

Biologia molecolare della cellula

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

21 maggio 2020

Indice

I Introduzione alla cellula 20

1 Introduzione 21

- 1.1 Microscopia 21
 - 1.1.1 Risoluzione 21
 - 1.1.2 Tecniche di microscopia ottica 22
- 1.2 Storia 22

2 Cellule e genomi 24

- 2.1 Caratteristiche universali della vita sulla Terra 24
 - 2.1.1 Tutte le cellule conservano la loro informazione ereditaria nello stesso codice chimico lineare (DNA) . . . 24
 - 2.1.2 Tutte le cellule replicano la loro informazione ereditaria mediante polimerizzazione su uno stampo 25
 - 2.1.3 Tutte le cellule trascrivono porzioni della loro informazione ereditaria nella stessa forma intermedia (RNA) 25
 - 2.1.4 Tutte le cellule usano proteine come catalizzatori . . 26
 - 2.1.5 Tutte le cellule traducono RNA nello stesso modo . . 26
 - 2.1.6 Il frammento di informazione genica che corrisponde ad una proteina è un gene 26
 - 2.1.7 La vita richiede energia libera 27

- 2.1.8 Tutte le cellule funzionano come fabbriche biochimiche che impiegano le stesse strutture molecolari base . . 27
- 2.1.9 Tutte le cellule sono chiuse in una membrana plasmatica attraverso la quale nutrienti e materiali di scarto devono passare 27
- 2.2 La diversità dei genomi e l'albero della vita 27
 - 2.2.1 Le cellule possono ottenere energia da una varietà di fonti di energia libera . . . 27
 - 2.2.2 Alcune cellule fissano azoto e anidride carbonica per altre 28
 - 2.2.3 La più grande diversità biochimica esiste tra le cellule procariote 28
 - 2.2.4 L'albero della vita possiede tre rami principali: Batteri, Archei ed Eucarioti 28
 - 2.2.5 Alcuni geni evolvono rapidamente, altri sono altamente conservati 28
 - 2.2.6 Nuovi geni sono generati da geni preesistenti 29
 - 2.2.7 La duplicazione genica permette la creazione di famiglie di geni imparentati in una stessa cellula 29
 - 2.2.8 I geni possono essere trasferiti tra organismi 29
 - 2.2.9 Molti geni sono comuni tra tutti i rami primari dell'albero della vita 30
 - 2.2.10 Le mutazioni rivelano la funzione dei geni 30
- 2.3 Informazione genetica negli eucarioti 30
 - 2.3.1 Le cellule eucariote potrebbero essersi originate come predatori 30
 - 2.3.2 Le moderne cellule eucariote si sono evolute da una simbiosi 30

2.3.3	Gli eucarioti possiedono genomi ibridi	31	3.2.5	Gli enzimi abbassano la barriera di energia di attivazione che blocca la reazione chimica	37
2.3.4	I genomi eucarioti sono grandi	31	3.2.6	Gli enzimi possono guidare i substrati lungo specifici cammini di reazioni	37
2.3.5	Il genoma definisce il programma dello sviluppo multicellulare	31	3.2.7	Come gli enzimi trovano i loro substrati, la rapidità dei movimenti molecolari	37
2.3.6	Molti eucarioti vivono come cellule solitarie	32	3.2.8	Il cambio di energia libera di una reazione determina se può avvenire spontaneamente	38
3	Chimica e bioenergetica della cellula	33	3.2.9	Molecole vettore attivate sono essenziali per la biosintesi	38
3.1	Le componenti chimiche della cellula	33	3.2.10	L'ATP è il vettore attivo più utilizzato	38
3.1.1	L'acqua è mantenuta da legami a idrogeno	33	3.2.11	NADH e NADPH sono vettori di elettroni	39
3.1.2	Quattro tipi di attrazione non covalente aiuta a unire le molecole nelle cellule	34	3.2.12	Esistono molte altre molecole vettori nella cellula	39
3.1.3	Alcune molecole polari formano acidi e basi in acqua	34	3.2.13	La sintesi di polimeri biologici è guidata dall'idrolisi dell'ATP	40
3.1.4	La cellula è formata da composti di carbonio	34	3.3	Come le cellule ottengono energia dai nutrienti	40
3.1.5	Le cellule contengono quattro principali famiglie di piccole molecole organiche	35	3.3.1	La glicolisi è un cammino centrale per produrre ATP	40
3.1.6	La chimica della cellula è dominata da macromolecole con proprietà notevoli	35	3.3.2	La fermentazione produce ATP in assenza di ossigeno	41
3.1.7	I legami non covalenti specificano la forma di una macromolecola e i suoi legami con le altre molecole	35	3.3.3	La glicolisi mostra come gli enzimi accoppiano l'ossidazione alla conservazione di energia	41
3.2	Catalisi e utilizzo dell'energia da parte delle cellule	36	3.3.4	Gli organismi conservano le molecole nutrienti in serbatoi speciali	41
3.2.1	Il metabolismo della cellula è organizzato dagli enzimi	36	3.3.5	Zuccheri e acidi grassi sono degradati in acetile CoA nei mitocondri	42
3.2.2	L'ordine biologico è reso possibile dal rilascio di calore dalla cellula	36	3.3.6	Il ciclo di acido citrico genera NADH ossidando i gruppi acetili in CO ₂	42
3.2.3	Le cellule ottengono energia ossidando molecole organiche	36			
3.2.4	Ossidazione e riduzione coinvolgono il trasferimento di elettroni	36			

3.3.7	Il trasporto di elettroni guida la sintesi della maggior parte dell'ATP nelle cellule	42	4.1.13	Legami incrociati covalenti stabilizzano proteine extracellulari	47
3.3.8	Amminoacidi e nucleotidi sono parte del ciclo azotato	43	4.1.14	Le molecole proteiche spesso svolgono la funzione di subunità per l'assemblaggio di grandi strutture	48
4	Proteine	44	4.1.15	I fattori di assemblaggio aiutano la formazione di complesse strutture biologiche	48
4.1	Forma e struttura delle proteine	44	4.1.16	Fibrille amiloidi possono formarsi da molte proteine	48
4.1.1	La forma di una proteina è specificata dalla sua sequenza degli amminoacidi	44	4.1.17	Molte proteine contengono domini a bassa complessità che possono formare amiloidi reversibili	49
4.1.2	Le proteine si ripiegano nella conformazione a minore energia	45	4.2	Funzione delle proteine	49
4.1.3	L' α -elica e il β -foglietto sono pattern di piegamento comuni	45	4.2.1	Tutte le proteine si legano ad altre molecole	49
4.1.4	I domini proteici sono unità modulari da cui le proteine più grandi sono costruite	45	4.2.2	La conformazione superficiale di una proteina determina la sua chimica	49
4.1.5	Poche delle catene polipeptidiche possibili saranno utili alla cellula	45	4.2.3	La comparazione di sotto-sequenze tra membri di una famiglia proteica evidenzia i siti di legame cruciali	50
4.1.6	Le proteine possono essere classificate in molte famiglie	46	4.2.4	Le proteine si legano con altre proteine attraverso molti tipi di interfacce	50
4.1.7	Alcuni domini proteici si trovano in molte proteine diverse	46	4.2.5	I siti di legame degli anticorpi sono estremamente versatili	50
4.1.8	Il genoma umano codifica un complesso insieme di proteine, rivelando che molto rimane sconosciuto	46	4.2.6	La costante di equilibrio misura la forza di legame	50
4.1.9	Proteine più grandi contengono più di una catena polipeptidica	47	4.2.7	Gli enzimi sono catalizzatori potenti e molto specifici	51
4.1.10	Alcune proteine globulari formano lunghi filamenti elicoidali	47	4.2.8	Il legame con il substrato è il primo passo nella catalisi enzimatica	51
4.1.11	Molte proteine hanno forme allungate e fibrose	47	4.2.9	Gli enzimi velocizzano la reazione stabilizzando selettivamente stati transitivi	51
4.1.12	Le proteine contengono una grande quantità di catene polipeptidiche intrinsecamente disordinate	47	4.2.10	Gli enzimi possono usare simultaneamente catalizzatori acidi e basici	51

4.2.11	Il lisozima illustra come un enzima funziona	52	4.2.24	Un elaborato sistema di coniugazione di ubiquitina è utilizzato per marcare le proteine	55
4.2.12	Molecole strettamente legate aggiungono altre funzioni alle proteine	52	4.2.25	I complessi proteici con parti interscambiabili fanno un efficiente uso dell'informazione genica	56
4.2.13	Complessi multi-enzima aiutano ad aumentare il tasso del metabolismo cellulare	52	4.2.26	Una proteina GTP-legante mostra come grandi movimenti proteici siano possibili	56
4.2.14	La cellula regola le attività catalitiche dei propri enzimi	53	4.2.27	Le proteine motrici producono grandi movimenti nelle cellule	56
4.2.15	Gli enzimi allosterici possiedono due o più siti di legame che interagiscono . .	53	4.2.28	I trasportatori di membrana imbrigliano energia per pompare le molecole attraverso le membrane . .	57
4.2.16	Due ligandi i cui siti di legame sono accoppiati devono avere effetto reciprocamente sul legame dell'altro	53	4.2.29	Le proteine formano grandi complessi che funzionano come macchinari proteici	57
4.2.17	Insiemi di proteine simmetriche producono transizioni allosteriche cooperative . .	54	4.2.30	Impalcature concentrano insiemi di proteine che interagiscono	57
4.2.18	Molti cambi nelle proteine sono guidati dalla fosforilazione proteica . . .	54	4.2.31	Molte proteine sono controllate da modifiche covalenti che le dirigono verso siti specifici all'interno della cellula	57
4.2.19	Una cellula eucariotica contiene un gran numero di proteina chinasi e proteina fosfatasi	54	4.2.32	Una complessa rete di interazioni proteiche sottosta alle funzioni della cellula . .	57
4.2.20	La regolazione della proteina chinasi Src rivela come una proteina può funzionare come un microprocessore	54			
4.2.21	Le proteine che si legano e regolano il GTP sono onnipresenti regolatori . . .	55	II Meccanismi genetici basici	59	
4.2.22	Le proteine regolatorie GAP e GEF controllano l'attività delle proteine GTP-leganti determinando se è legato GTP o GDP	55	5 DNA, cromosomi e genomi	60	
4.2.23	Le proteine possono essere regolate dall'aggiunta covalente di altre proteine .	55	5.1	La struttura e la funzione del DNA	60
			5.1.1	Una molecola di DNA consiste di due catene di nucleotidi complementari .	60
			5.1.2	La struttura del DNA mette a disposizione un meccanismo per l'ereditarietà . .	61
			5.1.3	Negli eucarioti il DNA è racchiuso nel nucleo cellulare	61

5.2	DNA cromosomico e il suo confezionamento nella fibra cromatina . . .	61	5.3.5	Le modifiche covalenti e le varianti istoniche agiscono insieme per controllare le funzioni dei cromosomi . . .	65
5.2.1	Il DNA eucariotico è confezionato in un insieme di cromosomi	61	5.3.6	Un complesso di proteine lettrici e scrittrici possono espandere modifiche alla cromatina lungo un cromosoma	66
5.2.2	I cromosomi contengono lunghe stringhe di geni . . .	62	5.3.7	Barriere nella sequenza di DNA bloccano l'espansione dei complessi di lettura-scrittura separando domini di cromatina vicini	66
5.2.3	La sequenza nucleotidica del genoma umano mostra come i geni sono ordinati . .	62	5.3.8	La cromatina nei centromeri rivela come le varianti degli istoni possono creare strutture speciali	66
5.2.4	Ogni molecola di DNA che forma un cromosoma lineare deve contenere un centromero, due telomeri e un'origine di replicazione . .	62	5.3.9	Alcune strutture cromatiniche possono essere ereditate direttamente	67
5.2.5	Le molecole di DNA sono altamente conservate nei cromosomi	63	5.3.10	L'attivazione e la repressione di strutture di cromatina può essere ereditato epigeneticamente	67
5.2.6	I nucleosomi sono unità base della struttura del cromosoma eucariote	63	5.3.11	Le strutture di cromatina sono importanti per le funzioni del cromosoma eucariotico	67
5.2.7	La struttura del nucleo del nucleosoma rivela come il DNA è condensato	63	5.4	La struttura globale dei cromosomi	67
5.2.8	I nucleosomi hanno strutture dinamiche e sono soggetti a cambi catalizzati da complessi rimodellanti a cromatina ATP-dipendenti	64	5.4.1	I cromosomi sono piegati in grandi anelli di cromatina	67
5.2.9	I nucleosomi sono tipicamente condensati in una fibra cromatinica	64	5.4.2	Cromosomi politene sono utili per visualizzare le strutture di cromatina . . .	67
5.3	La struttura e la funzione della cromatina	64	5.4.3	Esistono multiple forme di cromatina	68
5.3.1	L'eterocromatina è altamente organizzata e limita l'espressione genica	64	5.4.4	Gli anelli di cromatina decondensano quando i geni al loro interno sono espressi	68
5.3.2	Lo stato eterocromatico è auto-propagante	65	5.4.5	La cromatina può muoversi a siti specifici nel nucleo per alterare l'espressione dei geni	68
5.3.3	I nuclei istonici sono modificati covalentemente a molti siti diversi	65	5.4.6	Reti di macromolecole formano un insieme di ambienti biochimici distinti nel nucleo	69
5.3.4	La cromatina acquisisce varietà addizionale attraverso inserzioni specifiche al sito di un insieme di varianti di istoni	65			

5.4.7	I cromosomi mitotici sono altamente condensati	69	5.5.11	La duplicazione genica fornisce una fonte di novità genica durante l'evoluzione	72
5.5	Come si evolvono i genomi	69	5.5.12	Geni duplicati divergono . .	73
5.5.1	Il confronto tra i genomi rivela sequenze di DNA attraverso la loro evoluzione del throughput di evoluzione	70	5.5.13	L'evoluzione del gene globina mostra come la duplicazione del DNA contribuisce all'evoluzione degli organismi	73
5.5.2	L'alterazione dei genomi è causata da fallimento del normale meccanismo per la copia e il mantenimento del DNA e da elementi del DNA trasponibili	70	5.5.14	I geni che codificano nuove proteine possono essere creati ricombinando gli esoni	73
5.5.3	La sequenza genomica di due specie differisce in proporzione al tempo in cui si sono evolute separatamente	70	5.5.15	Mutazioni neutrali si diffondono diventando fissate in una popolazione, con probabilità dipendente dalla dimensione della popolazione	74
5.5.4	L'albero filogenetico costruito dal confronto delle sequenze di DNA traccia le relazioni di tutti gli organismi	70	5.5.16	Molto può essere imparato dall'analisi della variazione tra gli umani	74
5.5.5	Un confronto tra cromosomi umani e dei topi mostra come la struttura dei genomi diverge	71	6	Replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA	76
5.5.6	La dimensione del genoma dei vertebrati riflette i tassi relativi di addizione e perdita del DNA in un lignaggio	71	6.1	Il mantenimento della sequenza di DNA	76
5.5.7	Si può inferire la sequenza di alcuni genomi antichi . .	71	6.1.1	I tassi di mutazione sono estremamente bassi	76
5.5.8	Il confronto tra sequenze multispecie identifica sequenze di DNA conservato di funzione sconosciuta . . .	72	6.1.2	I tassi di mutazione bassi sono necessari per la vita come la conosciamo	77
5.5.9	Cambi in sequenze precedentemente conservate possono aiutare a decifrare passi critici dell'evoluzione .	72	6.2	Meccanismi di replicazione del DNA	77
5.5.10	Mutazioni nella sequenza di DNA che controlla l'espressione genica ha guidato molti dei cambi evolutivi nei vertebrati . . .	72	6.2.1	L'accoppiamento delle basi sottostà la replicazione e riparazione del DNA	77
			6.2.2	La forcella di replicazione del DNA è asimmetrica . .	77
			6.2.3	L'alta fedeltà del meccanismo di replicazione del DNA richiede molti meccanismi di correzione	78
			6.2.4	Solo la replicazione nella direzione 5'-3' permette una correzione efficiente . .	78

6.2.5	Un enzima che polimerizza i nucleotidi sintetizza corti primer di RNA sul filamento in ritardo	79	6.3.6	Un grande complesso multisubunità si lega alle origini di replicazione eucariotiche	82
6.2.6	Proteine speciali aiutano l'apertura della doppia elica sopra la forcella di replicazione	79	6.3.7	Nuovi nucleosomi sono assemblati in coda alla forcella di replicazione	83
6.2.7	Un anello che scivola mantiene una DNA polimerasi in movimento sul DNA . . .	79	6.3.8	I telomeri sono condensati in strutture specializzate che proteggono la fine dei cromosomi	83
6.2.8	Le proteine a una forcella di replicazione cooperano per formare una macchina di replicazione	80	6.3.9	La lunghezza dei telomeri è regolata dalla cellula e dagli organismi	84
6.2.9	Un sistema di riparazione direzionato al filamento rimuove gli errori di replicazione che sfuggono alla macchina di replicazione . .	80	6.4	Riparazione del DNA	84
6.2.10	La DNA topoisomerasi impedisce l'ingarbugliamento del DNA durante la replicazione	80	6.4.1	Senza la riparazione del DNA, danni spontanei cambierebbero rapidamente la sequenza del DNA	84
6.2.11	La replicazione del DNA è fundamentalmente simile in eucarioti e batteri	81	6.4.2	La doppia elica del DNA è prontamente riparata . . .	84
6.3	Inizializzazione e completamento della replicazione del DNA nei cromosomi	81	6.4.3	Danni al DNA possono essere rimossi attraverso molti cammini	84
6.3.1	La sintesi del DNA inizia alle origini di replicazione .	81	6.4.4	L'accoppiamento di riparazione a asportazione di nucleotidi con la trascrizione garantisce che il DNA più importante è riparato efficientemente	85
6.3.2	I cromosomi batterici hanno un'origine singola per la replicazione	81	6.4.5	La chimica delle basi del DNA facilita l'individuazione dei danni	85
6.3.3	I cromosomi eucariotici contengono multiple origini di replicazione	82	6.4.6	Speciali translesioni della DNA polimerasi sono usate durante emergenze . .	85
6.3.4	Negli eucarioti la replicazione del DNA avviene durante un'unica parte del ciclo vitale della cellula . .	82	6.4.7	Rotture nel doppio filamento sono efficientemente riparate	86
6.3.5	Diverse regioni dello stesso cromosoma si replicano a tempi distinti durante la fase S	82	6.4.8	Danno al DNA ritarda la progressione del ciclo cellulare	86
			6.4.9	Riparazione omologa	86
			6.4.10	L'accoppiamento delle basi del DNA guida la ricombinazione omologa	86

6.4.11	La ricombinazione omologa può riparare perfettamente rotture a doppio filamento nel DNA	87	6.5.4	Retrotrasposoni simili ai retrovirus assomigliano ai retrovirus ma non possiedono un capsido	90
6.4.12	Il cambio di filamenti avviene grazie la proteina RecA/Rad51	87	6.5.5	Una grande frazione del genoma umano è composta di retrotrasposoni nonvirali	90
6.4.13	La ricombinazione omologa può salvare forcelle di replicazione danneggiate	87	6.5.6	La ricombinazione conservativa specifica al sito può riordinare il DNA reversibilmente	91
6.4.14	Le cellule regolano l'uso della ricombinazione omologa durante la riparazione del DNA	87	7	Come una cellula legge il genoma, dal DNA alle proteine	92
6.4.15	La ricombinazione omologa è cruciale per la meiosi	88	7.1	Dal DNA all'RNA	92
6.4.16	La ricombinazione meiotica comincia con una rottura a doppio filamento programmata	88	7.1.1	Le molecole di RNA hanno un unico filamento	92
6.4.17	Le giunzioni di Holliday sono formate durante la meiosi	88	7.1.2	La trascrizione produce RNA complementare a un filamento di DNA	93
6.4.18	La ricombinazione omologa produce crossover e non-crossover durante la meiosi	88	7.1.3	L'RNA polimerasi causa la trascrizione	93
6.4.19	La ricombinazione omologa solitamente causa conversione genica	89	7.1.4	Le cellule producono diverse categorie di molecole di RNA	93
6.5	Trasposizione e ricombinazione specifica al sito conservativa	89	7.1.5	Segnali codificati nel DNA indicano l'RNA polimerasi dove iniziare e dove finire	93
6.5.1	Attraverso la transizione gli elementi genetici mobili possono inserirsi in ogni sequenza di DNA	89	7.1.6	I segnali di inizio e terminazione della trascrizione sono eterogenei nella sequenza nucleotidica	94
6.5.2	Trasposoni solo a DNA si possono muovere attraverso un meccanismo a copia-incolla	90	7.1.7	L'iniziazione della trascrizione negli eucarioti richiede molte proteine	94
6.5.3	Alcuni virus usano un meccanismo di trasposizione per muoversi nel cromosoma della cellula ospite	90	7.1.8	La RNA polimerasi II richiede un insieme di fattori di trascrizione generali	95
			7.1.9	La polimerasi II richiede attivatori, mediatori e proteine per la modifica della cromatina	95
			7.1.10	L'allungamento della trascrizione negli eucarioti richiede proteine accessorie	95
			7.1.11	La trascrizione crea tensione superelocale	96

7.1.12	L'allungamento della trascrizione è strettamente accoppiato con il processamento dell'RNA	96	7.2.1	Una sequenza di mRNA è decodificata in insiemi di tre nucleotidi	100
7.1.13	L'incappucciamento dell'RNA è la prima modifica dei pre-mRNA eucariotici .	96	7.2.2	Molecole di tRNA combinano amminoacidi ai codoni	101
7.1.14	L'RNA splicing rimuove le sequenze di introni dal pre-mRNA	96	7.2.3	tRNA sono modificati covalentemente prima che escano dal nucleo	101
7.1.15	Sequenze di nucleotidi segnalano dove avviene lo slicing	96	7.2.4	Specifici enzimi accoppiano amminoacidi con la molecola di tRNA appropriata	101
7.1.16	Lo splicing dell'RNA è svolto dallo spliceosoma .	97	7.2.5	La modifica da tRNA sintetasi assicura accuratezza .	101
7.1.17	Lo spliceosoma usa l'idrolisi dell'ATP per produrre una serie di riordinamenti RNA-RNA	97	7.2.6	Gli amminoacidi sono aggiunti alla terminazione C ⁻ di una catena polipeptidica crescente	102
7.1.18	Altre proprietà del pre-mRNA e la sua sintesi spiega le scelte dei siti propri di splice	97	7.2.7	Il messaggio di RNA è decodificato nei ribosomi .	102
7.1.19	La struttura cromatinica influenza l'RNA splicing .	98	7.2.8	Fattori di allungamento portano avanti la traduzione e ne aumentano l'accuratezza	102
7.1.20	Lo splicing di RNA mostra plasticità notevole	98	7.2.9	Molti processi biologici superano le limitazioni intrinseche all'accoppiamento di basi complementari .	103
7.1.21	RNA splicing catalizzato dallo spliceosoma si è probabilmente evoluto da meccanismi di autosplicing	98	7.2.10	L'accuratezza nella traduzione richiede una spesa di energia libera	103
7.1.22	Enzimi di processamento dell'RNA generano la terminazione 3' degli mRNA eucariotici	98	7.2.11	Il ribosoma è un ribozima .	103
7.1.23	mRNA maturi eucariotici sono esportati selettivamente dal nucleo	99	7.2.12	La sequenza nucleotidica negli mRNA segnala dove iniziare la sintesi delle proteine	104
7.1.24	Anche gli RNA non codificanti sono sintetizzati e processati nel nucleo	99	7.2.13	I codoni di fine marcano la fine della traduzione	104
7.1.25	Il nucleolo è una fabbrica di produzione di ribosomi .	100	7.2.14	Le proteine sono create su poliribosomi	105
7.1.26	Il nucleo contiene una varietà di aggregati subnucleari	100	7.2.15	Ci sono piccole variazioni nel codice genetico standard	105
7.2	Da RNA a proteine	100	7.2.16	Meccanismi di controllo della qualità agiscono per prevenire la traduzione di mRNA danneggiati	105
			7.2.17	Alcune proteine cominciano a piegarsi mentre vengono sintetizzate	105

7.2.18	Accompagnatori molecolari aiutano a guidare il piegamento della maggior parte delle proteine	106	8.2.5	La struttura del nucleosoma promuove legami cooperativi di regolatori di trascrizione	110
7.2.19	La cellula utilizza diversi tipi di accompagnatori . . .	106	8.3	I regolatori di trascrizione attivano e disattivano i geni	110
7.2.20	Regioni idrofobiche esposte forniscono segnali critici per il controllo di qualità delle proteine	106	8.3.1	Il repressore triptofano disattiva i geni	110
7.2.21	Il proteosoma è una proteasi compartimentalizzata con siti attivi reclusi . .	106	8.3.2	I repressori disattivano i geni e gli attivatori li attivano	111
7.2.22	Molte proteine sono controllate da distruzione regolata	107	8.3.3	Un attivatore e un repressore controllano l'operone Lac	111
8	Controllo dell'espressione genica	108	8.3.4	L'inanellamento del DNA può avvenire durante la regolazione genica dei batteri	111
8.1	Una panoramica del controllo dei geni	108	8.3.5	Interruttori complessi controllano la trascrizione genica negli eucarioti	111
8.1.1	Diversi tipi di cellule sintetizzano diversi insiemi di RNA e proteine	108	8.3.6	Una regione di controllo di un gene eucariotico consiste di un promotore e molte sequenze cis-regolatorie	112
8.1.2	Segnali esterni possono causare il cambio dell'espressione dei geni di una cellula	108	8.3.7	I regolatori di trascrizione eucariotici lavorano in gruppi	112
8.1.3	L'espressione dei geni può essere regolata a molti dei passaggi nel cammino da DNA a RNA a proteine . .	108	8.3.8	Le proteine attivatrici promuovono l'assemblaggio di RNA polimerasi al punto di inizio della trascrizione .	112
8.2	Controllo della trascrizione da parte di proteine leganti a specifiche sequenze	109	8.3.9	Gli attivatori di trascrizione eucariotici direzionano la modifica di strutture cromatiniche locali	113
8.2.1	La sequenza dei nucleotidi nella doppia elica di DNA può essere letta da proteine	109	8.3.10	Gli attivatori di trascrizione possono promuoverla rilasciando la RNA polimerasi dai promotori	113
8.2.2	I regolatori di trascrizione contengono motivi strutturali che possono leggere sequenze di DNA	109	8.3.11	Gli attivatori di trascrizione lavorano sinergicamente	113
8.2.3	La dimerizzazione dei regolatori di trascrizione aumenta la loro affinità e specificità per il DNA . . .	109	8.3.12	Repressori di trascrizione eucariotici possono inibire la trascrizione in molti modi	114
8.2.4	I regolatori di trascrizione si legano cooperativamente al DNA	110			

8.3.13	Sequenze di DNA isolanti impediscono a regolatori di influenzare geni distanti . .	114	8.4.4	Alterazioni globali al cromosoma nella struttura cromatinica possono essere ereditate	118
8.3.14	Meccanismi genetici molecolari che creano e mantengono tipi di cellula specializzati	114	8.4.5	Meccanismi epigenetici assicurano che pattern stabili di espressione genica possono essere trasmessi a cellule figlie	118
8.3.15	Complessi interruttori genici che regolano lo sviluppo della Drosophila sono creati da molecole più piccole	114	8.5	Controlli post trascrizionali	118
8.3.16	Il gene Eve della Drosophila è regolato da controlli combinatori	115	8.5.1	L'attenuazione della trascrizione causa la terminazione prematura di alcune molecole di RNA	118
8.3.17	I regolatori di trascrizione sono messi ingioco da segnali extracellulari	115	8.5.2	Riboswitches rappresentano probabilmente antiche forme di controllo genico . .	119
8.3.18	Il controllo dei geni combinatorio diversi tipi di cellule	115	8.5.3	RNA splicing alternativo può produrre diverse forme di proteine dallo stesso gene	119
8.3.19	Combinazioni di regolatori di trascrizione master specificano il tempo della cellula controllando l'espressione di molti geni .	115	8.5.4	La definizione di un gene è stata modificata	119
8.3.20	Cellule specializzate devono rapidamente attivare e disattivare insieme di geni .	115	8.5.5	Un cambio nel sito della rottura del trascritto a RNA e dell'aggiunta di Poli-A può cambiare la terminazione C di una proteina	119
8.3.21	Cellule differenziate mantengono la loro identità . .	116	8.5.6	Modifiche dell'RNA possono cambiare il significato del messaggio RNA	120
8.3.22	Circuiti di trascrizione permettono alla cellula di compiere operazioni logiche	116	8.5.7	Il trasporto di RNA dal nucleo può essere regolato .	120
8.4	Meccanismi che rinforzano la memoria cellulare in piante e animali	116	8.5.8	Alcuni mRNA sono localizzati in regioni specifiche del citosol	120
8.4.1	Pattern di metilazione del DNA possono essere ereditati quando le cellule dei vertebrati si dividono . . .	116	8.5.9	Le regioni non tradotte 5' e 3' controllano la traduzione dei propri mRNA	121
8.4.2	Isole ricche di CG sono associate con molti geni nei mammiferi	117	8.5.10	La fosforilazione di un fattore di iniziazione regola globalmente la sintesi proteica	121
8.4.3	L'imprinting genomico si basa sulla metilazione del DNA	117	8.5.11	Iniziazione al codone AUG a monte dell'inizio di traduzione può regolare l'iniziazione della traduzione eucariotica	121

8.5.12	Siti di entrata interni al ribosoma forniscono opportunità per il controllo traduzionale	122	9.1.3	Il bistrato lipidico è un fluido bidimensionale	128
8.5.13	Cambi nella stabilità dell'mRNA possono regolare l'espressione genica	122	9.1.4	La fluidità del bistrato lipidico dipende dalla sua composizione	128
8.5.14	La regolazione della stabilità dell'mRNA coinvolge corpi P e granuli di stress .	122	9.1.5	Nonostante la loro fluidità i bistrati lipidici possono formare domini di composizioni diverse	129
8.6	Regolazione dell'espressione genica da RNA non codificanti	123	9.1.6	Goccioline di lipidi sono circondate da un monostrato fosfolipidico	129
8.6.1	I trascritti di piccoli RNA non codificanti regolano molti geni animali e di piante attraverso interferenza RNA	123	9.1.7	L'asimmetria del bistrato lipidico è funzionalmente importante	129
8.6.2	Il miRNA regola la traduzione e stabilità dell'mRNA	123	9.1.8	I glicolipidi si trovano sulla superficie di tutte le membrane plasmatiche eucariotiche	129
8.6.3	L'interferenza a RNA è anche usata come un meccanismo di difesa per la cellula	123	9.2	Proteine di membrana	130
8.6.4	L'interferenza a RNA può direzionare la formazione di eterocromatina	124	9.2.1	Le proteine di membrana si possono associare con il bistrato lipidico in vari modi	130
8.6.5	I piRNA proteggono la linea germinale da elementi trasponibili	124	9.2.2	Ancore lipidiche controllano la localizzazione nella membrana di alcune proteine segnalatrici	131
8.6.6	I batteri usano piccoli RNA non codificanti per proteggersi dai virus	124	9.2.3	Nella maggior parte delle proteine transmembrana la catena polipeptidica attraverso il bistrato lipidico in una conformazione a α -elica	131
8.6.7	Lunghi RNA non codificanti hanno funzioni diverse nella cellula	125	9.2.4	α -eliche transmembrana interagiscono tra di loro . .	131
III Organizzazione interna della cellula			126		
9 Struttura di membrana			127		
9.1	Il bistrato lipidico	127	9.2.5	Alcuni barili β formano grandi canali	132
9.1.1	Fosfogliceridi, sfingolipidi e steroli sono i lipidi più comuni nelle membrane cellulari	127	9.2.6	Molte proteine di membrana sono glicosilate	132
9.1.2	I fosfolipidi formano bistrati spontaneamente . . .	128	9.2.7	Le cellule possono confinare proteine e lipidi a domini specifici nella membrana	132
			9.2.8	Il citoscheletro corticale dà alle membrane forza meccanica e vincola la diffusione delle proteine di membrana	133

9.2.9	Proteine piegatrici di membrana deformano i bistrati	133	10.3	Canali e le proprietà elettriche delle membrane	137
10	Trasporto di membrana di piccole molecole e proprietà elettriche delle membrane	134	10.3.1	Le acquaporine sono permeabili all'acqua ma impermeabili agli ioni	138
10.1	Principi del trasporto di membrana	134	10.3.2	Canali ionici sono selettivi degli ioni e fluttuano tra stato aperto e chiuso	138
10.1.1	Bistrati lipidici liberi da proteine sono impermeabili agli ioni	134	10.3.3	Il potenziale di membrana nelle cellule animali dipende principalmente dai canali di leak K^+ e dal suo gradiente attraverso la membrana plasmatica	138
10.1.2	Ci sono due classi di proteine di trasporto di membrana: trasportatori e canali	134	10.3.4	Il potenziale di riposo decade lentamente quando la pompa Na^+-K^+ è fermata	139
10.1.3	Il trasporto attivo è mediato da trasportatori accoppiati da una fonte di energia	135	10.3.5	La struttura dei canali batterici K^+ mostra come un canale ionico lavora	139
10.2	Trasportatori e trasporto di membrana attivo	135	10.3.6	Canali meccanosensibili proteggono cellule batteriche contro pressioni osmotiche estreme	139
10.2.1	Il trasporto attivo può essere guidato da gradienti di concentrazione ionica	135	10.3.7	La funzione di un neurone dipende sulla sua struttura allungata	139
10.2.2	Trasportatori nella membrana plasmatica regolano il pH citosilico	136	10.3.8	Canali di cationi voltage-gated generano potenziali di azione in cellule elettricamente generate	140
10.2.3	Una distribuzione asimmetrica dei trasportatori nelle cellule epiteliali sottosta al trasporto transcellulare dei soluti	136	10.3.9	L'utilizzo di channelrhodopsin ha rivoluzionato lo studio di circuiti neurali	140
10.2.4	Ci sono tre classi di pompe guidate dall'ATP	136	10.3.10	La mielinizzazione aumenta la velocità e l'efficienza della propagazione del potenziale di azione nelle cellule nervose	140
10.2.5	Una ATPasi P-tipo pompa Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmico nelle cellule muscolari	136	10.3.11	Registrazione di morsetti mostra che canali ionici hanno uno stato binario	141
10.2.6	La pompa Na^+-K^+ della membrana plasmatica stabilisce gradienti Na^+ e K^+ attraverso la membrana plasmatica	137	10.3.12	Canali di cationi voltage-gated sono evolutivamente e strutturalmente imparentati	141
10.2.7	I trasportatori ABC costituiscono la più grande famiglia di proteine di trasporto di membrana	137			

10.3.13	Diversi tipi di neuroni mostrano caratteristiche proprietà di stable firing	141	11.1.3	Le proteine si possono muovere tra i compartimenti in modi diversi	147
10.3.14	Canali ionici transmitter-gated convertono segnali chimici in elettrici alla sinapsi chimica	141	11.1.4	Sequenze di segnali e recettori di ordinamento direzionano le proteine al corretto indirizzo nella cellula	148
10.3.15	Le sinapsi chimiche possono essere eccitatorie o inibitorie	142	11.1.5	La maggior parte degli organelli non può essere costruita da nuovo e richiedono informazioni nell'organello stesso	148
10.3.16	I recettori di acetilcolina alle giunzioni neuromuscolari sono canali di cationi transmitter-gated eccitatori	142	11.2	Il trasporto di molecole tra il nucleo e il citosol	149
10.3.17	I neuroni contengono molti tipi di canali transmitter-gated	143	11.2.1	Complessi di pori nucleari perforano la membrana nucleare	149
10.3.18	La trasmissione neuromuscolare coinvolge l'attivazione sequenziale di cinque insiemi diversi di canali ionici	143	11.2.2	Segnali di localizzazione direzionano le proteine nucleari al nucleo	149
10.3.19	I singoli neuroni sono complessi dispositivi computazionali	143	11.2.3	Recettori di importazione nucleare si legano sia ai segnali di localizzazione nucleare e alle proteine NPC	150
10.3.20	La computazione neuronale richiede una combinazione di almeno tre tipi di canali K^+	144	11.2.4	L'esportazione nucleare lavora come l'importazione ma in senso opposto	150
10.3.21	Potenziamento a lungo termine (LPT) nell'ippocampo dei mammiferi dipende dall'entrata di Ca^{2+} attraverso canali recettori di NMDA	144	11.2.5	La Ran GTPasi impone direzionalità al trasporto attraverso NPC	150
11	Compartimenti intracellulari e ordinamento delle proteine	146	11.2.6	Il trasporto attraverso NPC può essere regolato controllando l'accesso ai macchinari di trasporto . .	151
11.1	La compartimentalizzazione della cellula	146	11.2.7	Durante la mitosi la membrana nucleare si disassembla	151
11.1.1	Tutte le cellule hanno lo stesso insieme base di organelli racchiusi da membrana	146	11.3	Il trasporto di proteine in mitocondri e cloroplasti	151
11.1.2	Origini evolutive spiegano le reazioni topologiche degli organelli	147	11.3.1	La traslocazione nei mitocondri dipende da sequenze di segnale e traslocatori di proteine	152
			11.3.2	I precursori mitocondriali sono importati come catene polipeptidiche non piegate	152

12 Traffico di membrana intracellulare 162

12.1 I meccanismi molecolari di trasporto di membrana e il mantenimento della diversità compartimentale	162
12.1.1 Ci sono vari tipi di vescicole incapsulate	163
12.1.2 L'assemblaggio di una capsula di clatrina guida la formazione della vescicola	163
12.1.3 Proteine adattatrici selezionano il cargo nelle vescicole incapsulate a clatrina	163
12.1.4 I fosfonositidi marcano gli organelli e i domini di membrana	163
12.1.5 Proteine piegatrici della membrana aiutano a deformare la membrana durante la formazione delle vescicole	164
12.1.6 Proteine citoplasmatiche regolano la separazione e decapsulamento delle vescicole	164
12.1.7 GTPasi monomeriche controlla l'assemblaggio della capsula	164
12.1.8 Non tutte le vescicole di trasporto sono sferiche	165
12.1.9 Le proteine Rab guidano le vescicole di trasporto alle loro membrane obiettivo	165
12.1.10 Cascade di Rab possono cambiare l'identità di un organello	166
12.1.11 Le SNARE mediano la fusione di membrana	166
12.1.12 SNARE interagenti devono essere separati prima che possano funzionare ancora	167
12.2 Trasporto dall'ER attraverso l'apparato di Golgi	167
12.2.1 Le proteine lasciano l'ER in vescicole di trasporto incapsulate in COPII	167
12.2.2 Solo proteine appropriatamente piegate e assemblate possono lasciare l'ER	167
12.2.3 Raggruppamenti vescicolari tubulari mediano il trasporto dall'ER all'apparato di Golgi	168
12.2.4 Il cammino di recupero all'ER usa segnali di ordinamento	168
12.2.5 Molte proteine sono selettivamente trattenute nei compartimenti dove funzionano	168
12.2.6 L'apparato di Golgi consiste di una serie ordinata di compartimenti	169
12.2.7 Le catene oligosaccaridi sono processate nell'apparato di Golgi	169
12.2.8 I proteoglicani sono assemblati nell'apparato di Golgi	169
12.2.9 Il ruolo della glicosilazione	170
12.2.10 Il trasporto attraverso l'apparato di Golgi potrebbe accadere attraverso maturazione cisternale	170
12.2.11 La matrice di proteine del Golgi aiuta ad organizzare lo stack	170
12.3 Il trasporto dalla rete trans Golgi ai lisosomi	170
12.3.1 I lisosomi sono il sito principale della digestione intracellulare	171
12.3.2 I lisosomi sono eterogenei	171
12.3.3 I vacuoli delle piante e dei funghi sono lisosomi versatili	171
12.3.4 Multipli cammini portano materiali ai lisosomi	171
12.3.5 L'autofagia degrada proteine ed organelli non voluti	172
12.3.6 Un recettore mannosio 6-fosfato ordina le idrolasi lisosomiali nella rete trans Golgi	172
12.3.7 Alcuni lisosomi e corpi multivescicolari subiscono esocitosi	173

12.4 Il trasporto nella cellula dalla membrana plasmatica: endocitosi .	173	12.5.4 Vescicole secretorie aspettano vicino la membrana plasmatica fino a che vengono segnalate di rilasciare i loro contenuti	178
12.4.1 Vescicole pinocitiche si formano da pozzi incapsulati nella membrana plasmatica .	173	12.5.5 Per esocitosi rapida le vescicole sinaptiche sono preparate alla membrana plasmatica presinaptica . .	178
12.4.2 Non tutte le vescicole pinocitiche sono incapsulate da clatrina	174	12.5.6 Vescicole sinaptiche si possono formare direttamente da vescicole endocitiche . .	179
12.4.3 Le cellule usano endocitosi mediata da recettori per importare macromolecole selezionate extracellulari . .	174	12.5.7 I componenti della membrana di una vescicola secretoria sono velocemente rimossi dalla membrana plasmatica	179
12.4.4 Proteine specifiche sono recuperate dagli endosomi giovani e ritornate alla membrana plasmatica . . .	175	12.5.8 Alcuni eventi di esocitosi regolata servono per ingrandire la membrana plasmatica	179
12.4.5 I recettori segnalanti nella membrana plasmatica sono regolati da degradazione nei lisosomi	175	12.5.9 Cellule polarizzate direzionano le proteine dalla rete trans Golgi al dominio appropriato della membrana plasmatica	180
12.4.6 Gli endosomi giovani maturano in endosomi maturi .	175		
12.4.7 Complessi proteici ESCRT mediano la formazione di vescicole intralumenali nei corpi multivescicolari	176	13 Conversione energetica: mitocondri e cloroplasti	181
12.4.8 Endosomi riciclatori regolano la composizione della membrana plasmatica . . .	176	14 Segnalazione cellulare	182
12.4.9 Cellule fagocitiche specializzate possono ingerire grandi particelle	176	14.1 Principi di segnalazione cellulare .	182
12.5 Il trasporto dalla rete trans Golgi all'esterno cellulare: esocitosi . . .	177	14.1.1 Segnali extracellulari possono agire lungo distanze corte o lunghe	182
12.5.1 Molte proteine e lipidi sono trasportate automaticamente alla rete trans Golgi alla superficie extracellulare .	177	14.1.2 Molecole di segnale extracellulare si legano a recettori specifici	183
12.5.2 Le vescicole secretorie si separano dalla rete trans Golgi	178	14.1.3 Ogni cellula è programmata per rispondere a specifiche combinazioni di segnali extracellulari	183
12.5.3 I precursori di proteine secretorie sono processate proteoliticamente durante la formazione di vescicole secretorie	178	14.1.4 Ci sono tre classi principali di proteine recettrici sulla superficie cellulare	183

