidica e la membrana nucleare rilasciando il DNA in soluzione. La soluzione contiene anche un agente tamponante per mantenere il *pH* della soluzione in modo da preservare la stabilità del DNA. Viene anche aggiunta una proteasi per rimuovere le proteine legate al DNA e distruggere enzimi cellulari che lo digerirebbero. L'estratto cellulare contenente la proteasi viene incubato a 50°, temperatura ottimale per l'attività della proteasi.

11.2.3.3 Precipitazione o flocculazione del *DNA*

11.2.3.3.1 Metodo di precipitazione

11.2.3.3.1.1 Sali Il tampone di lisi contiene anche sali che rendono il DNA meno solubile nell'estratto cellulare. La carica negativa del DNA legata ai gruppi fosfato lo rende solubile. Quando un sale viene aggiunto al campione gli ioni sodio del sale sono attratti dalle cariche negative del DNA e le neutralizzano, permettendo alle molecole di DNA di unirsi tra di loro.

11.2.3.3.1.2 Alcol L'aggiunta di alcol freddo precipita il DNA in quanto insolubile in presenza di un'alta concentrazione salina e di alcol.

11.2.3.3.2 Visualizzare il DNA Il DNA precipitato è visibile come fini filamenti bianchi al limite dello strato alcolico, mentre le altre sostanze cellulari rimangono in soluzione. Sono necessari migliaia di filamenti di DNA per formare una fibra grande abbastanza da essere visibile. Il DNA in caso di contaminazioni può assumere colorazione giallognola o rossiccia e non galleggiare nella soluzione.

11.2.3.3.2.1 Contaminazioni In caso di contaminazioni il DNA deve essere fatto precipitare di nuovo: si pelletta il flocculo, si rimuove il surnatante, si aggiunge alcol freddo e si lascia incubare a basse temperature e lo si risospende in *TE* (tris-edta) o acqua.

11.2.3.3.3 Altre molecole Le altre molecole rimangono in soluzione e non sono pertanto visibili.

11.3 Giorno 3 - Colture cellulari

Si intende per coltura cellulare, una coltura di cellule che deriva da un tessuto e fatta crescere in un ambiente artificiale a loro favorevole. Dal tessuto di origine animale o vegetale si rimuove pertanto una porzione di cellule.

11.3.1 Disgregazione del tessuto

Il tessuto deve essere disgregato per generare un coltura. La disgregazione può essere:

- Enzimatica: enzimi proteolitici.
- Meccanica: disgregatori meccanici per rompere i legami cellula cellula.

11.3.2 Coltura primaria

Si definisce coltura primaria lo stadio successivo all'isolamento delle cellule. È eterogenea in quanto i tessuti contengono diversi tipi di cellule. Il mantenimento è limitato in quanto le cellule non possiedono capacità di replicazione infinita ma permette di osservare caratteristiche delle cellule in vivo. Queste proliferano in appropriate condizioni fino a che saturano il terreno e devono essere trasferite. Il passaggio o subculture genera una linea cellulare.

11.3.3 Linea cellulare

La linea cellulare è una coltura cellulare omogenea, costituita ovvero da un solo tipo cellulare.

11.3.3.1 Finita

Le cellule si dividono e propagano solo per un numero limitato di volte prima di perdere l'abilità di proliferare ed andare incontro a senescenza.

11.3.3.2 Continua

Le cellule si propagano in maniera indefinita in quanto sono diventate immortali spontaneamente (derivano da un tumore) in seguito a trasformazione con oncogeni virali o trattamenti chimici. Le cellule trasformate crescono molto velocemente ma perdono molte delle caratteristiche originali in vivo.

11.3.4 Morfologia della coltura cellulare

11.3.4.1 Colture in sospensione

Le colture in sospensione sono cresciute nel terreno di coltura in piccoli gruppi o solitarie. Crescono senza aderire. Sono tipicamente derivate dal sangue, non costituiscono tessuti solidi e sono libere di circolare nel fluido.

11.3. GIORNO 3 - COLTURE CELLULARI

11.3.4.2 Colture in adesione

Le colture in adesione o su monostrato necessitano per crescere di superfici solide trattate con sostanze specifiche. Aderiscono alla superficie del contenitore. Queste cellule possiedono morfologie specifiche in base al tipo cellulare: allungate bipolari o multipolari.

11.3.4.3 Forma

La forma delle cellule dipende dal tessuto dal quale si ricavano e può essere:

- Sferica per le cellule in sospensione.
- Allungata per cellule bipolari o multipolari come i fibroblasti.
- Poligonale con dimensioni più regolari come le cellule *HeLa*.

11.3.5 Età delle colture

L'età delle colture può essere indicata come numeri di passaggi (numero di volte in cui una linea cellulare viene sottocoltivata) o come livello di raddoppio.

11.3.5.1 Passaggi

Seminando le cellule in un substrato queste cominciano a replicarsi e a ricoprire tutta la superficie disponibile. Quando saturano l'ambiente vanno diluite altrimenti si bloccano nella fase G_1 e vanno incontro ad apoptosi. Si rende necessario pertanto fare un passaggio: le si diluisce in un altro contenitore per dargli il tempo di crescere. Il tempo di passaggio dipende dalla velocità di replicazione delle cellule.

11.3.5.2 Livello di raddoppio

Si intende per livello di raddoppio il numero di volte totali in cui una popolazione cellulare ha raddoppiato a partire dal suo isolamento primario. È analogo al population doubling time, il tempo in cui una popolazione raddoppia.

11.3.6 Ottenere una coltura cellulare

Oltre alla messa a punto della coltura primaria in laboratorio si può acquistare da organizzazioni come *ATCC* o richiederle da altri laboratori.

11.3.7 Applicazioni della coltura cellulare

Una coltura cellulare è uno dei maggiori strumenti della biologia cellulare e molecolare. È un eccellente sistema modello in vitro per studiare:

- Normale fisiologia, biochimica e biologia.
- Sviluppo di nuovi farmaci e produzione di composti biologici.
- Effetto di farmaci e composti tossici.
- Terapia genica.
- Mutagenesi e carcinogenesi.
- Consulenza genetica.

11.3.8 Ambiente cellulare - terreno di coltura

Per coltivare una linea cellulare le cellule devono essere mantenute con un alto grado di sterilità, devono ricevere i nutrienti e trovarsi a temperatura e pH stabili.

11.3.8.1 Costituenti base

I costituenti base di un terreno di coltura sono le componenti e sostanze nutritive necessarie alla crescita delle cellule.

- Sali inorganici: bilanciamento osmotico, adesione cellulare, mantenimento del potenziale di membrana.
- Vitamine per crescita e proliferazione cellulare
- Cofattori enzimatici.
- Acidi grassi.
- Carboidrati come fonte di energia, glucosio e galattosio.
- Lipidi.
- Amminoacidi per la proliferazione cellulare.
- Fattori di crescita e ormoni (siero fetale bovino *FBS*).
- Assenza di virus o micoplasmi.

11.3.8.1.1 Siero Il siero è uno dei costituenti base del terreno di coltura, è un mix di albumine, fattori e inibiti di crescita che serve per:

- Crescita cellulare.
- Neutralizzazione di tossine.

Un siero è il siero bovino fetale *FBS* che deve esser controllato in ogni batch per l'assenza di virus e micoplasmi.

11.3.8.2 Mantenimento del pH

Le cellule necessitano di un pH neutro tra 7.2 e 7.4. La regolazione del Ph avviene tramite due sistemi di tamponamento o buffering.

11.3.8.2.1 Tamponamento naturale Il bilanciamento avviene attraverso CO_2 atmosferica, nell'incubatore si trova a pressione parziale al 5-10%. Nel terreno si inserisce anche bicarbonato che si accoppa con CO_2 per creare un tampone. È poco costoso e non tossico.

11.3.8.2.2 Tamponamento chimico Si aggiunge *HEPES* al terreno. Questo garantisce una capacità di tamponamento maggiore e non richiede atmosfera gassosa controllata. È costoso e tossico ad elevate concentrazioni.

11.3.8.2.3 Rosso fenolo Molti terreni ne contengono un identificatore come il rosso fenolo. Questo cambia colore quando cambia il pH : con pH neutro è rosso, ma diventa giallo con pH acido e viola con pH basico. In caso di cambio di colore si rende necessario cambiare il terreno.

11.3.9 Contenitori e strumenti per le colture cellulari

Per far crescere le colture cellulari si rendono necessari diversi strumenti.