14.1.5	Recettori di superficie cellulare inoltrano segnali attraverso molecole di segnale intracellulare	184
14.1.6	I segnali intracellulari devono essere specifici e precisi nel citoplasma rumoroso	184
14.1.7	Complessi di segnalazione intracellulare si formano sui recettori attivati	185
14.1.8	Domini di interazione modulari mediano le interazioni tra proteine di segnale intracellulari	185
14.1.9	La relazione tra segnale e risposta varia in cammini di segnale diversi	185
14.1.10	La velocità di una risposta dipende dal turnover delle molecole di segnale	186
14.1.11	Le cellule possono rispondere improvvisamente a un segnale in graduale aumento	186
14.1.12	Il feedback positivo può generare una risposta binaria	186
14.1.13	Il feedback negativo è un motivo comune nei sistemi di segnalazione	187
14.1.14	Le cellule possono variare la loro sensibilità a un segnale	187
14.2	Segnalazione attraverso recettori accoppiati a proteine G	187
14.2.1	Proteine G trimeriche inoltrano i segnali da GPCR . .	188
14.2.2	Alcune proteine G regolano la produzione di AMP ciclico	188
14.2.3	La proteina chinasi dipendente da AMP ciclico (PKA) media la maggior parte degli effetti dell'AMP ciclico	188
14.2.4	Alcune proteine G segnalano attraverso fosfolipidi . .	188
14.2.5	Ca^{2+} agisce come un mediatore intracellulare onnipresente	189
14.2.6	Il feedback genera onde e oscillazioni di Ca^{2+}	189
14.2.7	Proteine chinasi dipendenti da Ca^{2+} e da calmodulina mediano molte risposte a segnali di Ca^{2+}	189
14.2.8	Alcune proteine G regolano direttamente canali ionici	190
14.2.9	Olfatto e vista dipendono su GPCR che regolano canali ionici	190
14.2.10	L'ossido nitrico è un mediatore di segnalazione gassoso che passa tra le cellule	191
14.2.11	Messaggeri secondarie e cascate enzimatiche amplificano i segnali	191
14.2.12	La desensibilizzazione di GPCR dipende dalla fosforilazione dei recettori	191
14.3	Segnalazione attraverso recettori accoppiati da enzimi	192
14.3.1	I recettori tirosina chinasi (RTK) attivati si autofosforilano	192
14.3.2	Le tirosine fosforilate sugli RTK servono come siti di attracco per proteine di segnalazione intracellulari .	192
14.3.3	Le proteine con domini SH2 si legano a tirosine fosforilate	192
14.3.4	La GTPasi Ras media la segnalazione per la maggior parte delle RTK	193
14.3.5	Ras attiva una molecola di segnale MAP chinasi	193
14.3.6	Proteine di impalcatura aiutano a prevenire la comunicazione tra moduli MAP chinasi paralleli . . .	193
14.3.7	La famiglia di GTPasi Rho accoppia funzionalmente recettori della superficie cellulare al citoscheletro	194

14.3.8	La PI 3-chinasi produce siti di attracco per lipidi nella membrana plasmatica	194	15.1.5	La divisione e organizzazione di cellule batteriche dipende da omologhi di proteine citoscheletrali eucariotiche	200
14.3.9	Il cammino di segnalazione PI-3-chinas-Akt stimola la sopravvivenza e crescita delle cellule animali	194	15.2	Actina e proteine leganti all'actina	200
14.3.10	RTK e GPCR attivano cammini di segnalazione sovrapposti	195	15.2.1	Le subunità di actina si assemblano testa a coda per creare filamenti flessibili e polari	200
14.3.11	Alcuni recettori accoppiati ad enzimi si associano con la chinasi tirosina citoplasmatica	195	15.2.2	La nucleazione è il passo limitante nella formazione dei filamenti di actina . . .	200
14.3.12	I recettori citochina attivano il cammino di segnalazione JAK-STAT	195	15.2.3	Filamenti di actina hanno due terminazioni distinte che crescono a tassi diversi	201
14.3.13	La proteina tirosina fosfatasi inverte la fosforilazione delle tirosine	196	15.2.4	L'idrolisi dell'ATP tra filamenti di actina porta a routine in uno stato di equilibrio	201
14.3.14	Le proteine di segnale della superfamiglia $TGF\beta$ agiscono attraverso recettori serina/treonina chinasi e Smads	196	15.2.5	Proteine leganti all'actina influenzano la dinamica e l'organizzazione del filamento	201
14.4	Strade di segnalazione alternative nella regolazione genica	197	15.2.6	La disponibilità dei monomeri controlla l'assemblaggio dei filamenti di actina	201
14.5	Segnalazione nelle piante	197	15.2.7	Fattori di nucleazione dell'actina accelerano la polimerizzazione e generano filamenti dritti o ramificati	202
15	Il citoscheletro	198	15.2.8	Proteine che si legano a filamenti di actina alterano la dinamica del filamento .	202
15.1	Funzione e origine del citoscheletro	198	15.2.9	Proteine di separazione regolano la depolimerizzazione del filamento di actina .	202
15.1.1	I filamenti del citoscheletro si adattano per formare strutture dinamiche o stabili	198	15.2.10	Insiemi di filamenti di actina di alto livello influenzano le proprietà meccaniche e la segnalazione della cellula	203
15.1.2	Il citoscheletro determina l'organizzazione cellulare e la sua polarità	199	15.3	Miosina e actina	203
15.1.3	I filamenti si assemblano da subunità proteiche che impartiscono proprietà fisiche e dinamiche specifiche	199	15.3.1	Proteine motrici basate sull'azione sono membri della superfamiglia miosina	203
15.1.4	Proteine accessorie e motrici regolano i filamenti del citoscheletro	200			

15.3.2 La miosina genera forza accoppiando l'idrolisi dell'ATP a cambi conformazionali	204	15.3.4 Un aumento nella concentrazione citosolica di Ca^{2+} inizia la contrazione muscolare	204
15.3.3 Lo scivolamento di miosina II lungo un filamento di actina causa la contrazione muscolare	204	15.4 Microtubuli	205
		15.4.1 I microtubuli sono tubi vuoti fatti da protofilamenti	205
16 Il ciclo cellulare			206

Parte I

Introduzione alla cellula

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Microscopia

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

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

1.1.1 Risoluzione

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

Parametri fisici

I parametri fisici che determinano la risoluzione sono:

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

1.1.2 Tecniche di microscopia ottica

Microscopia a cambio di fase

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

Microscopia a fluorescenza

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

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

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

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

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

1.2 Storia

Mendel è considerato il padre della genetica moderna. Fu un monaco benedettino che visse nell'800 che introdusse la quantificazione in biologia. I suoi esperimenti riguardanti piante di piselli hanno osservato che prendendo due linee pure con un fenotipo diverso e incrociandole nella prima generazione si ottenevano piante con un solo fenotipo. Successivamente incrociando tra di loro piante della

prima generazione osservò una ricomparsa dell'altro fenotipo in rapporto di 3 a 1. Mendel associò questa scoperta alla presenza di due alleli, uno dominante e uno recessivo che determinavano il fenotipo. Successivamente determinò anche che due caratteri vengono trasmessi in modo indipendente. Nel 1871 viene scoperto il DNA grazie al lavoro di Miescher che chiama nucleina in quanto si trova nel nucleo della cellula. Il suo lavoro riguardava l'estrazione delle cellule da bende impregnate di pus, ricche pertanto di materiale cellulare. Dall'estrazione della nucleina, ricca di fosforo e acida, notò che la sua concentrazione era lineare con il numero di cellule e le cellule che si dividevano molto ne possedevano di più.

Dal 1909 gli esperimenti di Morgan gli valsero il premio Nobel per le sue scoperte riguardanti il ruolo dei cromosomi nell'ereditarietà. Riconobbe infatti che la sede dell'informazione genetica sono i cromosomi, isolati dalla *Drosophila*, utilizzata a causa dei suoi grandi cromosomi. Riuscì pertanto a confermare che i geni sono depositati nei cromosomi nel nucleo della cellula, che sono organizzati in una lunga riga nei cromosomi, che tratti dipendenti l'uno dall'altro corrispondono a geni che sono in siti vicini sui cromosomi e scoprì il fenomeno del crossover.

Nel 1928 Griffith studiò lo *Streptococcus Pneumoniae*, un patogeno presente in due varianti con diversa patogenicità: Rough (R) e Smooth (S). Se la variante S viene iniettata in un topo questo muore, mentre con R non muore. Dopo aver ucciso il patogeno di tipo S e averlo iniettato in un topo sano, questo non si ammalava, ma unendo a S morto un agente R vivo il topo, iniettato con la combinazione, moriva. Viene pertanto ipotizzato il passaggio orizzontale di materiale genetico.

Nel 1943 Avery conferma che il DNA è la molecola responsabile del trasferimento genetico orizzontale utilizzando lo stesso agente di Griffith riuscì a separare in coltura l'estratto cellulare nelle varie componenti molecolari: proteine, DNA, lipidi e polisaccaridi. Trattando le cavi con queste molecole separatamente scoprì che il responsabile della trasmissione genica orizzontale era il DNA.

Nel 1952 Hershey e Chase marcarono DNA con P^{32} e le proteine con S^{35} dei virus batteriofagi (che replicano il proprio DNA attraverso batteri fino a farli esplodere). Durante l'infezione di questi virus sull'*Escherichia coli*, separati tramite frullazione e con il loro materiale estratto attraverso lisi si nota come la maggior parte conteneva P^{32} , determinando il DNA come la molecola responsabile dell'infezione.

Nel 1953 Watson e Crick riuscirono a determinare la struttura del DNA e a formulare il dogma centrale della biologia molecolare: Il passaggio da DNA a mRNA può avvenire anche in senso contrario



Figura 1.1: Il dogma centrale della biologia molecolare

nel caso dei retrovirus.

Nel 1996 Mello e Fire evidenziarono l'importanza dell'RNA e del microRNA, vincendo il premio Nobel per la scoperta dell'interferenza dell'RNA e la proprietà dell'RNA a doppio filamento di interferire e spegnere l'espressione genica. Il microRNA è un RNA con 20-22 nucleotidi a singolo filamento, scoperto prima nelle piante che lo usano per difendersi dalle infezioni virali. L'RNA a doppio filamento fa in modo che il gene codificante la proteina corrispondente venga silenziato in modo che non esprima la proteina.

Capitolo 2

Cellule e genomi

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

2.1 Caratteristiche universali della vita sulla Terra

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

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

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

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

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

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

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

2.1.4 Tutte le cellule usano proteine come catalizzatori

Anche le proteine sono lunghe catene polimeriche non ramificate formate dall'unione in serie di monomeri comuni a tutti gli esseri viventi. Portano un'informazione sotto forma di una sequenza lineare di simboli. Dopo l'acqua sono l'elemento più presente nella cellula. I monomeri sono detti amminoacidi e ne esistono 20, sono tutti formati dalla stessa struttura centrale standard che permette la formazione di catene a cui è attaccato un gruppo laterale che determina il carattere chimico specifico. Ciascuna molecola proteica o polipeptide si ripiega in una forma tridimensionale precisa con siti reattivi sulla sua superficie. Questi polimeri di amminoacidi si legano con alta specificità ad altre molecole e agiscono da enzimi che catalizzano reazioni in cui vengono rotti o creati legami covalenti e dirigono pertanto la maggioranza dei processi chimici. Hanno anche funzione strutturale, motile, di rilevazione segnali, che viene determinata in base alla sequenza di amminoacidi creata dalla sequenza genica. Il circuito a feedback di catalizzazione del processo di duplicazione del DNA da parte delle proteine, che viene poi utilizzato per produrre proteine e RNA è alla base del comportamento auto-catalitico e capace di auto-riprodursi degli organismi viventi.

2.1.5 Tutte le cellule traducono RNA nello stesso modo

La traduzione dell'informazione genica è un processo complesso. L'informazione contenuta in un mRNA è letta in gruppo di tre nucleotidi alla volta: ciascuna tripletta di nucleotidi (codone) codifica un singolo amminoacido. Questa codifica porta a ridondanza in quanto ci sono 64 codoni ma 20 amminoacidi. Il codice è letto dal tRNA (RNA transfer). Ogni tipo di tRNA possiede ad un'estremità un amminoacido specifico e all'altra estremità una sequenza di tre nucleotidi (anticodone) che gli permette tramite l'accoppiamento di basi di riconoscere un gruppo di codoni nell'mRNA. Per la sintesi proteica una successione di molecole di tRNA cariche degli amminoacidi deve legarsi all'mRNA e gli amminoacidi devono essere uniti per espandere la catena proteica e i tRNA liberati dal loro carico devono essere rilasciati. Questo insieme di processi viene eseguito dal ribosoma formato da due catene principali di RNA detto rRNA (RNA ribosomiale) e da un gran numero di proteine diverse. Questa struttura si attacca ad un'estremità dell'mRNA e si sposta lungo di essa catturando molecole di tRNA cariche e mettendo insieme gli amminoacidi in modo da formare una nuova catena proteica.

2.1.6 Il frammento di informazione genica che corrisponde ad una proteina è un gene

Le molecole di DNA contengono le specifiche per migliaia di proteine. Sequenze speciali nel DNA servono come punteggiatura, indicando dove l'informazione di ciascuna proteina inizia e finisce. Ogni segmento del DNA è trascritto in una molecola di mRNA, codifica di diverse proteine. Tali segmenti sono i geni. Le molecole di RNA trascritte possono essere processate in modi diversi in modo da generare un insieme di versioni alternative di una proteina. Oltre a questo alcune parti sono trascritte in RNA con funzioni catalitiche, strutturali o regolatorie. Un gene viene pertanto definito come il segmento della sequenza di DNA corrispondente a una singola proteina o un insieme di proteine varianti o a una singola molecola di RNA catalitica, strutturale o regolatoria. L'espressione dei geni è regolata in base alla necessità della proteina o RNA che producono. Questo avviene grazie a lunghezze di DNA regolatorio che intramezzano la sequenza che legano delle proteine che controllano il tasso della trascrizione. In questo modo il genoma della cellula determina la natura delle proteine e quando devono essere prodotte.

2.1.7 La vita richiede energia libera

Una cellula vivente è un sistema chimico dinamico che opera lontano dall'equilibrio chimico. Affinchè una cellula cresca deve prendere dall'ambiente energia e materiali per far avvenire le reazioni. Questo consumo di energia è ciò che tiene la cellula in vita. L'energia è anche fondamentale per la propagazione dell'informazione genetica. Il processo che guida la formazione dei legami che determinano le molecole all'interno della cellula richiede energia per formare legami abbastanza forti da resistere a pressioni esterne.

2.1.8 Tutte le cellule funzionano come fabbriche biochimiche che impiegano le stesse strutture molecolari base

Siccome tutte le cellule creano DNA, RNA e proteine, devono contenere e manipolare una collezione simile di zuccheri semplici, nucleotidi e amminoacidi e altre sostanze come l'ATP (adenina trifosfato) per la sintesi di DNA e RNA e come trasportatore di energia libera.

2.1.9 Tutte le cellule sono chiuse in una membrana plasmatica attraverso la quale nutrienti e materiali di scarto devono passare

Un'altra caratteristica universale è che ogni cellula è rinchiusa da una membrana citoplasmatica che agisce da barriera selettiva e permette alla cellula di concentrare i nutrienti e di conservare i prodotti delle sintesi, crescendo i materiali di scarto. Le molecole che formano la membrana sono anfipatiche, ovvero formate da una parte idrofobica e una idrofila. Queste molecole poste in acqua si aggregano spontaneamente in modo da avvicinare tra di loro (e allontanare dall'acqua) la parte idrofobica. Tali tipi di molecole, come i fosfolipidi si aggregano in acqua per formare vescicole a bistrato. Tipicamente la coda idrofobica è costituita da polimeri di idrocarburi e dimostra perfettamente la tendenza della cellula di formare molecole le cui proprietà chimiche causano un auto-assemblaggio nella struttura necessaria alla cellula. Naturalmente il confine della cellula deve poter permettere il passaggio di alcuni elementi e sono pertanto presenti proteine di trasporto di membrana il cui compito di trasportare le molecole che entrano ed escono dalla cellula.

2.2 La diversità dei genomi e l'albero della vita

Il successo degli organismi viventi li ha portati ad occupare qualsiasi luogo sulla Terra. La maggior parte di questi organismi rimane però microscopica e invisibile all'occhio nudo.

2.2.1 Le cellule possono ottenere energia da una varietà di fonti di energia libera

Alcuni organismi come animali, funghi e molti batteri ottengono energia cibandosi di altri organismi viventi o dei prodotti chimici organici che producono, chiamati organotrofi. Altri la ottengono dal mondo non vivente e si dividono in due categorie: quelli che raccolgono l'energia dalla luce solare (fototrofi) e quelli che la ottengono da sistemi inorganici ricchi di essa (litotrofi). Gli organismi organotrofi non potrebbero esistere senza questi due. Gli organismi fototrofi includono batteri, alghe e piante, i litotrofi sono microscopici e vivono in condizioni impossibili per l'uomo. Alcuni litotrofi ottengono energia da reazioni aerobiche, altri da reazioni anaerobiche.

2.2.2 Alcune cellule fissano azoto e anidride carbonica per altre

La maggior parte della materia che compone le proteine è composta di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, zolfo e fosforo, molto presenti in ambienti non viventi, ma non in una forma chimica facilmente incorporata in molecole biologiche. Una gran quantità di energia è necessaria per guidare le reazioni che usano le molecole inorganiche di N_2 e CO_2 per fissare *N* e *C* e renderli disponibili agli organismi. Pertanto classi di cellule sono specializzate per fare questo lavoro. Si nota pertanto come le cellule viventi possano variare infinitamente in aspetti della loro biochimica.

2.2.3 La più grande diversità biochimica esiste tra le cellule procariote

Gli organismi viventi, in base alla loro struttura cellulare possono essere divisi in eucarioti e procarioti. Gli eucarioti mantengono il proprio DNA all'interno di una membrana intracellulare chiamata nucleo, mentre i procarioti non possiedono questo compartimento. La maggior parte delle cellule procariote sono piccole e vivono principalmente come individui indipendenti o in comunità vagamente organizzate. Possiedono tipicamente un rivestimento protettivo spesso detto parete cellulare sotto il quale si trova una membrana plasmatica che contiene un singolo compartimento citoplasmatico che contiene tutte le molecole necessarie per la vita. Vivono in una varietà di nicchie ecologiche e sono molto vari nelle loro capacità biochimiche.

2.2.4 L'albero della vita possiede tre rami principali: Batteri, Archei ed Eucarioti

La classificazione delle cose viventi dipende da somiglianze comuni, che, come mostrato da Darwin, suggerisce un antenato comune relativamente recente. I procarioti sono classificati in termini della loro biochimica e necessità nutrizionali. L'analisi genomica fornisce un modo più semplice e diretto di determinazione di relazioni evolutive. La sequenza di DNA di un organismo definisce la sua natura in maniera esaustiva e permette una facile comparazione con le informazioni corrispondenti in altre forme viventi e pertanto una determinazione immediata della loro distanza evolutiva. Questo ha permesso la distinzione dei procarioti in batteri e archei e come la prima cellula eucariota si sia generata da una cellula archea penetrata in un batterio antico.

2.2.5 Alcuni geni evolvono rapidamente, altri sono altamente conservati

Sia durante la conservazione che la copiatura dell'informazione genetica ci possono essere degli errori che alterano la sequenza nucleotidica creando delle mutazioni. Pertanto quando una cellula si divide le sue figlie sono spesso non del tutto uguali tra di loro. Questa mutazione può essere del tutto ininfluenza, migliorare la cellula o causare seri problemi. Questi cambiamenti possono essere mantenuti grazie alla selezione naturale ed è immediato notare come il terzo tipo di mutazione raramente verrà propagato. Alcune parti del genoma possono cambiare più facilmente: un segmento di DNA che non codifica proteine e non ha significativi ruoli regolatori può cambiare ad un tasso limitato unicamente dalla frequenza degli errori casuali, mentre un gene che codifica una proteina essenziale o una molecola di RNA genera quasi sempre una cellula che viene eliminata. Geni di quest'ultimo tipo sono detti altamente conservati. Questi sono i geni da osservare se si vogliono determinare le relazioni tra gli organismi più lontani. La classificazione nei tre domini si basa sull'analisi delle componenti di rRNA dei ribosomi.

2.2.6 Nuovi geni sono generati da geni preesistenti

Il materiale dell'evoluzione sono sequenze di DNA preesistenti e l'innovazione può accadere in molti modi:

- Mutazione intragenica: un gene casuale può essere modificato da cambiamenti nella sua sequenza di DNA attraverso errori che accadono principalmente nel processo della replicazione del DNA.
- Duplicazione genica: un gene esistente può essere accidentalmente duplicato in modo da creare un paio di geni identici all'interno della cellula che possono successivamente divergere.
- Mescolamento dei segmenti di DNA: due o più geni esistenti possono rompersi e raggrupparsi creando un gene ibrido consistente di un segmento che prima apparteneva a geni diversi.
- Trasferimento intracellulare orizzontale: un segmento di DNA può essere trasferito dal genoma di una cellula ad un'altra.

Ognuno di questi cambi lascia delle tracce caratteristiche ed è chiaro come siano avvenuti tutti.

2.2.7 La duplicazione genica permette la creazione di famiglie di geni imparentati in una stessa cellula

Una cellula duplica il suo intero genoma ogni volta che si divide, ma può accadere che la duplicazione abbia degli errori con una conservazione di segmenti originali e duplicati in una singola cellula. Una volta che un gene viene così duplicato, una delle coppie è libera di mutare e specializzarsi in una funzione diversa. Diverse iterazioni danno origine a famiglie di geni che possono essere derivate nello stesso genoma. Attraverso questo processo gli individui di una specie possiedono diverse varianti di un gene primordiale. Si chiamano ortologhi quei geni che si trovano in due specie diverse e derivano dallo stesso gene ancestrale nell'ultimo antenato comune, mentre si chiamano paraloghi quei geni che sono risultati da una duplicazione genica in un singolo genoma e probabilmente hanno ora funzioni differenti. Entrambi si classificano come geni omologhi.

2.2.8 I geni possono essere trasferiti tra organismi

I procarioti forniscono un buon esempio di trasferimento orizzontale dei geni da una specie di cellule all'altra. I segni più ovvi derivano da sequenze virali (dei batteriofagi). I virus sono piccoli pacchetti di materiale genetico evoluti come parassiti sui processi biochimici e riproduttivi della cellula. Non sono organismi viventi ma servono come vettori per il trasferimento di geni. Un virus si replica in una cellula, emerge da essa con un involucro protettivo e penetra, infettandola, un'altra cellula, che può essere anche di un'altra specie. Spesso la cellula infettata può morire, ma alcune volte il DNA virale potrebbe persistere nell'host per molte generazioni come un passeggero innocuo come plasmide o come sequenza inserita nel genoma regolare. Nei viaggi i virus possono recuperare frammenti di DNA dal genoma della cellula host e trasportarli in un'altra. Questi scambi sono comuni in procarioti ma rari in eucarioti di specie diverse. Molti procarioti possono recuperare anche DNA non virale dall'ambiente. Attraverso questi metodi batteri e archei possono acquisire geni da cellule vicine facilmente. Gli scambi orizzontali hanno un analogo tra gli eucarioti nell'attività sessuale.

2.2.9 Molti geni sono comuni tra tutti i rami primari dell'albero della vita

La sequenza di un gene permette di capire la sua funzione, confrontandola con un database preesistente. Data la sequenza genomica di organismi rappresentativi per archei, batteri e eucarioti e considerando gli scambi orizzontali si nota come i geni in comune sono principalmente quelli del sistema di traduzione, trascrizione e trasporto di amminoacidi.

2.2.10 Le mutazioni rivelano la funzione dei geni

L'analisi dei geni dipende da due approcci complementari: genetica e biochimica. La prima comincia con uno studio dei mutanti: si trova un organismo in cui il gene è alterato e si esaminano gli effetti sulla struttura e prestazioni. La biochimica analizza invece la funzione delle molecole. Combinando le due è possibile trovare quelle molecole la cui produzione dipende da un dato gene determinando allo stesso tempo il ruolo delle molecole nelle operazioni dell'organismo. La biologia molecolare ha permesso un rapido progresso in quanto si possono testare le contribuzioni dei geni all'attività del loro prodotto costruendo geni artificiali che combinano parte di un gene e parte di un altro. Gli organismi possono essere ingegnerizzati per produrre l'RNA o la proteina specificata dal gene in grandi quantità.

2.3 Informazione genetica negli eucarioti

Le cellule eucariote sono più grandi ed elaborate rispetto alle cellule procariote, come i loro genomi. La dimensione maggiore è accoppiata con radicali differenze strutturali e funzionali. Inoltre le cellule eucariote formano organismi multicellulari che arrivano a livelli di complessità maggiori.

2.3.1 Le cellule eucariote potrebbero essersi originate come predatori

Per definizione le cellule eucariote mantengono il proprio DNA nel nucleo. L'involucro nucleare, un doppio strato di membrana circonda il nucleo e separa il DNA dal citoplasma. Sono circa 1000 volte più voluminose rispetto ai procarioti e possiedono un citoscheletro elaborato, un sistema di filamenti proteici nel citoplasma che forma, insieme ad altre proteine un sistema strutturale e motile. Esiste una serie di membrane simile alla membrana citoplasmatica che racchiudono diversi spazi nella cellula, molti dei quali riguardano digestione e secrezione. Non hanno una parete cellulare gli organismi procarioti unicellulari sono chiamati protozoi e possono cambiare la loro forma e intrappolare altre cellule e piccoli oggetti attraverso fagocitosi. Una delle ipotesi sull'origine delle cellule eucariote riguarda una cellula primordiale predatrice. I movimenti rapidi erano necessari alla caccia e il nucleo necessario alla protezione del genoma rispetto ai movimenti del citoscheletro.

2.3.2 Le moderne cellule eucariote si sono evolute da una simbiosi

Tutte le cellule eucariote contengono i mitocondri, piccoli corpi nel citoplasma incapsulati in un doppio strato di membrana che consumano ossigeno e intrappolano energia dall'ossidazione di molecole nutritive come gli zuccheri per produrre la maggior parte dell'ATP. Sono simili in dimensioni ai piccoli batteri e possiedono il proprio genoma nella forma di una molecola di DNA circolare, i propri ribosomi e il proprio rRNA. È generalmente accettato che si sono originati da una forma di batterio aerobico fagocitato da una cellula ancestrale anaerobica. Sfuggendo alla digestione questi batteri si sono evoluti in simbiosi con la cellula fagocitante e la sua progenie, ricevendo protezione

e nutrimento in cambio di energia. Recenti analisi genomiche suggeriscono che la prima cellula eucariote si sia formata rispetto a una cellula archea fagocitata da un batterio aerobico. La maggior parte delle cellule eucariote di piante e alghe contengono anche un'altra classe di membrane chiamate i cloroplasti che svolgono la fotosintesi che come i mitocondri possiedono il proprio genoma. Si sono quasi certamente generati come batteri simbiotici fotosintetici, acquisiti da cellule eucariote che avevano già i mitocondri. Una cellula eucariote equipaggiata con i cloroplasti non necessita di predare in quanto riceve nutrimento dalla fotosintesi e pertanto hanno perso la capacità di muoversi, scambiandola con la formazione di una parete cellulare protettiva. I funghi, come le cellule animali possiedono mitocondri ma non cloroplasti e una spessa parete esterna che limita la loro abilità di muoversi rapidamente o di fagocitare altre cellule. Si sono evoluti in spazzini, nutrendosi degli scarti di altre cellule o delle cellule stesse morte.

2.3.3 Gli eucarioti possiedono genomi ibridi

L'informazione genetica degli eucarioti ha un'origine ibrida: dall'ancestrale cellula archea anaerobica e dal batterio che vi si è adattato come simbiote. La maggior parte dell'informazione è conservata nel nucleo, ma una piccola quantità rimane all'interno del mitocondrio e nei cloroplasti. Quando il DNA di mitocondri e cloroplasti è separato dal DNA nucleare e analizzato e sequenziato si nota come siano versioni degeneri e ridotte dei corrispondenti genomi batterici. La ragione di questo è che molti geni si sono spostati da essi al DNA del nucleo che mostra pertanto chiare prove dell'origine batterica.

2.3.4 I genomi eucarioti sono grandi

La selezione naturale ha favorito mitocondri con piccoli genomi, mentre il genoma nucleare sembra essersi ingrandito, probabilmente la dimensione maggiore era un vantaggio nella vita predatoria. Grazie all'accumulazione di segmenti di DNA derivati dagli elementi trasportabili parassitici il genoma della maggior parte degli eucarioti è molti ordini di grandezza maggiore rispetto ai batteri e agli archei. Questa maggiore disponibilità porta ad avere più geni e maggior parti di DNA non codificante (98% per gli esseri umani). Molto del DNA non codificante è quasi certamente inutile, ma una parte svolge l'attività di regolare l'espressione dei geni adiacenti, cruciale per la formazione di sistemi multicellulari complessi.

2.3.5 Il genoma definisce il programma dello sviluppo multicellulare

Le cellule in piante e animali sono estremamente varie, ma comunque derivano tutte dalla stessa cellula e contengono per la maggior parte copie identiche dello stesso genoma. Le differenze risultano dal modo in cui le cellule fanno uso selettivo delle proprie istruzioni geniche secondo gli indizi che ricevono dall'embrione sviluppatore. La cellula si comporta come una macchina multifunzione con sensori e abilità di esprimere diversi insiemi di geni secondo la sequenza di segnali che riceve. Il genoma in ogni cellula è grande abbastanza da accomodare le informazioni per l'intero sistema multicellulare, di cui viene usata un'unica parte. Un numero di geni codifica proteine che regolano l'attività di altri geni detti regolatori di trascrizione e si legano, direttamente o indirettamente al DNA regolatorio adiacenti ai geni da controllare. Le cellule sono inoltre in grado di inviare segnali con i propri vicini, pertanto lo stesso sistema di controllo governa ogni cellula, con diverse conseguenze in base ai messaggi scambiati. Il risultato è un preciso insieme di cellule in stati diversi.

2.3.6 Molti eucarioti vivono come cellule solitarie

Molte specie di cellule eucariote formano organismi unicellulari come predatori (protozoi) o come fotosintetizzatori (algae unicellulari) o come spazzini (funghi unicellulari o lieviti). L'anatomia dei protozoi è elaborata e include strutture complesse come sensori, organi motili e di attacco. Nei termini di lignaggio e sequenze di DNA questi organismi presentano molte più differenze rispetto alle controparti multicellulari.

Capitolo 3

Chimica e bioenergetica della cellula

La vita è un sistema chimico auto-sostenibile capace di andare in contro a evoluzione Darwiniana, i virus non sono considerati esseri viventi in quanto incapaci di sostenersi senza una cellula ospite. Considerando una cellula si vogliono considerare dinamicità, informazione e riproduzione. Una cellula contiene tanti organelli non stabili ma in continuamente in movimento, i mitocondri fabbriche di ATP che vanno in contro a processi di divisione e fusione che si muovono lungo i microtubuli. La caratteristica principale di una cellula viva è la dinamicità del sistema. L'informazione viene contenuta dalle cellule sotto forma di DNA (3 miliardi di nucleotidi). La maggior parte delle cellule sono capaci di riprodursi, processo che permette la diffusione delle loro informazioni contenute nel DNA, la duplicazione del DNA nelle cellule figlie può incorrere in degli errori che genera mutazioni che portano all'evoluzione.

3.1 Le componenti chimiche della cellula

Gli organismi viventi sono composti da un piccolo sottoinsieme di elementi: carbonio (C), idrogeno (H), azoto (N) e ossigeno (O) formano il 96.5% del peso della cellula. Gli atomi di questi elementi sono legati da legami covalenti in modo da formare molecole in quanto sono più resistenti delle energie termiche all'interno della cellula e sono rotti solo durante specifiche reazioni con altri atomi e molecole. Due molecole diverse possono essere tenute insieme da legami non covalenti molto più deboli.

3.1.1 L'acqua è mantenuta da legami a idrogeno

Le reazioni all'interno della cellula avvengono in ambiente acquoso, pertanto la vita si basa sulle proprietà chimiche dell'acqua. In ogni molecola d'acqua (H_2O) i due atomi di H sono legati all'atomo O da due legami covalenti altamente polari, pertanto si trova una distribuzione ineguale di elettroni che causa una regione carica positivamente verso gli atomi H e negativamente verso l'O. Quando una parte carica positivamente si avvicina a una negativa si formano legami a idrogeno, molto meno forti di quelli covalenti e facilmente rotti dall'energia termica delle molecole. Questi legami durano pertanto un periodo breve. Questi legami sono responsabili dello stato liquido dell'acqua, dell'alta tensione superficiale e punto di ebollizione. Alcune molecole come gli alcoli che possiedono

legami polari possono formare legami a idrogeno con l'acqua si dissolvono facilmente in acqua e sono chiamate idrofile (zuccheri, DNA, RNA e la maggior parte delle proteine). Le molecole idrofobiche invece sono apolari e non formano legami a idrogeno e pertanto non si dissolvono nell'acqua, un importante esempio sono gli idrocarburi, in cui gli H sono legati con gli atomi di C attraverso legami non polari, questa proprietà è sfruttata dalle cellule le cui membrane sono costruite da molecole con lunghe catene idrocarburiche.

3.1.2 Quattro tipi di attrazione non covalente aiuta a unire le molecole nelle cellule

Molto della biologia dipende dagli specifici legami causati da legami non covalenti: attrazione elettrostatica (legami ionici), legami a idrogeno e attrazioni di van der Waals e un quarto fattore che è la forza idrofobica. Nonostante ognuna di queste forze da sola sarebbe troppo debole per essere efficace si sommano tra loro in modo da creare una forte attrazione tra due molecole separate. Si noti anche come formando un'interazione competitiva con queste molecole l'acqua riduca fortemente la forza delle attrazioni elettrostatiche e dei legami a idrogeno.

3.1.3 Alcune molecole polari formano acidi e basi in acqua

Una delle reazioni chimiche più significative nella cellula occorre quando una molecola con un legame covalente altamente polare tra un idrogeno e un altro atomo si dissolve in acqua. Tale idrogeno ha quasi completamente perso il proprio elettrone e pertanto esiste quasi come nucleo di idrogeno caricato positivamente (H^+). Quando la molecola polare viene circondata da molecole d'acqua il protone viene attratto dalla loro carica parzialmente negativa e si può dissociare dalla molecola originale formando uno ione idronio (H_3O^+). La reazione inversa accade molto velocemente, pertanto in soluzione acquosa i protoni continuano a spostarsi tra una molecola e l'altra. Le sostanze che compiono questa reazione sono dette acidi e maggiore la concentrazione di H_3O^+ , più acida la soluzione. Questo ione risulta presente anche in acqua pura a causa del continuo movimento di protoni, in una concentrazione $10^{-7}M$. Per convenzione la concentrazione di H_3O^+ è riferita come la concentrazione di H^+ e espressa utilizzando la scala del pH, logaritmica. L'acqua pura ha un valore di 7 ed è detta neutra. Per valori di pH maggiori di 7 è detta basica, per valori minori detta acida. Gli acidi si caratterizzano in forti o deboli in base a quanto facilmente perdono i protoni in acqua. Molti degli acidi importanti per la cellula sono deboli. A causa dell'effetto sulla natura delle molecole dei protoni liberi l'acidità all'interno della cellula deve essere regolata. L'opposto di un acido è una base, molecole che accettano un protone in soluzione acquosa, ancora una volta nelle cellule sono presenti per la maggior parte basi deboli. Acidi e basi hanno azioni contrastanti e tendono ad annullare reciprocamente il loro effetto, pertanto l'interno della cellula è mantenuto vicino alla neutralità da buffer, acidi e basi deboli che tendono a compiere scambi di protoni ad un pH vicino a 7, mantenendo l'ambiente della cellula costante.

3.1.4 La cellula è formata da composti di carbonio

Senza considerare l'acqua e gli ioni inorganici come il potassio, la maggior parte delle molecole nella cellula sono basate sul carbonio, un atomo con la capacità di formare grosse molecole. Siccome il carbonio è piccolo e possiede quattro elettroni liberi nel livello esterno può formare legami covalenti con altri atomi e con se stesso, in modo da formare catene ed anelli in modo da generare molecole grandi e complesse. I composti del carbonio sono detti molecole organiche. Alcune combinazioni di

atomi compaiono ricorrentemente nella cellula e ognuno di questi gruppi possiede proprietà chimiche e fisiche proprie che influiscono sul loro comportamento.

3.1.5 Le cellule contengono quattro principali famiglie di piccole molecole organiche

Le molecole della cellula sono basate sul carbonio e hanno pesi molecolari tra 100 e 1000 e contengono circa 30 atomi di carbonio. Sono solitamente trovate libere in soluzione. Alcune sono usate come monomeri per costruire macromolecole polimeriche, altre agiscono come fonti di energia e sono divise e trasformate in altre piccole molecole con più ruoli nella cellula. Sono molto meno presenti rispetto alle macromolecole. Tutte le molecole organiche sono sintetizzate e divise dallo stesso insieme di componenti, pertanto i composti nella cellula sono chimicamente simili e possono essere classificati per la maggior parte in zuccheri, acidi grassi, nucleotidi e amminoacidi.

3.1.6 La chimica della cellula è dominata da macromolecole con proprietà notevoli

Le macromolecole sono le molecole organiche più abbondanti per peso nella cellula. Sono le strutture principali per la costruzione della cellula e definiscono le proprietà degli organismi viventi. Le macromolecole nella cellula sono polimeri che sono costruiti legando covalentemente piccole molecole organiche (monomeri) in lunghe catene. Le proteine sono abbondanti e versatili, alcune servono da enzimi, che catalizzano tutte le reazioni interne alla cellula, altre hanno funzione strutturale, o per compattare il DNA nei cromosomi, altre ancora agiscono come produttrici di forza motile. Nonostante le reazioni chimiche per la formazione di polimeri varino tra proteine, acidi nucleici e polisaccaridi in tutte le molecole cresce grazie all'addizione di un monomero in una fine di una catena in una reazione di condensazione, in cui una molecola di acqua è persa con ogni subunità aggiunta. Questa operazione richiede gli stessi enzimi per tutta la molecola ed è pertanto facilmente serializzabile. Tranne i polisaccaridi i monomeri che formano le macromolecole esistono in diverse varianti e richiedono pertanto una sequenza precisa di addizione per formare la macromolecola corretta.

3.1.7 I legami non covalenti specificano la forma di una macromolecola e i suoi legami con le altre molecole

La maggior parte dei legami covalenti nella macromolecola permettono una rotazione degli atomi che legano, permettendo grande flessibilità garantendo ad essa un gran numero di conformazioni possibili quando l'energia termica causa rotazioni. Nonostante questo la maggior parte delle macromolecole biologiche sono altamente costrette a causa di un gran numero di legami non covalenti che si formano tra diverse parti della stessa molecola e causano la macromolecola in una conformazione particolare, determinata dalla sequenza lineare dei monomeri. Questo accade nella maggior parte delle proteine e in molte delle piccole molecole di RNA. Questi legami non covalenti possono anche creare forte attrazione tra molecole diversi in modo da creare un'interazione molecolare con alta specificità e con vari gradi di affinità, permettendo rapida dissociazione dove necessario. Questo processo è fondamentale per tutte le catalisi biologiche, permettendo il loro funzionamento come enzimi e per la creazione di strutture cellulari complesse.

3.2 Catalisi e utilizzo dell'energia da parte delle cellule

Una delle principali differenze tra organismi viventi e non viventi è che i primi creano e mantengono ordine. Per farlo necessitano di operare un insieme di reazioni chimiche in cui alcune molecole sono separate per mettere a disposizione altre molecole per costruirne altre.

3.2.1 Il metabolismo della cellula è organizzato dagli enzimi

Le reazioni chimiche che una cellula performa accadrebbero normalmente unicamente ad alte temperature, pertanto ogni reazione richiede un'accelerazione specifica nella sua reattività. Questo fatto permette alla cellula di controllare la sua chimica. Il controllo è operato da catalizzatori biologici specializzati, proteine detti enzimi o RNA detto ribosomi. Ogni enzima catalizza una delle possibili reazioni che sono connesse in serie in modo che il prodotto di una sia il substrato di un'altra. Questi cammini lineari sono legati uno con l'altro, formando un insieme di reazioni interconnesse che permettono alla cellula di sopravvivere, crescere e riprodursi. Esistono due principali flussi di reazioni chimiche: quelle cataboliche che separano i nutrienti in piccole molecole, generando energia e alcune piccole molecole fondamentali e anaboliche o biosintetiche in cui le piccole molecole e l'energia vengono utilizzate per guidare la sintesi delle molecole che formano la cellula. Insieme costituiscono il metabolismo della cellula.

3.2.2 L'ordine biologico è reso possibile dal rilascio di calore dalla cellula

Le cellule devono ridurre il proprio livello di entropia e pertanto recuperare energia dall'ambiente sotto forma di cibo o fotoni, che viene poi utilizzata per generare l'ordine necessario. Nel corso di queste reazioni una parte dell'energia utilizzata viene trasformata in calore. L'energia, nel caso delle cellule animali viene ottenuta rompendo i legami dei nutrienti e viene trasformata in energia termica. La cellula non può beneficiare del calore rilasciato a meno che queste reazioni che generano energia siano accoppiati direttamente con i processi che generano l'ordine molecolare.