11.3. GIORNO 3 - COLTURE CELLULARI

11.3.9.1 Contenitori per cellule

Si dividono in:

- Flask, con tappo ventilato per permettere lo scambio di CO_2 .
- Piastra di coltura con chiusura non ermetica.
- Microplate con chiusura non ermetica. Le microplate permettono di osservare colture diverse in parallelo: verrà utilizzata quella a 6 pozzetti per contenere le colture, di cui 4 verranno colorate.

11.3.9.2 Altri strumenti

- Tubi da 50 e 15mL.
- Microtubi da 0.5, 1.5 e 2mL.
- Pipette sierologiche 1, 2, 5, 10, 25mL.
- Pipette.
- Puntali.
- Micropipette a volume variabile.

11.3.10 Area di lavoro

11.3.10.1 Cappa biologica

La cappa biologica è un'area di lavoro asettica che garantisce:

- Il contenimento di liquidi e aerosol infettivi che si generano durante una procedura di lavoro.
- Protezione da polvere e contaminanti microbici presenti nell'aria.

È presente un flusso costante unidirezionale di aria filtrata da filtri *HEPA* sull'area di lavoro che è orizzontale e verticale per proteggere operatore e coltura cellulare.

11.3.10.1.1 Utilizzo Si disinfetta la superficie con etanolo 70% e si asciuga con carta prima e dopo il lavoro. Si sterilizza prima e dopo con raggi *UV*. Si noti come è un'area di lavoro e non di conservazione. Non si deve coprire le griglie esterne in quanto sono quelle responsabili del mantenimento del flusso.

11.3.10.2 Incubatore

L'incubatore è il luogo in cui vengono conservate le cellule in crescita. È in grado di mantenere la temperatura ottimale (37°) e una quantità fissa di CO_2 5% a pressione parziale in grado di contrastare l'acidificazione dei terreni. Anche l'umidità rimane stabile in modo da impedire l'evaporazione del terreno di coltura.

11.3.10.3 Contaminazioni

11.3.10.3.1 Contaminazioni chimiche Possono essere origine di contaminazioni chimiche endotossine, ioni metallici, tracce di disinfettanti. La contaminazione chimica è difficile da rilevare.

11.3. GIORNO 3 - COLTURE CELLULARI

11.3.10.3.2 Contaminazioni biologiche Se la coltura non viene lavorata correttamente può venir contaminata da batteri, funghi o micoplasmi. Quando questo avviene non è più utilizzabile: questi organismi cambiano infatti le condizioni di crescita. Si nota la presenza di batteri grazie a caratteristici pallini nella coltura. Un'altra contaminazione comune è quella da lievito, presente nell'aria.

11.3.10.3.3 Evitare contaminazioni La sorgente principale di contaminazioni è l'operatore. La cappa biologica dedicata a colture cellulari si trova in una stanza dedicata ad esse. L'operatore deve lavorare in maniera asettica:

- Lavarsi le mani.
- Indossare guanti e camice.
- Disinfettare i guanti con etanolo 70%.
- Disinfettare la superficie prima e dopo il lavoro.
- Disinfettare tutto ciò che viene messo sotto cappa.
- Dispensare liquidi con pipette o pipettatore.
- Usare materiale sterile.
- Aprire pipette, scatole di puntali, fiasche, tubi e reagenti solo sotto cappa.
- Dopo aver aperto un contenitore posizionare il tappo all'in giù.
- Richiudere ogni contenitore con cellule o reagenti appena possibile.
- Utilizzare antibiotici nel terreno

11.3.10.4 Norme di sicurezza

Un laboratorio di coltura cellulare presenta rischi specifici: manipolazione delle colture di cellule umane e animali e reagenti tossici, corrosivi e mutageni.

- Autoclavare tutti i rifiuti biologici solidi che vengono a contatto con cellule o reagenti.
- Raccogliere rifiuti liquidi dopo ciascun esperimento e trattare con candeggina.
- Si assuma che le colture cellulari sono pericolose in quanto possono contenere virus o altri organismi.
- Leggere il safety data sheet dei reagenti.
- Non si mangia e non si beve.
- Si indossano guanti e camice dedicato.
- Si usa materiale sterile.
- Si usano dispositivi appropriati per maneggiare liquidi contenenti cellule.
- Si lavora sotto cappa biologica.
- Si decontaminano le superfici di lavoro con disinfettante.
- Si lavano le mani dopo aver lavorato con le cellule e prima di lasciare il laboratorio.

11.3.11 Mantenimento delle cellule

11.3.11.1 Controllo delle cellule

Le cellule vanno controllate ogni giorno, osservando colore del terreno di coltura e la loro morfologia. In caso di terreno esausto lo si rimuove e se ne aggiunge di fresco. In presenza di stato di semi-confluenza delle cellule si rimuovono e si fa un passaggio o semina in altre fiasche.

11.3.11.2 Rimozione delle cellule - harvesting

In caso le cellule risultino sane si può staccarle dal substrato.

11.3.11.2.1 Rimozione meccanica La rimozione meccanica delle cellule avviene attraverso pipetta o cell scraper.

11.3.11.2.2 Rimozione con enzimi proteolitici Per la rimozione con enzimi proteolitici si utilizzano enzimi che disgregano i legami cellula-cellula in quanto pone meno stress alle cellule. Esempi sono tripsina, collagenasi, accutasi o *EDTA*. Questi causano il distacco delle cellule dalla superficie in maniera veloce ed efficace. La reazione di proteolisi può essere bloccata aggiungendo il terreno con siero.

11.3.12 Esercitazione

Si indossano guanti e camice e si utilizzano cellule *HeLa* in fiasca *T-75* per ogni gruppo. Nell'aula di microscopia vengono osservate le cellule al microscopio invertito in campo chiaro con obiettivo 2.5× e 10× e si valuta la confluenza cellulare. Sotto cappa si controllano i reagenti.

11.3.12.1 Conta cellulare

1. Aprire la fiasca con le cellule ed aspirare il terreno.
2. Aggiungere 10mL di *PBS*, chiudere la fiasca e muoverla per lavare la superficie interna.
3. Aspirare il *PBS* e aggiungere 1mL di tripsina.
4. Mettere la fiasca a 37° nell'incubatore per 2 minuti,
5. Bloccare l'azione della tripsina aggiungendo 8mL di terreno di coltura.
6. Spipettare la sospensione cellulare cercando di lavare tutta la superficie della fiasca.
7. Raccogliere la sospensione cellulare e trasferirla nel tubo da 50mL.
8. Trasferire 20µl di sospensione con la pipetta in una vial e aggiungere 20µl di trypan blue. Mescolare con la pipetta.
9. Trasferire 10µl nella camera di Buerker.
10. Contare le cellule di 3 quadrati, fare la media e calcolare il numero di cellule per millilitro con:

$$\text{numero medio cellule} \cdot \text{fattore di diluizione} \cdot 10\,000$$

11.4. GIORNO 4 - COLORAZIONE DI ORGANELLI CITOPLASMATICI

11.3.12.1.1 Camera di Buerker La camera di Buerker è un vetrino particolare in cui si posiziona la porzione di coltura. Il vetrino portaoggetto va fissato con acqua in modo da impedirne movimenti. Il vetrino contiene delle scanalature che lo suddividono in 9 quadrati. Quelli esterni sono a loro volta divisi in 16 quadratini e quello centrale in 25. Queste divisioni rendono più facile la conta. Per convenzione si contano anche le cellule presenti nel quadrato anteriore di destra e sui bordi.

11.3.12.1.2 Trypan blue Trypan blue è internalizzato dalle cellule morte, che pertanto diventano blu opaco. Le cellule vive invece sono bianche e luminose e rifrangono la luce emessa dal microscopio. Essendo che diluisce la coltura introduce un fattore di diluizione di 2.

11.3.12.2 Preparazione delle colture

1. Aggiungere alle due colture dish 7mL di terreno e alla 6-well plate 2mL per pozzetto.
2. Seminare $1 \cdot 10^6$ cellule in un culture dish per l'estrazione del DNA.
3. Seminare $1 \cdot 10^6$ cellule in un culture dish per l'estrazione delle proteine.
4. Seminare $2 \cdot 10^5$ cellule in ogni pozzetto della 6-well plate.
5. Indicare su ogni culture dish e sulla 6-well plate il numero della linea cellulare, data e nome del gruppo.
6. Mettere tutto nell'incubatore a 37°.

11.4 Giorno 4 - Colorazione di organelli citoplasmatici

La colorazione di organelli citoplasmatici avviene attraverso coloranti a fluorescenza.

11.4.1 Fluorescenza

La fluorescenza è un caso particolare di luminescenza che si verifica per eccitazione: è la proprietà di alcune sostanze di rimettere a lunghezza d'onda maggiore le radiazioni elettromagnetiche ricevute.