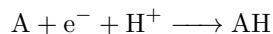
3.2.3 Le cellule ottengono energia ossidando molecole organiche

Tutte le cellule animali e vegetali utilizzano l'energia conservata in legami chimici di molecole organiche, sia che siano zuccheri sintetizzati dalla fotosintesi sia che siano ottenuti mangiando. L'energia è estratta da un processo di ossidazione graduale. L'atmosfera contiene molto ossigeno e in presenza di ossigeno la forma di carbonio più stabile è la CO_2 e quella dell'idrogeno H_2O . Una cella è pertanto capace di ottenere energia permettendo a carbonio e idrogeno delle molecole di combinarsi con l'ossigeno per produrre CO_2 e H_2O . Questo processo è chiamato respirazione aerobica. La fotosintesi e la respirazione sono processi complementari. Si nota pertanto come l'utilizzo di carbonio formi un grande ciclo che coinvolge l'intera biosfera.

3.2.4 Ossidazione e riduzione coinvolgono il trasferimento di elettroni

L'ossidazione nella cellula avviene attraverso l'uso di enzimi in cui il metabolismo prende le molecole attraverso un numero di reazioni che raramente coinvolgono la diretta addizione di ossigeno. L'ossidazione si riferisce a quel processo in cui elettroni sono trasferiti da un atomo all'altro (il processo inverso è la riduzione). Essendo che il numero di elettroni deve essere conservato durante una reazione ossidazione e riduzione accadono contemporaneamente: una molecola guadagna un elettrone e un'altra lo perde. Questi termini si riferiscono anche a un parziale spostamento di elettroni in un legame covalente: quando se ne crea uno polare l'atomo dalla parte del delta positivo acquisisce una

parziale carica positiva ed è detto ossidato. Quando una molecola recupera un elettrone recupera anche un protone allo stesso momento e l'effetto netto è l'addizione di un atomo di idrogeno alla molecola:



Queste reazioni, dette di idrogenazione sono riduzioni, mentre quelle inverse, di deidrogenazione sono dette ossidazioni. In una molecola organica avviene un'ossidazione quando il numero di legami C-H diminuisce, una riduzione quando aumenta. Le cellule utilizzano gli enzimi per catalizzare le ossidazioni attraverso una sequenza di reazioni che permettono il raccolto dell'energia prodotta.

3.2.5 Gli enzimi abbassano la barriera di energia di attivazione che blocca la reazione chimica

Si noti come le reazioni chimiche procedono spontaneamente unicamente nella direzione che porta alla perdita di energia libera (energeticamente favorevoli). Essendo che le molecole negli esseri viventi si trovano in uno stato energetico relativamente stabile è necessario, affinché una reazione inizi di un'energia di attivazione, creato da collisioni casuali insolitamente energetiche, che diventano più violente maggiore è l'energia. La chimica di una cellula è altamente controllata e il superamento del livello di energia è svolto da enzimi che si legano con un'altra molecola (substrato) in modo da ridurre l'energia di attivazione necessaria per la reazione. Questi enzimi sono detti catalizzatori e aumentano il tasso delle reazioni chimica in quanto permettono maggiori collisioni casuali con le molecole circostanti.

3.2.6 Gli enzimi possono guidare i substrati lungo specifici cammini di reazioni

Un enzima non può cambiare il punto di equilibrio per una reazione in quanto aumenta anche il tasso della reazione inversa. Nonostante questo sono capaci di guidare le reazioni verso un cammino specifico in quanto sono altamente selettivi e molto precisi, catalizzando un'unica reazione, pertanto ogni enzima selettivamente abbassa l'energia di attivazione di una delle reazioni chimiche possibili che il substrato può svolgere. In questo modo insieme di enzimi possono direzionare ognuna delle molecole lungo cammini specifici. Ogni enzima possiede un sito attivo, uno spazio in cui solo particolari substrati possono legarsi e dopo la reazione rimangono invariati e possono pertanto funzionare più volte.

3.2.7 Come gli enzimi trovano i loro substrati, la rapidità dei movimenti molecolari

Un enzima può catalizzare la reazione di migliaia di substrati al secondo. L'attacco veloce è possibile perché il movimento causato dal calore è estremamente veloce. Questi movimenti molecolari sono classificati in:

- Movimento traslatorio: il movimento della molecola da un posto all'altro.
- Vibrazioni: il movimento di atomi legati da legami covalenti tra di loro.
- Rotazioni.

Questi movimenti aiutano ad unire le superfici di molecole che interagiscono. Il movimento delle molecole causa il processo di diffusione e in questo modo ogni molecola collide con un gran numero

di altre molecole al secondo. La distanza netta alla fine di una passeggiata casuale è proporzionale alla radice del tempo impiegato. Essendo che gli enzimi si muovono più lentamente dei substrati si possono considerare fermi. Il tasso di incontro dell'enzima con il suo substrato dipende alla concentrazione dell'ultimo. Una collisione del substrato con il sito attivo causa immediatamente la creazione del sistema enzima-substrato. L'alta specificità è data dal fatto che una forma errata causa legami covalenti più deboli dell'agitazione termica.

3.2.8 Il cambio di energia libera di una reazione determina se può avvenire spontaneamente

Nonostante gli enzimi velocizzino le reazioni non possono forzare reazioni energeticamente sfavorevoli. Questo tipo è però necessario per alcune operazioni della cellula, pertanto gli enzimi accoppiano reazioni energeticamente favorevoli in modo da produrre energia che viene utilizzata per le reazioni sfavorevoli e produrre ordine biologico. Il livello di energia libera (G) esprime l'energia disponibile per fare lavoro e viene presa in considerazione quando il sistema subisce un cambiamento (ΔG), critico in quanto è una diretta misura della quantità di disordine creata nell'universo da una reazione. Reazioni energeticamente favorevoli hanno un ΔG negativo, quelle sfavorevoli positivo e possono avvenire unicamente se accoppiate con reazioni sfavorevoli tale che il ΔG totale rimanga negativo. La concentrazione dei reagenti influenza il cambio di energia libera e la direzione di una reazione. A causa di questo per comparare le reazioni si deve utilizzare il cambio di energia libera standard o ΔG° , definito alla concentrazione per reagenti di $1 \frac{M}{L}$. Per una reazione $Y \longrightarrow X$ a $37^\circ C$, ΔG° è in relazione a ΔG come:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[X]}{[Y]}$$

Dove R è la costante dei gas reali e T la temperatura assoluta. Si noti come al procedere della reazione il rapporto tra i reagenti cambia e avvicina ΔG a zero, dove si raggiunge l'equilibrio chimico e non esiste un cambio di energia libera per guidare la reazione in nessuna direzione e pertanto il rapporto di prodotto e substrato raggiunge un valore costante K detta costante di equilibrio. I ΔG delle reazioni accoppiate sono additivi, pertanto una reazione sfavorevole può essere guidata da una favorevole nel caso la seconda segua la prima.

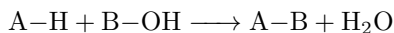
3.2.9 Molecole vettore attivate sono essenziali per la biosintesi

L'energia rilasciata dall'ossidazione delle molecole deve essere temporaneamente conservata prima che possa essere canalizzata nella sintesi. Nella maggior parte dei casi questo avviene come energia chimica di legame in un sottoinsieme di molecole dette molecole vettore con dei legami covalenti ricchi di energia. Queste molecole si diffondono rapidamente all'interno della cellula trasportando l'energia. Questi vettori attivati conservano energia in una forma facilmente scambiabile sotto forma di un gruppo chimico o elettrone mantenuto ad un livello energetico alto e può servire sia come fonte energetica che di materiali. Sono detti anche coenzimi. Esempi di queste molecole sono ATP, NADH e NADPH. La formazione di un vettore attivo è accoppiata con una reazione energeticamente favorevole come ossidazione: la quantità di calore rilasciata viene ridotta di una quantità pari a quella conservata nei legami, sufficiente a iniziare un'altra reazione.

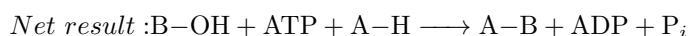
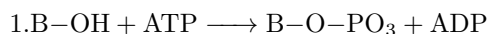
3.2.10 L'ATP è il vettore attivo più utilizzato

L'ATP è la molecola utilizzata per conservare e utilizzare l'energia. È sintetizzato in una reazione di fosforilazione in cui un gruppo fosfato è aggiunto all'ADP (adenina disfosfato). Quando richiesto

l'ATP dona il suo pacchetto di energia attraverso l'idrolisi in ADP e fosfato inorganico. L'ADP generato ritorna poi disponibile per la fosforilazione. Questa reazione è accoppiata con molte altre di sintesi. Una tipica reazione biosintetica è una in cui due molecole A e B sono unite per produrre $A-B$ durante la condensazione:



Esiste un cammino indiretto in cui un accoppiamento con l'idrolisi dell'ATP causa la reazione di avvenire: l'idrolisi viene utilizzata per convertire $B-OH$ in un composto intermedio più energetico che poi interagisce direttamente con $A-H$ per formare $A-B$. Il meccanismo più semplice coinvolge il trasferimento di un fosfato dall'ATP a $B-OH$ per creare $B-O-PO_3$:



La reazione di condensazione è pertanto forzata dall'idrolisi in un cammino catalizzato da un enzima.

3.2.11 NADH e NADPH sono vettori di elettroni

Altri vettori che partecipano nelle reazioni di ossidazione-riduzione sono parte delle reazioni accoppiate. Questi vettori sono specializzati nel trasportare elettroni mantenuti ad alta energia e atomi di idrogeno, i principali è NAD^+ (dinucleotide adenina nicotinammide) e $NADP^+$ (dinucleotide adenina nicotinammide fosfato) che raccolgono un pacchetto di energia corrispondente a due elettroni e un protone H^+ e sono convertiti in $NADH$ (dinucleotide adenina nicotinammide ridotto) e $NADPH$ (dinucleotide adenina nicotinammide fosfato ridotto) che possono pertanto essere considerate vettori di ioni idruri. Il $NADPH$ è prodotto durante un insieme di reazioni cataboliche che producono energia due atomi di idrogeno sono rimossi da una molecola di substrato. Entrambi gli elettroni ma non un H^+ sono aggiunti all'anello di $NADP^+$ per formare $NADPH$, mentre il protone H^+ è rilasciato in soluzione. Il $NADPH$ rilascia facilmente lo ione idruro in una reazione di ossidazione-riduzione in modo da raggiungere uno stato più stabile ottenendo un rilascio di energia libera negativa. Il gruppo fosfato del $NADPH$ dà alla molecola una forma completamente diversa rispetto al $NADH$, rendendole riconoscibili a enzimi completamente diversi in quanto si rende necessario regolare due reazioni di trasferimento di elettroni indipendentemente. Il $NADPH$ opera con gli enzimi che catalizzano le reazioni anaboliche di sintesi per le molecole ricche di energia, mentre il $NADH$ opera come intermedio nel sistema di reazioni cataboliche che generano ATP. La genesi delle due molecole avviene essa stessa indipendentemente in modo da avere un controllo fine sul rapporto tra NAD^+ e $NADH$ (mantenuto alto) e tra $NADP^+$ e $NADPH$, mantenuto basso.

3.2.12 Esistono molte altre molecole vettori nella cellula

Altri vettori attivati possono trasportare un gruppo in un legame ad alta energia e instabile. Il resto della molecola, solitamente la parte più grande permette il riconoscimento da parte di enzimi. Molte di queste parti contengono un nucleotide (solitamente adenosina). Si noti come ATP trasferisce fosfato, $NADPH$ elettroni e idrogeno. Altri vettori attivati trasferiscono gruppi utilizzati per la biosintesi e sono generati in reazioni accoppiati con l'idrolisi dell'ATP.

3.2.13 La sintesi di polimeri biologici è guidata dall'idrolisi dell'ATP

Le molecole della cellula sono composte da subunità unite in una reazione di condensazione, in cui i costituenti di una molecola d'acqua (OH e O) sono rimossi dai reagenti. Conseguentemente l'azione inversa, la rottura di tutti e tre i tipi di polimeri avviene attraverso idrolisi catalizzata, energeticamente favorevole. Acidi nucleici, proteine e polisaccaridi sono polimeri prodotti dall'addizione ripetuta di monomeri a un capo di una catena che cresce. La condensazione in ogni passaggio richiede energia data dall'idrolisi di un nucleoside trifosfato. Per ogni tipo di macromolecola esiste un cammino catalizzato: il gruppo $-OH$ che viene rimosso nella reazione di condensazione è prima attivato legandosi con una molecola che lo porta ad uno stato energetico elevato, attraverso una serie di intermedi ad alta energia. Ogni vettore attivato ha dei limiti nella sua capacità di guidare una reazione sintetica: il ΔG dell'idrolisi dell'ATP dipende dalla concentrazione dei reagenti, ma si trova tra -46 e $-54 \frac{kJ}{M}$ e potrebbe pertanto guidare una reazione con $\Delta G = +40 \frac{kJ}{M}$ che non è abbastanza per alcune reazioni. In questi casi l'idrolisi viene alterata in modo che produca AMP e pirofosfato (PP_i) che si idrolizza in un passo successivo. L'intero processo crea un $\Delta G = -100 \frac{kJ}{M}$. Una reazione che avviene in questo modo è la sintesi degli acidi nucleici dal nucleoside trifosfato. La condensazione ripetitiva può essere orientata verso la testa o verso la coda. Nella head polymerization, il legame reattivo è trasportato alla fine del polimero crescente e deve pertanto essere rigenerato ogni volta che un monomero viene aggiunto e il monomero trasporta con sé il legame che viene utilizzato per il prossimo monomero. Nella tail polymerization il legame è trasportato da ogni monomero.

3.3 Come le cellule ottengono energia dai nutrienti

La riserva costante di energia necessaria alla generazione e mantenimento dell'ordine delle cellule è ottenuta dai legami chimici energetici nelle molecole dei nutrienti. Proteine, lipidi e polisaccaridi che li compongono sono rotti in piccole molecole prima che la cellula possa usarle attraverso digestione enzimatica e successivamente entrano il citosol della cellula, dove avviene una graduale ossidazione. Gli zuccheri sono un'importante fonte di energia e vengono ossidati in passi controllati in anidride carbonica (CO_2) e acqua.

3.3.1 La glicolisi è un cammino centrale per produrre ATP

Il processo principale per l'ossidazione degli zuccheri è la glicolisi, una serie di reazioni che produce ATP senza ossigeno molecolare. Avviene nel citosol e include molti microorganismi anaerobici. Durante la glicolisi una molecola di glucosio è convertita in due molecole di piruvato a tre atomi di carbonio. Per ogni molecola di glucosio sono idrolizzate due molecole di ATP per fornire energia nei primi passaggi, ma alla fine sono prodotte quattro molecole di ATP, con un guadagno netto di due ATP e di NADH. La glicolisi coinvolge 10 reazioni separate in ognuna delle quali viene prodotto uno zucchero intermedio e catalizzata da un enzima diverso. L'ossidazione avviene rimuovendo elettroni grazie a NAD^+ producendo NADH dal carbonio derivato dalla molecola di glucosio. La natura a passaggi rilascia l'energia in piccoli pacchetti che possono essere salvati in un vettore attivo. Alcuni dell'energia rilasciata guida la sintesi di ATP da ADP e P_i e altra rimane negli elettroni nel vettore NADH. Negli organismi aerobici le molecole di NADH donano gli elettroni a una catena di trasporto e il NAD^+ viene utilizzato ancora per la glicolisi.

3.3.2 La fermentazione produce ATP in assenza di ossigeno

Per la maggior parte delle cellule la glicolisi è solo un preludio al passaggio finale della rottura dei nutrienti: il piruvato è trasportato ai mitocondri, dove è convertito in CO_2 e acetile CoA, il cui gruppo acetile è successivamente ossidato in CO_2 e H_2O . In contrasto, per molti organismi anaerobici la glicolisi rimane la fonte principale di ATP. In queste condizioni anaerobiche il piruvato e gli elettroni del NADH rimangono nel citosol. Il piruvato è convertito in prodotti secreti dalla cellula come etanolo e CO_2 nei lieviti o in acido lattico nei muscoli. In questo processo il NADH libera i suoi elettroni ed è convertito in NAD^+ per mantenere la reazione di glicolisi. Questi processi sono chiamati fermentazioni.

3.3.3 La glicolisi mostra come gli enzimi accoppiano l'ossidazione alla conservazione di energia

Due reazioni centrali della glicolisi (passi 6 e 7) convertono lo zucchero intermedio gliceraldeide 3-fosfato in 3-fosfogliceraldeide, ossidando un gruppo aldeide in un acido carbossilico. La reazione completa rilascia energia libera per convertire una molecola di ADP in una di ATP e per trasferire due elettroni e protoni dall'aldeide al NAD^+ , contemporaneamente liberando abbastanza calore da rendere la reazione energeticamente favorevole con $\Delta G = -12.5 \frac{\text{kJ}}{\text{M}}$. La reazione è guidata da due enzimi che si legano agli zuccheri intermedi. Il primo enzima (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) forma un legame covalente temporaneo con l'aldeide attraverso un gruppo $-\text{SH}$ e catalizza la sua ossidazione attraverso NAD^+ nel suo sito attivo. Il legame substrato-legame è successivamente rotto da uno ione fosfato per produrre un intermedio ad alta energia che viene rilasciato dall'enzima. Questo secondo intermedio si lega al secondo enzima fosfoglicerato chinasi che catalizza il trasferimento del fosfato all'ADP, creando l'ATP e completando il processo di ossidazione dell'aldeide in acido carbossilico. La rottura del legame fosfato crea l'energia necessaria per la sintesi dell'ATP.

3.3.4 Gli organismi conservano le molecole nutrienti in serbatoi speciali

Tutti gli organismi devono mantenere un rapporto ATP-ADP alto per rimanere in vita. Per compensare a lunghi periodi senza accesso a nutrienti gli animali conservano gli acidi grassi come goccioline di grasso composte di trigliceridi insolubili principalmente nel citoplasma di cellule di grasso specializzate (adipociti). Per conservazione a breve termine lo zucchero è conservato come glicogeno, la cui sintesi e degradazione sono rapidamente regolate al bisogno. Quando le cellule necessitano di più ATP di quanto riescano a produrre dai nutrienti nel sangue degradano il glicogeno in glucosio 1-fosfato che viene convertito in glucosio 6-fosfato per la glicolisi. Quantitativamente il grasso è più presente del glicogeno in quanto è più efficiente: libera più energia ed è insolubile in acqua. Lo zucchero e l'ATP necessario alle piante è prodotto in organelli separati come i cloroplasti per la fotosintesi e i mitocondri per l'ATP. Essendo questi organelli isolati da una membrana e mancanti in alcune cellule, gli zuccheri sono esportati dai cloroplasti ai mitocondri di tutte le cellule. Durante i periodi di eccesso di capacità fotosintetica i cloroplasti convertono dello zucchero in grassi e amido, un polimero del glucosio analogo al glicogeno. I grassi nelle piante sono trigliceridi e differiscono unicamente nel tipo di acidi grassi che predominano. Entrambi sono conservati nei cloroplasti. Quando il glucosio raggiunge un livello soglia negli animali i trigliceridi sono idrolizzati per produrre acidi grassi e glicerolo e sono trasferiti nel flusso sanguigno. Gli acidi grassi sono ossidati direttamente.

3.3.5 Zuccheri e acidi grassi sono degradati in acetile CoA nei mitocondri

Nei metabolismi aerobici il piruvato prodotto dalla glicolisi nel citosol è trasportato nei mitocondri, dove è decarbossilato da un complesso di tre enzimi detto il complesso piruvato deidrogenasi. Il prodotto è una molecola di CO_2 , una di NADH e acetil CoA. Gli acidi grassi dal flusso sanguigno sono trasportati nei mitocondri dove sono ossidati. Ogni molecola di acido grasso (attivata, acile grasso CoA) è rotta completamente da un ciclo di reazione che rompe due atomi di carbonio dalla coda carbossile generando una molecola di acetile CoA per ogni ciclo. Sono prodotte una molecola di NADH e una di FADH_2 . La maggior parte di questa energia rimane conservata nelle molecole di acetile CoA e pertanto entra in gioco il ciclo di reazione di acido citrico, in cui il gruppo acetile ($-\text{COCH}_3$) viene ossidato in CO_2 e H_2O .

3.3.6 Il ciclo di acido citrico genera NADH ossidando i gruppi acetili in CO_2

Il ciclo di acido citrico o ciclo di acido tricarbossilico o ciclo di Krebs crea i due terzi dell'ossidazione totale dei composti di carbonio nelle cellule e i suoi prodotti principali sono CO_2 e elettroni ad alta energia nella forma di NADH. La prima è secreta come scarto, mentre i secondi sono passati a catene di trasporto di elettroni legate alla membrana, eventualmente combinandosi con l'ossigeno per formare acqua. Il ciclo in sé non richiede ossigeno, ma viene utilizzato in reazioni seguenti e avviene nei mitocondri. Il gruppo acetile non è ossidato direttamente: il gruppo è trasferito da CoA a una molecola di ossalacetato per formare l'acido tricarbossilico o acido citrico, che viene gradualmente ossidato permettendo la produzione di molecole vettore ad alta energia. Alla fine delle otto reazioni l'ossalacetato viene rigenerato e rientra in un altro ciclo. La molecola di FADH_2 (flavina adenina dinucleotide ridotto) viene prodotta da FAD e il trifosfato ribonucleico GTP dal GDP, molto simile dell'ATP, il cui trasferimento del gruppo fosfato all'ADP produce ATP. L'energia conservata in NADH e FADH_2 viene utilizzata per la produzione di ATP attraverso fosforilazione ossidativa, che richiede ossigeno gassoso. L'acqua mette a disposizione gli atomi di ossigeno necessari alla produzione di CO_2 . Alcuni amminoacidi passano dal citosol ai mitocondri, dove sono convertiti in acetile CoA o altri intermedi del ciclo di Krebs che insieme alla glicolisi forma un punto per le reazioni biosintetiche producendo intermedi come ossalacetato e α -chetoglutarato. Alcune di queste sostanze prodotte dal catabolismo sono trasferite dal mitocondrio al citosol, dove vengono utilizzate in reazioni anaboliche come precursori per la sintesi di molte molecole essenziali.

3.3.7 Il trasporto di elettroni guida la sintesi della maggior parte dell'ATP nelle cellule

La maggior parte dell'energia chimica rilasciata nell'ultima parte della degradazione di un nutriente permette il trasferimento da parte di NADH e FADH_2 degli elettroni che hanno preso durante l'ossidazione del nutriente a catene di trasporto di elettroni, incorporate nella membrana interna del mitocondrio. Come gli elettroni passano lungo la catena di molecole elettrone-accettori e molecole elettrone-donatori passano sequenzialmente a stati di energia minore. Questa energia pompa protoni H^+ lungo la membrana dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrane e al citosol, generando un gradiente di ioni H^+ che serve come fonte di energia per la cellula per reazioni come la generazione di ATP attraverso fosforilazione di ADP. Alla fine della serie di trasferimenti gli elettroni sono passati a molecole di ossigeno gassoso diffuso nel mitocondrio che producono acqua. Questo processo detto fosforilazione ossidativa succede anche nella membrana plasmatica dei batteri. L'ossidazione di una molecola di glucosio in H_2O e CO_2 è utilizzata per produrre 30 molecole di ATP.

3.3.8 Amminoacidi e nucleotidi sono parte del ciclo azotato

Gli atomi di azoto e zolfo passano da composto a composto e all'ambiente in una serie di cicli reversibili. Essendo l'azoto poco reattivo solo alcuni organismi sono in grado di incorporarlo attraverso fissazione. La maggior parte dell'azoto organico deriva pertanto dal passaggio tra organismi. L'azoto viene ricevuto da proteine e acidi nucleici che vengono rotti in amminoacidi e nucleotidi e viene utilizzato per produrre proteine e acidi nucleici. Circa metà degli amminoacidi sono essenziali per l'uomo: non possono essere sintetizzati. I nucleotidi possono essere sintetizzati attraverso cammini biosintetici specializzati. Tutto l'azoto nelle basi purine e pirimidine sono derivati dall'amminoacido glutammina, dall'acido aspartico e dalla glicina, mentre gli zuccheri del ribosio e del desossiribosio dal glucosio. Gli amminoacidi non utilizzati in biosintesi possono essere ossidati per creare energia metabolica. Carbonio e idrogeno formano CO_2 e H_2O , mentre gli atomi di azoto sono spostati in varie forme e appaiono come urea, che viene secreta. Ogni amminoacido viene processato diversamente. Lo zolfo, per essere usato per la vita, deve essere ridotto a solfuro (S_2^-). Lo stato di ossidazione dello zolfo richiesto per la biosintesi di metionina, cisteina, del coenzima A e i centri a ferro-zolfo per il tramorto di elettroni. La riduzione dello zolfo comincia in batteri, funghi e piante, dove enzimi e TAP sono utilizzati per creare un cammino per l'assimilazione. Gli esseri umani non possono compiere questo processo.

Capitolo 4

Proteine

Le proteine costituiscono la maggior parte della massa secca della cellula. Svolgono le principali funzioni strutturali e la maggior parte delle funzioni della cellula: gli enzimi mettono a disposizione le superfici che catalizzano le reazioni chimiche. Quelle incorporate nella membrana plasmatica formano canali e pompe per il controllo del passaggio di piccole molecole nella cellula, hanno funzione di messaggeri intra e inter cellulari, si occupano del movimento della cellula, sono anticorpi, tossine, ormoni e hanno mille altre funzioni.

4.1 Forma e struttura delle proteine

4.1.1 La forma di una proteina è specificata dalla sua sequenza degli amminoacidi

Esistono 20 amminoacidi diversi che vengono codificati dal DNA di un organismo, ognuno con proprietà chimiche diverse. Una molecola proteica è costituita da una lunga catena senza ramificazioni di questi amminoacidi, ognuno legato ai suoi vicini attraverso un legame peptidico covalente. Sono pertanto dette polipeptidi. Ogni tipo di proteina possiede una sequenza di amminoacidi unica e ne esistono migliaia di tipi. La sequenza ripetuta di atomi lungo il nucleo della catena polipeptidica è detto il polypeptide backbone, al quale si attaccano quelle porzioni di amminoacidi non coinvolte nel legame peptidico e che conferiscono all'amminoacido le sue proprietà uniche. Le 20 catene laterali differenti degli amminoacidi differiscono nelle proprietà: alcune sono apolari e idrofobiche, altre negativamente o positivamente cariche, altre formano legami covalenti. Le proteine formano una catena flessibile che può ripiegarsi in infiniti modi. Tale struttura può essere determinata da molti legami non covalenti che si formano tra una parte della catena e l'altra e sono: legami idrogeno, attrazioni elettrostatiche e forze di Van der Waals che in parallelo possono mantenere insieme due regioni della catena. La forza di questo gran numero di legami non covalenti determina la stabilità di ogni forma ripiegata. Può entrare anche in gioco una forza apparente di attrazione idrofobica. La forma viene pertanto influenzata fortemente dalla distribuzione degli amminoacidi polari e non polari. I non polari tendono a trovarsi all'interno della molecola in modo da evitare il contatto con l'acqua, mentre i gruppo polari verso l'esterno. Amminoacidi polari all'interno della proteina sono tipicamente legati con altri amminoacidi polari o al backbone polipeptidico attraverso legami a idrogeno.

4.1.2 Le proteine si ripiegano nella conformazione a minore energia

La maggior parte delle proteine possiedono una particolare struttura tridimensionale. Tale conformazione è quella che minimizza la sua energia libera. La sequenza di amminoacidi contiene tutte le informazioni necessarie alla struttura della proteina. La maggior parte si piega in una singola conformazione stabile, che può variare leggermente quando interagiscono con altre molecole. Nelle cellule una proteina detta *molecular chaperone* assiste il processo di piegatura legandosi a catene polipeptidiche parzialmente piegate e aiutandole verso il cammino più favorevole. Sono richiesti per prevenire la formazione di aggregati proteici attraverso regioni idrofobiche temporaneamente esposte. Rendono pertanto il processo più affidabile. La maggior parte delle proteine si trovano ad una lunghezza da 50 a 2000 amminoacidi. Proteine grandi consistono di domini proteici, unità strutturali che si piegano indipendentemente.

4.1.3 L' α -elica e il β -foglietto sono pattern di piegamento comuni

Analizzando la struttura tridimensionale delle proteine diventa chiaro come esistano due pattern di piegamento regolari. L' α -elica e il β -foglietto e sono causati dal legame a idrogeno tra i gruppi N-H e C=O nel backbone polipeptidico, senza coinvolgere elementi della catene secondarie degli amminoacidi. Pertanto, nonostante siano incompatibili rispetto ad alcuni amminoacidi molte sequenze le possono formare. In entrambi i casi la proteina adotta una conformazione regolare e ripetuta. La parte centrale di molte proteine contiene regioni estese di β -foglietti che possono fermare segmenti vicini di backbone polipeptidico con lo stesso orientamento (catene parallele) o che si piega su sè stessa (catene anti-parallele). Un α -elica viene generata quanto una singola catena polipeptidica si torce su sè stessa per formare un cilindro rigido. Un legame a idrogeno si forma ogni quarto legame peptidico, legando il C=O di un peptide con il N-H di un altro. L' α -elica pertanto compie un giro completo ogni 3.6 amminoacidi. Questa conformazione è abbondante nelle proteine di membrana come quelle di trasporto e i recettori, specialmente nella parte che attraversa la stessa e composta da amminoacidi non polari. In altre proteine le α -eliche si avvolgono su sè stesse formando una bobina arrotolata, che si forma quando due o quattro α -eliche hanno la maggior parte delle catene laterali non polari da una parte, in modo che possano avvolgersi tra di loro.

4.1.4 I domini proteici sono unità modulari da cui le proteine più grandi sono costruite

Vengono distinti quattro livelli di organizzazione nella struttura di una proteina: la struttura primaria è la sequenza di amminoacidi, lunghezze di catena polipeptidica che formano α -eliche e β -foglietti sono la struttura secondaria, la completa organizzazione tridimensionale viene detta struttura terziaria e se la proteina è costituita da un complesso di più catene polipeptidiche la struttura è detta quaternaria. Si intende per dominio proteico una sotto-struttura prodotta da una qualsiasi parte contigua di catena polipeptidica che può piegarsi indipendentemente rispetto alle altre. Contengono solitamente tra i 40 e i 350 amminoacidi e sono le unità modulari che costituiscono proteine più grandi. Diversi domini di una proteina sono solitamente associati con diverse funzioni. Le proteine più piccole contengono un singolo dominio, mentre le più grandi anche a dozzine, spesso connessi da corte e non strutturate lunghezze di catena polipeptidica che formano cardini flessibili tra i domini.

4.1.5 Poche delle catene polipeptidiche possibili saranno utili alla cellula

Le possibili combinazioni di una catena polipeptidica di lunghezza n sono 20^n e pertanto solo una piccola frazione di questo insieme crea una conformazione tridimensionale stabile, circa una in un

miliardo. La selezione naturale ha portato la cellula a scegliere quelle proteine che, oltre a possedere tale conformazione, possiedono proprietà chimiche finemente regolate in modo da permettere alla proteina di catalizzare una particolare reazione o per svolgere la funzione strutturale richiesta.

4.1.6 Le proteine possono essere classificate in molte famiglie

Una volta che la proteina si è evoluta per formare una conformazione stabile con un'utilità può essere modificata attraverso meccanismi genetici in modo da creare nuove proteine con diverse funzioni. Questo processo porta alla nascita di famiglie di proteine con sequenza e conformazione simili ma con funzione distinte. La struttura di diversi membri di una famiglia di proteine è conservata maggiormente rispetto alla sequenza di amminoacidi. Molti cambi di amminoacidi sono neutri, senza effetto sulla struttura e funzione della proteina. Le proteine che subiscono cambi maligni vengono scartate durante il processo evolutivo.

4.1.7 Alcuni domini proteici si trovano in molte proteine diverse

Le proteine formate da multipli domini si sono formate dall'unione accidentale di sequenze di DNA che codificano ogni dominio. Nel processo evolutivo del mescolamento del dominio, molte larghe proteine si sono evolute attraverso l'unione di domini preesistenti in nuove combinazioni. Come risultato si sono create nuove superfici leganti alla giustapposizione dei domini, dove si trovano molti dei siti funzionali della proteina. Un sottoinsieme di domini è stato molto mobile durante l'evoluzione, con strutture versatili dette moduli proteici. Alcuni domini possiedono un nucleo stabile formato da β -foglietti con anelli sporgenti di catena polipeptidica. Gli anelli sono situati per formare siti di legame per altre molecole. Il loro successo evolutivo è dovuto al fatto che mettono a disposizione una base per la generazione di siti di legame, richiedendo unicamente piccoli cambi agli anelli esterni. Si possono inoltre integrare facilmente all'interno di altre proteine in quanto possiedono alle terminazioni $-N$ e $-C$. Quando il DNA codifica tale dominio svolge una duplicazione a tandem. I domini duplicati con questo ordinamento in linea possono essere collegati per formare strutture estese con sé stessi o altri domini. Queste strutture estese rigide sono comuni in matrici di molecole extracellulari e nella porzione extracellulare di proteine recettrici sulla superficie della cellula. Altri tipi di domini sono detti plug-in con i legami $-N$ e $-C$ vicini. Dopo il riordinamento genetico sono messi come inserimenti in una regione ad anello di una sequenza proteina. La frequenza di utilizzo dei domini differisce tra tipi di organismi. Il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che possiede un dominio di riconoscimento degli antigeni è presente unicamente negli umani, con funzioni specializzate e sono stati selezionati fortemente durante evoluzioni recenti. Molte coppie di domini si trovano insieme in molte proteine: la maggior parte delle proteine che contengono coppie di due domini si sono sviluppate relativamente tardi durante l'evoluzione.

4.1.8 Il genoma umano codifica un complesso insieme di proteine, rivelando che molto rimane sconosciuto

Il sequenziamento del genoma umano ha rivelato che contiene circa 21000 geni che codificano proteine e che i vertebrati hanno ereditato la maggior parte delle proteine dagli invertebrati, nonostante in media ogni proteina sia più complessa. Il mescolamento dei domini durante l'evoluzione ha portato alla creazione di molte nuove combinazioni di domini. La maggior varietà delle proteine permette più possibile interazioni proteina-proteina.

4.1.9 Proteine più grandi contengono più di una catena polipeptidica

Gli stessi legami non covalenti che permettono il piegamento della proteina le permettono di legarsi con altre proteine per formare strutture più grandi nella cellula. Ogni regione di una superficie di una proteina che può interagire con altre molecole si dice sito di legame. Una proteina ne può contenere diversi. Se tale sito riconosce la superficie di una seconda proteina il legame tra le due catene polipeptidiche crea una proteina più larga con una geometria definita. Ogni catena polipeptidica in tale proteina è detta subunità proteica. Nel caso più semplice due catene polipeptidiche con la stessa conformazione possono legarsi testa-a-testa, formando un complesso simmetrico di due subunità mantenuto dall'interazione tra due siti di legame identici. Molte proteine contengono due o più tipi di catene polipeptidiche.

4.1.10 Alcune proteine globulari formano lunghi filamenti elicoidali

Una proteina si dice globulare se la catena polipeptidica si ripiega su se stessa formando una forma compatta simile ad una palla con una superficie irregolare. Alcune di queste proteine si possono combinare formando lunghi filamenti se ogni molecola possiede un sito di legame complementare ad un'altra regione sulla superficie della stessa molecola. Essendo che ogni subunità si lega alle altre allo stesso modo e il legame non è mai una retta la struttura complessiva assumerà una forma ad elica.

4.1.11 Molte proteine hanno forme allungate e fibrose

Gli enzimi tendono ad essere proteine globulari: nonostante molte sono larghe e complicate con multiple subunità, la maggior parte hanno una forma arrotondata. Ci sono funzioni che richiedono che ogni molecola proteica occupi una lunga distanza. Queste proteine possiedono generalmente una struttura semplice allungata e sono dette proteine fibrose. Il citoscheletro è formato da forme chiamate filamenti intermedi simili a corde. Sono abbondanti all'esterno della cellula, dove formano la maggior parte della struttura del gel della matrice extracellulare che aiuta a legare collezioni di cellule insieme per formare tessuti. Le proteine di matrice sono secrete dalle cellule e si assemblano in fibrilli lunghi.

4.1.12 Le proteine contengono una grande quantità di catene polipeptidiche intrinsecamente disordinate

Un'altra molecola abbondante nella matrice proteica è l'elastina, un polipeptide altamente disordinato, il cui disordine è fondamentale per la sua funzione di produrre una mesh che può essere spostata da una conformazione all'altra. Hanno funzioni importanti nei siti di legame, prendendo una forma solo quando incontrano la molecola che legano. Una funzione predominante di queste parti è per l'appunto formare siti di legami con altre proteine ad alta specificità ma alterati da fosforilazione o defosforilazione o modifiche iniziate da eventi di segnale. Vengono utilizzate come legame per mantenere due domini proteici in prossimità in modo da permettere al substrato di muoversi tra i siti attivi in un complesso multi-enzima. Creano micro-regioni con una consistenza simile a gel che limita la diffusione.

4.1.13 Legami incrociati covalenti stabilizzano proteine extracellulari

Molte proteine si trovano all'esterno della membrana plasmatica della cellula o sono secrete come matrice extracellulare. Tutte queste sono esposte alle condizioni dell'ambiente. Per mantenere la loro struttura la catena polipeptidica è stabilizzata da legami covalenti incrociati che possono

legare due amminoacidi nella stessa proteina o legare differenti catene polipeptidiche. Il legame più comune è quello zolfo-zolfo o legami disolfuro che si formano quando la cella prepara le proteine per l'esportazione. La loro formazione è catalizzata nel reticolo endoplasmatico da un enzima che lega due paia di gruppi $-SH$ di cisteina adiacenti nella proteina piegata. Non cambiano la conformazione della proteina ma si limitano a rafforzarne la struttura. Tali legami non riescono a formarsi nel citosol a causa del gran numero di agenti riduttori.

4.1.14 Le molecole proteiche spesso svolgono la funzione di subunità per l'assemblaggio di grandi strutture

Lo stesso principio che permette alle proteine di associarsi tra di loro formando anelli o filamenti operano per generare larghe strutture formate da un insieme di diverse macromolecole come complessi enzimatici, ribosomi, virus e membrane che non sono composti da una singola molecola formata da legami covalenti, ma dall'assemblaggio di molte molecole attraverso legami non covalenti che formano le subunità della struttura. Questo processo presenta dei vantaggi:

- Una grande struttura costruita da subunità ripetute richiede meno informazione genetica.
- Sia l'assemblaggio che il deassemblamento possono essere controllati e resi reversibili in quanto i legami di associazione hanno poca energia.
- Gli errori nella sintesi della struttura sono evitati più facilmente.

Alcune subunità proteiche si assemblano in larghi fogli piatti in cui altre subunità sono ordinate in pattern esagonali. In alcuni casi proteine di membrana si originano come un bistrato lipidico. Il foglio esagonale può essere facilmente trasformato in un tubo o una sfera cava che si lega a molecole di DNA e RNA nell'involucro dei virus. La formazione di strutture chiuse come anelli, tubi o sfere crea maggiore stabilità in quanto aumenta il numero di legami tra le subunità ed essendo creata da legami mutualmente dipendenti e cooperativi può essere assemblata o disassemblata da piccoli cambi di una subunità. Molte strutture nella cellula sono capaci di auto-assemblaggio. L'informazione per la creazione di molte delle macromolecole è contenuta nelle subunità stesse.

4.1.15 I fattori di assemblaggio aiutano la formazione di complesse strutture biologiche

Nei casi in cui le molecole non si possano formare spontaneamente da una soluzione dei componenti sono necessarie informazioni supplementari fornite da enzimi e altre proteine che svolgono la funzione di stampi, ovvero fattori di assemblaggio che guidano la costruzione ma non fanno parte della struttura finale.

4.1.16 Fibrille amiloidi possono formarsi da molte proteine

Una classe di strutture proteiche, utilizzata per delle funzioni della cellula può contribuire a certe malattie quando non controllata. Sono β -foglietti auto-riproducenti chiamati fibrille amiloide. Si costruiscono da una serie di catene polipeptidiche identiche che si stratificano una sull'altra creando uno stack di β -foglietti orientati perpendicolarmente all'asse formando un filamento cross-beta. Una porzione della proteina possiede la capacità di formare tali strutture in quanto possiede differenti sequenze e seguono diversi cammini. In condizioni normali il meccanismo che controlla le proteine si degrada con l'età, permettendo occasionalmente alle proteine di formare aggregati patologici che possono essere rilasciati dalla cellula morta e aggregarsi all'esterno come fibrille amiloide nella

matrice extracellulare che in casi estremi possono uccidere altre cellule e danneggiare i tessuti. Queste molecole possono anche essere utilizzate dalla cellula per concentrare in granuli secretori molecole da espellere.

4.1.17 Molte proteine contengono domini a bassa complessità che possono formare amiloidi reversibili

Un grande insieme di domini a bassa complessità possono formare fibre amiloidi che hanno ruoli funzionali nel nucleo e nel citoplasma, sono normalmente senza struttura e consistono di lunghezze di sequenze di amminoacidi lunghe centinaia di monomeri con un sottoinsieme dei 20 amminoacidi. Queste strutture formate sono unite da legami non covalenti deboli e si dissociano facilmente in presenza dei segnali corretti. Molte proteine con tale dominio contengono un altro insieme di domini che si lega specificamente ad altre proteine o al RNA, pertanto la loro aggregazione controllata può formare un idrogel che unisce queste e altre molecole in strutture puntate chiamate corpi intracellulari o granuli. mRNA specifico può essere inviato in questi granuli dove è salvato fino a che reso disponibile da un disassemblaggio controllato del nucleo formato dalla struttura amiloide.

4.2 Funzione delle proteine

Le proteine spesso possiedono parti mobili la cui azione meccanica è accoppiata ad un evento chimico che le dona le capacità che sottostanno i processi dinamici della cellula.

4.2.1 Tutte le proteine si legano ad altre molecole

Le interazioni fisiche di una proteina con altre molecole determinano le sue proprietà biologiche. Tutte le proteine si legano con altre molecole con legami che possono essere stretti o deboli e temporanei. Il legame ha un alto livello di specificità con una molecola detta ligando. Tale abilità dipende dalla capacità della proteina di formare un insieme di legami non covalenti deboli e interazioni idrofobiche che essendo deboli sono effettivi unicamente quando si formano simultaneamente e pertanto possibili solo se la superficie del ligando si adatta alla proteina. Il sito che si associa con il ligando, detto sito di legame consiste di una cavità nella superficie costituito da un particolare ordinamento di amminoacidi che appartengono a diverse parti della catena che vengono avvicinate dal piegamento. Regioni separate forniscono siti di legame per diversi ligandi permettendo la regolazione dell'attività della proteina. Gli atomi che si trovano all'interno della proteina contribuiscono alla forma della superficie e alle proprietà fisico-chimiche.

4.2.2 La conformazione superficiale di una proteina determina la sua chimica

Le capacità chimiche delle proteine richiedono che i gruppi chimici nella superficie interagiscono in modo che aumentino la reattività chimica di una o più catene laterali di amminoacidi. Queste interazioni sono divisibili in due categorie. L'interazione con diverse parti vicine della catena possono impedire l'accesso di molecole d'acqua al sito di legame in quanto possono formare legami a idrogeno che possono competere con i ligandi per i siti. Questo avviene in quanto l'acqua tende a formare legami con altre molecole d'acqua pertanto risulta sfavorevole che una singola molecola si separi dalla rete creata. Il raggrupparsi di catene laterali polari può alterare la loro reattività: se un gran numero di catene laterale cariche negativamente vengono forzate insieme la loro affinità per le cariche

positive aumenta di molto e quando amminoacidi interagiscono tra di loro gruppi solitamente non reattivi come $-\text{CH}_2\text{OH}$ possono diventare reattivi permettendo la creazione o rottura dei legami covalenti selezionati. La reattività della superficie proteica non dipende pertanto unicamente dalla sequenza di amminoacidi ma anche dal loro orientamento relativo.

4.2.3 La comparazione di sotto-sequenze tra membri di una famiglia proteica evidenzia i siti di legame cruciali

Il sequenziamento genomico permette di raggruppare molti domini proteici in famiglie che mostrano la loro evoluzione da un antenato comune. I membri di una famiglia sono simili. Si può utilizzare il tracciamento evolutivo per identificare i siti in un dominio proteico che sono fondamentali alla sua funzione. I siti che legano altre molecole sono i più probabili ad essere mantenuti invariati e pertanto gli amminoacidi che non sono cambiati in tutti membri della famiglia sono mappati su un modello della struttura tridimensionale di un membro della famiglia e le posizioni invarianti formano dei cluster sulla superficie della proteina.

4.2.4 Le proteine si legano con altre proteine attraverso molti tipi di interfacce

Le proteine possono legarsi tra di loro in molti modi. In molti casi una porzione della superficie di una proteina entra in contatto con un anello esteso di una catena polipeptidica con una seconda proteina (interazione superficie-stringa). Un secondo tipo di interfaccia si forma quando due α -eliche da due proteine si accoppiano formando una coiled-coil, che si trova spesso in famiglie regolatrici dei geni. Il modo più comune di interazione è attraverso la corrispondenza precisa tra due superfici con un'interazione molto stretta data dal gran numero di legami che si formano e molto specifica.

4.2.5 I siti di legame degli anticorpi sono estremamente versatili

Tutte le proteine si devono legare a particolari ligandi per compiere la propria funzione. Gli anticorpi o immunoglobuline sono proteine prodotte dal sistema immunitario in risposta a molecole esterne. Ogni anticorpo si lega strettamente con una molecola obiettivo particolare disattivandola o marcandola per la distruzione. L'anticorpo deve riconoscere l'obiettivo o antigene con grande specificità. Sono molecole a forma di Y con due siti di legame identici complementari a una piccola parte della superficie di una molecola antigenica. Sono formati da molti anelli di catena polipeptidica che protrudono dalla fine di un paio di domini proteici giustapposti. Solo cambiando la lunghezza e gli amminoacidi di questi anelli sono in grado di generare diversi siti di legame per diversi antigeni senza cambiare la struttura di base.

4.2.6 La costante di equilibrio misura la forza di legame

Le molecole che collidono con superfici che si accoppiano male formano pochi legami deboli e si dissociano rapidamente mentre se ne formano troppi l'associazione può persistere nel tempo. Associazioni forti accadono quando una funzione biologica richiede che le molecole rimangano associate per molto tempo. Eventualmente ogni complesso di ligandi e proteine arriva ad un equilibrio in cui i tassi di distruzione e associazione delle molecole si eguaglia. Si può pertanto calcolare la costante di equilibrio K per misurare la forza dell'associazione ed è anche una misura diretta della differenza di energia libera tra lo stato legato e libero.

4.2.7 Gli enzimi sono catalizzatori potenti e molto specifici

Molte proteine possono svolgere la loro funzione semplicemente legandosi con altre molecole, ma per alcune questo è solo un necessario primo passo, come per gli enzimi. Gli enzimi sono molecole che causano le trasformazioni chimiche che creano e rompono legami covalenti nelle cellule. Legano dei ligandi detti substrati e li convertono in prodotti con grande rapidità. Gli enzimi velocizzano le reazioni di molti ordini di grandezza senza modificarsi: agiscono da catalizzatori. È infatti la catalisi di un insieme di reazioni chimiche da parte degli enzimi che permette alla cellula di rimanere in vita. Gli enzimi si possono raggruppare in classi funzionali che possono svolgere reazioni chimiche simili. Ogni tipo di enzima all'interno della classe è altamente specifico e catalizza un singolo tipo di reazione. Lavorano in gruppo, con il prodotto di un enzima che diventa il substrato per un altro in una rete elaborata di cammini che fornisce alla cellula energia e materiali.

4.2.8 Il legame con il substrato è il primo passo nella catalisi enzimatica

Per un enzima il legame di ogni substrato alla proteina è un inizio necessario. Denotando un enzima E , il substrato S e il prodotto P la reazione più semplice è:



C'è un limite a quanto substrato un enzima può processare nel tempo, nonostante un aumento della concentrazione di enzima questa raggiunge un massimo in cui la molecola di enzima è saturata con il substrato e il tasso della reazione dipende su quanto rapidamente l'enzima può processarlo. Questo tasso massimo è detto numero di turnover, solitamente di 1000 molecole di substrato al secondo per molecola di enzima. L'altro parametro cinetico è K_m , la concentrazione del substrato che permette la reazione di procedere a metà del tasso massimo. Un valore di K_m basso vuol dire che l'enzima raggiunge il tasso catalitico massimo ad una bassa concentrazione di substrato e che si legano molto strettamente.

4.2.9 Gli enzimi velocizzano la reazione stabilizzando selettivamente stati transitivi

Gli enzimi raggiungono tassi di reazioni elevatissimi grazie a molte ragioni. In primo luogo quando due molecole devono reagire l'enzima aumenta la concentrazione locale di queste molecole al sito catalitico, mantenendole nell'orientazione corretta. Oltre a questo dell'energia di legame contribuisce alla catalisi. Le molecole di substrato devono passare degli stati intermedi di geometria e distribuzione di elettroni alterata prima di formare il prodotto finale. L'energia libera necessaria per ottenere lo stato più instabile o stato di transizione è detta energia di attivazione ed è il determinante maggiore per il tasso di reazione. Gli enzimi possiedono un maggiore grado di affinità per lo stato di transizione del substrato rispetto alla forma stabile. Siccome il legame stretto riduce l'energia dello stato di transizione, l'enzima accelera la reazione abbassando l'energia di attivazione richiesta.

4.2.10 Gli enzimi possono usare simultaneamente catalizzatori acidi e basici

Gli enzimi non solo si legano strettamente ad uno stato di transizione ma contengono atomi posizionati in modo da alterare la distribuzione degli elettroni che partecipano nella creazione e rottura del legame covalente. I legami polipeptidici possono essere idrolizzati nell'assenza di un enzima

esponendoli a un acido o base forte. Sono gli unici a poter usare catalisi acide o basiche simultaneamente in quanto la struttura rigida impedisce che si combinino. L'adattamento stretto tra enzima e substrato deve essere preciso: un piccolo cambio, anche di 1\AA può ridurre di l'attività dell'enzima di un migliaio di volte.

4.2.11 Il lisozima illustra come un enzima funziona

Per dimostrare come gli enzimi catalizzano le reazioni chimiche si analizza un enzima antibiotico che si trova in secrezioni come saliva e lacrime. Il lisozima catalizza il taglio di catene polisaccaridi nella parete cellulare dei batteri. Il lisozima catalizza un'idrolisi: aggiunge una molecola d'acqua ad un singolo legame nella catena causandone la rottura. La rottura è energeticamente favorevole in quanto l'energia richiesta per la rottura del legame è minore di quella della catena intatta, ma vi si trova una barriera energetica e la molecola d'acqua che collide solo se il polisaccaride è distorto nello stato di transizione, stato irraggiungibile in condizioni normali. Quando il polisaccaride si lega al lisozima il sito attivo dell'enzima è una lunga fessura che lega sei zuccheri legati alla volta. Appena il polisaccaride si lega forma un complesso e l'enzima lo taglia aggiungendo una molecola d'acqua lungo uno dei legami zucchero-zucchero. Le catene prodotte sono rilasciate, lasciando libero l'enzima per una successiva interazione. Il tasso di idrolisi aumenta perchè le condizioni causate nel sito attivo riducono l'energia di attivazione necessaria distorcendo uno degli zuccheri. Il legame da rompere è tenuto vicino da due amminoacidi acidi (acido glutammico e aspartico) che partecipano nella reazione. Nelle reazioni che coinvolgono due o più reagenti il sito attivo agisce come stampo che unisce i substrati nella corretta orientazione. Passi successivi nella reazione portano le catene laterali nello stato originale permettendo il riutilizzo dell'enzima.

4.2.12 Molecole strettamente legate aggiungono altre funzioni alle proteine

Ci sono molte istanze in cui è necessario aggiungere altre molecole alle proteine affinché svolgano la loro funzione. Tali molecole si trovano nei siti attivi e sono dette coenzimi che sono spesso vitamine o loro derivati. In alcuni casi possono formare legami covalenti che le rendono parte della proteina stessa.

4.2.13 Complessi multi-enzima aiutano ad aumentare il tasso del metabolismo cellulare

L'efficienza degli enzimi è cruciale per il mantenimento della vita in quanto il tasso di reazioni desiderabili deve essere maggiore del tasso delle reazioni avverse che avvengono naturalmente. Si può misurare il tasso del metabolismo attraverso il consumo di ATP. Una cellula mammifera consuma la propria capacità di ATP ogni paio di minuti, ovvero circa 10^7 molecole al secondo. Tale velocità è dovuta all'efficienza degli enzimi, alcuni hanno raggiunto la massima velocità possibile e sono limitati unicamente dalla frequenza delle collisioni (reazione limitata dalla diffusione). La quantità del prodotto di un enzima dipende dalla sua concentrazione e quella del substrato. Se una sequenza deve avvenire rapidamente deve essere presente ogni intermedio metabolico ed enzima in grande concentrazione. Ci sono limiti alla concentrazione massima. La maggior parte dei metaboliti sono presenti in concentrazioni micromolari e gli enzimi con concentrazioni ancora più basse. Il tasso metabolico viene mantenuto pertanto grazie all'organizzazione spaziale della cellula che può aumentare il tasso della reazione spostando enzimi formando grandi proteine dette complessi multi-enzima. Essendo organizzato in modo che il prodotto di un enzima sia passato direttamente all'enzima successivo la

concentrazione del substrato non deve essere limitante. La maggior parte degli enzimi inoltre hanno evoluto siti di legame con particolari regioni della cellula. Anche i sistemi di membrane intracellulari sono utilizzati a questo scopo in quanto possono segregare particolari substrati e i relativi enzimi.

4.2.14 La cellula regola le attività catalitiche dei propri enzimi

Una cellula vivente contiene migliaia di enzimi, molti dei quali operano contemporaneamente e vicini tra di loro, generando una complessa rete di cammini metabolici composti da catene di reazioni chimiche. In questi cammini ci sono molti punti in cui diversi enzimi competono per lo stesso substrato. Sono pertanto necessari controlli per regolare quando e quanto rapidamente ogni reazione accade. Questa regolazione avviene a molti livelli: viene controllato il numero di enzimi prodotti regolando l'espressione genica. Gli enzimi vengono inoltre confinati in compartimenti subcellulari come membrane intracellulari o scaffold proteici (o concentrandoli su essi). Gli enzimi possono anche essere modificati covalente mente per disattivarli. Il tasso della distruzione delle proteine è un altro metodo di regolazione, ma il principale è il cambio di attività derivato dal legame con una molecola particolare. Quest'ultimo accade quando un enzima si lega con una molecola (non substrato) a un sito regolatorio speciale, alterando il tasso con cui l'enzima converte il substrato in prodotto. Nel processo di feedback inhibition un prodotto successivo del cammino chimico inibisce un enzima precedente, pertanto quando la reazione produce grandi quantità di prodotto rallenta da sola. Quando i cammini si intersecano o si ramificano ci sono diversi punti di controllo alla fine del cammino che controllano la propria sintesi. Quando la concentrazione di prodotto diminuisce il processo ritorna a velocità normali. Un altro tipo di regolazione è positiva: il prodotto stimola l'azione dell'enzima, questo accade principalmente quando un prodotto di un ramo della rete chimica stimola l'attività di un enzima in un altro cammino.

4.2.15 Gli enzimi allosterici possiedono due o più siti di legame che interagiscono

Si nota nelle regolazioni a feedback che la molecola regolatoria possiede una forma diversa rispetto al substrato o all'enzima. Per questo l'effetto sull'enzima è detto allosteria. Gli enzimi che partecipano in questo processo possiedono due siti di legame sulla loro superficie: uno attivo per il legame con il substrato e uno regolatorio per il legame con la molecola regolatoria. Questi due siti comunicano in modo da influenzare gli eventi catalitici. L'interazione è detta cambio conformazionale della proteina: il legame in uno dei siti attivi cambia leggermente la forma della proteina stessa: durante l'inibizione quando la molecola regolatoria si lega cambia la forma del sito attivo in capacitandolo. La maggior parte delle proteine sono allosteriche e possono adottare due o più conformazioni differenti, cambiando tra esse in base a quale ligando si lega. Oltre agli enzimi sono allosterici i recettori, le proteine strutturali e quelle motrici.

4.2.16 Due ligandi i cui siti di legame sono accoppiati devono avere effetto reciprocamente sul legame dell'altro

Gli effetti di un legame del ligando segue un principio chimico detto linkage: se una proteina che lega il glucosio lega un'altra molecola su un sito attivo distante, se tale sito attivo cambia forma a causa del cambio di conformazione causato dal glucosio i due siti sono detti accoppiati. Quando due ligandi preferiscono il legame con la stessa conformazione di una proteina allosterica ogni ligando deve aumentare l'affinità dell'altro per la proteina. In maniera inversa il linkage opera negativamente

quando i due ligandi si vogliono legare a conformazioni diverse della molecola e devono competere per il legame.

4.2.17 Insiemi di proteine simmetrici producono transizioni allosteriche cooperative

Un singolo feedback negativo non basta per l'ottimale regolazione della cellula e pertanto la maggior parte degli enzimi che partecipano nel feedback sono insiemi simmetrici di subunità identiche. Con questo ordinamento il legame di una molecola ad un ligando su un sito su una subunità promuove un cambio allosterico nell'intero insieme (i legami con i ligandi delle altre subunità avviene più facilmente). Avviene pertanto una transizione allosterica cooperativa che permette un cambio nella concentrazione dei ligandi per cambiare l'insieme da uno stato attivo a uno inattivo. Questo principio è comune a proteine che non sono enzimi.

4.2.18 Molti cambi nelle proteine sono guidati dalla fosforilazione proteica

Le proteine sono regolate anche dall'aggiunta di un gruppo fosfato. Un evento di fosforilazione può influenzare la proteina: può cambiare la conformazione attraendo un insieme di amminoacidi carichi positivamente e cambiando la forma del sito attivo. Quando un secondo enzima rimuove il gruppo fosfato la proteina ritorna alla conformazione originale. In secondo luogo il gruppo fosfato può formare parte di una struttura che altre proteine riconoscono. Infine la sua aggiunta può mascherare un sito di legame che tiene unite due proteine, rompendo il legame. La fosforilazione proteica reversibile controlla l'attività, struttura, e localizzazione di enzimi e altre proteine.

4.2.19 Una cellula eucariotica contiene un gran numero di proteina chinasi e proteina fosfatasi

La fosforilazione di una proteina coinvolge il trasferimento catalizzato dalla proteina chinasi del gruppo fosfato terminale di una molecola di ATP al gruppo idrossile di un amminoacido serina, treonina o tirosina. Tale reazione è tipicamente unidirezionale a causa della grande quantità di energia libera rilasciata quando viene rotto il legame fosfato-fosfato nell'ATP. La proteina fosfatasi catalizza l'azione inversa di rimozione del gruppo fosfato o defosforilazione. Esistono un gran numero di questi enzimi, ognuno responsabile di poche proteine o specifici substrati da subunità regolatori. Lo stato di fosforilazione dipende dall'attività relativa della proteina chinasi e fosfatasi che la modificano. Questi enzimi fanno parte di una grande famiglia di enzimi che condivide una sequenza catalitica di circa 290 amminoacidi. Le differenze permettono la specificità.

4.2.20 La regolazione della proteina chinasi Src rivela come una proteina può funzionare come un microprocessore

Le migliaia di diverse proteine chinasi sono organizzate in una rete complessa di cammini segnalatori che aiutano a coordinare le attività della cellula, guidare il ciclo cellulare e ritrasmettere segnali nella cellula dall'esterno. Proteine chinasi individuali svolgono il ruolo di dispositivi di input/output nel processo di integrazione. Una parte importante dell'input a queste proteine di processamento dei segnali viene dal controllo eseguito dai fosfati aggiunti e rimossi da essi dalle proteine chinasi e fosfatasi. La famiglia Src delle proteine chinasi hanno questo comportamento e contengono una corta regione -N terminale che si lega covalentemente a un acido grasso fortemente idrofobico che la

ancora alla faccia citoplasmatica della membrana plasmatica. Dopo il gruppo terminale si trovano due domini SH3 e SH2 seguiti da il dominio catalitico della chinasi. Normalmente esistono nella versione inattiva, ma transizionano in quella attiva quando viene rimosso il fosfato -C terminale al legame del dominio SH3 da una proteina di attivazione. Quando accade l'attivazione segnala il completamento di un insieme di eventi.

4.2.21 Le proteine che si legano e regolano il GTP sono onnipresenti regolatori

Il controllo dell'attività di una cellula attraverso addizione e rimozione di un gruppo fosfato avviene anche quando non viene direttamente attaccato a essa ma è parte del nucleotide guanina GTP che si legano molto strettamente con un gruppo di proteine dette GTP-leganti. Queste proteine si trovano nella conformazione attiva quando formano il legame con il GTP. La perdita del gruppo fosfato avviene quando il legame GTP è idrolizzato in GDP da una reazione catalizzata dalla proteina stessa. Tali proteine, dette anche GTPasi costituiscono una grande famiglia di proteine con variazioni dello stesso dominio globulare dove avviene il legame con il GTP. Quando il GTP legato si idrolizza il dominio cambia conformazione e disattiva la proteina.

4.2.22 Le proteine regolatorie GAP e GEF controllano l'attività delle proteine GTP-leganti determinando se è legato GTP o GDP

Le proteine GTP-leganti sono controllate da proteine regolatorie che determinano se a esse è legato GTP o GDP. Sono disattivate da una proteina GTPasi-attivante che si lega a essa e idrolizza il GTP legato in GDP che rimane legato e fosfato inorganico che viene rilasciato. La proteina rimane in forma inattiva fino a che non incontra un fattore di scambio di nucleotide guanina (GEF) che si lega alla proteina con il GDP e causa il suo rilascio. Il sito è immediatamente riempito da una molecola di GDP, presenti in eccesso. Il GEF attiva la proteina aggiungendo il gruppo fosfato indirettamente.

4.2.23 Le proteine possono essere regolate dall'aggiunta covalente di altre proteine

Le cellule contengono una famiglia speciale di piccole proteine i cui membri sono attaccati a molte altre proteine in modo da determinarne l'attività. In ogni caso la loro estremità carbossilica si lega all'amminoacido lisina di una proteina obiettivo attraverso un legame isopeptidico. Questa addizione porta ad un cambio di conformazione reversibile (attraverso reazioni catalizzate da enzimi). La proteina più comune di questo tipo è la ubiquitina che si lega alle proteine in vari modi, ognuno con un significato diverso. Può formare catene di poliubiquitina con diverse modifiche alle funzioni della proteina che legano.

4.2.24 Un elaborato sistema di coniugazione di ubiquitina è utilizzato per marcare le proteine

Per selezionare le proteine target per l'addizione di ubiquitina si deve attivare la terminazione carbossilica di quest'ultima attraverso un enzima ubiquitina-attivante che utilizza l'idrolisi dell'ATP per ricavare l'energia necessaria ad attaccare l'ubiquitina con se stessa attraverso un legame covalente ad alta energia. La proteina passa a enzimi di coniugazione di ubiquitina che la uniscono con le ubiquitina ligasi che si legano a speciali segnali di degradazione detti degrons nei substrati aiutando il secondo insieme di enzimi a formare una catena di poliubiquitina collegata ad una lisina. La catena

sulla proteina obiettivo viene riconosciuta da un particolare recettore nel proteosoma, causano la distruzione di essa.

4.2.25 I complessi proteici con parti interscambiabili fanno un efficiente uso dell'informazione genica

Il SCF ubiquitina ligasi è un complesso proteico che lega proteine obiettivo aggiungendogli una catena di poliubiquitina. Ha una struttura a forma di C composta da cinque subunità proteiche, la più grande serve come impalcatura per le altre. Ad un'estremità si trova il secondo enzima del processo di coniugazione di ubiquitina, all'altra parte un braccio che lega il substrato o proteina F-box. Quando il complesso è attivato F-box lega il sito attivo alla proteina obiettivo e la sposta nel centro in modo che sue lisine entrino in contatto con la poliubiquitina. Catalizza poi una ripetuta addizione di polipeptidi ubiquitina alle lisine marcando la proteina per distruzione rapida nel proteosoma. Specifiche proteine sono marcate per distruzione in risposta a segnali specifici, aiutando a guidare il ciclo della cellula. Il tempismo della distruzione richiede la creazione di specifici pattern di fosforilazione della proteina richiesto per il riconoscimento dalla subunità F-box e l'attivazione dell'ubiquitina ligasi SCF. Molti dei bracci che legano il substrato sono interscambiabili nel complesso proteico e richiedono più di 70 geni. Esistono molti tipi di proteine F-box e una famiglia di SCF-like ubiquitina ligasi. Una proteina con parti interscambiabili fa uso economico dell'informazione genetica nella cellula.

4.2.26 Una proteina GTP-legante mostra come grandi movimenti proteici siano possibili

La proteina EF-Tu fornisce un buon esempio di come cambi allosterici nella conformazione della proteina producono movimenti amplificando un cambio conformazionale locale. Tale proteina è un fattore di allungamento nella sintesi proteica, caricando ogni amminoacil-tRNA sul ribosoma in quanto quest'ultimo forma un forte complesso con la forma legata al GTP. Questa molecola di tRNA può trasferire il suo amminoacido alla catena polipeptidica crescente solo dopo che il GTP è idrolizzato. Essendo che tale reazione è fatta partire da un giusto adattamento alla molecola di mRNA nel ribosoma EF-Tu serve come fattore discriminante tra coppie errate di mRNA e tRNA. Confrontando la conformazione della proteina nelle forme legate a GTP e GDP si osserva come il riposizionamento del tRNA avviene. La dissociazione del gruppo fosfato causa un cambio nel sito che lega il GTP che causa una propagazione di cambio di movimento lungo un α -elica detta switch helix che serve come aggancio che aderisce a un sito specifico in un altro dominio della molecola, mantenendola in una conformazione chiusa. Il cambio conformazionale causa la separazione della switch helix permettendo a domini separati di aprirsi rilasciando la molecola di tRNA permettendo l'utilizzo dell'amminoacido.

4.2.27 Le proteine motrici producono grandi movimenti nelle cellule

Lo scopo principale delle proteine motrici è muovere altre molecole. Sono responsabili della contrazione muscolare e dei movimenti delle cellule, oltre a permettere movimenti intracellulari come il movimento dei cromosomi in parte opposte della cellula durante la mitosi, per muovere gli organelli e gli enzimi con filamenti di DNA durante la sintesi del DNA. Senza nessuna guida questi movimenti sono reversibili e la proteina si sposterebbe casualmente lungo un filamento. Per rendere i cambi conformazionali, e pertanto i movimenti, unidirezionali si deve accoppiare il movimento con l'idrolisi di molecole di ATP legate alla proteina. Essendo che l'idrolisi dell'ATP rilascia molta energia è

molto improbabile che avvenga il movimento inverso. Il legame di ATP sposta la proteina in una conformazione e l'idrolizzazione cambia la conformazione e il rilascio dell'ADP la cambia in una terza. L'energia rilasciata dall'idrolisi rende i cambi conformazionali irreversibili e il ciclo va in una direzione, spostando sempre la proteina lungo la stessa direzione.

4.2.28 I trasportatori di membrana imbrigliano energia per pompare le molecole attraverso le membrane

Le proteine allosteriche possono imbrigliare l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP, dal gradiente ionico o dal trasporto di elettroni. I trasportatori ACO costituiscono una classe di proteine pompe legate alla membrana. La loro funzione principale è trasportare molecole idrofobiche dal citoplasma, rimuovendo molecole tossiche. Tali trasportatori contengono un paio di subunità che attraversano la membrana legate a una coppia di subunità che legano ATP sotto la membrana plasmatica. L'idrolisi dell'ATP guida un cambio conformazionale trasmettendo una forza che causa il movimento da parte delle subunità legate alla membrana della molecola legata attraverso il doppio strato lipidico. Alcune di queste proteine sono pompe rotanti che accoppiano l'idrolisi dell'ATP con il trasporto di ioni H^+ e sono utilizzate per acidificare l'interno del lisozoma. Possono funzionare al contrario catalizzando la reazione di sintesi dell'ATP se il gradiente è abbastanza ripido.

4.2.29 Le proteine formano grandi complessi che funzionano come macchinari proteici

Grandi proteine possono svolgere funzioni elaborate. La maggior parte delle reazioni sono catalizzate da un insieme altamente coordinato e collegato di queste macchine proteiche che utilizzano una reazione energeticamente favorevole come l'idrolizzazione dell'ATP per causare una serie di cambi conformazionali che causano il movimento coordinato dell'insieme.

4.2.30 Impalcature concentrano insiemi di proteine che interagiscono

Le proteine sono localizzate in specifici siti della cellula e sono assemblate e attivate solo quando necessario. Questo meccanismo coinvolge impalcature proteiche, proteine con multipli siti di legame con altre proteine che servono per unire proteine interagenti e per posizionarle in parti specifiche della cellula.

4.2.31 Molte proteine sono controllate da modifiche covalenti che le dirigono verso siti specifici all'interno della cellula

Un gran numero di proteine sono modificate su più amminoacidi con eventi regolatori producendo pattern diversi. Queste modifiche covalenti possono essere considerate come un codice regolatorio combinatorio: gruppi modificanti specifici sono aggiunti o rimossi in risposta a segnali cambiando l'attività e la stabilità della proteina, pertanto la molecola è in grado di rispondere velocemente e con grande versatilità a cambi nella sua condizione o ambiente.

4.2.32 Una complessa rete di interazioni proteiche sottosta alle funzioni della cellula

Per comprendere le funzioni di ogni complesso proteico si deve ricostituirlo dalle parti proteiche purificate in modo da poter studiare dettagliatamente i modi di operazioni in condizioni controllate.

Esistono un gran numero di interazioni proteina-proteina e possono essere studiate attraverso mappe di interazione tra proteine, utili per identificare la funzione probabile di proteine non caratterizzate in base alla posizione relativa alle altre. Queste reti devono essere analizzate con cura perchè la stessa proteina può essere utilizzata in complessi diversi e avere diverse funzioni. Nei confronti incrociati le proteine con pattern di interazione simile probabilmente hanno la stessa funzione della cellula.

Parte II

Meccanismi genetici basici

Capitolo 5

DNA, cromosomi e genomi

La vita dipende dall'abilità della cellula di conservare, recuperare e tradurre le istruzioni genetiche richieste per creare e mantenere un organismo vivente. Queste informazioni ereditarie, salvate come geni, sono passate da una cellula a una sua figlia durante la divisione cellulare e da una generazione di organismi all'altra attraverso le cellule riproduttive. Le informazioni genetiche consistono principalmente di istruzioni per la costruzione delle proteine, macromolecole versatili che svolgono la maggior parte delle funzioni della cellula. Le informazioni genetiche sono trasportate su cromosomi, strutture a filo nel nucleo che diventano visibili durante la divisione e composti di DNA (acido desossiribonucleico) e proteine in egual misura. La determinazione della struttura a doppia elica del DNA ha risolto il problema di come le informazioni nel DNA sono replicate e come una molecola di DNA utilizza la sequenza dei suoi monomeri per produrre le proteine.

5.1 La struttura e la funzione del DNA

Negli anni 50 la struttura del DNA è stata determinata grazie a diffrazione a raggi X, che indicarono la composizione a due fili avvolti in un'elica fornendo un grande indizio a Watson-Crick e al loro modello.

5.1.1 Una molecola di DNA consiste di due catene di nucleotidi complementari

Una molecola di acido desossiribonucleico consiste di due catene polinucleotide lunghe note come filamenti e composte da quattro tipi di subunità. Le catene sono anti-parallele tra di loro e tra le basi dei nucleotidi si formano legami a idrogeno che le tengono unite. I nucleotidi sono composti da zuccheri a 5 atomi di carbonio a cui sono attaccati dei gruppi fosfati e una base contenente azoto. Nel caso dei nucleotidi del DNA lo zucchero è il desossiribosio attaccato a un singolo gruppo fosfato (da cui il nome) e la base può essere adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T). I nucleotidi sono legati covalentemente in una catena attraverso gli zuccheri e i fosfati che formano un backbone di legami zucchero-fosfato-zucchero-fosfato alternati. I legami dei nucleotidi danno al filo del DNA una polarità chimica. Il gruppo 5' fosfato si lega con il gruppo 3' idrossile di un altro monomero e pertanto tutte le subunità hanno lo stesso orientamento. Inoltre le due terminazioni dello strand sono facilmente distinguibili e ci si riferisce ad esse come alla terminazione 3' e 5', indicando la polarità. Grazie alla direzionalità e linearità del filo di DNA può essere letto facilmente. La doppia elica si genera dalla struttura chimica delle catene polinucleotidiche in quanto sono mantenute insieme da

legami a idrogeno tra le basi su due fili diversi. Tutte le basi si trovano all'interno della doppia elica con i backbones verso l'esterno. In ogni caso una base a due anelli (una purina) è sempre legata con una ad anello singolo (una pirimidina): A si accoppia con T e G con C. Questo accoppiamento complementare delle basi permette l'ordinamento più energeticamente favorevole all'interno della doppia elica in quanto ogni coppia possiede la stessa lunghezza mantenendo i backbones a distanza costante. Per massimizzare l'efficienza spaziale i backbones si avvolgono formando una doppia elica destra con un giro completo ogni 10 paia. I membri di ogni base possono interagire solo se i fili sono anti-paralleli. Ogni strand della molecola contiene una sequenza complementare a quella dell'altro filamento.

5.1.2 La struttura del DNA mette a disposizione un meccanismo per l'ereditarietà

La struttura a polimero lineare composto da quattro monomeri permette al DNA di trasportare informazioni in forma chimica, mentre la natura a doppio filamento permette la sua duplicazione. Essendo ogni filamento complementare all'altro può agire come stampo per la sintesi di un nuovo filamento complementare. Nominando i filamenti S e S' , S agisce da stampo per la formazione di S' e S' per S , permettendo l'accurata copia dell'informazione nel DNA. Questa capacità permette alla cellula di replicare il proprio genoma e passarlo ai discendenti. Il DNA permette la codifica di proteine (le cui funzioni sono determinate dalla forma e pertanto in ultimo dalla sequenza di amminoacidi) attraverso una corrispondenza esatta tra i quattro nucleotidi e i venti amminoacidi. L'intero gruppo di informazioni mantenute dal DNA di un organismo è detto genoma e specifica tutte le molecole di RNA e proteine che l'organismo sintetizzerà.

5.1.3 Negli eucarioti il DNA è racchiuso nel nucleo cellulare

Circa tutti il DNA della cellula si trova isolato nel nucleo, che occupa circa il 10% del volume totale, delimitato da un involucro nucleare formato da due bistrati lipidici concentrici. Queste membrane sono punte a intervalli da pori nucleari in cui le molecole si trasferiscono dal nucleo al citosol. Tale involucro è connesso a un sistema di membrane intracellulari detto reticolo endoplasmatico che si estende nel citoplasma ed è meccanicamente supportato da una rete di filamenti intermedi detti lamine nucleari. L'involucro permette alle proteine che agiscono sul DNA di essere concentrate dove necessario e mantiene gli enzimi nucleari e citosolici separati.

5.2 DNA cromosomico e il suo confezionamento nella fibra cromatina

La funzione più importante del DNA è quella di trasportare i geni, informazioni che specificano tutte le molecole di RNA e le proteine che compongono l'organismo. Il DNA nucleare degli eucarioti è diviso in cromosomi.

5.2.1 Il DNA eucariotico è confezionato in un insieme di cromosomi

Ogni cromosoma consiste di una singola molecola lineare di DNA estremamente lunga associata con proteine che piegano e impacchettano il filamento in una struttura compatta. Oltre a queste proteine si trovano altre proteine e molecole di RNA che si occupano dell'espressione genica e della riparazione e replicazione del DNA. Il complesso formato dal DNA e le proteine strettamente legate prende il

nome di cromatina. Nei batteri il DNA si trova in forma circolare. Con l'eccezione dei gameti, cellule specializzate che non possono moltiplicare o a cui manca il DNA e cellule che replicano il loro DNA senza completare la divisione cellulare ogni nucleo cellulare umano contiene due coppie di ogni cromosoma, uno ereditato dal padre e uno dalla madre. I cromosomi di tale coppia sono detti omologhi, l'unica coppia non omologa nei maschi è quella dei cromosomi Y (dal padre) e X (dalla madre). Ogni uomo contiene 46 cromosomi: 22 paia comuni tra i sessi e una coppia detta dei cromosomi sessuali che possono essere distinti attraverso colorazione basata sull'ibridazione del DNA in cui un piccolo filamento marcato con un colore fluorescente agisce da sonda che si lega alla sequenza complementare illuminando il cromosoma obiettivo. L'insieme dei 46 cromosomi durante la mitosi è detto cariotipo.

5.2.2 I cromosomi contengono lunghe stringhe di geni

I cromosomi trasportano geni, definiti come segmenti di DNA che contengono le istruzioni per sintetizzare una particolare proteina (o una famiglia) o molecole di RNA significativamente funzionali. Oltre ai geni il genoma di organismi multicellulari e di molti altri eucarioti contiene grandi segmenti sparsi la cui funzione non è compresa. Alcuni di questi segmenti sono fondamentali per la regolazione dell'espressione genica. Questi segmenti generano grandi diversità nella dimensione genomica quando si comparano le specie e creano sequenze molto diverse per organismi strettamente imparentati, anche se contengono gli stessi geni. La divisione del genoma in cromosomi è unico per la specie, con numero e dimensione dei cromosomi diversa.

5.2.3 La sequenza nucleotidica del genoma umano mostra come i geni sono ordinati

Si nota come solo una piccola percentuale del genoma umano codifica le proteine e circa metà è composta da pezzi mobili che si sono inseriti nei cromosomi durante l'evoluzione. La dimensione media di un gene è circa 27·000 coppie di basi. Siccome solo circa 1·300 paia sono richieste per codificare una proteina di dimensione media (430 amminoacidi negli umani) il resto della sequenza consiste di lunghezze di DNA non codificante che interrompe quello codificante. Le sequenze codificanti sono dette esoni, mentre quelle non codificanti introni. Il DNA umano consiste di una lunga stringa di esoni e introni (che sono la maggioranza) che si alternano. Oltre a introni e esoni ogni gene è associato con sequenze di DNA regolatorio responsabile che il gene sia espresso al momento e a livello giusto. Negli esseri umani occupano decine di migliaia di coppie di basi. Oltre ai geni codificanti le proteine ne esistono altri che codificano molecole di RNA con funzione propria.

5.2.4 Ogni molecola di DNA che forma un cromosoma lineare deve contenere un centromero, due telomeri e un'origine di replicazione

Per formare un cromosoma funzionale una molecola di DNA deve poter essere abile di replicarsi e i replicati devono essere separati e partizionati in cellule figlie. Questo processo accade attraverso una serie ordinata di passaggi detti ciclo cellulare che fornisce la separazione temporale tra la duplicazione dei cromosomi e la segregazione in due cellule figlie. Durante una lunga interfase i geni sono espressi e i cromosomi sono replicati rimanendo in un paio di cromatidi sorelle. In questo momento i cromosomi sono estesi in modo che la maggior parte della cromatina esista come lunghi fili e i cromosomi individuali non siano distinguibili. In un momento successivo si condensano in modo da separare le cromatidi sorelle e distribuiti alle cellule figlie. I cromosomi altamente condensati sono detti cromosomi mitotici. Ogni cromosoma opera come un'unità strutturale indipendente. Le

operazioni di replicazione sono controllate da tre tipi di sequenze nucleotidiche nel DNA, ognuna delle quali si lega a proteine specifiche che guidano la macchina che replica e segrega i cromosomi. Un tipo di sequenza nucleotidica agisce come origine della replicazione del DNA, ovvero il luogo dove la duplicazione inizia, ne esistono diverse per assicurarsi che l'intero cromosoma venga replicato rapidamente. Dopo la replicazione del DNA le due cromatidi sorelle rimangono attaccate a una fine mentre vengono condensate producendo cromosomi mitotici. Un'ulteriore sequenza specializzata detta centromero permette a una copia di ogni cromosoma duplicato e condensato di essere portata nella cellula figlia quando si divide. Un complesso proteico detto cinetocoro si forma al centromero e attacca i cromosomi al mandrino mitotico, permettendo la loro separazione. La terza sequenza di DNA specializzata forma i telomeri, le terminazioni dei cromosomi. Permettono una replicazione efficiente e formano strutture che proteggono la fine del cromosoma da essere confusa con una molecola di DNA in necessità di riparazione.

5.2.5 Le molecole di DNA sono altamente conservate nei cromosomi

Tutti gli organismi eucariotici possiedono metodi per impacchettare il DNA in cromosomi. Questa compressione viene svolta da proteine che avvolgono e piegano il DNA in livelli sempre più alti di organizzazione. Nonostante molto meno condensati rispetto a cromosomi mitotici sono comunque compressi. La struttura dei cromosomi è dinamica: regioni specifiche dell'interfase dei cromosomi decondensa per permettere l'accesso di sequenze specifiche del DNA per l'espressione genica, riparazione e replicazione ricondensandosi dopo. La condensazione avviene pertanto in modo da permettere accesso rapido e localizzato al DNA su richiesta.

5.2.6 I nucleosomi sono unità base della struttura del cromosoma eucariote

Le proteine che si legano al DNA per formare i cromosomi sono divise in istoni e proteine non-istoniche che contribuiscono con la stessa massa ad un cromosoma. Il complesso di entrambe le classi di proteine è noto come cromatina. Gli istoni sono responsabili per il primo e basilico livello di condensazione cromosomica detto nucleosoma, un complesso DNA-proteina. Si nota come il nucleosoma sia formato da una stringa di DNA con parti di esso avvolte intorno a istone. Ogni nucleo istonico del nucleosoma consiste di un complesso di 8 proteine istoniche e DNA a doppio filamento lungo 147 coppie di basi. Questo ottamero forma un nucleo proteico lungo il quale si lega. La regione di DNA linker che separa ogni nucleo di nucleosoma può essere lunga fino a 80 basi. In media i nucleosomi si ripetono ogni circa 200 coppie di basi.

5.2.7 La struttura del nucleo del nucleosoma rivela come il DNA è condensato

La forma a disco del nucleo istonico in cui il DNA è avvolto in una bobina sinistra di 1.7 giri è composta da quattro istoni, proteine che condividono una piega istonica formata da tre α -eliche connesse da due anelli. Durante l'assemblaggio del nucleosoma le pieghe istoniche si legano prima tra di loro formando dimeri, poi tetrameri e infine ottameri. L'interfaccia tra il DNA e l'istone forma 142 legami a idrogeno in ogni nucleosoma. Circa metà di questi legami derivano dal backbone amminoacido e quello del DNA, le interazioni idrofobiche e saline mantengono il DNA e la proteina insieme nel nucleosoma. Un quinto del nucleo istonico è formato da lisina o da arginina (amminoacidi basici) e le loro cariche positive possono neutralizzare il backbone del DNA. Queste interazioni spiegano perché il legame con l'istone è indipendente dalla sequenza delle basi. Oltre alla piega

istonica ogni nucleo istonico possiede una coda N-terminale che si estende all'esterno del nucleo DNA-istone che subisce cambi covalenti che controllano aspetti della struttura cromatina e della funzione. Gli istoni sono proteine altamente conservate.

5.2.8 I nucleosomi hanno strutture dinamiche e sono soggetti a cambi catalizzati da complessi rimodellanti a cromatina ATP-dipendenti

Il DNA in un nucleosoma isolato si svolge quattro volte al secondo, rimanendo esposto per intervalli di tempo, rendendolo disponibile per il legame con altre proteine. Dalla cromatina nella cellula è necessario un ulteriore allentamento in quanto le cellule contengono una varietà di complessi di rimodellamento a cromatina ATP-dipendenti. Questi complessi includono una subunità che idrolizza ATP che lega il nucleo proteico del nucleosoma e il DNA legato a esso. Utilizzando l'energia fornita dall'ATP muove il DNA cambiando la struttura del nucleosoma temporaneamente allentando il legame tra il DNA e il nucleo istonico. Attraverso ripetuti cicli di idrolisi dell'ATP il complesso può catalizzare uno scorrimento del nucleosoma in modo da riposizionarlo esponendo specifiche regioni di DNA rendendole disponibili ad altre proteine. Inoltre cooperando con altre proteine che si legano agli istoni e servono come accompagnatrici di istoni questi complessi sono capaci di rimuovere parte o tutto il nucleo del nucleosoma. Un tipico nucleosoma è sostituito ogni ora o due all'interno della cellula. Questi complessi esistono in molte varianti con ruoli diversi. La maggior parte sono proteine con 10 o più subunità altri creano specifici cambi sugli istoni. Quando i geni sono attivati o disattivati questi complessi vengono portati a regioni specifiche del DNA dove agiscono sulla struttura cromatinica. La maggior influenza sul posizionamento del nucleosoma sembra essere altre proteine strettamente legate al DNA, che possono favorire la presenza di un nucleosoma adiacente a loro o forzare il suo allontanamento.