11.4.1.1 Fluorocromi

I fluorocromi sono molecole che assorbono radiazione magnetica e sono eccitate da una luce di un colore ed emettono una luce di colore diverso con lunghezza d'onda maggiore. Quando si smette di eccitarli non continuano ad emettere luce.

11.4.1.1.1 Struttura Contengono tipicamente anelli aromatici che permettono la più intensa e utile emissione fluorescente molecolare.

11.4.1.1.2 Vantaggi

- Molecole piccole.
- Vasta gamma di colori.
- Possibilità di legarsi ad altre molecole.

11.4.1.1.3 Svantaggi

- Tendenza a decadere d'intensità nel corso dell'osservazione o photobleaching.

11.4.1.1.4 Photobleaching Si intende per fotobleaching la diminuzione della fluorescenza di un campione dovuta alla degradazione fotochimica del fluoroforo. Avviene quando un fluoroforo perde permanentemente la capacità di fluorescere a causa di danneggiamenti chimici introdotti da fotoni e modifiche di legami covalenti.

11.4.1.1.4.1 Ridurre il photobleaching Per ridurre il photobleaching si può:

- Diminuire l'intensità dell'indicatore luminoso.
- Diminuire il tempo di esposizione all'indicatore luminoso.

11.4.1.2 Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è un tipo di microscopia ottica in cui il campione viene colorato con anticorpi fluorescenti o sostanze specifiche coniugate con fluorocromi. La luce utilizzata ha lunghezze d'onda specifiche per essere eccitate ed emetteranno nel visibile.

11.4.1.2.1 Struttura del microscopio Il microscopio possiede una lampada a sorgente luminosa che emette luce diversa a seconda di filtri. Questa luce a una lunghezza d'onda specifica eccita il fluoroforo che emette la luce catturata dall'oculare.

11.4.2 Scopo dell'esercitazione

Lo scopo dell'esercitazione è preparare colorazioni vitali e fissare le cellule in coltura per colorarne strutture intracellulari con fluorofori. Successivamente avviene l'osservazione di strutture intracellulari tipiche della cellula eucariote. La coltura cellulare proviene da cellule umane in coltura cresciute su vetrino. Le cellule vengono fissate in modo che rimangano intatte riducendo al minimo il danno alle strutture del campione.

11.4.3 Reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico è un sistema membranoso composto da vescicole, cisterne, sacculi e canali con aspetto reticolare. Tra i diversi compartimenti il reticolo endoplasmatico è quello più esteso e arriva ad occupare fino al 90% della totalità delle membrane.

11.4.3.1 Composizione

Il reticolo endoplasmatico si divide in:

- Reticolo endoplasmatico ruvido *RER*.
- Reticolo endoplasmatico liscio *SER*.
- Reticolo endoplasmatico transizionale.

11.4.3.2 Funzioni

Le funzioni del reticolo endoplasmatico sono:

11.4. GIORNO 4 - COLORAZIONE DI ORGANELLI CITOPLASMATICI

- Trasporto di proteine appena tradotte dall'insieme o pool di ribosomi della cellula.
- Glicosilazione di proteine e loro indirizzamento verso le sedi finali come Golgi e altri organelli o secrezione.
- Controllo e degradazione di proteine malripiegate.
- Riserva di ioni calcio, utile in caso di processi come contrazione, apoptosi, iniziazione di processi cellulari ciclici, vie di segnalazione.
- Detossificazione di sostanze esterne come xenobiotici.

11.4.3.3 ERTracker

La glibenclamide è un farmaco utilizzato da pazienti diabetici per correggere l'iperglicemia. Fa parte della famiglia delle sulfaniluree. La molecola stimola e favorisce la secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas. Si lega al recettore *SUR1* associato al canale K^+ *ATP*-dipendente. Questi canali sono prominenti sul reticolo endoplasmatico. Questo colorante assorbe a 504nm nel blu ed emette a 511nm nel verde.

11.4.4 Mitochondri

I mitocondri sono organelli citoplasmatici delle cellule eucariote.

11.4.4.1 Composizione

Sono a forma di fagiolo con due membrane sovrapposte. La membrana interna forma creste che si ripiegano dentro ad una matrice.

11.4.4.2 Funzione

La funzione principale dei mitocondri è la produzione di energia sotto forma di *ATP* dalla demolizione di carboidrati in ambiente aerobico.