5.2.9 I nucleosomi sono tipicamente condensati in una fibra cromatinica

I nucleosomi sono tipicamente condensati uno sull'altro, generando vettori in cui il DNA è altamente denso, pertanto la cromatina forma una fibra. Questa vicinanza è causata da legami tra nucleosomi che coinvolgono la coda degli istoni e un istone addizionale che svolge la funzione di linker (H1) che si lega a ogni nucleosoma e cambia il percorso del DNA quando esce dal nucleosoma.

5.3 La struttura e la funzione della cromatina

I meccanismi che creano le strutture cromatiniche in diverse regioni della cellula hanno diverse funzioni e possono essere ereditate attraverso ereditarietà epigenetica, ovvero ereditarietà superimposta sull'ereditarietà genetica del DNA.

5.3.1 L'eterocromatina è altamente organizzata e limita l'espressione genica

Esistono due tipi di cromatina nell'interfase dei nuclei di molte cellule eucariotiche: una forma altamente condensata detta eterocromatina e una meno condensata detta eucromatina. L'eterocromatina è altamente concentrata in certe regioni specializzate: i centromeri e nei telomeri e presente in luoghi che variano in base allo stato fisiologico della cellula. Contiene tipicamente pochi geni e quando parti eucromatiche vengono convertite in eterocromatiche i rispettivi geni vengono disattivati. Descrive domini di cromatina compatti che sono resistenti all'espressione genica.

5.3.2 Lo stato eterocromatico è auto-propagante

Attraverso la rottura e la riunione dei cromosomi una parte eucromatica può essere trasformata in una eterocromatina in un effetto detto di posizione. Riflette l'allargamento dello stato eterocromatico ed è il modo in cui l'eterocromatina è creata e mantenuta. Quando una condizione eterocromatica si stabilisce in una zona viene ereditata dalle cellule figlie nella variegazione dell'effetto di posizione. Si nota pertanto come l'eterocromatina genera sè stessa in un feedback positivo che si espande spazialmente e temporalmente. Esistono geni che aumentano o diminuiscono questo processo che codificano proteine cromosomali non istoni che interagiscono con gli istoni coinvolti nella modifica o mantenimento della struttura cromatinica.

5.3.3 I nuclei istonici sono modificati covalentemente a molti siti diversi

Le catene laterali degli amminoacidi dei quattro istoni del nucleosoma sono soggette a molti cambi covalenti, come l'acetilazione della lisina, la mono-, di- e trimetilazione delle lisine e la fosforilazione delle serine. Un gran numero di queste modifiche avvengono sulle code istoniche -N terminali che protrudono dal nucleosoma. Sono tutte reversibili e catalizzate da enzimi altamente specifici. Ogni enzima è reclutato su siti specifici della cromatina in tempi determinati in base alle proteine regolatorie della trascrizione o fattori di trascrizione che riconoscono e si legano a specifiche sequenze di DNA. Sono prodotte in tempi e luoghi diversi, determinando dove e quando tali enzimi agiscono. Il DNA determina pertanto come gli istoni sono modificati, ma in alcuni casi le modifiche covalenti possono persistere creando una memoria della storia di sviluppo della cellula che può essere trasmessa ereditariamente. Differenti gruppi di nucleosomi presentano diverse modifiche, che vengono controllate e hanno importanti conseguenze. L'acetilazione delle lisine allenta la struttura cromatinica in quanto il gruppo acetile rimuove la carica positiva della lisina, riducendone l'affinità con le code dei nucleosomi adiacenti, ma gli effetti più importanti sono generati dall'abilità di reclutare altre proteine in queste lunghezze di cromatina alterata. La trimetilazione di una specifica lisina sulla coda H3 attrae la proteina HP1 eterocromatina-specifica contribuendo alla stabilizzazione ed espansione della cromatina. Le proteine reclutate agiscono con gli istoni modificati determinando dove e quando i geni saranno espressi. Si nota pertanto come la struttura di ogni dominio cromatinico governa la lettura delle informazioni genetiche e infine struttura e funzioni della cellula.

5.3.4 La cromatina acquisisce varietà addizionale attraverso inserzioni specifiche al sito di un insieme di varianti di istoni

Nella cellula sono contenuti alcune varianti di istoni che si possono assemblare in nucleosomi. Gli istoni principali sono sintetizzati primariamente durante la fase S del ciclo cellulare e si assemblano in nucleosomi sulle eliche di DNA figlie dietro la forcella di replicazione, mentre le varianti sono sintetizzate nell'interfase e sono inseriti in cromatine già formate con un processo di cambio istonico catalizzato dal complesso di rimodellazione della cromatina ATP-dipendente che contiene subunità che causano il suo legame a siti specifici della cromatina e a accompagnatori di istoni che trasportano una particolare variante, inserendoli pertanto in luoghi con alta specificità.

5.3.5 Le modifiche covalenti e le varianti istoniche agiscono insieme per controllare le funzioni dei cromosomi

Le modifiche degli istoni avvengono in insiemi ordinati. Alcune combinazioni determinano come e dove il DNA condensato possa essere acceduto e manipolato, creando un insieme di marcature che

determinano se la lunghezza di cromatina è stata appena replicata, o è danneggiata o come e dove l'espressione genica deve accadere. Molte proteine regolatorie contengono piccoli domini che si legano a marcature specifiche come la lisina trimetilata sull'istone H3. Questi domini sono legati insieme in una grande proteina o complesso che riconosce una combinazione specifica di modifiche all'istone. Si crea pertanto un complesso lettore che permette a particolari combinazioni di marcature di attrarre proteine per eseguire le funzioni biologiche nel momento corretto. Queste marcature sono dinamiche e si creano sulle code istoniche che si trovano sull'esterno del nucleo del nucleosoma.

5.3.6 Un complesso di proteine lettrici e scrittrici possono espandere modifiche alla cromatina lungo un cromosoma

Il fenomeno dell'effetto di posizione richiede che forme modificate di cromatina abbiano l'abilità di espandersi per distanze sostanziale lungo il cromosoma. Si nota come gli enzimi che aggiungono o rimuovono modifiche agli istoni fanno parte di complessi che possono essere trasportati dai regolatori di trascrizione su lunghezze specifiche di DNA, ma dopo che l'enzima marca i nucleosomi può avvenire una reazione a catena in cui lavora insieme a una proteina di lettura nello stesso complesso che riconosce la marcatura e si lega a tale nucleosoma, attivando l'enzima di scrittura e posizionandolo su un nucleosoma vicino. Attraverso i cicli di lettura-scrittura la proteina può trasportare l'enzima di scrittura lungo il DNA espandendo la marcatura lungo il cromosoma. Un processo simile avviene per rimuovere le modifiche agli istoni.

5.3.7 Barriere nella sequenza di DNA bloccano l'espansione dei complessi di lettura-scrittura separando domini di cromatina vicini

Nella cellula esistono sequenze di DNA che marcano i confini di domini di cromatina e li separano. Questa sequenza di barriera contiene un insieme di siti di legame per gli enzimi istoni acetilasi. Siccome la lisina acetilata è incompatibile con la metilazione richiesta per l'espansione dell'eterocromatina si blocca la sua espansione. Esistono comunque molte altre modifiche alla cromatina che raggiungono questo scopo.

5.3.8 La cromatina nei centromeri rivela come le varianti degli istoni possono creare strutture speciali

Le varianti di istoni che trasportano nucleosomi possono produrre marcature nella cromatina persistenti. Un esempio di questo è la formazione e ereditarietà di una struttura di cromatina specializzata al centromero, la regione necessaria per l'attacco al mandrino mitotico e alla segregazione ordinata delle copie del genoma durante la divisione cellulare. Ogni centromero è contenuto da una cromatina centromerica che persiste durante l'interfase che contiene una variante dell'istone H3 nota come CENP-A (centromere protein-A) e altre proteine che condensano il nucleosoma in ordinamenti particolarmente densi e formano il cinetocoro, la struttura richiesta per l'attacco al mandrino mitotico. I centromeri consistono di sequenze di DNA corte e ripetute dette DNA alfa satellite. La presenza di queste sequenze in altre parti di DNA suggerisce come da sole non siano sufficienti per la formazione del centromero. Altri centromeri sono stati osservati su cromosomi frammentati e inizialmente eucromatici. I centromeri sono pertanto definiti da un insieme di proteine, piuttosto che da una sequenza di DNA specifica.

5.3.9 Alcune strutture cromatiniche possono essere ereditate direttamente

I cambi nell'attività del centromero devono essere trasmessi alle generazioni successive. Si nota come la formazione di un centromero *de novo* richiede un inizio evento di inseminazione con strutture specifiche al DNA che contengono nucleosomi con CENP-A, che avviene più rapidamente lungo il DNA alfa satellite. Essendo che i tetrameri di H3-H4 sono ereditati si nota come un nucleosoma contenente CENP-A è stato assemblato su una lunghezza di DNA è banale come un nuovo centromero possa essere generato nello stesso luogo, assumendo che la presenza di un istone CENP-A recluti selettivamente più istoni CENP-A nei suoi vicini. Si nota inoltre come la generazione del centromero sia un processo altamente cooperativo.

5.3.10 L'attivazione e la repressione di strutture di cromatina può essere ereditato epigeneticamente

L'ereditarietà epigenetica è centrale nella creazione di organismi multicellulari in quanto permettono la creazione di tessuti diversi. Si nota come le strutture specifiche della cromatina tendono a persistere e a essere trasmesse nei cicli di divisione.

5.3.11 Le strutture di cromatina sono importanti per le funzioni del cromosoma eucariotico

La condensazione del DNA in nucleosomi è fondamentale per l'evoluzione di organismi multicellulari in quanto cellule si devono specializzare cambiando l'accessibilità e l'attività di centinaia di geni, processo che richiede sulla memoria cellulare che si trova in parte nella struttura cromatinica che crea strutture che silenziano geni temporaneamente o in maniera persistente.

5.4 La struttura globale dei cromosomi

Come una fibra a $30nm$ il nucleo avrebbe una lunghezza di $1mm$ e sarebbe troppo grande per essere contenuto nel nucleo. Si rende pertanto necessario un secondo livello di piegamento che coinvolge il piegamento della cromatina in una serie di anelli e bobine in maniera dinamica.

5.4.1 I cromosomi sono piegati in grandi anelli di cromatina

I cromosomi, accoppiati in preparazione per la meiosi si presentano in una serie di grandi anelli di cromatina che si emanano da un asse cromosomico lineare. In queste circostanze un anello contiene sempre la stessa sequenza di DNA che rimane estesa nello steso modo. Questi cromosomi producono grandi quantità di RNA e la maggior parte dei geni negli anelli sono espressi. La maggior parte del DNA si trova comunque condensata nell'asse dove i geni non sono espressi.

5.4.2 Cromosomi politene sono utili per visualizzare le strutture di cromatina

Alcuni tipi di cellule diventano anormalmente grandi attraverso multipli cicli di sintesi del DNA senza divisione cellulare. Tali cellule sono dette poliploidi e tutte le copie di ogni cromosoma sono allineate creando giganti cromosomi politene organizzati in bande e interbande, dove il DNA è più concentrato nelle prime. Queste strutture permettono di esaminare l'organizzazione della cromatina su larga

scala. Si nota come insiemi specifici di proteine non istoni si assemblano sui nucleosomi influenzando le funzioni biologiche. Il reclutamento di queste proteine può avvenire su grandi lunghezze di DNA, generando strutture cromatiniche simili a grandi tratti del genoma, separate dai domini vicini da proteine di barriera. Il cromosoma interfase può essere pertanto considerato come un mosaico di strutture cromatiniche contenenti modifiche del nucleosoma associate con un particolare insieme di proteine non istoni.

5.4.3 Esistono multiple forme di cromatina

L'analisi della locazione degli istoni e delle proteine non istone nella cromatina può essere mappata lungo tutta la sequenza di DNA di un organismo. Tre tipi di cromatina repressiva dominano nell'organismo della *Drosophila* e due tipi di cromatina su geni attivamente trascritti. Ognuno di questi tipi è associato con un complesso diverso di proteine non istone. L'eterocromatina classica contiene più di 6 proteine come la proteina eterocromatina 1 (HP1), mentre le forme a polycomb contengono un simile numero di proteine PcG. Oltre ai cinque principali sono presenti forme minori ognuna delle quali diversamente regolata e con ruoli distinti. L'insieme delle proteine legate ad un luogo varia in base al tipo della cellula e al suo stato di sviluppo.

5.4.4 Gli anelli di cromatina decondensano quando i geni al loro interno sono espressi

Quando la cellula si sviluppa distinti puffs cromosomici si formano e i vecchi recedono in cromosomi politene quando nuovi geni sono espressi e i vecchi sono disattivati. Dall'ispezione di un puff si nota come la maggior parte si generino dalla decondensazione di una singola banda cromosomica. Quando i geni nell'anello non sono espressi questo assume una struttura spessa, estendendosi durante la loro espressione. Si nota come la cromatina a lato del loop decondensato appaia più compatta in quanto un anello costituisce un dominio funzionale distinto della struttura cromatinica. Anelli di cromatina altamente condensata si espandono quando il gene è espresso. Ognuno dei 46 cromosomi dell'interfase tendono a occupare il proprio territorio discreto nel nucleo e non sono impigliati tra di loro estensivamente. Le regioni eterocromatiniche sono associate con la lamina nucleare. La maggior parte dei cromosomi umani sono piegati in una conformazione detta globulo frattale: un ordinamento senza nodi che facilita un impacchettamento denso che preserva l'abilità della cromatina di spiegarsi e ripiegarsi.

5.4.5 La cromatina può muoversi a siti specifici nel nucleo per alterare l'espressione dei geni

La posizione dei geni nel nucleo cambia quando diventa altamente espresso, pertanto una regione che diventa attivamente trascritta si espande fuori dal territorio del suo cromosoma in un anello esteso in quanto l'assemblaggio delle più di 100 proteine richieste per iniziare l'espressione genica viene facilitato in regioni del nucleo ricche di queste. Si nota come il nucleo è eterogeneo con regioni con funzioni diverse in cui porzioni del cromosoma si possono muovere quando sono soggette a processi biochimici.

5.4.6 Reti di macromolecole formano un insieme di ambienti biochimici distinti nel nucleo

Uno dei sottocompartimenti più grossi del nucleo è il nucleolo, una struttura dove si forma la subunità del ribosoma e altre reazioni specializzate. Consiste di una rete di RNA e proteine concentrate intorno a geni di RNA ribosomiale che sono attivamente trascritti, presenti in multiple copie nel genoma che sono raggruppate in un singolo nucleolo nonostante si trovino su cromosomi diversi. Sono presenti anche diversi organelli come corpi di Cajal e granuli intercromatinici, composti da proteine e RNA che si legano creando reti altamente permeabili a altre proteine e molecole di RNA nel nucleoplasma circostante. Queste strutture creano ambienti biochimici distinti immobilizzando gruppi di macromolecole distinte permettendo a altre molecole in essi di essere efficientemente processate attraverso cammini di reazione complessi impartendo molti dei vantaggi cinetici della compartimentalizzazione pur essendo incapaci di concentrare o escludere piccole molecole in quanto non possiedono il bistrato lipidico. Questi sottocompartimenti si formano solo quando necessario creando alte concentrazioni locali di enzimi e molecole di RNA necessarie per un processo particolare. In maniera analoga quando il DNA è danneggiato da radiazioni l'insieme di enzimi necessario alla riparazione del DNA si unisce in foci discrete nel nucleo creando fabbriche di riparazione che sintetizzano DNA o RNA. Queste entità si creano attraverso lunghe catene polipeptidiche o molecole di RNA non codificanti intervallati con siti di legame specifici che concentrano multiple proteine e altre molecole necessarie. Esiste anche una struttura analoga al citoscheletro in cui i cromosomi e gli altri componenti del nucleo sono organizzati detta matrice nucleare.

5.4.7 I cromosomi mitotici sono altamente condensati

I cromosomi di quasi tutte le cellule eucariotiche diventano visibili durante la mitosi, quando si arrotolano per formare una struttura altamente condensata con una lunghezza di un decimo rispetto a un cromosoma interfase. Le due molecole di DNA prodotte durante la replicazione del DNA sono piegate separatamente producendo due cromatidi sorelle unite al centromero, coperti da grandi quantità di complessi RNA-proteine e altre molecole. Una volta che si toglie questa copertura ogni cromatide si organizza in anelli di cromatina che si estendono da un'impalcatura centrale. Le caratteristiche visibili del cromosoma mitotico sono nello stesso ordine ripetuto alla molecola di DNA. La condensazione di cromosomi mitotici è il livello finale di impacchettamento dei cromosomi. Questo processo di compattazione è dinamico e altamente organizzato che permette lo sgarbugliamento delle cromatidi sorelle in modo da permettere la loro separazione e protegge le molecole di DNA fragili dalla rottura quando sono tirate nelle cellule figlie. La condensazione comincia nella fase *M* ed è connessa con la progressione del ciclo cellulare. Durante questa fase si blocca l'espressione dei geni e sono fatte specifiche modifiche agli istoni in modo da riorganizzare la cromatina mentre si compatta.

5.5 Come si evolvono i genomi

Geni omologhi (con uno stesso antenato) possono essere riconosciuti in lunghe distanze filogenetiche. Il riconoscimento di questa similitudine è utile per inferire la funzione di proteine e geni. La sequenza dei geni individuali è più conservata rispetto alla struttura genomica.

5.5.1 Il confronto tra i genomi rivela sequenze di DNA attraverso la loro evoluzione del throughput di evoluzione

Le regioni di progenie che codificano le sequenze di amminoacidi delle proteine (esoni) si trovano in segmenti corti (145 paia di nucleotidi), dispersi in area in cui la sequenza nucleotidica ha poche conseguenze. Questo ordinamento rende difficile identificare tutti gli esoni e inizio e fine di un gene. Un approccio è cercare per sequenze di DNA con una funzione simile e sono più probabilmente conservate rispetto a quelle senza funzione. Tali regioni con sequenze simili sono dette regioni conservate. Oltre a rivelare le sequenze che codificano esoni importanti e molecole di RNA contengono sequenze di DNA regolatorio con funzione sconosciuta. Le regioni non conservate riflettono il DNA la cui sequenza è molto meno probabilmente critica per la funzione. Si possono ottenere risultati più importanti includendo diverse specifiche. Circa il 5% del genoma consiste di sequenze conservate multispecie, di cui solo un terzo codifica proteine, mentre il resto è regolatorio e cluster di siti di legami per proteine e per la produzione di molecole di RNA con altro scopo.

5.5.2 L'alterazione dei genomi è causata da fallimento del normale meccanismo per la copia e il mantenimento del DNA e da elementi del DNA trasponibili

L'evoluzione dipende da incidenti e errori seguiti da sopravvivenza non casuale. La maggior parte dei cambi genetici sono il risultato di fallimenti nel meccanismo in cui i genomi sono copiati e riparati quando danneggiati insieme al movimento di parti del DNA trasponibili. Il meccanismo di replicazione compie un errore in un nucleotide su mille ogni milione di anni. Nonostante questo in una popolazione di 10·000 diploidi individuali in un milione di anni ogni possibile sostituzione nucleotidica sarà stata provata circa 20 volte. Gli errori nella replicazione, ricombinazione o riparazione del DNA possono portare a cambi locali nella sequenza dette mutazioni puntuali o a riordinamenti a larga scala come eliminazioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni. Oltre a questi fallimenti il genoma contiene elementi di DNA mobile che sono fonte di cambi genomici, questi trasposoni sono sequenze parassitiche che si diffondono nel genoma che colonizzano, distruggendo la funzione o alterando la regolazione dei geni. Questo processo ha modificato profondamente i genomi.

5.5.3 La sequenza genomica di due specie differisce in proporzione al tempo in cui si sono evolute separatamente

Le differenze tra i genomi delle specie si sono accumulate lungo 3 miliardi di anni. Il processo di evoluzione genomica si può ricostruire tra confronti dettagliati dei genomi degli organismi contemporanei. La struttura di base per questo lavoro è l'albero filogenetico, costruito secondo il confronto dei geni o sequenze proteiche. Per organismi distanti la conservazione delle sequenze è dovuta a una soluzione purificativa in cui vengono eliminate le mutazioni che interferiscono con le funzioni genetiche importanti.

5.5.4 L'albero filogenetico costruito dal confronto delle sequenze di DNA traccia le relazioni di tutti gli organismi

Gli alberi filogenetici basati sulle sequenze molecolari possono essere confrontati con i record di fossili in modo da avere un'idea ancora più chiara del processo evolutivo in quanto il secondo fornisce date assolute, nonostante tempi di divergenza precisi siano difficili da stabilire. Gli alberi costruiti con questo aiuto suggeriscono che i cambi nella sequenza di particolari geni o proteine avvengono ad un

tasso costante che dà un orologio molecolare per l'evoluzione unico per differenti categorie di sequenze di DNA. Questo orologio scorre più rapidamente per sequenze non soggette a selezione purificativa: porzioni di introni che non hanno splicing o segnali regolatori, la terza posizione in codoni sinonimi e geni che sono stati inattivati irreversibilmente da mutazioni (pseudogeni) e più lentamente per sequenze con vincoli funzionali critici. Occasionalmente cambi rapidi possono accadere in sequenze altamente conservate e si pensa riflettano periodi di selezione positiva per mutazioni vantaggiose. La velocità di questo orologio molecolare è determinata dal tasso di selezione purificante e dal tasso di mutazione. Si nota come il tasso di mutazione in mitocondri animali sia estremamente alto. Le categorie per cui l'orologio è veloce sono le più informative per eventi evolutivi recenti. Questi orologi presentano inoltre una risoluzione temporale maggiore rispetto ai record fossili e sono una guida affidabile.

5.5.5 Un confronto tra cromosomi umani e dei topi mostra come la struttura dei genomi diverge

I lignaggi umani e dei topi si sono evoluti separatamente per circa 80 milioni di anni e i secondi hanno orologi molecolari veloci, divergendo più rapidamente. Se il genoma è organizzato in cromosomi quasi identicamente la sua organizzazione diverge significativamente. Continuano ad esistere blocchi di DNA in cui l'ordine dei geni è lo stesso, dette regioni di sintenia. Da queste osservazioni si è notato come piccole parti di DNA sono eliminate e aggiunte a velocità elevate, anche se guadagni di sequenza da duplicazione e moltiplicazione di trasposoni ha compensato per queste eliminazioni, pertanto la dimensione del genoma è rimasta invariata dall'ultimo comune antenato di topi e umani per gli umani, mentre è diminuita per i topi. Prove di questo possono essere ottenute dal confronto dettagliato delle regioni di sintenia. Il DNA è aggiunto ai genomi attraverso la duplicazione spontanea di segmenti cromosomici e dall'inserzione di nuove coppie di trasposoni attivi essendo gli eventi di trasposizione duplicativi.

5.5.6 La dimensione del genoma dei vertebrati riflette i tassi relativi di addizione e perdita del DNA in un lignaggio

In vertebrati imparentati lontanamente la dimensione del genoma può cambiare consideratamente senza effetto sull'organismo o sul numero dei geni. Questo avviene in quanto tutti i vertebrati sono soggetti di un continuo processo di addizione e perdita del DNA e pertanto la dimensione del genoma dipende dall'equilibrio di questi processi. Il numero di geni è invece mantenuto attraverso selezione purificante.

5.5.7 Si può inferire la sequenza di alcuni genomi antichi

I genomi di organismi ancestrali possono essere inferiti ma non osservati direttamente. La selezione deve aver mantenuto proprietà funzionali critiche, pertanto il confronto tra organismi odierni mostra che la frazione del genoma soggetta a selezione purificante è piccola e pertanto la sequenza di DNA varia grandemente. Per antenati con un gran numero di discendenti si può inferire la loro sequenza confrontando la sequenza di questi ultimi.

5.5.8 Il confronto tra sequenze multispecie identifica sequenze di DNA conservato di funzione sconosciuta

La massa di sequenze di DNA nei database mette a disposizione una risorsa utile a determinare i cammini evolutivi e come le cellule e gli organismi funzionano. Si è notata una grande quantità di sequenza di DNA che non codifica proteine conservata durante l'evoluzione dei mammiferi, chiaramente rivelata analizzando blocchi di DNA sintetici da specie diverse, determinando le sequenze conservate multispecie. La maggior parte di queste sequenze non codificanti sono corte per la maggior parte e la loro conservazione implica una funzione importante che è stata mantenuta dalla selezione purificante. Molte di queste sequenze producono molecole di RNA non tradotte come i lunghi RNA non codificanti lncRNA che si pensa abbiano un'importante funzione nella regolazione dell'espressione genica.

5.5.9 Cambi in sequenze precedentemente conservate possono aiutare a decifrare passi critici dell'evoluzione

L'analisi delle differenze tra le specie viene effettuata attraverso le sequenze conservate multispecie che rappresentano le sequenze di DNA probabilmente funzionalmente importanti. Queste sequenze non sono conservate perfettamente e si trovano delle differenze che in una piccola percentuale rappresentano segni di scatti evolutivi. Le regioni accelerate umane (HARs) si pensa riflettano funzioni importanti che ci differiscono dalle altre specie. Un quarto dei 50 siti individuali si trovano vicino a geni associati con lo sviluppo neuronale. Un altro approccio consiste nel ricercare mutazioni importanti attraverso le sequenze di DNA conservate e concentrarsi sui siti cromosomici con eliminazioni. Solo una di queste eliminazioni trovate negli umani si trovano in regioni codificanti.

5.5.10 Mutazioni nella sequenza di DNA che controlla l'espressione genica ha guidato molti dei cambi evolutivi nei vertebrati

Si può tentare di tracciare le origini degli elementi regolatori del DNA che hanno avuto ruoli critici nell'evoluzione dei vertebrati. Si inizia identificando i 3 milioni di sequenze non codificanti che sono state conservate in evoluzioni recenti dei vertebrati che rappresenta un'innovazione caratteristica di un ramo dell'albero dei vertebrati e consistono di DNA regolatorio che regola il gene vicino. Si possono identificare i geni più vicini a esse e si può stimare quando ogni elemento regolatorio è arrivato in esistenza. Gli elementi regolatori conservati appaiono associati con geni che codificano proteine per la regolazione della transizione per proteine per lo sviluppo embrionale, successivamente si trovano le regolazioni per geni codificanti i recettori per segnali extracellulari e l'ultima innovazione sembra riguardare le proteine che modificano altre proteine dopo la traduzione.

5.5.11 La duplicazione genica fornisce una fonte di novità genica durante l'evoluzione

L'evoluzione dipende dalla creazione di un nuovo gene e dalla modifica di quelli preesistenti. I geni senza omologhi sono scarsi e si trovano spesso famiglie di geni con differenti membri in specie diverse per la cui creazione è stato necessario la duplicazione ripetuta di geni le cui copie diversero per svolgere funzioni diverse. La duplicazione dei geni avviene ad alti tassi in tutti i lignaggi, contribuendo al processo di addizione del DNA.

5.5.12 Geni duplicati divergono

Inizialmente non è presente alcuna selezione per mantenere lo stato duplicato, pertanto molti eventi di duplicazione possono essere seguiti da mutazioni che causano la perdita di funzione sui geni. Questo ciclo eliminerebbe l'effetto della duplicazione. Passando il tempo la somiglianza tra tali pseudogeni disattivati e l'origine della duplicazione viene erosa dalle mutazioni con la relazione omologa non più identificabile. Un'altra possibilità è che entrambe le copie rimangano funzionali mentre divergono, prendendo ruoli diversi e spiega la presenza delle famiglie geniche e ha un ruolo critico nell'evoluzione di complessità biologica crescente. Una duplicazione dell'intero genoma può avvenire nel caso in cui avvenga la replicazione del DNA senza divisione cellulare. Il risultato con il passare del tempo crea altro materiale genico con possibilmente funzioni diverse.

5.5.13 L'evoluzione del gene globina mostra come la duplicazione del DNA contribuisce all'evoluzione degli organismi

La somiglianza delle proteine globina odierne in struttura e sequenza amminoacida indica che devono derivare da un gene antenato comune. Si possono ricostruire eventi che hanno prodotto i vari tipi di molecole di emoglobina considerando le diverse forme che assume nell'albero della vita. Questa molecola ha permesso agli organismi di crescere in dimensione e molecole che legano l'ossigeno si possono trovare in piante, funghi e batteri. Negli animali la proteina più primitiva è una catena polipeptidica di circa 150 amminoacidi, ma si presenta in forma più complessa in vertebrati complessi, composta da due catene di globina. Durante una serie di mutazioni e duplicazioni hanno stabilito un gene globina per nel genoma in cui ognuno codificante due catene α - e β - che si associano per formare una molecola di emoglobina che consiste delle quattro catene. I quattro siti che si legano all'ossigeno nella molecola $\alpha_2\beta_2$ interagiscono, permettendo un cambio allosterico cooperativi quando lega e rilascia l'ossigeno che permette uno scambio più efficiente. Durante l'evoluzione dei mammiferi il gene per la catena β si è duplicato ed è stato modificato dando origine a una catena simile alla β presente nel feto, con una molecola con un'affinità più alta rispetto a quella presente negli adulti. Il nuovo gene si è duplicato di nuovo e mutato producendo due nuovi geni ε e γ , con la prima prodotta nelle prime fasi dello sviluppo per formare $\alpha_2\varepsilon_2$ rispetto alla catena fetale γ che produce $\alpha_2\gamma_2$. Durante l'evoluzione dei primati una nuova duplicazione del gene β ha prodotto un gene per la δ -globina producendo una forma minore di emoglobina $\alpha_2\delta_2$ presente unicamente nei primati adulti. Ognuno di questi geni duplicati è stato modificato da mutazioni puntiformi che influiscono sulle proprietà della molecola di emoglobina finale e cambi nelle regioni regolatorie che determinano la temporizzazione e il livello di espressione del gene e pertanto ogni globina è creata in diverse quantità e a tempi diversi dello sviluppo dell'uomo. Nel genoma umano i geni generati dal β gene originale sono ordinati in una serie di sequenze di DNA omologhe che si trovano a 50'000 basi di distanza su un singolo cromosoma. Un singolo cluster di geni α -globina si trova su un cromosoma separato. Esistono duplicazioni di sequenze di pseudo geni globina disattivati da mutazioni che impediscono la loro espressione come proteine funzionali.

5.5.14 I geni che codificano nuove proteine possono essere creati ricombinando gli esoni

La duplicazione del DNA può agire su una scala più piccola unendo segmenti di DNA corti duplicati. Le proteine codificate da geni creati in questa maniera possono essere riconosciute dalla presenza di domini simili legati covalentemente l'uno all'altro in serie. Le immunoglobuline e le proteine fibrose sono un esempio di questo. Ogni esone separato codifica un'unità di proteina pieghevole o dominio.

Si crede che l'organizzazione del DNA come una serie di esoni separati da introni ha facilitato l'evoluzione di nuove proteine: la duplicazione necessaria per formare un singolo gene codificante per una proteina con domini ripetuti può avvenire rompendo e riunendo il DNA lungo l'introne a un lato di un esone e pertanto gli introni aumentano la probabilità di un evento di duplicazione favorevole. Vari parti dei geni sono servite come elementi modulari che si sono duplicati e spostati lungo il genoma per formare una grande diversità delle cose viventi.

5.5.15 Mutazioni neutrali si diffondono diventando fissate in una popolazione, con probabilità dipendente dalla dimensione della popolazione

Confrontando due specie che si sono separate fa poca differenza quali individui sono confrontati. Nonostante questo ogni diversità fissa comincia come una nuova mutazione in un individuo singolo. Se la dimensione della popolazione riproducibile in cui è avvenuta la popolazione è N , la frequenza dell'allele iniziale per una nuova mutazione è $\frac{1}{2N}$ per un organismo diploide. La fissazione nella popolazione dipende dalle conseguenze funzionali della popolazione: una mutazione con un evento deleterio viene eliminata dalla selezione purificante e non si fissa, mentre le mutazioni che danno un vantaggio riproduttivo su individui si possono diffondere rapidamente. La mutazione selezionata lungo una quantità di sequenze vicine sarà una parte di un grande mosaico. Le mutazioni neutrali possono diffondersi e fissarsi nella popolazione e contribuiscono al cambio evolutivo dei genomi, creando la maggiore differenza tra scimmie e esseri umani. La diffusione delle mutazioni neutrali dipende su una variazione casuale del numero di prole che porta la mutazione prodotta da ogni individuo che porta la mutazione, causando cambi nella relativa frequenza dell'allele mutante nella popolazione. Questo processo di cammino casuale può causare l'estinzione della mutazione o la sua fissazione. Assumendo una popolazione di dimensione costante e con accoppiamenti casuali e selezione neutrale per la popolazione, quando una nuova mutazione avviene in una popolazione di dimensione N , la probabilità che essa si fissi è circa $\frac{1}{2N}$ in quanto ci sono $2N$ copie di geni nella popolazione diploide e ognuna di esse ha una probabilità uguale di diventare la versione dominante. Per le mutazioni che si fissano il tempo di fissazione è circa $4N$ generazioni.

5.5.16 Molto può essere imparato dall'analisi della variazione tra gli umani

Esiste un grande numero di varianti che si incontrano. Da un confronto dettagliato di sequenze di DNA tra un gran numero di umani in tutto il globo è possibile determinare quante generazioni sono passate dall'origine di una mutazione neutrale. Da questi dati è possibile determinare le migrazioni degli esseri umani primitivi. Un'altra fonte di variazione si trova nella duplicazione e eliminazione di grandi blocchi di DNA. Confrontando il genoma di individuo con il modello si possono trovare circa 100 differenze in blocchi di sequenza. Alcune di queste copy number variations (CNVs) sono molto comuni, mentre altre sono presenti in poche minoranze. Le variazioni intraspecie sono caratterizzate come polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) che sono punti in cui la sequenza genomica in una grande frazione della popolazione possiede un nucleotide, mentre un'altra un secondo. Per qualificarsi come un polimorfismo la variante deve essere comune abbastanza che due individui casuali siano diversi sia almeno dell'1%. Queste variazioni possono utili per analisi della mappatura genetica in cui si tenta di associare tratti specifici con sequenze specifiche, pur non avendo effetto sul fitness umano. Si trovano anche sequenze con tassi di mutazioni estremi come le ripetizioni CA, onnipresenti nel genoma umano e degli altri eucarioti. Se sequenze con il motif $(CA)_n$ sono replicate con bassa fedeltà a causa di un errore tra lo stampo e un nuovo filamento di DNA appena sintetizzato, pertanto

il valore n varia grandemente tra un genoma e il prossimo. Questa ripetizione crea un ottimo marcatore. Nonostante si trasmetta abbastanza fedelmente tra i figli (una lunghezza per la madre e una per il padre) i cambi sono abbastanza frequenti da permettere alti livelli di eterozigosità nella popolazione. Un sottoinsieme di queste mutazioni sono responsabili per gli aspetti ereditabili degli individui.

Capitolo 6

Replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA

L'abilità della cellula di mantenere un alto grado di ordine dipende dall'accurata duplicazione di grandi quantità di informazioni genetiche trasportate in forma chimica come DNA. Il processo della replicazione del DNA deve avvenire prima che una cellula possa produrre due cellule figlie geneticamente indipendenti. Il mantenimento dell'ordine richiede anche una continua sorveglianza e riparazione dell'informazione genetica, continuamente danneggiata dall'ambiente chimicamente, attraverso radiazioni, calore e molecole attive generate nella cellula. Questi processi vengono svolti da proteine che catalizzano processi rapidi e accurati che avvengono all'interno della cellula. Se la sopravvivenza a breve termine di una cellula dipende dalla prevenzione dei cambi nella sequenza, quella a lungo termine richiede che una sequenza di DNA cambi lungo le generazioni in modo da permettere adattamento evolutivo a un ambiente dinamico. Nonostante gli sforzi della cellula avvengono dei cambi nel DNA che possono mettere a disposizione varianti che la selezione spinge durante l'evoluzione.

6.1 Il mantenimento della sequenza di DNA

La sopravvivenza dell'individuo richiede un alto grado di stabilità genetica. Solo raramente il processo di mantenimento del DNA fallisce causando cambi permanenti nel DNA o mutazioni, che possono distruggere un organismo se avvengono in posizioni vitali della sequenza del DNA.

6.1.1 I tassi di mutazione sono estremamente bassi

Il tasso di mutazione può essere determinato direttamente attraverso esperimenti con batteri come l'*Escherichia coli* che si divide ogni 30 minuti e una cellula singola può generare una grande popolazione in meno di un giorno. In tale popolazione è possibile individuare una piccola frazione di batteri con una mutazione dannosa in un gene particolare se non è necessario alla sopravvivenza. Tale frazione è una sottostima delle mutazioni in quanto ne esistono silenti. Dopo aver corretto per queste mutazioni silenti si trova che un singolo gene per una proteina di dimensione media (10^3 paia di nucleotidi) accumula una mutazione una volta ogni 10^6 generazioni: il tasso di mutazione è pertanto di tre cambi nucleotidici per 10^{10} nucleotidi per generazione di cellule. Recentemente è stato possibile misurare il tasso di mutazione direttamente in organismi più complessi e la riproduzione sessuale. In

questo caso la sequenza genomica di una famiglia si sequenzia e una comparazione determina circa 70 mutazioni di singoli nucleotidi in ogni discendente. Normalizzando alla dimensione del genoma umano il tasso di mutazione di un nucleotide cambia per 10^8 nucleotidi per generazione. Questa è una sottostima in quanto non considera le mutazioni letali che non sarebbero presenti nella progenie. Circa 100 divisioni accadono tra il concepimento e il tempo di produzione di uova e sperma che producono una nuova generazione, pertanto il tasso umano di mutazione è di 1 mutazione per 10^{10} divisioni cellulari. In entrambi gli esperimenti si nota come i tassi di mutazioni sono estremamente bassi e con un fattore di tre l'uno dall'altro: sono infatti preservati i meccanismi base che garantiscono questi tassi bassi e sono stati conservati da cellule ancestrali molto antiche.

6.1.2 I tassi di mutazione bassi sono necessari per la vita come la conosciamo

Essendo che la maggior parte delle mutazioni sono deleterie, nessuna specie può permettersi di accumularle. Pur essendo il tasso di mutazioni basso si pensa limiti il numero di proteine che può dipendere a 30'000 in quanto per un numero maggiore la probabilità che una componente chiave sia danneggiata da una mutazione diventa troppo elevata. Le cellule di un organismo che si riproduce sessualmente sono di due tipi: le cellule germinali e quelle somatiche. Le prime trasmettono l'informazione tra genitore e prole, mentre le seconde formano il corpo dell'organismo. Le cellule germinali devono essere protette contro alti tassi di mutazione per mantenere la specie, cosa che deve avvenire anche nelle cellule somatiche per la corretta formazione di un corpo organizzato. I cambi nucleotidici nelle cellule somatiche possono creare cellule varianti, alcune delle quali attraverso selezione naturale locale proliferano rapidamente. Nei casi estremi si genera un cancro, la cui probabilità aumenta linearmente con il tasso di mutazione. Pertanto sia la perpetuazione di una specie con un gran numero di geni e la prevenzione di cancro che risultano da mutazioni delle cellule somatiche dipendono dall'alta fedeltà con cui le sequenze di DNA sono replicate e mantenute.

6.2 Meccanismi di replicazione del DNA

Tutti gli organismi duplicano il proprio DNA con estrema accuratezza prima di ogni divisione cellulare.

6.2.1 L'accoppiamento delle basi sottostà la replicazione e riparazione del DNA

Il meccanismo che usa la cellula per copiare la sequenza di DNA è il DNA templating che richiede la separazione dell'elica di DNA in due filamenti stampi e il riconoscimento di ogni nucleotide nel filamento stampo da parte del nucleotide libero complementare. La separazione dell'elica espone i gruppi donatori e accettori con legami a idrogeno per ogni base, allineandolo per la polimerizzazione catalizzata da enzimi in una nuova catena di DNA. Il primo di tali enzimi è detto DNA polimerasi: i nucleotidi liberi che formano il substrato sono trifosfati deossiribonucleici e la loro polimerizzazione in DNA richiede un singolo filamento come stampo.

6.2.2 La forcella di replicazione del DNA è asimmetrica

Durante la replicazione ognuno dei due filamenti originali viene utilizzato come stampo per la formazione di un nuovo filamento. Siccome ognuna delle due cellule figlie eredita una nuova doppia

elica contenente un filamento originale e uno nuovo quest'ultima è detta replicata semiconservativamente. Si nota una regione di replicazione localizzata che si muove lungo la doppia elica parentale. A causa della struttura a forma di Y tale regione è detta forcella di replicazione e vi si trova un complesso multienzima che contiene la DNA polimerasi che sintetizza il DNA per entrambi i filamenti figli. Il meccanismo di replicazione del DNA sembra una continua crescita di entrambi i filamenti, ma a causa dell'orientamento antiparallelo il meccanismo richiederebbe la polimerizzazione da 5'-3' per un filamento e da 3'-5' per l'altro e pertanto due tipi diversi di enzimi DNA polimerasi che in realtà riesce a sintetizzare unicamente nella direzione 5'-3'. Il filamento nella direzione opposta viene sintetizzato grazie all'esistenza di segmenti di DNA detti frammenti di Okazaki (1000 – 2000 basi) transitori che si trovano alla forcella di replicazione. Questi sono polimerizzati unicamente nella direzione 5'-3' e sono uniti dopo la sintesi per creare lunghe catene di DNA. La forcella ha una struttura simmetrica e il filamento figlio sintetizzato continuamente è detto il filamento principale la cui sintesi dipende leggermente dal filamento in ritardo la cui sintesi è discontinua e ha direzione opposta alla crescita della sintesi del DNA.

6.2.3 L'alta fedeltà del meccanismo di replicazione del DNA richiede molti meccanismi di correzione

Le coppie complementari standard non sono le uniche possibili: con piccoli cambi nella geometria dell'elica è possibile formare legami tra G e T e esistono rare forme tautomeriche di C che si accoppiano con A. L'alta fedeltà della duplicazione richiede meccanismi di controllo sequenziali che correggono ogni accoppiamento iniziale errato. Il primo passo è fatto dalla DNA polimerasi quando un nuovo nucleotide è aggiunto covalentemente alla catena: quello corretto ha un'affinità più alta con la polimerasi che si muove. Dopo il legame, ma prima dell'addizione covalente alla catena l'enzima subisce un cambio conformazionale in cui si stringe lungo il sito attivo. Lo stringimento avviene più facilmente per le basi incorrette. La seconda reazione di correzione è detta correzione esonucleica avviene quando un nucleotide è aggiunto covalentemente alla catena. La DNA polimerasi è altamente discriminante nelle catene di DNA che allungano: richiedono una base 3' – OH accoppiata con un filamento primari. Queste molecole con un nucleotide sbagliato a tale terminazione del primer non sono efficaci come stampi. Le molecole di DNA polimerasi correggono il primer attraverso un separato sito catalitico (in una diversa subunità o dominio). Questo 3'-5' esonucleasi di correzione elimina ogni residuo non accoppiato o mal accoppiato alla terminazione del primer, continuando fino a che abbastanza nucleotidi sono stati rimossi per generare una terminazione correttamente accoppiata che può iniziare la sintesi. Queste proprietà di autocorrezione della DNA polimerasi dipendono dalla richiesta di un primer a terminazione perfettamente accoppiata, cosa non inclusa nell'RNA polimerasi. La frequenza di errore è di 1 ogni 10^4 eventi di polimerizzazione nella sintesi e traduzione dell'RNA.

6.2.4 Solo la replicazione nella direzione 5'-3' permette una correzione efficiente

La necessità di accuratezza spiega perché la replicazione del DNA avviene solo nella direzione 5'-3': se una DNA polimerasi aggiungesse trifosfati deossiribonucleici nella direzione opposta la terminazione 5' dovrebbe fornire il trifosfato necessario per il legame covalente e gli sbagli non potrebbero essere eliminati attraverso idrolizzazione in quanto la terminazione 5' senza tale gruppo terminerebbe la sintesi. Nonostante tutti questi meccanismi la DNA polimerasi può creare degli errori, che possono essere individuati da un processo detto di riparazione direzionata al filo.

6.2.5 Un enzima che polimerizza i nucleotidi sintetizza corti primer di RNA sul filamento in ritardo

Per il filamento principale è necessario un solo primer all'inizio della replicazione, mentre sul filamento in ritardo ogni volta che la DNA polimerasi completa un corto frammento di Okazaki deve iniziare a sintetizzare un nuovo frammento a un sito più in avanti. Un meccanismo produce il primer necessario e dipende dall'enzima detto DNA primasi, che usa trifosfati ribonucleici per sintetizzare corti primer a RNA sul filamento in ritardo. Si noti come un filamento di RNA può formare legami con uno di DNA, generando una doppia elica ibrida se le sequenze sono complementari e pertanto lo stesso principio di sintesi del DNA guida la sintesi dei primer a RNA. Essendo che un primer a RNA contiene un nucleotide appropriatamente accoppiato con una terminazione $3' - OH$ a una fine può esser allungato dalla DNA polimerasi a questa fine per formare un frammento di Okazaki, sintesi che finisce quando la polimerasi incontra il primer a RNA attaccato alla terminazione $5'$ del segmento pretendente. Per produrre un filamento continuo di DNA si utilizza un sistema di riparazione del DNA che elimina i primer a RNA e li sostituisce con DNA. L'enzima DNA ligasi successivamente unisce la terminazione $3'$ del nuovo segmento con quella $5'$ del vecchio. Il primer a RNA è necessario per mantenere basso il tasso di mutazioni in quanto marca i frammenti come copie sospette.

6.2.6 Proteine speciali aiutano l'apertura della doppia elica sopra la forcella di replicazione

Per permettere la sintesi la doppia elica deve essere aperta prima della forcella di replicazione in modo che i trifosfati desossiribonucleici possano formare coppie di base con i filamenti. Essendo la doppia elica stabile in condizioni fisiologiche sono necessarie la DNA elicasi e un singolo filamento di DNA legato a proteine per aprire la doppia elica in tale ambiente. La DNA elicasi sono state per la prima volta isolate come proteine che idrolizzano l'ATP quando sono legate a un singolo filamento del DNA, reazione che le permette di spingersi lungo un filamento singolo. Quando incontrano una regione a doppia elica continuano a muoversi lungo il proprio filamento separandola a 1000 nucleotidi al secondo. Esistono elicasi che lavorano in entrambe le direzioni della polarità. Proteine che si legano a singoli filamenti di DNA o proteine di destabilizzazione dell'elica si legano strettamente e cooperativamente per esporre singoli filamenti di DNA senza coprire le basi aiutando l'elicasi stabilizzando la conformazione a singolo filamento e impedendo la formazione di corte eliche a forcina nel filamento in ritardo.

6.2.7 Un anello che scivola mantiene una DNA polimerasi in movimento sul DNA

Da sole le molecole di DNA polimerasi sintetizzerebbero una piccola stringa di nucleotidi prima di separarsi dallo stampo. Questa tendenza permette a una polimerasi che ha sintetizzato un frammento di Okazaki di separarsi e essere riciclata velocemente ma rende difficile la sintesi di sequenze lunghe se non fosse per una proteina detta PCNA che funziona come un morsetto scorrevole che mantiene la polimerasi fermamente sul DNA mentre si muove e la rilascia appena incontra una regione a doppia elica. Tale proteina forma un grande anello intorno alla doppia elica. Una faccia si lega al retro della DNA polimerasi, mentre l'intero anello scorre liberamente lungo il DNA. L'assemblaggio di tale proteina richiede un'idrolisi dell'ATP da parte di un complesso proteico detto caricatore di morsetto che idrolizza l'ATP mentre carica il morsetto su una giunzione primer. Sul filamento principale la DNA polimerasi è strettamente legata al morsetto e i due rimangono associati per molto tempo. Sul filamento in ritardo ogni volta che la polimerasi arriva alla terminazione $5'$ del frammento di Okazaki

si rilascia dal morsetto e si dissocia dallo stampo. Questa molecola si associa successivamente con un nuovo morsetto assemblato sul primer a RNA del successivo frammento.

6.2.8 Le proteine a una forcella di replicazione cooperano per formare una macchina di replicazione

Le proteine coinvolte nella replicazione sono ordinate in un complesso multienzima che si mantiene stazionario rispetto all'ambiente con il DNA che si muove al suo interno. All'inizio della forcella di replicazione la DNA elicasi apre l'elica dove due molecole di DNA polimerasi lavorano sul filamento principale e quello in ritardo, la prima in maniera continua la seconda in piccoli intervalli. L'associazione stretta di queste proteine aumenta l'efficienza della replicazione ed è permessa da un piegamento all'indietro del filamento in ritardo. Questo ordinamento facilita il caricamento del morsetto polimerasi ogni volta che un frammento di Okazaki è sintetizzato. Le proteine di replicazione sono legate insieme in una singola grande unità ($> 10^6$ dalton) permettendo una sintesi efficiente e coordinata.

6.2.9 Un sistema di riparazione direzionato al filamento rimuove gli errori di replicazione che sfuggono alla macchina di replicazione

Una classe di mutanti possiede alterazioni nei geni mutatori che aumentano il tasso di mutazioni spontanee: alcuni di essi possiedono forme difettive di esonucleasi di correzione. Questo studio ha scoperto un meccanismo che rimuove errori di replicazioni e sfuggiti all'esonucleasi detto sistema di strand-directed mismatch repair che individua potenziali distorsioni nell'elica del DNA e corregge uno dei due nucleotidi scorretti: per essere corretto deve essere in grado di distinguere e rimuovere gli error solo nei nuovi filamenti. Nei procarioti viene utilizzato un meccanismo di distinzione dei filamenti che dipende dalla metilazione di residui di A nel GATC gruppi metile sono aggiunti in tutti i residui nella sequenza GATC, ma non fino a che è passato abbastanza tempo: pertanto le uniche sequenze GATC non metilate si trovano unicamente nel filamento dietro la forcella di replicazione. Il riconoscimento di GATC non metilati permette a nuovi filamenti di DNA di essere distinti dai vecchi. Il processo per questa correzione coinvolge pertanto il riconoscimento del filamento, l'escissione della porzione che contiene la mancata corrispondenza e la risintesi del segmento escisso con il vecchio stampo. Questo sistema riduce il numero di errori di un fattore tra 100 e 1000. Nelle cellule eucariotiche viene utilizzato un altro metodo per riconoscere il nuovo filamento: i nuovi filamenti in ritardo contengono transientemente nicks o single-strand breaks che forniscono il segnale che direziona il sistema di correzione. Questa strategia richiede che anche il filamento principale sia nicked.

6.2.10 La DNA topoisomerasi impedisce l'ingarbugliamento del DNA durante la replicazione

Mentre la forcella di replicazione si muove lungo il DNA crea il problema dell'avvolgimento: due filamenti genitori devono essere srotolati in modo da permettere la replicazione. In principio questo srotolamento può essere ottenuto rapidamente ruotando il cromosoma lungo la forcella ma è sfavorevole per cromosomi lunghi, pertanto solo il DNA davanti alla forcella viene srotolato e il sovraarrotolamento è rilassato dalla DNA topoisomerasi, associabile a una nucleasi reversibile che si aggiunge al backbone fosfato rompendo i legami fosfodiersteri nel filamento che si riforma quando la proteina va via. La topoisomerasi 1 produce una rottura a filamento singolo transiente che permette a due sezioni dell'elica del DNA tra le due parti del nick di ruotare liberamente tra di loro utilizzano

6.3. INIZIALIZZAZIONE E COMPLETAMENTO DELLA REPLICAZIONE DEL DNA NEI CROMOSOMI

i legami fosfodiesteri come pivot. Tensione nell'elica guida la rotazione nella direzione che la elimina: la replicazione avviene con la rotazione di piccole sezioni della sequenza. Siccome il legame con la proteina mantiene l'energia del legame fosfodiesteri la ricreazione di esso è rapida e non richiede energia esterna. La topoisomerasi II forma un legame covalente con entrambi i filamenti del DNA, creando una rottura in entrambi transiente. Questi enzimi sono attivati dai siti sul cromosoma dove le doppie eliche si incrociano come quelle generate da un sovraavvolgimento in una forcella di replicazione. Quando una molecola di topoisomerasi II si lega in un sito di incrocio usa l'idrolisi dell'ATP per rompere una doppia elica irreversibilmente creando un gate di DNA, causa la seconda vicina doppia elica di passare nell'apertura e successivamente riunisce l'elica rotta e si dissocia dal DNA. Il passaggio della doppia elica nel gate avviene nella direzione che causa l'eliminazione del sovraavvolgimento. Può anche separare due cicli di DNA interbloccati.

6.2.11 La replicazione del DNA è fundamentalmente simile in eucarioti e batteri

Molto di quello che è conosciuto dell'enzimologia della replicazione del DNA negli eucarioti è stata conservata durante il processo evolutivo che ha separato batteri ed eucarioti. Pur essendoci più proteine per i secondi le funzioni di base sono le stesse.

6.3 Inizializzazione e completamento della replicazione del DNA nei cromosomi

6.3.1 La sintesi del DNA inizia alle origini di replicazione

Essendo la doppia elica stabile per iniziare la replicazione deve essere aperta e i due filamenti separati, processo svolto da proteine iniziatrici che si legano alla doppia elica e separano i due filamenti rompendo i corrispondenti legami a idrogeno. Queste regioni in cui la doppia elica viene aperta sono dette origini di replicazione, specificate da sequenze di nucleotidi che attraggono proteine iniziatrici e altre lunghezze facili da aprire: A e T sono mantenute insieme da meno legami a idrogeno rispetto a C e G. Il processo alla base è lo stesso per batteri ed eucarioti, ma differisce nel modo in cui il processo avviene e come è regolato.

6.3.2 I cromosomi batterici hanno un'origine singola per la replicazione

Il genoma dell'E. coli è contenuto in una molecola di DNA circolare. La replicazione inizia ad un singolo sito e le due forcelle di replicazione procedono in direzioni opposte fino a che si incontrano. L'unico punto in cui la replicazione può essere controllata è l'inizio. Il processo inizia quando le proteine iniziatrici legate a ATP si legano in copie multiple in siti specifici del DNA avvolgendolo formando un complesso DNA-proteine che destabilizza la doppia elica vicina. Questo complesso attrae due DNA elicasi, legate a un caricatore elicasi, analogo al caricatore di morsetti ma che mantiene l'elicasi in una forma inattiva fino a che è propriamente caricata sulla forcella di replicazione nascente. Una volta che è caricata si dissocia e l'elicasi inizia a svolgere il DNA esponendo i filamenti in modo che la DNA primasi possa sintetizzare il primo primer a RNA che porta all'assemblaggio delle proteine necessarie per creare due forcelle di replicazione che continuano a sintetizzare il DNA fino a che tutto lo stampo è stato replicato. L'interazione tra le proteine iniziatrici con l'origine di replicazione è regolata, permettendo l'inizio del processo solo se ci sono nutrienti sufficienti per completarlo e che solo una replicazione avvenga per divisione cellulare. Dopo che la replicazione

6.3. INIZIALIZZAZIONE E COMPLETAMENTO DELLA REPLICAZIONE DEL DNA NEI CROMOSOMI

è iniziata la proteina iniziatrice è disattivata dall'idrolisi dell'ATP e l'origine di replicazione ha un periodo refrattario causato da un ritardo della metilazione dei nuovi nucleotidi A nell'origine. L'iniziazione non può accadere fino a che le A sono metilate e la proteina iniziatrice è riportata allo stato legato all'ATP.

6.3.3 I cromosomi eucariotici contengono multiple origini di replicazione

Le forcelle di replicazione eucariotiche si muovono di circa 50 nucleotidi al secondo a causa dello stato più denso della cromatina. Si è notato come sono presenti da 30'000 a 500'000 origini di replicazione per la divisione di una cellula umana in modo che una cellula possa coordinare le regioni attive con altre caratteristiche dei cromosomi come i geni che sono espressi. Le forcelle di replicazione sono formate in coppie e creano una bolla di replicazione che si muove in direzioni opposte da un punto di origine comune, che si fermano quando collidono con un'altra forcella che si muove nella direzione opposta. Molte forcelle di replicazione operano indipendentemente su ogni cromosoma e formano due eliche di DNA figlie complete.

6.3.4 Negli eucarioti la replicazione del DNA avviene durante un'unica parte del ciclo vitale della cellula

Se i batteri replicano il DNA quasi continuamente negli eucarioti questo avviene solo durante la fase S o di sintesi del DNA che in una cellula mammifera dura circa 8 ore, al termine delle quali ogni cromosoma è stato completamente replicato in due coppie che rimangono unite al centromero fino alla fase M.

6.3.5 Diverse regioni dello stesso cromosoma si replicano a tempi distinti durante la fase S

Le origini di replicazione non sono tutti attivate allo stesso momento, ma in cluster di circa 50 adiacenti, ognuna delle quali è replicata durante una piccola parte della fase S. L'ordine di attivazione dipende in parte dalla struttura cromatinica: l'eterocromatina nell'ultima parte della fase in quanto il ritardo potrebbe essere in relazione con la decondensazione della cromatina. Le forcelle di replicazione si muovono ad una velocità costante durante la fase S.

6.3.6 Un grande complesso multisubunità si lega alle origini di replicazione eucariotiche

La maggior parte delle sequenze di DNA che devono come origini di replicazione contengono un sito di legame per una proteina iniziatrice formata da molte subunità detta ORC (origin recognition complex), una lunghezza di DNA ricca in A e T e almeno un sito di legame per proteine che facilitano il legame dell'ORC modificando la struttura cromatinica. Per garantire che tutto il DNA sia copiato una e una sola volta le elicasi replicative vengono caricate sequenzialmente sulle origini e attivate per iniziare la replicazione del DNA. Durante la fase G_1 le elicasi replicative sono caricate sul DNA vicino all'ORC per creare un complesso prereplicativo. Successivamente proteine chinasi specializzate attivano l'elicasi. L'apertura della doppia elica permette il caricamento delle proteine di replicazione rimanenti come la DNA polimerasi. La chinasi che inizia la replicazione previene l'assemblaggio di nuovi complessi prereplicativi fino alla fase M successiva che ripristina l'intero ciclo. Lo fanno fosforilando l'ORC rendendolo incapace di accettare nuove elicasi. Pertanto il complesso

6.3. INIZIALIZZAZIONE E COMPLETAMENTO DELLA REPLICAZIONE DEL DNA NEI CROMOSOMI

prereplicativo può formarsi unicamente nella fase G_1 , mentre può essere attivato e disassemblato unicamente nella fase S , due fasi mutualmente esclusive.

6.3.7 Nuovi nucleosomi sono assemblati in coda alla forcella di replicazione

La duplicazione dei cromosomi richiede la sintesi e assemblaggio di nuove proteine cromosomiche sul DNA in coda alla forcella. La cellula richiede un gran numero di nuove proteine istoni in massa uguale al nuovo DNA sintetizzato per creare nuovi nucleosomi in ogni ciclo della cellula, pertanto gli organismi possiedono multiple copie del gene per ogni istone. Gli istoni sono sintetizzati principalmente nella fase S , quando il livello di mRNA istone aumenta di 50 volte e degradati alla fine della fase. Le proteine istone invece sopravvivono per l'intera vita della cellula. Il collegamento tra sintesi del DNA e degli istoni riflette un meccanismo di feedback che monitora il livello degli istoni liberi per garantire che le quantità siano uguali. Quando la forcella di replicazione avanza e passa attraverso nucleosomi del genitore e pertanto è richiesto un complesso di rimodellamento della cromatina che destabilizza le interfacce DNA-istone in modo che la forcella possa superarle efficientemente. Mentre la forcella di replicazione passa attraverso la cromatina gli istoni sono spostati. Quando un nucleosoma viene attraversato l'ottamero istonico viene rotto in un tetramero H3-H4 e due dimeri H2A-H2B. Il primo rimane associato debolmente con il DNA ed è distribuito a caso tra uno dei due figli, mentre i dimeri sono completamente rilasciati. I tetrameri H3-H4 recentemente sintetizzati sono aggiunti per riempire i buchi e i dimeri, metà vecchi e metà nuovi sono aggiunti a caso per completare il nucleosoma. La lunghezza dei frammenti di Okazaki è determinata dal punto in cui la DNA polimerasi è bloccata da un nuovo nucleosoma. Pertanto i frammenti hanno la stessa lunghezza della lunghezza di ripetizione dei nucleosomi. L'aggiunta di tetrameri e dimeri richiede accompagnatori istoni o fabbriche di assemblaggio di cromatina, complessi a multisubunità che si legano agli istoni altamente basici e li rilasciano solo nel contesto appropriato e diretti verso il DNA appena replicato attraverso un'interazione specifica con il morsetto PCNA che rimangono sul DNA abbastanza a lungo per permettere ai primi di completare il loro compito.

la telomerasi replica la fine dei cromosomi

Il meccanismo di replicazione del filamento in ritardo incontra problemi alla fine del cromosoma lineare: l'RNA primer finale non può essere sostituito dal DNA in quanto non c'è una fine $3' - OH$ disponibile per la polimerasi di riparazione. I batteri risolvono il problema con DNA circolare, mentre gli eucarioti attraverso sequenze specializzate dette telomeri che contengono molte ripetizioni di sequenze corte (negli umani GGGTTA), riconosciute dall'enzima telomerasi che le rifornisce ogni volta che la cellula si divide. La telomerasi riconosce la fine di un telomero e la allunga nella direzione $5' - 3'$ utilizzando uno stampo a RNA componente dell'enzima stesso per sintetizzare nuove copie della ripetizione. Dopo l'estensione del filo genitore della telomerasi la replicazione del filamento in ritardo può essere completata dalla DNA polimerasi standard che usa queste estensioni per sintetizzare il filamento complementare.

6.3.8 I telomeri sono condensati in strutture specializzate che proteggono la fine dei cromosomi

I telomeri devono essere in grado di distinguere tra le rotture accidentali del cromosoma: una nucleasi specializzata si attacca alla fine $5'$ dei cromosomi lasciando protrudere un singolo filamento che in combinazione con le ripetizioni di GGGTTA attrae un gruppo di proteine che formano un

cappuccio detto shelterin che nasconde i telomeri dai rivelatori di danni che monitorano il DNA: la fine protrudente del DNA si infila nella sequenza ripetuta del telomero. Questi anelli a T sono regolati dal shelterin e proteggono ulteriormente la fine del cromosoma.

6.3.9 La lunghezza dei telomeri è regolata dalla cellula e dagli organismi

Essendo i processi che fanno crescere e riducono ogni sequenza di telomeri sono bilanciati approssimativamente una fine cromosomica contiene un numero variabile di ripetizioni telomeriche. Molte cellule hanno un numero di meccanismi omeostatici che mantengono il numero di queste ripetizioni in intervallo. Nella maggior parte delle divisioni cellulari i telomeri si accorciano gradualmente per limitare la proliferazione di cellule ribelli nei tessuti adulti. Le ripetizioni telomeriche sono erose in quantità diverse in tipi diversi di cellule grazie a un enzima che non può tenere il passo con la duplicazione. Dopo molte generazioni le cellule discendenti avranno cromosomi senza funzione telomerica e attivano una risposta ad danni del DNA che causa la fine del ciclo cellulare e della duplicazione in un processo detto replicative cell senescence.

6.4 Riparazione del DNA

Mantenere la stabilità genetica per la vita richiede meccanismi per riparare le lesioni accidentali che continuano ad avvenire. La maggior parte dei cambi nel DNA sono immediatamente corretti da un insieme di proteine dette DNA repair. Solo lo 0.02% dei cambi del DNA si accumula come permutazioni permanenti. Una grande parte della capacità di codifica dei genomi è utilizzata per queste proteine.

6.4.1 Senza la riparazione del DNA, danni spontanei cambierebbero rapidamente la sequenza del DNA

Nonostante il DNA sia un materiale altamente stabile è una molecola organica complessa suscettibile a cambi spontanei che porterebbero a mutazioni se lasciate non riparate. Il DNA della cellula umana perde circa 18'000 basi purine ogni giorno a causa dei legami N-glicosilici al deossiribosio si idrolizzano nella depurinazione. Similmente una deaminazione della citosina nell'uracile accade a circa 100 basi per cellula al giorno. Le basi del DNA possono essere danneggiate da una collisione con metaboliti reattivi prodotti nella cellula come forme reattive di ossigeno o il donatore di metile S-adenosilmetionine o da radiazioni ultraviolette. Se lasciate non corrette queste modifiche porterebbero alla cancellazione di basi o a sostituzioni durante la replicazione con conseguenze disastrose.

6.4.2 La doppia elica del DNA è prontamente riparata

La struttura a doppia elica del DNA è adatta alla riparazione in quanto porta due copie dell'informazione genetica, pertanto quando un filamento è danneggiato quello complementare mantiene una copia intatta della stessa informazione che viene utilizzata durante la riparazione. I tipi di processi di riparazione presentati non possono operare su DNA o RNA a singolo filamento.

6.4.3 Danni al DNA possono essere rimossi attraverso molti cammini

Le cellule hanno diversi modi per riparare il DNA utilizzando diversi enzimi che agiscono in base alla lesione. Nei due cammini più comuni il danno è asportato e la sequenza originale è ripristinata

dalla DNA polimerasi utilizzando il filamento non danneggiato come stampo. Differiscono riguardo a come eliminano il danno. Nel primo cammino detto riparazione tramite asportazione della base coinvolge un insieme di enzimi detti DNA glicosilasi che possono riconoscere un tipo specifico di base nel DNA e catalizzare la rimozione idrolitica. Ne esistono al meno sei tipi, come quelli che rimuovono C e A deamminate, diversi tipi di basi alcalinate o ossidate, basi con anelli aperti e quelle in cui un doppio legame carbonio-carbonio è stato convertito in un legame singolo. Una base alterata viene riconosciuta in un processo con un passo base in cui avviene un flip-out del nucleotide danneggiato dall'elica mediato da un enzima che permette alla DNA glicosilasi di controllare tutte le parti della base per danni. Questi enzimi si muovono lungo tutto il DNA alla ricerca di danni. Quando viene trovata una base danneggiata la rimuove dallo zucchero. Il buco creato dalla DNA glicosilasi è riconosciuto da un enzima detto AP endonucleasi che taglia il backbone a fosfodiester e il vuoto lasciato è riparato. La depurinazione lascia uno zucchero con una base mancante e sono pertanto riparate direttamente con un AP endonucleasi. Il secondo cammino principale è detto riparazione a asportazione del nucleotide. Questo meccanismo può riparare danni causati da grandi cambi nella struttura della doppia elica. Un grande complesso multienzimico scansiona il DNA alla ricerca di una distorsione della doppia elica e la DNA elicasi rimuove il singolo filamento contenente la lesione. Il grande gap prodotto è riparato dalla DNA polimerasi e dalla DNA ligasi. Un'alternativa a questi meccanismi è la reversione chimica diretta, utilizzata selettivamente per la rapida rimozione di lesioni altamente mutagene o citotossiche.

6.4.4 L'accoppiamento di riparazione a asportazione di nucleotidi con la trascrizione garantisce che il DNA più importante è riparato efficientemente

Tutto il DNA è sotto costante sorveglianza per i danni, ma le cellule possiedono modi per direzionare la riparazione a sequenze che sono richieste urgentemente. Lo fanno legando la polimerasi al cammino di riparazione a asportazione di nucleotidi. La RNA polimerasi stalla a queste lesioni e attraverso proteine di accoppiamento direziona il complesso di riparazione a questi siti. La RNA polimerasi viene poi fatta riprendere da dove si era fermata con una reazione complessa.

6.4.5 La chimica delle basi del DNA facilita l'individuazione dei danni

La doppia elica del DNA sembra ottima per la riparazione e la natura delle quattro basi rende chiara la distinzione tra quelle danneggiate e non danneggiate ogni possibile deaminazione presente nel DNA presenta una base innaturale che può essere riconosciuta e rimossa da una DNA glicosilasi specifica. L'uracile nell'RNA è stato sostituito dalla timina in quanto se no il sistema di riparazione non sarebbe stato in grado di distinguere una C deaminata da una U naturale.

6.4.6 Speciali translesion della DNA polimerasi sono usate durante emergenze

Se il DNA soffre di danni pesanti si rende necessaria una strategia diversa: la replicazione della DNA polimerasi si ferma quando incontra DNA danneggiato e in emergenze vengono utilizzate altre polimerasi, versatili ma meno accurate dette translesion polimerasi per replicare attraverso il danno. Tali polimerasi possono riconoscere un tipo specifico di danno e aggiungere i nucleotidi necessari per ripristinare la sequenza iniziale. Altri fanno congetture educate. Non hanno un meccanismo di proofreading esonucleico e sono meno discriminanti nella scelta dell'incorporazione del nucleotide e

possono pertanto aggiungere solo pochi nucleotidi alla volta. Queste polimerasi portano rischi alla cellula a causa della loro imprecisione.

6.4.7 Rotture nel doppio filamento sono efficientemente riparate

Un tipo di danno al DNA pericoloso avviene quando entrambi i filamenti della doppia elica sono rotti, lasciando nessun filamento stampo capace di riparare il danno accuratamente. Due meccanismi vengono utilizzati per riparare a questi danni. Il primo è l'unione delle terminazioni non omologo in cui le terminazioni rotte sono riunite da DNA ligation con la perdita dei nucleotidi nel sito dell'unione. Questo meccanismo è comune delle cellule somatiche dei mammiferi. Ha come risultato una mutazione e può inoltre unire due parti del cromosoma non inizialmente insieme. Il secondo tipo è detto ricombinazione omologa. Entrambi vengono utilizzati, il secondo solo durante e poco dopo la replicazione quando cromatidi sorelle sono disponibili come stampo.

6.4.8 Danno al DNA ritarda la progressione del ciclo cellulare

Le cellule possono riconoscere molti tipi di danni e gli enzimi sono rendono efficiente la riparazione ritardando la progressione del ciclo cellulare fino a che la riparazione è completa. Questi ritardi facilitano la riparazione rendendo disponibile il tempo necessario affinché i meccanismi si completino. I danni risultano anche in una maggiore sintesi di enzimi di riparazione attraverso speciali proteine di segnale che percepiscono i danni e regolano l'espressione genica.

6.4.9 Riparazione omologa

Un ulteriore meccanismo di riparazione del DNA è detta ricombinazione omologa, la cui caratteristica fondamentale è uno scambio di filamenti di DNA tra un paio di duplex omologhi della sequenza di DNA, segmenti di doppia elica che sono molto simili nella sequenza nucleotidica. Questo scambio permette a una lunghezza di DNA duplex di essere stampo per ripristinare informazioni perse o danneggiate. Essendo non legata al filamento complementare al danno è molto versatile. È il modo in cui vengono riparate rotture a doppio filamento. Questi danno la maggior parte delle volte nascono quando la forcella di replicazione si stalla o viene rotta indipendentemente. La ricombinazione omologa corregge questi errori ed è fondamentale per ogni cella proliferante. È il meccanismo più versatile. Inoltre durante la meiosi catalizza lo scambio di informazioni genetiche tra cromosomi omologhi materni e paterni creando nuove combinazioni di sequenza di DNA passata ai discendenti.

6.4.10 L'accoppiamento delle basi del DNA guida la ricombinazione omologa

La ricombinazione omologa avviene unicamente tra duplex di DNA che hanno regioni di sequenza estensiva omologhe. I due duplex che stanno svolgendo ricombinazione omologa testano la sequenza dell'altro da un duplex e un singolo filamento dell'altro. La corrispondenza non deve essere perfetta ma deve essere molto simile. L'interazione di accoppiamento di basi può essere imitato permettendo a una doppia elica di riformarsi dai singoli filamenti nel processo di DNA rinaturazione o ibridazione che avviene quando rare collisioni giustappongono nucleotidi complementari su due filamenti singoli, permettendo la creazione di corte lunghezze di doppia elica. Questa parte lenta è seguita da un zippering in cui la regione di doppia elica si estende per massimizzare il numero di reazioni che accoppiano le basi. L'ibridazione può creare regioni di doppia elica consistenti di filamenti che si sono originati da molecole duplex diverse se sono similmente complementari. La ricombinazione omologa

avviene attraverso un insieme di reazioni che permettono a due duplex del DNA di campionare le rispettive sequenze senza dissociarsi in singoli filamenti.

6.4.11 La ricombinazione omologa può riparare perfettamente rotture a doppio filamento nel DNA

La ricombinazione omologa può riparare doppi filamenti accuratamente, senza alcuna perdita o alterazione al sito di riparazione. Per fare questo il DNA danneggiato deve essere avvicinato dal DNA omologo che serve da stampo per la riparazione. Per questa ragione il processo avviene dopo la replicazione, che può creare rischi di incidenti che richiedono questa riparazione. Il cammino più semplice per la riparazione mostra come il duplex di DNA danneggiato e l'omologo si ingarbugliano in modo che uno dei filamenti danneggiati può usare il complementare del duplex intatto come stampo. Le terminazioni del DNA danneggiato sono resecati da nucleasi per produrre terminazioni 3' a filamento singolo protrudenti. Successivamente avviene uno scambio di filamenti o strand invasion in cui una terminazione a filamento singolo 3' dalla molecola danneggiata entra nel duplex stampo e cerca per la sequenza omologa attraverso accoppiamento delle basi. Dopo che questo è avvenuto una polimerasi estende il filamento invasore utilizzando l'informazione fornita dallo stampo ripristinando l'informazione. Infine i filamenti si separano, avviene altra sintesi di riparazione e legatura ripristinano le doppie eliche originali e completano il processo di riparazione.

6.4.12 Il cambio di filamenti avviene grazie la proteina RecA/Rad51

La proteina che compie lo scambio di filamenti avviene grazie alla proteina RecA in *E. coli* e Rad51 negli eucarioti. Per catalizzare lo scambio la proteina si lega cooperativamente al filamento invasore, facendo in modo che l'insieme forzi i lDNA in gruppi di tre nucleotidi consecutivi mantenuti come in una doppia elica convenzionale ma tra triplette adiacenti il backbone è svolto e allungato. Questo filamento si lega al duplex DNA in modo da allungarlo, destabilizzandolo e rendendo la separazione dei filamenti semplice. Il filamento invasore può poi campionare la sequenza attraverso accoppiamento di basi, che avviene in blocchi di triplette: se una corrispondenza è trovata si prova la prossima tripletta e così via. RecA idrolizza l'ATP e i passaggi precedenti richiedono che ogni monomero di RecA siano legati con esso, ma la ricerca non richiede l'idrolisi, avvenendo per collisione molecolare. Una volta che la reazione è completa l'idrolisi è necessaria per disassemblare RecA dal complesso delle molecole di DNA e la DNA polimerasi e DNA ligasi possono completare il processo di riparazione.

6.4.13 La ricombinazione omologa può salvare forcelle di replicazione danneggiate

Il ruolo più importante della ricombinazione omologa è che salva forcelle di replicazione in stallo o danneggiato. Una causa possono essere intervalli vuoti nell'elica di DNA sopra la forcella che quando sono raggiunti causano la sua rottura.

6.4.14 Le cellule regolano l'uso della ricombinazione omologa durante la riparazione del DNA

La ricombinazione omologa presenta dei rischi alla cellula in quanto può riparare a danni usando bit di genoma sbagliati come stampo. Un cromosoma umano danneggiato può essere riparato usando l'omologo da altri parenti invece che dalla cromatide sorella, convertendo la sequenza del DNA

riparato dalla sequenza materna a quella paterna o viceversa. Questo causa una perdita di eterozigotà, passaggio critico nella formazione di molti cancro. Per minimizzare il rischio di errori ogni passaggio del processo è regolato. Il processamento delle terminazioni danneggiate è coordinato con la divisione cellulare: gli enzimi di nucleasi che causano questo processo sono attivati in parte da fosforilazione solo nelle fasi S e G_2 quando un duplex figlio può essere utilizzato come stampo per la riparazione aiutato dalla prossimità. Il caricamento di RecA e Rad52 è controllato attraverso una serie di proteine accessori come Rad52 in modo da rendere il processo accurato ed efficiente. Sono create ad alto livello negli eucarioti e trasportate nel nucleo in una forma inattiva. Quando avviene un danno convergono rapidamente nel sito e attivano.

6.4.15 La ricombinazione omologa è cruciale per la meiosi

La ricombinazione omologa viene usata come metodo per trasportare nuove combinazioni di geni come risultato di scambio di materiale genetico tra diversi cromosomi, parte necessaria per la meiosi. Diventa parte integrale del processo dove cromosomi sono separati a cellule germinali producendo cromosomi attraverso crossing-over e conversione dei geni, creando cromosomi ibridi che contengono informazioni sia materne che paterni. Il processo di base è lo stesso.

6.4.16 La ricombinazione meiotica comincia con una rottura a doppio filamento programmata

La ricombinazione meiotica inizia con una proteina specializzata che rompe entrambi i filamenti dell'elica in un cromosoma ricombinante e come una topoisomerasi rimane legata covalentemente al DNA rotto. Una nucleasi specializzata degrada la terminazione legata dalla proteina, rimuovendola e lasciando una terminazione 3' protrudente. Molte proteine specifiche alla meiosi direzionano le altre in modo da svolgere il processo in maniera leggermente diversa. Inoltre la ricombinazione avviene tra cromosomi materni e paterni.

6.4.17 Le giunzioni di Holliday sono formate durante la meiosi

Nella meiosi un intermedio detto giunzione di Holliday o scambio cross-strand può adottare multiple conformazioni e un insieme speciale di proteine di ricombinazione che vi si legano e stabilizzano l'isomero simmetrico aperto. Le proteine che legano le giunzioni possono catalizzare una reazione di branch migration dove il DNA è avvolto attraverso la giunzione rompendo e riformando accoppiamenti di basi. Le giunzioni utilizzano l'idrolisi dell'ATP per espandere le regioni di DNA eteroduplex inizialmente create dalla reazione di scambio di filamento. Tipicamente si formano in coppie.

6.4.18 La ricombinazione omologa produce crossover e non-crossover durante la meiosi

Durante la meiosi ci sono due risultati della ricombinazione omologa: negli umani il 90% delle rotture del doppio filamento si risolvono come non-crossover: i due duplex si separano in una forma non alterata ad eccezione di una regione eteroduplex vicino al sito della rottura. L'altro risultato è dovuto alla formazione e taglio di una doppia giunzione di Holliday con un enzima specializzato per la formazione di un crossover: le due porzioni originali di ciascun cromosoma sono scambiate, creando due cromosomi che hanno fatto crossover. I crossover che si formano sono distribuiti nel cromosoma in modo che il crossover in una posizione inibisce crossing-over nelle regioni vicine. Il meccanismo regolatorio associato non è capito ma viene detto crossover control garantisce la

distribuzione costante dei punti di crossover e assicura che ogni cromosoma svolga un crossover ogni meiosi. Circa due crossover avvengono per cromosoma e svolgono importante ruolo meccanico nella segregazione dei cromosomi durante la meiosi. La macchina di ricombinazione lascia una regione eteroduplex con un singolo filamento con la sequenza di DNA dell'omologo paterno accoppiato con un filamento dell'omologo materno. Queste regioni possono tollerare un piccolo numero di coppie non corrispondenti, marcando siti di conversione genica potenziale.

6.4.19 La ricombinazione omologa solitamente causa conversione genica

È una regola fondamentale della genetica che a parte il DNA mitocondriale, ereditato dalla madre, ogni genitore faccia una contribuzione genetica uguale alla discendenza. Un insieme completo di geni è ereditato dalla madre e uno dal padre. Sottostante a questa legge si trova l'accurata separazione di cromosomi a cellule germinali durante la meiosi. Quando una cellula diploide in un genitore fa la meiosi per produrre quattro cellule germinali aploidi metà dei geni dovrebbero essere materne e l'altra metà paterne. Versioni alternative dello stesso gene sono dette alleli e la divergenza dalla distribuzione aspettata durante la meiosi è detta conversione genica, che avviene per una piccola parte del genoma e in molti casi parte di un gene viene cambiata. Molti cammini possono causare la conversione genica, ma uno dei più importanti nasce come conseguenza della ricombinazione durante la meiosi: se i due filamenti parte di una regione eteroduplex non possiedono sequenze identiche si formano coppie di basi errate e pertanto si utilizza a caso lo stampo materno o paterno per la riparazione e pertanto un allele sarà perso e l'altro duplicato.

6.5 Trasposizione e ricombinazione specifica al sito conservativa

L'ordine dei geni sui cromosomi che subiscono la ricombinazione omologa è lo stesso. La trasposizione e ricombinazione conservativa specifica al sito sono ricombinazioni che non richiedono regioni di DNA omologo sostanziale. Queste due reazioni di ricombinazioni possono alterare l'ordine dei geni in un cromosoma e tipi di mutazioni che introducono nuovi blocchi di DNA nel genoma. Sono dedicate a muovere una grande varietà di segmenti di DNA specializzati o elementi genetici mobili da una posizione all'altra. Spesso uno di questi geni codifica un enzima che catalizza il movimento dell'elemento rendendo questa ricombinazione possibile. Tutte le cellule contengono elementi genetici mobili che hanno avuto un ruolo evolutivo profondo nella formazione del genoma odierno. Sono considerati parassiti molecolari che persistono in quanto la cellula non può eliminarli, ma possono anche creare benefici a essa. Il loro movimento produce molte varianti genetiche da cui dipende l'evoluzione in quanto possono riordinare sequenze vicine dell'ospite.

6.5.1 Attraverso la transizione gli elementi genetici mobili possono inserirsi in ogni sequenza di DNA

Gli elementi che si muovono per trasposizione sono detti trasposoni. In questo processo un enzima specifico codificato dal trasposone detto trasposasi agisce su una sequenza di DNA specifica a ogni fine del trasposone causando il suo inserimento in un nuovo sito di DNA obiettivo. La maggior parte sono poco selettivi e possono inserirsi in locazioni diverse nel genoma. La maggior parte si muovono raramente. I trasposoni possono essere classificati in base a struttura e meccanismo di trasposizione in trasposoni solo a DNA retrotrasposoni simili ai retrovirus e retrotrasposoni non retrovirali.

6.5.2 Trasposoni solo a DNA si possono muovere attraverso un meccanismo a copia-incolla

Questi trasposoni esistono unicamente come DNA durante il loro movimento sono predominanti nei batteri e sono responsabili per la resistenza agli antibiotici. Nonostante questi elementi mobili possono traspirarsi solo all'interno della cellula si possono muovere tra cellule attraverso il trasferimento di geni orizzontale. Una volta introdotti nella nuova cellula si possono inserire nel genoma ed essere passati a tutta la progenie. Si possono spostare da un sito donatore a uno obiettivo attraverso una trasposizione copia-incolla dove il trasposone è asportato da un luogo del genoma e inserito in un altro. La reazione produce una corta duplicazione della sequenza obiettivo al sito di inserzione, ripetizioni che affiancano il trasposone servono come records di eventi di trasposizione precedenti. Quando il trasposone è asportato dal luogo originale lascia un buco nel cromosoma la cui lesione può essere riparata da un sistema di riparazione a doppio filamento se il cromosoma è stato appena replicato e esiste una copia dell'ospite. Alternativamente una reazione di unione delle terminazioni non omologa avviene e la sequenza del DNA a fianco del trasposone è modificata, producendo una mutazione nel sito da cui il trasposone si è asportato.