11.4.4.3 MitoTracker

Il MitoTracker è una molecola permeabile alla membrana cellulare che contiene un'estremità di clorometile reattiva ai tioli. Quando entra nel mitocondrio durante la respirazione cellulare viene ossidata e viene coniugata a tioli che la rendono fluorescente. Questo colorante assorbe a 579nm nel verde ed emette a 599nm nell'arancione.

11.4.5 Membrana citoplasmatica

11.4.5.1 Wheat germ agglutinin *WGA*

La membrana citoplasmatica viene marcata con *WGA*, una lectina che protegge il grano da insetti, lieviti e batteri. È una proteina agglutinina e si lega al N-acetil-D-glucosammide. Questo colorante assorbe a 590nm nel verde ed emette a 617nm nel rosso.

11.4.5.1.1 Lectine Le lectine sono una famiglia di proteine altamente specifiche per determinati zuccheri. Svolgono un importante ruolo biologico nel processo di riconoscimento dei polisaccaridi sulle membrane cellulari.

11.4.6 Citoscheletro

11.4.6.1 Composizione

Il citoscheletro è composto da polimeri di *G*-actina che si polimerizza in *F*-actina e altri polimeri.

11.4.6.2 Funzioni

Il citoscheletro:

- Esercita la trazione sui cromosomi.
- Separa la cellula in divisione.
- Dirige il traffico intracellulare.
- Sostiene la membrana plasmatica.
- Crea collegamenti meccanici per la resistenza allo shock.
- È responsabile del movimento cellulare e dell'estensione delle protrusioni cellulari.

11.4.6.3 Falloidina

Il marcatore del citoscheletro è la falloidina che reagisce stechiometricamente con il citoscheletro e crea un legame specifico con actina. Il colorante assorbe a 495nm nel blu e trasmette a 518nm nel verde.

11.4.7 Nucleo

11.4.7.1 Composizione

Il nucleo è un organello a doppia membrana e contiene il *DNA* e nucleoli.

11.4.7.2 DAPI

DAPI o 4', 6'-diammin-2-fenilindolo si lega nel solco minore della doppia elica del *DNA* (ad adenina e timina) attraverso un prolung antifade. Passa attraverso le membrane cellulari di cellule fissate e vitali. Il nucleolo non viene colorato in quanto ricco di proteine e RNA. Permette inoltre di determinare la fase del ciclo cellulare della cellula. Questo colorante assorbe a 359nm nel viola ed emette a 461nm nel blu.

11.4.8 Colorazione vitale

11.4.8.1 Fissaggio delle cellule

Lo scopo del fissaggio è ridurre al minimo i danni alle strutture del campione. Per farlo si utilizzano aldeidi o solventi organici. Le prime permettono una buona conservazione della struttura cellulare creando legami crociati tra gruppi amminici delle catene laterali. In questo esperimento viene utilizzata paraformaldeide al 4%. Essendo composti tossici vanno tenuti sotto cappa.

11.4.8.2 Protocollo

Si aspira totalmente il campione cercando di rimuovere il terreno e si aggiunge la soluzione di paraformaldeide utilizzando una micropipetta. Le cellule fissate sono mantenute stabili senza alterare la struttura.

11.4.8.3 Prime colorazioni

A questo punto si può aggiungere *WGA-594*.

11.4.8.4 Permeabilizzazione

Per preparare le cellule per l'ingresso di falloidina si devono permeabilizzare le membrane con l'utilizzo di saponi. In questo modo si distrugge la membrana fosfolipidica. Altre molecole come *SDS* e *tryphon* aiutano a formare pori di membrana.

11.4.8.5 Colorazioni

Dopo aver aggiunto la paraformaldeide si lava con *PBS* e si aggiungono i coloranti. Essendo le colorazioni fotosensibili si mette in incubazione per 20 minuti coperte da stagnola in modo da evitare la degradazione del campione. Dopo l'incubazione si recupera dalla superficie cellulare il vetrino e montarlo sul vetrino portaoggetti. Si usano vetrini di vetro in quanto danno meno dispersione ottica. Si fissa il mounting media che contiene oltre alle colle anche *DAPI*.

11.4.8.6 Sincronizzare le cellule

È possibile sincronizzare le cellule bloccandole tutte in G_1 sottoponendole a uno stress: si può togliere il siero dal terreno di coltura.