6.5.3 Alcuni virus usano un meccanismo di trasposizione per muoversi nel cromosoma della cellula ospite

Alcuni virus sono considerati elementi genetici mobili in quanto usano meccanismi di trasposizioni per integrare i loro genomi nella cellula ospite, codificando proteine che incapsulano la loro informazione genetica in particelle virali che possono infettare altre cellule. La trasposizione ha un ruolo fondamentale nel ciclo vitale dei virus come i retrovirus: al di fuori della cellula esistono come un singolo filamento di RNA incapsulato in un capsido proteico con un enzima trascrittasi inversa. Durante il processo di infezione l'RNA virale entra la cellula ed è convertito in un doppio filamento di DNA dall'enzima che può polimerizzare DNA su uno stampo a RNA o DNA. Il termine retrovirus si riferisce alla capacità del virus di invertire il flusso delle informazioni genetiche. Una volta che la trascrittasi inversa ha prodotto la molecola di DNA sequenze specifiche nelle sue terminazioni sono riconosciute da una trasposi chiamata integrasi che lo inserisce nel cromosoma con un meccanismo simile dai trasposoni solo a DNA.

6.5.4 Retrotrasposoni simili ai retrovirus assomigliano ai retrovirus ma non possiedono un capsido

Una famiglia di trasposoni detta retrotrasposoni simili ai retrovirus si muove dentro e fuori i cromosomi con un meccanismo simile a quello dei retrovirus. Questi elementi sono presenti in organismi diversi e non hanno la capacità di lasciare la cellula residente. Il primo passo nella loro trasposizione è la trascrizione dell'intero trasposone, producendo una copia a RNA dell'elemento che è tradotto come un RNA messaggero nella cellula codifica un enzima di trascrittasi inversa che forma una copia di DNA a doppia elica della molecola di RNA attraverso un intermedio RNA-DNA ibrido che viene poi integrato nel cromosoma con un enzima di integrasi codificato dall'elemento.

6.5.5 Una grande frazione del genoma umano è composta di retrotrasposoni nonvirali

Una frazione significativa di molti cromosomi dei vertebrati è composta da sequenze di DNA ripetute che, negli umani, sono principalmente versioni mutate e troncate di retrotrasposoni nonvirali.

La maggior parte sono ormai immobili, ma una piccola parte è ancora capace di muoversi. Questi trasposoni si muovono attraverso un meccanismo che richiede un complesso di endonucleasi e trascrittasi inversa. L'RNA e la trascrittasi hanno un ruolo più diretto nell'evento di ricombinazione. Alcuni non portano la propria endonucleasi o trascrittasi inversa.

6.5.6 La ricombinazione conservativa specifica al sito può riordinare il DNA reversibilmente

Questo tipo di meccanismo di ricombinazione riordina altri tipi di elementi di DNA mobili. In questo cammino rottura e riunione avvengono a due siti speciali, uno in ogni molecola di DNA partecipante. In base alla posizione e al relativo orientamento dei due siti può accadere integrazione, esportazione o inversione del DNA. Questo processo avviene grazie a un enzima che rompe e riunisce due doppie eliche a sequenze specifiche. Lo stesso enzima che le unisce le può rirompere, ripristinando la sequenza delle due molecole di DNA originale. Viene spesso utilizzato dai virus a DNA per muovere i loro genomi in quelli della cellula ospite. Quando è integrato il DNA virale viene replicato ed è passato a tutte le cellule discendenti. Se la cellula ospite subisce danni il virus può invertire la reazione di ricombinazione, asportare il proprio genoma e incapsularlo in una particella di virus. Sono molte le differenze con la trasposizione: richiede sequenze specializzate sia sul donatore che sul recipiente che contengono siti di riconoscimento per la ricombinasi che catalizzerà il riordinamento. I meccanismi di reazione sono fondamentalmente diversi: la ricombinasi che catalizza la reazione assomiglia alla topoisomerasi in quanto forma legami covalenti temporanei con il DNA e usa questa energia per completare il riordinamento del DNA. Tutti i legami fosfati utilizzati durante un evento di ricombinazione sono ripristinati al completamento. La ricombinazione conservativa specifica al sito viene utilizzata da molti batteri per controllare l'espressione di un gene specifico.

Capitolo 7

Come una cellula legge il genoma, dal DNA alle proteine

Il DNA nel genoma usa l'RNA come intermediario nella sintesi delle proteine. Quando una cellula necessita una proteina utilizza la sequenza appropriata della catena nucleotidica copiandola in RNA durante la trascrizione che direziona direttamente la sintesi della proteina durante la traduzione. Esistono varianti di questo processo in cui i trascritti a RNA vengono processati nel nucleo con processi come RNA splicing prima che posano uscire da esso. Questi cambi possono cambiare il significato di una molecola di DNA. Per molti geni inoltre il prodotto finale è RNA. I genomi di organismi multicellulari sono disordinati con corti esoni e lunghi introni. Sezioni che codificano il DNA sono separate da lunghe sequenze senza apparente significato.

7.1 Dal DNA all'RNA

Essendo che molte copie identiche dello stesso RNA possono essere completate dallo stesso gene ogni molecola di RNA può guidare la sintesi di molte proteine identiche, ma i geni sono trascritti e tradotti a tassi diversi, permettendo la cellula di avere vaste quantità di alcune proteine e piccole di altre. Inoltre la cellula regola l'espressione di ognuno dei suoi geni secondo i suoi bisogni, controllando la produzione del suo RNA.

7.1.1 Le molecole di RNA hanno un unico filamento

Il primo passo nella lettura delle istruzioni geniche è la copia di una particolare sequenza della sequenza di nucleotidi in una a RNA. L'informazione nell'RNA è scritta nello stesso linguaggio del DNA e questo processo è pertanto detto trascrizione. L'RNA è un polimero lineare composto da quattro tipi di subunità nucleotidiche legate da legami a fosfodiesteri. Differisce dal DNA in quanto i nucleotidi nell'RNA sono ribonucleici, ovvero contengono ribosio e contiene la base uracile invece della timina che si può legare all'adenina. La struttura complessiva è molto diversa: l'RNA è a filamento singolo e una catena può piegarsi in una forma simile a una proteina permettendogli di avere precise funzioni strutturali e catalitiche.

7.1.2 La trascrizione produce RNA complementare a un filamento di DNA

L'RNA è sintetizzato attraverso la trascrizione del DNA, che comincia con l'apertura e lo svolgimento di una piccola porzione della doppia elica che espone le basi sui filamenti, uno dei quali agisce come stampo per la sintesi della molecola di RNA. La sequenza di nucleotidi è determinata dall'accoppiamento di basi complementari tra i nucleotidi che arrivano e lo stampo. Quando avviene una corrispondenza il ribonucleide che arriva è legato covalentemente con la catena crescente in una reazione catalizzata da enzimi. La catena è allungata un nucleotide alla volta e possiede una sequenza complementare allo stampo. Il filamento di RNA non rimane legato con lo stampo ma è separato dietro al regione dove i nucleotidi sono aggiunti causando il rilasciamento come singolo filamento. Le molecole di RNA sono inoltre molto più corte rispetto le molecole di DNA.

7.1.3 L'RNA polimerasi causa la trascrizione

Gli enzimi che svolgono la trascrizione sono detti RNA polimerasi e catalizzano la formazione del legame fosfodiesterico che lega i nucleotidi muovendosi lungo il DNA, svolgendo l'elica sopra il sito attivo per la polimerizzazione. La catena di RNA è estesa nella direzione 5'-3'. I substrati sono ribonucleoside trifosfato la cui idrolizzazione fornisce l'energia necessaria alla reazione. Il rilascio immediato dell'RNA significa che le copie possono essere create in poco tempo, con la sintesi di molecole addizionali che inizia prima che quelle prime siano completate. L'RNA polimerasi catalizza l'unione di ribonucleidi e può cominciare una catena di RNA senza un primer. L'RNA polimerasi fa un errore una volta ogni 10^4 nucleotidi e le conseguenze di tale errore sono meno significative. Inoltre la stessa RNA polimerasi che comincia una molecola di RNA deve finirla senza dissociarsi dallo stampo. L'RNA polimerasi contiene un meccanismo di proofreading: se un ribonucleotide è aggiunto la polimerasi può indietreggiare e il sito attivo svolge una reazione di asportazione dove una molecola d'acqua sostituisce il pirofosfato ed è rilasciata una molecola di monofosfato.

7.1.4 Le cellule producono diverse categorie di molecole di RNA

La maggior parte dei geni trasportati in un DNA della cellula specificano la sequenza di amminoacidi della proteina e le molecole di RNA che sono copiate da questi geni sono detti RNA messaggeri o mRNA. Il prodotto finale di altri geni è la molecola di RNA, detti RNA non codificanti che servono come componenti strutturali, enzimatiche e regolatore per molti processi. Molecole di RNA piccolo nucleare o snRNA direzionano lo splicing di pre-mRNA per formare mRNA, l'RNA ribosomiale o rRNA forma il nucleo del ribosoma e i transfer RNA o tRNA forma gli adattatori che selezionano gli amminoacidi e li mantengono in posizione. I microRNA o miRNA e RNA piccolo interferente siRNA servono come regolatori per l'espressione genica e RNA piwi-interagente o piRNA protegge le linee germinali dai trasposoni. I long noncoding RNA o lncRNA con funzione di impalcature e regolano diversi processi cellulari come l'inattivazione del cromosoma X. Ogni segmento di DNA trascritto è detto unità di trascrizione che tipicamente possiede le informazioni di un gene. La maggior parte dell'RNA nella cellula è rRNA.

7.1.5 Segnali codificati nel DNA indicano l'RNA polimerasi dove iniziare e dove finire

Per trascrivere un gene accuratamente la RNA polimerasi deve riconoscere dove iniziare e finire sul genoma. Questo avviene in maniera diversa rispetto a batteri ed eucarioti. L'iniziazione di

una trascrizione è il punto in cui la cellula regola quali proteine devono essere prodotte e a quale velocità. L'RNA polimerasi batterica è un complesso a multisubunità che sintetizza l'RNA. Una subunità addizionale detta fattore sigma σ associa con l'enzima nucleo e lo assiste nella lettura dei segnali nel DNA che dicono dove iniziare la trascrizione. Il fattore σ e l'enzima di nucleo formano un oloenzima RNA polimerasi che aderisce debolmente al DNA batterico quando collidono e scivola rapidamente lungo il DNA fino a dissociarsi. Quando l'oloenzima arriva a una sequenza speciale che indica il punto di inizio per la sintesi di RNA detto protomero si lega fortemente in quanto il fattore σ crea contatto specifico con i limiti della base esposti all'esterno nella doppia elica. L'oloenzima polimerasi al protomero apre la doppia elica esponendo una piccola lunghezza di nucleotidi su ogni filamento chiamata bolla di trascrizione (di circa 10 nucleotidi), stabilizzata dal legame con il fattore σ con le basi non accoppiate. L'altro filamento agisce come stampo per l'accoppiamento di basi con i ribonucleotidi che arrivano, uniti dalla polimerasi per iniziare la catena di RNA. I primi 10 nucleotidi sono sintetizzati attraverso un meccanismo di "scrunching" dove la RNA polimerasi rimane legata al protomero e tira il DNA nel suo sito attivo espandendo la bolla di trascrizione. Questo processo genera stress e le catene di RNA sono rilasciate e forzando la polimerasi a riiniziare la sintesi. Questo processo di iniziazione abortiva è superato e lo stress generato aiuta l'enzima a rompere l'interazione con il protomero e con il fattore σ . La polimerasi inizia a muoversi lungo il DNA sintetizzando l'RNA muovendosi di base in base espandendo la bolla e contraendola al retro. Si continua l'allungamento della catena fino a che l'enzima incontra un terminatore dove la polimerasi si ferma e rilascia la molecola di RNA e lo stampo a RNA. La polimerasi si riassocia con il fattore σ ed è libera di riiniziare un processo di trascrizione. La maggior parte dei segnali di terminazione nei batteri è formata da una stringa di coppie A-T precedute da una sequenza due volte simmetrica di DNA che quando trascritta forma una forcina attraverso l'accoppiamento di basi che aiuta il disingaggio dell'RNA trascritto dal sito attivo.

7.1.6 I segnali di inizio e terminazione della trascrizione sono eterogenei nella sequenza nucleotidica

Le sequenze di inizio e fine sono codificate da sequenze in relazione, che riflettono aspetti del DNA che sono riconosciuti direttamente dal fattore σ . Queste caratteristiche formano una sequenza di nucleotidi consenzienti, una media di un gran numero di sequenze. Si possono anche riconoscere attraverso la frequenza relativa di basi in ogni posizione. Tale sequenza nei batteri varia in modo da determinare la forza dei geni (il numero di eventi di iniziazione per gene). Per i terminatori la struttura di base è quella che forma la forcina nell'RNA. Il filamento scelto per la sintesi dell'RNA dipende dall'orientamento del promotore.

7.1.7 L'iniziazione della trascrizione negli eucarioti richiede molte proteine

Gli eucarioti possiedono la RNA polimerasi I, II e III, simili strutturalmente e con subunità in comune, ma trascrivono diverse categorie di geni. La I e la III trascrivono geni che codificano tRNA, rRNA e piccoli RNA, la II trascrive la maggior parte dei geni, inclusi quelli che codificano le proteine. La RNA polimerasi II richiede molti fattori detti fattori di trascrizione generali e l'iniziazione avviene su DNA condensato in nucleosomi e forme superiori di struttura cromatinica.

7.1.8 La RNA polimerasi II richiede un insieme di fattori di trascrizione generali

I fattori di trascrizione generali aiutano a posizionare la polimerasi correttamente al promotore, a separare i due filamenti di DNA permettendo l'inizio della trascrizione e rilasciarla dal promotore per iniziare la modalità di allungamento. Sono generali in quanto richieste da tutti i promotori utilizzati dalla polimerasi II. Sono un insieme di proteine che interagiscono dette TFIIA, TFIIB, TFIIC, TFIIID e hanno funzione equivalente al fattore σ . Il processo di assemblaggio inizia quando TFIIID si lega a una sequenza di DNA a doppia elica detta TATA box attraverso la subunità TBP. Il legame causa una distorsione nel DNA della TATA box che crea una marcatura per la locazione di un promotore attivo. Altri fattori insieme alla RNA polimerasi II formano un complesso di iniziazione della trascrizione. Dopo che si è formato sul DNA promotore la RNA polimerasi II ottiene l'accesso al filamento stampo e TFIIH che contiene una DNA elicasi idrolizza l'ATP svolgendo il DNA. La RNA polimerasi II rimane al promotore sintetizzando corte lunghezze di RNA fino a subire una serie di cambi conformazionali che le permettono di spostarsi ed entrare nella fase di allungamento. In questa transizione viene aggiunto un gruppo fosfato alla coda della RNA polimerasi detto CTD (C-terminal domain). Durante l'iniziazione la serina nella quinta posizione della sequenza ripetuta è fosforilata da TFIIH che contiene una chinasi in una delle subunità. La polimerasi può poi disingaggiarsi dal cluster e subisce una serie di cambi conformazionali che le permettono di trascrivere per lunghe distanze senza dissociarsi dal DNA. Dopo che si è entrati nella fase di allungamento i fattori di trascrizione generali si separano per iniziare un altro processo.

7.1.9 La polimerasi II richiede attivatori, mediatori e proteine per la modifica della cromatina

L'inibizione della trascrizione negli eucarioti è complessa e richiede molte proteine. Innanzitutto delle proteine dette attivatori trascrizionali devono legarsi a speciali sequenze del DNA dette enhancers e aiutare ad attrarre l'RNA polimerasi II al punto d'inizio. Successivamente è necessario un complesso proteico detto mediatore che permette alle proteine attivatrici di comunicare con la Polimerasi II e con i fattori di trascrizione generali. Alla fine l'iniziazione della trascrizione richiede il reclutamento di enzimi modificatori della cromatina, complessi di rimodellizzazione e enzimi modificatori degli istoni che aumentano l'accesso al DNA nella cromatina. L'ordine di assemblaggio di queste proteine non segue un cammino preciso e differisce per gene. Per cominciare la trascrizione la RNA polimerasi II deve essere rilasciata da questo complesso attraverso proteolisi insito delle proteine attivatrici.

7.1.10 L'allungamento della trascrizione negli eucarioti richiede proteine accessorie

Una volta che l'RNA polimerasi ha iniziato la trascrizione si muove a scatti. RNA polimerasi allunganti sono associate con una serie di fattori di allungamento, proteine che diminuiscono la probabilità che l'RNA polimerasi si dissoci prima di aver finito la trascrizione. Si associano con la polimerasi dopo l'iniziazione. Quando l'RNA polimerasi si muove lungo un gene alcuni enzimi legati ad essa modificano gli istoni, lasciando una traccia, che potrebbe aiutare nelle trascrizioni successive e nella coordinazione dell'allungamento.

7.1.11 La trascrizione crea tensione superelicale

Il superavvolgimento del DNA è una conformazione che il DNA assume quando è presente tensione superelicale. Un grande superavvolgimento di DNA si forma per ogni 10 paia di nucleotidi svolti, processo energeticamente favorevole in quanto ripristina una torsione normale nella regione accoppiata rimanente. La RNA polimerasi crea tensione superelicale mentre si muove lungo una lunghezza di DNA ancorata alla terminazione, con tensione positiva davanti a lei e negativa dietro. Negli eucarioti questa tensione è rimossa dalla DNA topoisomerasi, mentre nei batteri una DNA girasi usa l'energia dell'idrolisi dell'ATP per imporre superavvolgimenti al DNA mantenendolo in costante tensione, ma in senso opposto da quello fornito dalla polimerasi.

7.1.12 L'allungamento della trascrizione è strettamente accoppiato con il processamento dell'RNA

Negli eucarioti la trascrizione è il primo passo per la produzione di una molecola di mRNA matura. Un passo successivo è la modificazione covalente delle terminazioni dell'RNA e la rimozione delle sequenze di introni nel processo di RNA splicing. La terminazione 5' viene incappucciata e la 3' attraverso poliadenilazione che permettono alla cellula di capire se le terminazioni sono entrambe presenti prima che sia esportata dal nucleo e tradotta. L'RNA splicing permette di sintetizzare proteine diverse dallo stesso gene. La fosforilazione della coda CTD della polimerasi permette la dissociazione delle altre proteine e l'associazione di nuove. Alcune di queste si legano all'RNA che si sta sintetizzando processandolo.

7.1.13 L'incappucciamento dell'RNA è la prima modifica dei pre-mRNA eucariotici

Appena l'RNA polimerasi II ha prodotto circa 25 nucleotidi di RNA alla terminazione 5' della molecola viene aggiunto un cappuccio formato di una guanina modificata. Tre enzimi in successione svolgono la reazione necessaria: una fosfatasi rimuove il fosfato dalla terminazione, una guanil trasferasi aggiunge un GMP in un legame inverso e un metil trasferasi aggiunge un gruppo metile alla guanosina. Questi enzimi si trovano alla catena della RNA polimerasi fosforilata alla posizione Ser5. Questo cappuccio metile indica la terminazione 5' dell'mRNA eucariotico e lo differenzia da altri tipi di RNA.

7.1.14 L'RNA splicing rimuove le sequenze di introni dal pre-mRNA

Essendo i geni eucariotici dispersi in sequenze di introni che vengono trascritte insieme agli esoni si devono rimuovere i primi attraverso l'RNA splicing per produrre la proteina. Questo processo avviene alla produzione dell'mRNA. Ogni splicing rimuove un introne attraverso due reazioni di trasferimento di fosforile o transesterificazioni sequenziali che legano insieme gli esoni rimuovendo gli introni. Il macchinario che lo svolge è un complesso consistente di 5 molecole di RNA e centinaia di proteine. Idrolizza molte molecole di ATP per evento. La complessità assicura uno splicing accurato e flessibile. Oltre agli aspetti evolutivisti della divisione in domini delle proteine per la ricombinazione lo splicing permette di produrre un insieme di proteine diverse dallo stesso gene.

7.1.15 Sequenze di nucleotidi segnalano dove avviene lo slicing

Il macchinario dello splicing deve riconoscere tre porzioni della molecola di RNA precursore il sito di splice 5', quello 3' e il ramo nella sequenza di introni che forma la base con il lazo. Ogni sito

possiede una sequenza di nucleotidi simile per ogni introne che fornisce indizi sul luogo di splicing. Queste sono corte e possono avere variabilità estesa e pertanto sono presenti altre informazioni per compiere la scelta ultima.

7.1.16 Lo splicing dell'RNA è svolto dallo spliceosoma

I passi fondamentali dello splicing sono svolti da molecole di RNA specializzate che riconoscono la sequenza che riconosce il luogo dello splicing e ne catalizza le reazioni chimiche. Sono molecole di circa 200 nucleotidi e sono U1, U2, U4, U5 e U6 e sono dette snRNA, insieme con almeno sette subunità proteiche per formare un snRNP (small nuclear ribonucleoprotein). Gli snRNP formano il nucleo dello spliceosoma, un complesso di RNA e proteine che svolge lo splicing. Durante la reazione di splicing il riconoscimento delle giunzioni 5', 3' e del sito di ramificazione avviene attraverso accoppiamento di basi tra il snRNA e le sequenze di RNA nel substrato. All'interno della cellula il complesso esiste come un assemblaggio vago di tutte le componenti che svolgono lo splicing come un'unità coordinata che continua a riordinarsi ogni volta che compie uno splice.

7.1.17 Lo spliceosoma usa l'idrolisi dell'ATP per produrre una serie di riordinamenti RNA-RNA

L'idrolisi dell'ATP è necessaria per l'assemblaggio e riordinamento dello spliceosoma per rompere e formare interazioni RNA-RNA. Ogni splice richiede circa 200 proteine. Questi riordinamenti permettono l'esame del pre-RNA dal snRNP. U1 riconosce il sito 5' attraverso l'accoppiamento di basi e successivamente questi legami sono rotti con l'idrolisi dell'ATP e viene sostituito con U6. Questi tipi di riordinamento avvengono molte volte e permettono un controllo da parte dello spliceosoma dei segnali di splicing aumentando la precisione del processo. Questi riordinamenti avvengono anche per creare i siti attivi nello spliceosoma per le due transesterificazioni, cosa che avviene sequenzialmente dopo che i segnali di splicing sono stati analizzati più volte. I siti catalitici sono formati da proteine e molecole di RNA e le seconde catalizzano la reazione chimica. Una volta che la chimica dello splicing è completata gli snRNP rimangono legati al lazo. Il loro disassemblamento richiede un'altra serie di riordinamenti RNA-RNA che richiedono l'idrolisi dell'ATP che permettono il ritorno di snRNA alla loro conformazione originale che ne permette il riutilizzo. Al completamento lo spliceosoma direziona un insieme di proteine per legarsi all'mRNA vicino la posizione precedentemente occupata dall'introne detto complesso di giunzione degli esoni (EJC) che marcano il sito di uno splicing riuscito e influenzano il destino dell'nRNA.

7.1.18 Altre proprietà del pre-mRNA e la sua sintesi spiega le scelte dei siti propri di splice

Il meccanismo di riconoscimento dello spliceosoma sfrutta due strategie aggizionali per aumentarne l'affidabilità. Il primo è una conseguenza di essere accoppiato con la trascrizione: quando questa procede la coda fosforilata della RNA polimerasi porta varie componenti dello spliceosoma che sono direttamente trasferite dalla polimerasi all'RNA mentre emerge da essa, aiutando a tenere traccia di esoni e introni. La seconda strategia è detta definizione degli esoni: la dimensione degli esoni tende a essere più uniforme di quella degli introni e attraverso questa definizione si possono ricercare sequenze di esoni di dimensione omogenea. Mentre la sintesi dell'RNA procede un gruppo di componenti aggizionali come proteine SR si assemblano sulla sequenza di esoni e aiutano a marcare i siti di splice. Queste proteine reclutano U1 snRNA che marca il limite dell'esone downstream e U2 che specifica l'upstream. Questi processi aumentano la precisione del deposito delle componenti iniziali

dello splicing. Negli esoni sono presenti sequenze dette splicing enhancers. Le sequenze di introni non sono rimosse dall'RNA nello stesso ordine in cui sono marcate.

7.1.19 La struttura cromatinica influenza l'RNA splicing

I nucleosomi tendono a essere posizionati sugli esoni e causano la proteina responsabile per la definizione degli esoni di assemblarsi all'RNA quando emerge dalla polimerasi. Cambi nella struttura cromatinica sono usati per cambiare i pattern di splicing in due modi. Siccome splicing e trascrizione sono accoppiate il tasso con cui la RNA polimerasi si muove lungo il DNA ha effetto sul tasso di splicing: minore la velocità minore il salto di esoni: l'assemblaggio dello spliceosoma iniziale può essere completato prima che una scelta alternativa di sito di splicing venga presentata. I nucleosomi in cromatina condensata possono causare una pausa nella polimerasi. Inoltre specifiche modifiche agli istoni attraggono componenti dello spliceosoma che possono essere facilmente trasferiti all'RNA emergente.

7.1.20 Lo splicing di RNA mostra plasticità notevole

In confronto ad altri processi nell'espressione dei geni lo splicing è flessibile. Il macchinario di splicing si è evoluto in modo da cercare il pattern migliore per le giunzioni, ma se uno di essi è stato danneggiato da una mutazione ricerca il prossimo migliore. Questa plasticità del processo suggerisce che cambi nei pattern di splicing sono stati importanti nell'evoluzione di geni e organismi e che mutazioni che riguardano lo splicing possono essere distrutte per l'organismo. La cellula inoltre può facilmente regolare i pattern di RNA splicing in modo da produrre diverse forme di una proteina a tempi e tessuti diversi.

7.1.21 Rna splicing catalizzato dallo spliceosoma si è probabilmente evoluto da meccanismi di autosplicing

Le cellule ancestrali utilizzavano RNA per le catalisi principali e salvavano informazioni geniche nell'RNA rispetto al DNA. Queste reazioni di splicing hanno molto probabilmente avuto un ruolo fondamentale. Come prova rimangono introni a RNA autosplicing.

7.1.22 Enzimi di processamento dell'RNA generano la terminazione 3' degli mRNA eucariotici

Quasi la RNA polimerasi II raggiunge la fine di un gene un meccanismo garantisce che la 3' fine del pre-mRNA sia processata. La posizione della terminazione 3' è specificata da segnali codificati dal genoma, trascritti nell'RNA mentre la polimerasi si muove attraverso essi e successivamente riconosciuti da una serie di proteine che si legano all'RNA e enzimi di processamento dell'RNA. Due proteine a subunità multiple dette CstF (cleavage stimulation factor) e CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) hanno grande importanza. Entrambe queste proteine viaggiano con la coda dell'RNA polimerasi e sono trasferite alla terminazione 3' quando emerge dalla polimerasi stessa. Una volta che queste proteine si legano con alle sequenze di riconoscimento altre proteine si assemblano con esse per creare la terminazione 3' dell'mRNA. L'RNA è rotto dalla polimerasi, successivamente un enzima detto poly-A polimerasi (PAP) aggiunge sequenzialmente 200 nucleotidi A alla terminazione appena prodotta. Il precursore delle addizioni è ATP. Mentre questa coda poly-A viene sintetizzata (senza stampo) le proteine che si legano ad essa sono assemblate su di essa. Dopo che la terminazione è stata separata la polimerasi continua a trascrivere e l'RNA che sintetizza

non possiede un cappuccio 5' e viene degradato da una esonucleasi trasportata lungo la coda della polimerasi che causa l'eventuale separazione della polimerasi dallo stampo e la terminazione della trascrizione.

7.1.23 mRNA maturi eucariotici sono esportati selettivamente dal nucleo

La sintesi e il processamento del pre-mRNA nel nucleo si svolge in maniera ordinata, ma solo una piccola percentuale di questo viene ulteriormente utilizzato dalla cellula, mentre il resto è non solo inutile ma potenzialmente dannoso. Per distinguere da questo pre-mRNA e l'mRNA maturo mentre una molecola di RNA viene processata perde delle proteine e ne acquisisce altre: la presenza di una proteina snRNP significa splicing incompleto o errato. Solo quando le proteine presenti sulla molecola di mRNA segnalano collettivamente che il suo processamento è stato completato con successo l'mRNA è esportato dal nucleo nel citosol, dove viene tradotto in proteine. I resti rimangono nel nucleo dove sono degradati dall'esosoma nucleare, un complesso proteico ricco di RNA esonucleasi. Le molecole di pre-mRNA più comuni della trascrizione sono hnRNP (heterogeneous nuclear ribonuclear proteins) e alcune di esse svolgono le eliche a forcina nell'RNA in modo da permettere una facile lettura dei segnali e uno splicing più semplice. I mRNA maturi sono guidati attraverso il complesso di pori nucleici o NPC, canali acquosi nella membrana nucleare che connettono il nucleoplasma con il citosol. Il passaggio di macromolecole richiede energia per un trasporto attivo in entrambe le direzioni attraverso il complesso. Le macromolecole sono mosse attraverso recettori di trasporto nucleari che le trasportano selettivamente. Affinchè avvenga l'esportazione dell'mRNA un recettore specifico deve essere caricato su di esso, un passo che avviene insieme alla rottura 3' e alla poliadenilazione. Una volta che l'esportazione avviene il recettore si dissocia, rientra nel nucleo e viene riutilizzato. Alcune delle proteine possono influenzare il comportamento dell'RNA successivamente all'esportazione, come la stabilità, l'efficienza della traduzione e la destinazione ultima.

7.1.24 Anche gli RNA non codificanti sono sintetizzati e processati nel nucleo

La maggior parte dell'RNA nella cellula ha funzioni strutturali e catalitiche. L'RNA più presente è quello ribosomiale rRNA, per circa l'80%. Questo RNA forma il nucleo del ribosoma. Gli eucarioti possiedono la RNA polimerasi I per la sintesi degli rRNA. È strutturalmente simile alla RNA polimerasi II senza una coda C-terminale e pertanto i suoi trascritti non sono nè incappucciati nè poliadenilati. Essendo le componenti a RNA del ribosoma prodotti finali dei geni in ogni cella sono presenti multiple copie dei geni rRNA. Le cellule umane ne contengono 200 per genoma aploide in piccoli cluster su 5 cromosomi diversi. Ci sono quattro tipi di rRNA eucariote, ognuno presente in una copia per ribosoma. Tre dei quattro (18S, 5.8S e 28S) sono creati modificando e rompendo un rRNA precursore, mentre il quarto (5S) sintetizzato da un cluster separato dalla polimerasi III. Le modificazioni che avvengono al precursore a 13'000 nucleotidi sono 100 metilazioni delle posizioni 2' – OH sui zuccheri nucleotidici e 100 isomerizzazioni dei nucleotidi uridina a pseudouridina. Queste modifiche aiutano il piegamento e assemblaggio dei rRNA finali o alterano leggermente la funzione dei ribosomi. Ogni alterazione è fatta a una posizione specifica determinata da RNA guida che si posizionano sul precursore tramite accoppiamento di basi e portano l'enzima modificatore alla posizione corretta. Tutti questi RNA sono detti piccoli RNA nucleari o snoRNA e svolgono le loro funzioni in sottocompartimenti del nucleo detti nucleoli. Molti sono codificati dagli introni di altri geni e sono sintetizzati da RNA polimerasi II e processati da sequenze di introni esportate.

7.1.25 Il nucleolo è una fabbrica di produzione di ribosomi

Il nucleolo è il sito per il processamento di rRNA e il loro assemblaggio in subunità del ribosoma. Non è confinato da una membrana ma consiste di un grande aggregato di macromolecole includenti i geni rRNA, rRNA precursori, maturi, enzimi per il loro processamento, snoRNP, fabbriche si assemblaggio come ATPasi, GTPasi, proteina chinasi e RNA elicasi, proteine ribosomiali e ribosomi parzialmente assemblati. Molti tipi di molecole di RNA svolgono un ruolo centrale nella chimica e struttura del nucleolo. I geni di rRNA, distribuiti in 10 cluster negli umani, durante l'interfase creano degli anelli che creano una parte del nucleolo, durante la fase M quando i cromosomi si condensano il nucleolo si frammenta e sparisce. Nella parte di telofase della mitosi, quando i cromosomi ritornano al loro stato semi-disperso riappare. La sua dimensione dipende dal numero di ribosomi che la cellula sta producendo. L'assemblaggio del ribosoma è un processo complesso. Oltre al ruolo centrale nella biogenesi del ribosoma il nucleolo è il sito dove altri RNA non codificanti sono prodotti e complessi RNA-proteine sono assemblati. Il nucleo può pertanto essere considerato come una fabbrica in cui RNA non codificanti sono trascritti, processati e assemblati con le proteine formando una grande varietà di complessi ribonucleoproteici.

7.1.26 Il nucleo contiene una varietà di aggregati subnucleari

Nel nucleo sono presenti altri corpi come i corpi di Cajal senza membrana e altamente dinamici in base alle necessità della cellula. Il loro assemblaggio è mediato dall'associazione di domini proteici semplici e la loro apparenza è il risultato di associazioni strette di elementi proteici e a RNA coinvolti nella sintesi, assemblaggio e conservazione di macromolecole coinvolte nell'espressione genica. I bodi di Cajal sono siti dove i snRNP e i snoRNP svolgono i loro ultimi passi di maturazione e dove i snRNP sono riciclati e i loro RNA si resettando dopo i riordinamenti dello splicing. I cluster di granuli intercromatinici sono proposti come pile di snRNP e altre componenti di processamento di RNA che sono usate nella produzione di mRNA. Sembra che la funzione principale di questi aggregati sia concentrare i componenti in modo da velocizzare il loro assemblaggio. I siti dello splicing sono nell'ordine delle migliaia, altamente dinamici e il risultato dell'associazione di componenti di trascrizione e splicing per la creazione di piccole fabbriche, il nome dato ad aggregati specifici contenenti un'alta concentrazione di componenti selezionate che creano catene di montaggio biochimiche.

7.2 Da RNA a proteine

La maggior parte dei geni nella cellula producono molecole di mRNA che servono come intermediari sul cammino verso le proteine.

7.2.1 Una sequenza di mRNA è decodificata in insiemi di tre nucleotidi

L'informazione di un mRNA maturo è utilizzata per sintetizzare una proteina. Questa sintesi è detta traduzione. Essendoci 4 nucleotidi diversi e 20 amminoacidi la traduzione non avviene uno a uno. Le regole di traduzione sono dette codice genetico. La sequenza di nucleotidi viene letta in gruppi consecutivi di 3 nucleotidi con 64 possibili combinazioni. Il codice è ridondante e alcuni amminoacidi sono codificati da più triplette dette codoni che codificano un amminoacido o la terminazione del processo di traduzione. Questo codice è utilizzato universalmente, con piccole differenze nei mitocondri, che hanno sistemi indipendenti. Una sequenza di RNA può essere tradotta in uno di tre diversi reading frame, dipendenti dal luogo di inizio della decodifica. Solo uno dei tre codifica la proteina richiesta.

7.2.2 Molecole di tRNA combinano amminoacidi ai codoni

I codoni non si legano direttamente all'amminoacido ma si richiede una molecola di adattamento che può riconoscere e legare sia il codone che l'amminoacido. Questi consistono di un insieme di piccole molecole di tRNA lunghi 80 nucleotidi piegandosi in una conformazione precisa. Quattro segmenti di tRNA sono a doppia elica producendo una molecola simile a un quadrifoglio che viene successivamente piagata in una forma a L compatta tenuta insieme da legami a idrogeno tra le diverse regioni della molecola. Due regioni di nucleotidi non accoppiati alle terminazioni della molecola sono fondamentali: una forma l'anticodone, tre nucleotidi che si accoppiano con il codone complementare e l'altra una regione a filamento singolo alla terminazione 3' dove l'amminoacido si attacca al tRNA. La ridondanza indica che esistono più di un tRNA per amminoacido e che alcuni tRNA possono legarsi a più codoni. Alcuni tRNA richiedono accoppiamento di basi accurato solo per due posizioni e possono tollerare una corrispondenza sbagliata (wobble) che spiega perchè molti codoni alternativi per un amminoacido differiscono solo nel terzo nucleotide.

7.2.3 tRNA sono modificati covalentemente prima che escano dal nucleo

La sintesi del tRNA avviene dalla RNA polimerasi III. Sono tipicamente sintetizzati come precursori più grandi, che sono rifilati per produrre tRNA maturo. Contengono anche introni. Lo splicing usa un meccanismo di copia-incolla catalizzato da proteine. Entrambi richiedono che il precursore sia correttamente piegato nella configurazione a quadrifoglio. Tutti i tRNA sono modificati chimicamente (1 in 10 nucleotidi è una versione alterata del ribonucleotide standard) che facilitano il riconoscimento del codone appropriato.

7.2.4 Specifici enzimi accoppiano amminoacidi con la molecola di tRNA appropriata

Il riconoscimento e l'attaccamento dell'amminoacido corretto dipende dall'enzima amminoacil-tRNA sintetasi che lega covalentemente ogni amminoacido con l'insieme corretto di molecole di tRNA. La maggior parte delle cellule possiedono una sintetasi diversa per ogni amminoacido. Queste reazioni attaccano alla terminazione 3' del tRNA l'amminoacido accoppiate con l'idrolisi dell'ATP producendo un legame ad alta energia tra il tRNA e l'amminoacido, energia utilizzata per legare l'amminoacido covalentemente con la catena polipeptidica crescente. Il codice genetico è tradotto pertanto da due insiemi di adattatori che agiscono sequenzialmente, ognuno dei quali corrisponde una superficie molecolare ad un'altra con grande specificità.

7.2.5 La modifica da tRNA sintetasi assicura accuratezza

La maggior parte delle sintetasi selezionano l'amminoacido corretto con un meccanismo a due fasi. Tale amminoacido ha la maggiore affinità per il sito attivo della sintetasi ed è favorito, ma la discriminazione tra amminoacidi simili avviene in un secondo passaggio dopo che l'amminoacido è stato legato covalentemente a AMP. Quando il tRNA si lega la sintetasi prova a forzare l'amminoacido adenilato in una seconda tasca di modifica nell'enzima la cui dimensione permette l'accesso unicamente ad amminoacidi strettamente imparentati con quello corretto. In questa tasca l'amminoacido è rimosso dall'AMP attraverso idrolisi, aumentando l'accuratezza a un errore ogni 40.000 accoppiamenti. La sintetasi deve anche essere in grado di riconoscere il corretto insieme di tRNA e la loro complementarità chimica permette di investigare diverse caratteristiche del tRNA. La maggior parte viene riconosciuta direttamente: ci sono tre tasche adiacenti di legame con i nucleotidi, ognuna delle quali complementare in forma e carica ad un nucleotide nell'anticodone.

7.2.6 Gli amminoacidi sono aggiunti alla terminazione C⁻ di una catena polipeptidica crescente

La reazione fondamentale nella sintesi di una proteina è la formazione di un legame peptide tra il gruppo carbossile alla fine di una catena polipeptidica e un gruppo ammino su un amminoacido in arrivo. Una proteina è sintetizzata per passaggi dalla terminazione N⁻ a quella C⁻ durante l'intero processo la terminazione carbossile crescente rimane attivata da l'attacco covalente a una molecola di tRNA. Ogni addizione rompe il legame covalente ad alta energia, sostituendolo con uno uguale con l'amminoacido più recente. In questo modo ogni amminoacido trasporta con sé l'energia di attivazione necessaria per l'addizione del prossimo amminoacido.

7.2.7 Il messaggio di RNA è decodificato nei ribosomi

La sintesi delle proteine è guidata da molecole di mRNA. Per mantenere un reading frame corretto e garantire accuratezza la sintesi avviene nel ribosoma, un complesso di proteine ribosomiali e molecole di RNA ribosomiali rRNA. Sono presenti in milioni nel citoplasma. Le loro subunità grande e piccola sono assemblate nel nucleo, dove rRNA si associano con le proteine ribosomiali trasportate lì. Queste due subunità sono esportate nel citoplasma dove si uniscono per sintetizzare le proteine. I ribosomi eucariotici e batterici hanno strutture e funzioni simili, composti da due subunità, una grande e una piccola che si uniscono formando un ribosoma con una massa di milioni di dalton. La subunità piccola crea il framework in cui i tRNA sono corrisposti ai codoni dell'mRNA, mentre la grande catalizza la formazione dei legami peptidi tra gli amminoacidi. Quando non sono attive le subunità sono separate. Si uniscono su una molecola di mRNA vicino alla terminazione 5' per iniziare la sintesi di una proteina. L'mRNA viene poi tirato attraverso il ribosoma tre nucleotidi alla volta. Mentre il codone entra la sequenza è tradotta in amminoacidi attraverso il tRNA. Quando si incontra un codone di stop il ribosoma rilascia la proteina finita e le due subunità possono separarsi per un futuro riutilizzo. In un secondo si possono aggiungere 2 amminoacidi per quelli eucariotici, 20 per i batterici. Il ribosoma contiene quattro siti di legame per le molecole di RNA: uno per l'mRNA e tre (siti A, P e E) per i tRNA, collegate strettamente nei siti A e P solo se il suo anticodone forma accoppiamento di basi con il codone complementare nel ribosoma. I siti A e P sono abbastanza vicini da permettere la formazione tra le due molecole di tRNA di legami tra le basi con i codoni adiacenti con la molecola di mRNA. Una volta che inizia la sintesi delle proteine ogni nuovo amminoacido è aggiunto alla catena crescente in un ciclo di reazioni a quattro passaggi: il legame di tRNA, la formazione del legame peptide, la traslocazione della grande subunità e la traslocazione della piccola subunità. Come risultato dei due passi di traslocazione l'intero ribosoma si muove di tre nucleotidi lungo l'mRNA.

7.2.8 Fattori di allungamento portano avanti la traduzione e ne aumentano l'accuratezza

Due fattori di allungamento entrano e lasciano il ribosoma durante ogni ciclo idrolizzando GTP in GDP con conseguente cambi conformazionali. Questi fattori sono chiamati EF-Tu e EF-G nei batteri e EF1 e EF2 negli eucarioti. L'accoppiamento con questi fattori e i la loro transizione di conformazione durante il ciclo velocizza e rende la sintesi più accurata. I cicli di associazione, idrolisi e dissociazione garantiscono che i cambi avvengano nella direzione corretta. EF-Tu aumenta l'accuratezza in quanto può legare contemporaneamente GTP e gli amminoacil-tRNA. In questa forma l'interazione codone-anticodone avviene nel sito A. A causa dei cambi di energia libera associati la corrispondenza corretta si lega più strettamente, ma con differenze troppo lievi per garantire

accuratezza. Per aumentare l'accuratezza della reazione il ribosoma e il EF-Tu lavorano insieme: i 16 rRNA nella piccola subunità determinano la correttezza della corrispondenza codone-anticodone piegandosi intorno ad esso e controllando i dettagli molecolari. Quando si trova una corrispondenza corretta il rRNA si chiude strettamente intorno alla coppia causando un cambio conformazionale al ribosoma che causa l'idrolisi del GTP dall'EF-Tu. Solo quando il GTP viene idrolizzato EF-Tu rilascia la stretta sul amminoacil-tRNA e gli permette di essere utilizzato nella sintesi. Se la corrispondenza non avviene i tRNA escono dal ribosoma prima che possano essere utilizzati. Dopo che il GTP viene idrolizzato e l'EF-Tu si dissocia c'è un ritardo mentre l'amminoacido si muove in posizione, impedendo ai tRNA incorretti di proseguire la sintesi in quanto si dissociano troppo rapidamente. Un'interazione codone-anticodone al sito P che avviene dopo l'incorporazione di un amminoacido errato causa un aumento del tasso di letture errate al sito A. Eventi scorretti successivi causano una terminazione prematura causata dai fattori di rilascio, che rilasciano la proteina errata per la degradazione.

7.2.9 Molti processi biologici superano le limitazioni intrinseche all'accoppiamento di basi complementari

Altri meccanismi vengono utilizzati per aumentare la specificità della sintesi. Il primo è l'adattamento indotto: l'interazione codone-anticodone è controllata dall'accoppiamento di basi e dal piegamento del ribosoma, che dipende dalla correttezza della corrispondenza. Un secondo principio è il proofreading cinetico: l'idrolizzazione del GTP dopo l'accoppiamento iniziale crea un passaggio irreversibile e inizia un tempo su un delay durante il quale l'amminoacil-tRNA si muove nella posizione corretta per la catalisi. Durante questo ritardo le coppie incorrette hanno una probabilità maggiore di dissociarsi in quanto la relazione con il tRNA è più debole e il ritardo maggiore.

7.2.10 L'accuratezza nella traduzione richiede una spesa di energia libera

La traduzione è un compromesso tra velocità e accuratezza, inoltre la sintesi delle proteine richiede più energia libera di tutti gli altri processi biosintetici. Quattro legami fosfati ad alta energia sono rotti per ogni nuovo legame peptidico: due per caricare il tRNA con l'amminoacido e due per il ciclo di reazioni durante la sintesi nel ribosoma. Altra energia viene consumata ogni volta che un tRNA incorretto entra nel ribosoma, comincia l'idrolisi del GTP ed è rifiutato.

7.2.11 Il ribosoma è un ribozima

Il ribosoma è un grande complesso formato per due terzi da RNA e per un terzo da proteine. Gli rRNA sono responsabili per la sua struttura, la sua abilità di posizionare i tRNA sui mRNA e l'attività catalitica. Gli RNA ribosomiali sono piegati in strutture tridimensionali precise e compatte che formano il nucleo del ribosoma e ne determinano la forma. Le proteine si trovano generalmente sulla superficie e riempiono i vuoti e fessure dell'RNA piegato. Alcune di queste mandano fuori regioni di catena polipeptidica che possono penetrare in buchi del nucleo, il loro ruolo principale sembra quello di stabilizzare il nucleo permettendo i cambi conformazionali necessari. Aiutano inoltre nell'assemblaggio degli rRNA che costituiscono il nucleo. Anche il sito catalitico per la formazione del legame peptidico è costituito da RNA nonostante non contenga gruppi funzionali facilmente ionizzabili. Si crede che la struttura dei 23S rRNA formi una tasca altamente strutturata che orienta precisamente i due reagenti attraverso una rete di legami a idrogeno. Il tRNA nel sito P contribuisce con un gruppo OH al sito attivo e partecipa direttamente nella catalisi, assicurando

che la reazione avvenga solo quando il tRNA è posizionato correttamente. Le molecole di RNA con attività catalitica sono dette ribozimi.

7.2.12 La sequenza nucleotidica negli mRNA segnala dove iniziare la sintesi delle proteine

L'iniziazione e la terminazione della traduzione condividono caratteristiche con il ciclo di allungamento. Il sito di inizio della sintesi della proteina sull'mRNA è cruciale in quanto stabilisce il reading frame per l'intera lunghezza del messaggio. Un errore di uno dei nucleotidi a questo stato causerebbe ogni codone seguente di essere letto male e creando una proteina non funzionale ed è l'ultimo punto in cui la cellula può decidere se l'mRNA verrà tradotto. Il tasso di questo passaggio è determinante del tasso in cui una proteina viene sintetizzata. La traduzione inizia con il codone AUG e un tRNA iniziatore che trasporta l'amminoacido metionina, in ogni terminazione N⁻ della proteina che viene rimosso da una proteasi specifica. Questo tRNA è riconosciuto da fattori di iniziazione in quanto ha una sequenza nucleotidica distinta da quello che usualmente trasporta la metionina. Il complesso iniziatore tRNA-metionina è prima caricato nella piccola subunità ribosomiale con i fattori eucariotici di iniziazione o eIF. Di tutti gli amminoacil-tRNA nella cellula solo l'iniziatore è in grado di legare la piccola subunità ribosomiale senza che sia presente il ribosoma completo e si lega direttamente al sito P. Successivamente la piccola subunità ribosomiale si lega alla terminazione 5' di un mRNA, riconosciuta grazie al cappuccio e poi si muove in avanti alla ricerca del primo AUG. Altri fattori di iniziazione agiscono come elicasi energizzate dall'ATP facilitandone il movimento. Quando trova AUG i fattori di iniziazione si dissociano permettendo alla subunità di associarsi con il complesso e completo ribosoma. Il tRNA iniziatore rimane al sito P, lasciando il sito A vuoto e la sintesi è pronta a cominciare. I nucleotidi che circondano il sito di inizio influenzano l'efficienza del riconoscimento dell'AUG durante lo scan. Se il sito di riconoscimento è diverso sostanzialmente dalle regioni adiacenti lo scan può a volte ignorare l'AUG e passare ad un altro. Questo fenomeno detto leaky scanning viene utilizzato per produrre la stessa proteina con e senza una sequenza di segnale attaccata. Il meccanismo per selezionare il codone di inizio nei batteri è diverso: ogni mRNA contiene uno specifico sito di legame al ribosoma locato pochi nucleotidi prima dell'AUG dove inizia la traduzione. I ribosomi batterici possono assemblare direttamente su un codone di inizio interno all'mRNA che pertanto può essere utilizzato per codificare più proteine e si dice policistronico.

7.2.13 I codoni di fine marcano la fine della traduzione

La fine del messaggio di codifica è segnalata dalla presenza di uno dei tre codoni di fine UUA, UAG o UGA che non sono riconosciuti da un tRNA e non specificano un amminoacido, ma segnalano al ribosoma di terminare la traduzione. I fattori di rilascio legano ogni ribosoma con un codone di fine posizionato al sito A, forzando la transferasi peptidica a catalizzare l'addizione di una molecola di acqua invece di un amminoacido al peptidil-tRNA. Questa reazione libera la fine carbossilica della catena polipeptidica dalla molecola di tRNA e il suo rilascio nel citoplasma. Il ribosoma poi rilascia la molecola di mRNA legata e si separa nelle due subunità che si possono poi assemblare su un'altra molecola di mRNA. Durante la traduzione il polipeptide nascente si muove attraverso un tunnel pieno d'acqua nella subunità grande del ribosoma. Le pareti del tunnel composte dai 23S rRNA sono un insieme di piccole superfici idrofobiche incastrate in una superficie idrofila più estensiva. Questa struttura non è complementare a nessun peptide e mette a disposizione un incapsulamento in cui il polipeptide può scivolare. Le proteine sono senza struttura mentre passano attraverso il ribosoma, anche se si possono creare delle regioni a α elica. Mentre lascia il ribosoma la proteina deve piegarsi nella conformazione utile alla cellula.

7.2.14 Le proteine sono create su poliribosomi

La sintesi della maggior parte delle proteine avviene tra i 20 secondi e molti minuti. Durante questo periodo avvengono molte iniziazioni su ognuno dei mRNA tradotti. Appena il ribosoma precedente ha tradotto abbastanza sequenza nucleotidica per muoversi la terminazione 5' viene messa in un nuovo ribosoma. Le molecole di mRNA che sono tradotte si trovano nella forma di poliribosomi: assemblaggi citoplasmatici grandi composti da molti ribosomi vicini al massimo 80 nucleotidi lungo un singolo mRNA.

7.2.15 Ci sono piccole variazioni nel codice genetico standard

Il codice genetico possiede delle rare eccezioni: nei mitocondri dei mammiferi AUA è tradotta in metionina, mentre nel citosol della cellula come isoleucina. Questo tipo di deviazione è specifica nell'organismo o nell'organello in cui avviene. In molte cellule avviene una ricodifica di traduzione in cui altra informazione di sequenza nucleotidica presente nell'mRNA può cambiare il significato del codice genetico ad un sito particolare dell'mRNA in quanto esiste un ventunesimo amminoacido, la selenocisteina, essenziale per molte funzioni enzimatiche che contiene un atomo di selenio al posto dello zolfo della cisteina. È prodotta enzimaticamente da una serina attaccata a una molecola speciale di tRNA che si accoppia con il codone UGA. L'mRNA per le proteine che la contengono possiedono una sequenza nucleotidica vicina che causa l'evento di ricodifica.

7.2.16 Meccanismi di controllo della qualità agiscono per prevenire la traduzione di mRNA danneggiati

Gli mRNA possono lasciare il nucleo danneggiati o danneggiarsi nel processo. Sono presenti molti meccanismi per impedire la loro traduzione come il riconoscimento del cappuccio 5' e la catena poli-A prima della traduzione. Il meccanismo più potente è il decadimento di mRNA mediato da nonsense che elimina gli mRNA difettivi prima che si sposino dal nucleo. Questo viene chiamato quando la cellula determina che una molecola di mRNA possiede un codone di terminazione nonsense nel posto errato. Avviene principalmente in una molecola con uno splice errato. Questo meccanismo inizia quando una molecola di mRNA viene trasportata nel citosol. Mentre la terminazione 5' emerge dal poro l'mRNA si incontra con un ribosoma che comincia la traduzione. Mentre questa procede il complesso di giunzione degli esoni legati all'mRNA a ogni sito di splice sono mossi dal ribosoma. Il codone di fine normale si trova dentro l'ultimo esone e quando il ribosoma arriva ad esso e si ferma nessun EJC sarà legato all'mRNA. In questo caso l'mRNA passa l'ispezione e può essere tradotto. Altrimenti la molecola viene degradata. Il primo passo di traduzione permette alla cellula di verificare la capacità della molecola di mRNA di produrre la proteina corretta mentre esce il nucleo.

7.2.17 Alcune proteine cominciano a piegarsi mentre vengono sintetizzate

La catena polipeptidica per essere utile alla cellula deve piegarsi nella conformazione, legare ogni cofattore necessario alla sua attività, essere modificata dalla chinasi o altri enzimi e assemblarsi con altre subunità proteiche con cui funziona. Queste informazioni sono contenute nella sequenza di amminoacidi. Quando una proteina si piega la parte idrofobica si trova in un nucleo interno e un gran numero di interazioni non covalenti si formano tra varie parti della molecola. L'insieme di queste interazioni energeticamente favorevoli determina la conformazione finale della catena. Per alcune proteine il ripiegamento inizia appena la catena esce dal ribosoma cominciando dalla terminazione N⁺. In questi casi si forma in pochi secondi una struttura compatta che contiene la maggior parte

delle strutture secondarie. Per alcuni domini proteici si crea uno stato flessibile detto il molten globule, il processo di inizio verso l'arrivo alla conformazione corretta.

7.2.18 Accompagnatori molecolari aiutano a guidare il piegamento della maggior parte delle proteine

La maggior parte delle proteine non si ripiegano correttamente durante la loro sintesi e richiedono proteine dette accompagnatori molecolari, utili in quanto stabiliscono il cammino di piegamento che la proteina deve compiere. Riconoscono specificatamente configurazioni scorrette dall'esposizione delle superfici idrofobiche causato da legami reciproci. Gli accompagnatori evitano questo legandosi con tali superfici.

7.2.19 La cellula utilizza diversi tipi di accompagnatori

Molti accompagnatori sono detti proteine a shock termico (hsp) in quanto sono sintetizzati in quantità maggiore dopo brevi esposizioni della cellula a temperature elevate che riflette all'operazione di un sistema di feedback che risponde a un aumento in proteine malformate aumentando la sintesi degli accompagnatori che aiutano a ripiegarsi. Ci sono diverse famiglie di accompagnatori e diversi membri funzionano in diversi organelli. Le proteine hsp60 e hsp70 lavorano con il loro piccolo insieme di proteine associate, hanno un'affinità per superfici idrofobiche esposte e idrolizzano l'ATP legandosi e rilasciando il substrato proteico ad ogni ciclo di idrolisi. hsp70 lavora con cellule appena sintetizzate con ogni suo monomero legandosi a una stringa di quattro o cinque amminoacidi idrofobici. Sull'ATP legante rilascia la proteina da una struttura a barile che agisce dopo che la proteina si è completamente sintetizzata. Detto chaperonina forma una camera di isolamento per il processo di piegamento. Per entrare nella camera la proteina substrato deve essere catturata attraverso l'entrata idrofobica e viene rilasciata nella camera piena di superfici idrofiliche e la camera è chiusa attraverso idrolisi dell'ATP. Qui il substrato si piega nella conformazione finale in isolamento. Quando l'ATP viene idrolizzato il coperchio della camera si separa e la proteina substrato esce dalla camera. L'energia dell'idrolisi viene utilizzata per movimenti meccanici che convertono gli accompagnatori dalla forma di cattura a quella di rilascio.

7.2.20 Regioni idrofobiche esposte forniscono segnali critici per i controlli di qualità delle proteine

L'azione della proteina hsp70 inizia quando una proteina sta venendo ancora sintetizzata. La cellula riconosce le proteine piegate male che richiedono turni addizionali di ripiegamento catalizzati dall'ATP. Se una proteina ha una superficie di amminoacidi idrofobi è anormale e può essere pericolosa per la cellula. Le proteine che si piegano velocemente da sole non mostrano questi pattern e possono evitare gli accompagnatori, mentre le altre sono riparate da essi. Quando questo non funziona un meccanismo la distrugge completamente. Questo cammino comincia con il riconoscimento di una superficie idrofobica anormale e finisce con la consegna della proteina a un complesso di proteasi detto proteosoma che la distrugge.

7.2.21 Il proteosoma è una proteasi compartimentalizzata con siti attivi reclusi

Il macchinario proteolitico e gli accompagnatori competono per il riconoscimento di una proteina piegate male. Se si ripiega rapidamente solo una piccola frazione viene degradata. L'apparato che

distrugge le proteine errate è il proteosoma, una proteasi dipendente dall'ATP. È presente in molte copie disperse nel citosol e nel nucleo e distrugge anche le proteine che sono entrate nel reticolo endoplasmatico. In questo caso sono riconosciute da un sistema di sorveglianza e le retrotrasloca nel citosol per la degradazione da parte del proteosoma. Ogni proteosoma consiste di un cilindro centrale vuoto formato da multiple subunità proteiche che si assemblano come uno stack di quattro anelli eptamerici. Alcune delle subunità sono proteasi i cui siti attivi si trovano all'interno della camera impedendo la loro azione incontrollata. Ogni fine del cilindro è associata a un complesso proteico che contiene sei anelli attraverso i quali le proteine obiettivo sono portate verso il nucleo dove sono degradate. La reazione di importazione è guidata dall'idrolisi dell'ATP e svolge la proteina obiettivo mentre si muove lungo il cappuccio esonendola alla proteasi nel nucleo. Le proteine appartengono alle unfoldases o proteina AAA che funzionano come esameri e hanno caratteristiche comuni alla DNA elicasi. Una proprietà cruciale del proteosoma è la processività del meccanismo: il substrato rimane legato fino a che non è completamente convertito in peptidi corti. I 19S cappucci del proteosoma agiscono come cancelli all'entrata del nucleo proteolitico interno e solo le proteine marcate per la distruzione possono passarci attraverso. La marcatura è il legame con l'ubiquitina, una piccola proteina che in questo caso è legata in una catena alla lisina 48. Un insieme speciale di molecole E3 è responsabile per l'ubiquitilazione di proteine denaturate, mal piegate o contenenti amminoacidi anormali o ossidati attraverso una superficie idrofobica esposta che agisce come segnale per queste molecole. In ogni caso si deve distinguere tra proteine completate con la conformazione errata e proteine che si stanno formando.

7.2.22 Molte proteine sono controllate da distruzione regolata

Un'altra funzione di questi cammini proteolitici è di conferire corte vite a proteine specifiche la cui concentrazione deve cambiare rapidamente con stati alterati della cellula. Alcune di queste sono degradate velocemente sempre, altre solo in certe condizioni. Questo viene controllato in una classe di meccanismi dall'attività di un ubiquitina ligasi che viene accesa da fosforilazione dell'E3 o da una transizione allosterica dell'E3 causata dal suo legame con una molecola. Il complesso di promozione dell'anafase (APC) è una ligasi a più subunità che è attivata da addizione di subunità durante la mitosi temporizzato dalla cellula. In risposta ad altri segnali si può creare un segnale di degradazione nella proteina causando una rapida ubiquitilazione. Un modo comune è la fosforilazione di un sito specifico che mostra un segnale di degradazione o una dissociazione di una subunità. Segnali di degradazione potenti possono essere creati rompendo un legame peptidico se questo crea una nuova terminazione N⁻ riconosciuta da una specifica proteina E3 come un residuo destabilizzante.

Capitolo 8

Controllo dell'espressione genica

8.1 Una panoramica del controllo dei geni

I differenti tipi di cellula in un organismo cellulare differiscono per struttura e funzione a causa delle diverse proteine che sintetizzano. Non sono differenze nella loro sequenza genica a determinarne la differenziazione ma i cambi nell'espressione dei geni.

8.1.1 Diversi tipi di cellule sintetizzano diversi insiemi di RNA e proteine

Molti processi sono comuni a tutte le cellule e due di esse in un singolo organismo condividono molti prodotti dei geni come proteine strutturali e cromosomi, RNA e DNA polimerasi, enzimi di riparazione del DNA, proteine ribosomiali e RNA, gli enzimi che catalizzano le reazioni centrali del metabolismo e molte proteine che formano il citoscheletro. Alcuni RNA e proteine sono abbondanti in cellule specializzate e non sono individuati in altri luoghi. Studi dei numeri degli RNA diversi suggeriscono che una tipica cellula umana ad ogni momento esprime tra il 30 e il 60% dei suoi geni. Il livello di espressione di quasi tutti i geni varia tra un tipo di cellula e l'altro. Le differenze tra gli mRNA sottostimano le differenze finali nelle proteine in quanto ci sono diversi passaggi dopo la produzione dell'RNA con cui l'espressione viene regolata.

8.1.2 Segnali esterni possono causare il cambio dell'espressione dei geni di una cellula

Ogni cellula è capace di alterare l'espressione dei geni in risposta a indizi extracellulari. Se una cellula del fegato è esposta all'ormone glucocorticoide si aumenta la produzione di energia dagli amminoacidi e altre piccole molecole inducendo l'enzima tirosina amminotrasferasi. Altre cellule rispondono diversamente o non rispondono affatto. Altre caratteristiche dell'espressione genica non cambiano e danno alla cellula le sue caratteristiche distintive.

8.1.3 L'espressione dei geni può essere regolata a molti dei passaggi nel cammino da DNA a RNA a proteine

La cellula può controllare la proteina che produce controllando quanto e quanto spesso viene trascritto il gene (controllo trascrizionale), controllando lo splicing e il processamento dei trascritti di RNA (controllo del processamento dell'RNA), selezionando quale mRNA completo viene esportato

al citosol e determinando dove viene localizzato (controllo di trasporto e localizzazione dell'RNA), selezionando quale mRNA nel citoplasma viene tradotto dal ribosoma (controllo traduzionale), destabilizzando certe molecole di mRNA nel citoplasma (controllo della degradazione dell'mRNA) e attivando, disattivando, degradando o localizzando selettivamente proteine dopo che sono state create (controllo dell'attività proteica).

8.2 Controllo della trascrizione da parte di proteine leganti a specifiche sequenze

Un gruppo di proteine detti regolatori di trascrizione riconoscono specifiche sequenze di DNA dette sequenze cis-regolatorie in quanto devono essere sullo stesso cromosoma del gene che regolano. I regolatori di trascrizione si legano a queste sequenze che sono disperse attraverso il genoma e il legame è messo in movimento da una serie di reazioni che specificano i geni da trascrivere e il tasso di trascrizione. La trascrizione di ogni gene è controllata da una collezione di sequenze cis-regolatorie che si trovano tipicamente vicino al gen, tipicamente a monte del punto di inizio di trascrizione. La maggior parte ha un complesso ordinamento di tali sequenze, ognuna riconosciuta da una proteina diversa che determinano il tempo e il luogo di trascrizione di ogni gene.

8.2.1 La sequenza dei nucleotidi nella doppia elica di DNA può essere letta da proteine

I regolatori di trascrizione riconoscono sequenze cis-regolatorie corte e specifiche nella doppia elica attraverso informazioni nella sua parte esterna: il lato di ogni coppia presenta un pattern di donatori e accettori di legami a idrogeno e parti idrofobiche sia nella scanalatura maggiore che minore. Tutti i regolatori di trascrizione fanno contatto con la scanalatura maggiore.

8.2.2 I regolatori di trascrizione contengono motivi strutturali che possono leggere sequenze di DNA

Il riconoscimento molecolare dipende da un adattamento esatto tra le superfici di due molecole: un regolatore di trascrizione riconosce una sequenza cis-regolatoria specifica in quanto la superficie della proteina è estensivamente complementare alle caratteristiche della doppia elica che presenta tale sequenza. Ogni regolatore di trascrizione fa una serie di contatti con il DNA attraverso legami ionici, a idrogeno e interazioni idrofobiche che in grande numero legano le due parti in una relazione stretta e specifica. Molti regolatori di trascrizione possiedono motivi strutturali che usano α -eliche o β -foglietti per legarsi alla scanalatura maggiore del DNA. Le catene laterali amminoacide che si estendono fanno contatti specifici con il DNA.

8.2.3 La dimerizzazione dei regolatori di trascrizione aumenta la loro affinità e specificità per il DNA

Un monomero di un regolatore di trascrizione tipico riconosce circa 6-8 coppie di nucleotidi, ma riconoscono un intervallo di sequenze strettamente imparentate con l'affinità della proteina variando in base a quanto la corrispondenza è corretta. Le sequenze cis-regolatorie mostrano l'intervallo di sequenze riconosciute da un regolatore di trascrizione particolare. La sequenza di DNA riconosciuta da un monomero non ha informazioni sufficienti per essere scelta da tutti le sequenze randomiche nel genoma e si rendono necessarie altre contribuzioni per aumentare la specificità. Molti regolatori

8.3. I REGOLATORI DI TRASCRIZIONE ATTIVANO E DISATTIVANO I GENI

di trascrizione formano dimeri con entrambi i monomeri facendo contatti molto simili con il DNA. In questo modo si raddoppia la lunghezza della sequenza riconosciuta e si aumenta l'affinità e la specificità del legame dei regolatori. Spesso si formano eterodimeri tra due regolatori diversi con più di una proteina in modo da creare diverse specificità diverse.

8.2.4 I regolatori di trascrizione si legano cooperativamente al DNA

Nel caso più semplice l'insieme dei legami covalenti che tiene insieme i dimeri è sufficiente per formare queste strutture obbligatoriamente e impedendo la loro separazione, caso in cui l'unità di legamento del dimero e la curva di legame per il regolatore di trascrizione ha una forma esponenziale standard. In molti casi i dimeri e gli eterodimeri sono tenuti insieme molto debolmente. Le proteine legano il DNA cooperativamente con una curva sigmoidale. Questo vuol dire che per un intervallo di concentrazioni del regolatore di trascrizione il legame è più un fenomeno binario che per legami non cooperativi, ovvero alla maggior parte delle concentrazioni la sequenza cis-regolatoria è o quasi vuota o quasi completamente occupata.

8.2.5 La struttura del nucleosoma promuove legami cooperativi di regolatori di trascrizione

Esiste un meccanismo secondario e indiretto per favorire i legami cooperativi che nasce dalla struttura nucleosomica dei cromosomi eucariotici. In generale i regolatori di trascrizione si legano al DNA nei nucleosomi con affinità minore rispetto al DNA da solo in quanto la superficie potrebbe essere contro il nucleosoma non disponibile o i cambi che i regolatori compiono al DNA sono contrastati dal legame stretto del DNA lungo il nucleo istonico. Anche senza rimodellazione i regolatori possono avere accesso limitato nel DNA che alla fine di un nucleosoma si espone temporaneamente e permette il legame dei regolatori. Queste proprietà del nucleosoma promuovono legami cooperativi in quanto se un regolatore entra nel DNA di un nucleosoma previene il suo restringimento aumentando l'affinità per un secondo regolatore. Se i due interagiscono tra di loro l'effetto cooperativo è maggiore arrivando in alcuni casi a separare l'istone. La cooperazione aumenta quando sono coinvolti complessi di rimodellazione del nucleosoma. Se un regolatore di trascrizione si lega alla sequenza cis-regolatoria e attrae un complesso di rimodellazione della cromatina, l'azione localizzata di quest'ultimo permette a un secondo regolatore di legarsi efficientemente vicino.

8.3 I regolatori di trascrizione attivano e disattivano i geni

8.3.1 Il repressore triptofano disattiva i geni

Il genoma nel batterio *E. coli* consiste di una molecola di DNA di $4.6 \cdot 10^6$ coppie di nucleotidi e codifica 4300 proteine. L'espressione dei geni viene regolata in base alla disponibilità di nutrienti nell'ambiente. Ci sono 5 geni che codificano per l'amminoacido triptofano in un cluster sul cromosoma e sono trascritti da un singolo promotore su una molecola di mRNA detta operone. Gli operoni sono rari negli eucarioti, dove i geni sono trascritti e regolati individualmente. Quando la concentrazione di triptofano è bassa l'operone è trascritto producendo un insieme di enzimi biosintetici che lavorano insieme per produrre triptofano da molecole più semplici. Quando il triptofano è abbondante l'amminoacido è importato nella cellula e la produzione di questi enzimi viene bloccata. Nel promotore dell'operone è presente una sequenza cis-regolatrice che è riconosciuta da un regolatore di trascrizione che quando si lega alla sequenza blocca l'accesso della RNA polimerasi al

8.3. I REGOLATORI DI TRASCRIZIONE ATTIVANO E DISATTIVANO I GENI

promotore impedendo la trascrizione. Questo regolatore è detto repressore del triptofano e la sequenza cis-regolatrice triptofano operatore. Il repressore può legarsi al DNA solo se ha anche legate molte molecole di triptofano. Il repressore è una proteina allosterica e il legame con il triptofano causa un cambio conformazionale in modo che possa legarsi alla sequenza operatore. Quando la concentrazione di triptofano diminuisce questo si disassocia dal repressore che non può più rimanere legato al DNA.

8.3.2 I repressori disattivano i geni e gli attivatori li attivano

Le proteine repressori trascrizionali disattivano i geni o li reprimono. Alcuni regolatori attivano i geni. Questi attivatori trascrizionali lavorano con il promotore che è solo marginalmente capace di legarsi a sequenze cis-regolatorie e contatta la RNA polimerasi per aiutarla a iniziare la trascrizione. Queste proteine attivatrici legate al DNA possono aumentare il tasso anche di 1000 volte. Queste proteine devono interagire con una seconda molecola per riuscire a legarsi al DNA: l'attivatore batterico CAP deve legare AMP ciclici prima che possa legarsi al DNA. I geni attivati da esso vengono trascritti in risposta a un aumento della concentrazione di cAMP che aumenta quando il glucosio non è più disponibile, guidando la produzione di enzimi che permettono al batterio di digerire altri zuccheri.

8.3.3 Un attivatore e un repressore controllano l'operone Lac

In molte istanze l'attività di un singolo promotore è controllata da diversi regolatori di trascrizione. L'operone Lac è controllato sia dai repressori Lac e dagli attivatori CAP. L'operone Lac codifica le proteine richieste per l'importazione e la digestione del lattosio. In assenza di glucosio il batterio crea cAMP che attiva CAP attivando i geni che permettono alla cellula di utilizzare alternative fonti di carbonio come il lattosio. Il repressore Lac disattiva l'operone in assenza di lattosio. Questo permette al controllo della regione dell'operone Lac di integrare due segnali diversi in modo che il gene è altamente espresso solo quando il glucosio è assente e il lattosio è presente. Tutti i regolatori di trascrizione devono legarsi al DNA per sortire un effetto. In questo modo ogni proteina regolatoria agisce selettivamente, controllando solo i geni che portano una sequenza cis-regolatoria riconosciuta da essa.

8.3.4 L'inanellamento del DNA può avvenire durante la regolazione genica dei batteri

Gli attivatori e i repressori sono molto simili in quanto devono riconoscere la sequenza cis-regolatoria attraverso lo stesso motivo strutturale. Alcune proteine possono pertanto agire sia come repressori che attivatori in base al loro posizionamento esatto nella sequenza. La maggior parte dei batteri hanno un genoma piccolo e compatto e le sequenze cis-regolatorie si trovano molto vicino al punto di inizio della trascrizione, con delle eccezioni in cui è distante centinaia o migliaia di coppie. In questi casi il DNA è inanellato permettendo a un legame proteico ad un sito distante di contattare la RNA polimerasi e il DNA si comporta come un legame aumentando la probabilità che le proteine collidano.

8.3.5 Interruttori complessi controllano la trascrizione genica negli eucarioti

I regolatori di trascrizione negli eucarioti coinvolgono molte proteine lunghe sequenze di DNA. Come nei batteri il tempo e luogo della trascrizione di un gene è regolato da sequenze cis-regolatorie che

sono lette dai regolatori di trascrizione che si legano a esse. Gli attivatori aiutano a legare la RNA polimerasi ad iniziare la trascrizione e i repressori bloccano il processo. Queste interazioni sono per la maggior parte indirette con molte proteine intermediarie come gli istoni. Negli organismi multicellulari dozzine di regolatori di trascrizione controllano un singolo gene con sequenze cis-regolatorie diffuse in decine di migliaia di paia di nucleotidi. L'inallentamento del DNA permette le proteine regolatorie di interagire tra di loro e con la polimerasi al promotore. Infine l'iniziazione della trascrizione deve superare il blocco imposto dai nucleosomi e strutture di livello superiore.

8.3.6 Una regione di controllo di un gene eucariotico consiste di un promotore e molte sequenze cis-regolatorie

Negli eucarioti la RNA polimerasi II trascrive tutti i geni codificatori delle proteine e molti non codificatori e richiede 5 fattori di trascrizione generali il cui assemblaggio mette a disposizione multipli passi per il regolamento della trascrizione. Si usa il termine regione del controllo del gene per descrivere l'intera lunghezza di DNA coinvolta nella regolazione e iniziazione della trascrizione che include il promotore, dove i fattori generali di trascrizione e la polimerasi si assemblano e tutte le sequenze cis-regolatorie in cui i regolatori si legano per controllare il tasso di assemblaggio al promotore. Alcune parti delle regioni regolatorie sono trascritte come lncRNA e si possono considerare come sequenze spaziatrici che i regolatori di trascrizione non riconoscono direttamente. In contrasto con il piccolo numero di fattori generali di trascrizione ci sono migliaia di diversi regolatori di trascrizione che attivano o disattivano un singolo gene. Negli eucarioti gli operoni sono rari e ogni gene è regolato individualmente.

8.3.7 I regolatori di trascrizione eucariotici lavorano in gruppi

I regolatori di trascrizione eucariotici si assemblano in gruppi alle loro sequenze cis-regolatorie con spesso interazioni cooperative. Oltre a questi sono presenti proteine coattivatrici o corepressori che si assemblano sul DNA con essi e non riconoscono specifiche sequenze di DNA e sono portati in queste posizioni dai regolatori di trascrizione. Queste interazioni proteina-proteina sono troppo deboli per avvenire in soluzione ma possono cristallizzarsi con l'appropriata combinazione di sequenze cis-regolatorie. I coattuatori e i corepressori influenzano la trascrizione dopo che sono stati localizzati sul genoma dai regolatori. Un regolatore può partecipare in più di un tipo di complesso regolatorio e funzionano pertanto come parti di un complesso che reprime la trascrizione. Ogni gene eucariotico è regolato da un insieme di proteine che devono essere tutte presenti per esprimere il gene al livello appropriato.

8.3.8 Le proteine attivatrici promuovono l'assemblaggio di RNA polimerasi al punto di inizio della trascrizione

Le sequenze cis-regolatorie in cui le proteine attivatrici si legano aumentano il tasso di iniziazione della trascrizione attraendo e posizionando RNA polimerasi II al promotore e rilasciarla in modo che il processo inizi. Alcune proteine attivatrici si legano direttamente a fattori di trascrizione generali velocizzando il loro assemblaggio al promotore che è stato portato in prossimità grazie all'inallentamento del DNA. La maggior parte degli attivatori attraggono coattuatori che poi svolgono il compito biochimico per iniziare la trascrizione. Uno di questi è il complesso di proteine mediatore composto da più di 30 subunità e serve come ponte tra gli attivatori legati al DNA, la RNA polimerasi e i fattori di trascrizione generali facilitando il loro assemblaggio al promotore.

8.3.9 Gli attivatori di trascrizione eucariotici direaziono la modifica di strutture cromatiniche locali

I fattori generali di trascrizione e l'RNA polimerasi sono incapaci di assemblarsi su un promotore che è condensato in un nucleosoma. Gli attivatori devono pertanto svolgere questo compito causando cambi alla struttura cromatinica rendendo il DNA più accessibile. Il modo più importante per compiere questo è attraverso cambi locali con modifiche covalenti degli istoni, rimodellamento dei nucleosomi, la loro rimozione e sostituzione. Gli attivatori usano tutti questi meccanismi e attraggono coattivatori che includono enzimi di modifica degli istoni, complessi di rimodellamento della cromatina dipendenti dall'ATP e accompagnatori di istoni, ognuno dei quali può alterare la struttura cromatinica del promotore. L'alterazione della struttura cromatinica può persistere per diverso tempo: in alcuni casi le modifiche sono eliminate appena i regolatori si disassociano dal DNA, cosa importante per geni che la cellula deve rapidamente attivare o disattivare in risposta a segnali esterni. In altri casi la struttura persiste in modo da estendere questa informazione alle generazioni successive e modificare la memoria dei pattern di espressione genica. Un tipo speciale di modifica cromatinica accade quando l'RNA polimerasi trascrive un gene: gli istoni dopo la polimerasi possono essere acetilati da enzimi, rimossi dagli accompagnatori degli istoni e depositati dietro la polimerasi. Questi istoni sono poi deacetilati e metilati rapidamente da complessi trasportati dalla polimerasi lasciando nucleosomi resistenti a trascrizione. Questo processo sembra prevenisca reiniziazioni spurie dietro a una polimerasi che deve crearsi una via attraverso la cromatina.

8.3.10 Gli attivatori di trascrizione possono promuoverla rilasciando la RNA polimerasi dai promotori

In alcuni casi l'iniziazione della trascrizione richiede che un attivatore di trascrizione legato al DNA rilasci la RNA polimerasi dal promotore in modo da permettere l'inizio della trascrizione. In altri casi la polimerasi si blocca dopo aver trascritto 50 nucleotidi e ulteriore allungamento richiede un attivatore legato dietro a essa. Queste polimerasi bloccate sono comuni negli esseri umani. Il rilascio della RNA polimerasi può avvenire attraverso un complesso di rimodellamento della cromatina che rimuove un blocco nucleosomico o attraverso un attivatore che comunica con la RNA polimerasi tipicamente attraverso un coattivatore segnalando di procedere. Infine i fattori di allungamento permettono alla polimerasi di trascrivere attraverso la cromatina che in alcuni casi è il passo chiave per il controllo. Una volta che i fattori di allungamento sono caricati permettono alla polimerasi di muoversi attraverso i blocchi cromatinici. Avere una RNA polimerasi già posizionata ad un promotore permette di bypassare il passaggio di assemblaggio e di rispondere più velocemente a segnali esterni.

8.3.11 Gli attivatori di trascrizione lavorano sinergicamente

I complessi di attivatori e coattivatori si assemblano cooperativamente sul DNA e possono promuovere diversi passi dell'iniziazione di trascrizione. L'aumento del tasso di reazione finale dovuto a un insieme di attivatori è il prodotto dei contributi dei singoli. Si nota pertanto come gli attivatori esibiscano sinergia trascrizionale.

8.3.12 Repressori di trascrizione eucariotici possono inibire la trascrizione in molti modi

I repressori di trascrizione possono diminuire il tasso di trascrizione e disattivare geni rapidamente. Grandi regioni di genoma possono essere disattivate dalla condensazione del DNA in forme cromatiniche specialmente resistenti, ma la maggior parte non sono organizzati per funzione e pertanto non è una strategia sempre disponibile. La maggior parte dei repressori lavorano gene per gene. Non competono direttamente con la RNA polimerasi per l'accesso al DNA ma usano molti meccanismi che bloccano la trascrizione. Tipicamente agiscono portando un corepressore al DNA. I repressori possono agire su più di un meccanismo ad un gene. La repressione è specialmente importante per organismi la cui crescita dipende da programmi di sviluppo elaborati e complessi.

8.3.13 Sequenze di DNA isolanti impediscono a regolatori di influenzare geni distanti

Per evitare che regolatori di geni diversi si influiscano tra di loro elementi del DNA compartimentalizzano il DNA in domini regolatori discreti. Sono presenti sequenze barriera che impediscono la diffusione di eterocromatina in geni che devono essere espressi. Un isolatore impedisce a sequenze cis-regolatorie di attivare geni inappropriati. Funzionano formando anelli di cromatina attraverso proteine specializzate che si legano a loro. Gli anelli tengono un gene e la sua regione di controllo in prossimità e aiutano a prevenire l'uscita di una regione di controllo in geni adiacenti. La distribuzione degli isolatori e sequenze barriera si pensa divida il genoma in domini indipendenti di regolazione genica e struttura cromatinica.

8.3.14 Meccanismi genetici molecolari che creano e mantengono tipi di cellula specializzati

Le cellule di organismi multicellulari mantengono la scelta della differenziazione in un tipo di cellula specifico, ricordando i cambi nell'espressione genica coinvolti nella scelta. Questa memoria è un prerequisito per la creazione di tessuti organizzati e per il mantenimento di tipi cellulari stabilmente differenziati.

8.3.15 Complessi interruttori genici che regolano lo sviluppo della Drosophila sono creati da molecole più piccole

Considerando il gene Even-skipped (Eve) della Drosophila la cui espressione è fondamentale per lo sviluppo dell'embrione si nota come se il gene è disattivato per mutazione, molte parti dell'embrione non si formano e questo muore. Quando Eve comincia ad essere espresso l'embrione è una singola cellula gigante contenente nuclei multipli in un citoplasma comune che contiene anche un insieme di regolatori di trascrizione distribuiti lungo la lunghezza dell'embrione fornendo informazioni posizionali che distinguono una parte dell'embrione dall'altra. I nuclei cominciano rapidamente ad esprimere geni diversi in quanto sono esposti a differenti regolatori. Le sequenze di DNA regolatorie che controllano il gene Eve si sono evolute per leggere le concentrazioni di regolatori di trascrizione ad ogni posizione e causano l'espressione del gene in sette fasce precisamente posizionate, ognuna larga tra 5 e 6 nuclei. La regione regolatoria del gene Eve è molto lunga ed è formata da una serie di moduli regolatori con una semplice sequenza cis-regolatoria responsabile per la specificazione di una particolare fascia di espressione lungo l'embrione.

8.3.16 Il gene Eve della Drosophila è regolato da controlli combinatori

Il modello del modulo regolatorio della seconda faccia contiene sequenze di riconoscimento per due regolatori di trascrizione (Bicoid e Hunchback) che attivano la trascrizione di Eve e per altri due (Küppel e Giant) che la reprimono. La concentrazione relativa di queste quattro proteine determina se il complesso presente alla fascia attiva la trascrizione. Tale elemento, come quelli di tutte le altre fasce sono autonomi. L'intera regione di controllo lega più di 20 regolatori di trascrizione. 7 combinazioni di regolatori ne specificano l'espressione, mentre altre combinazioni lo mantengono silente. La regione di controllo è pertanto costituita da una serie di moduli più piccoli, ognuno dei quali consiste di un unico ordinamento di corte sequenze cis-regolatorie riconosciute da regolatori di trascrizione specifici. Il gene Eve codifica un regolatore di trascrizione che controlla l'espressione di altri geni. L'embrione viene diviso in regioni sempre più specifiche fino a che costituisce le parti del corpo della Drosophila.

8.3.17 I regolatori di trascrizione sono messi ingioco da segnali extracellulari

Nella maggior parte degli embrioni e nelle cellule adulte i nuclei si trovano in cellule separate e si necessita un passaggio di informazioni extracellulari attraverso la membrana plasmatica per generare segnali nel citosol che causano l'attivazione di diversi regolatori.

8.3.18 Il controllo dei geni combinatorio diversi tipi di cellule

Ogni regolatore di trascrizione in un organismo contribuisce al controllo di molti geni. A causa di questo controllo combinatorio un regolatore di trascrizione non ha una funzione definita come un comandante di uno specifico insieme di geni o di un tipo cellulare, ma è la sua combinazione relativa con altri a stabilire quest'informazione. Il controllo genico combinatorio causa l'addizione di un nuovo regolatore di trascrizione che dipende dalla storia precedente. Durante lo sviluppo una cellula accumula una serie di regolatori che ne alterano l'espressione genica solo quando l'ultimo membro presente viene aggiunto. Questo meccanismo permette ad alcune cellule di convertire da un tipo all'altro.

8.3.19 Combinazioni di regolatori di trascrizione master specificano il tempo della cellula controllando l'espressione di molti geni

I pattern di espressione del tipo cellulare sono determinati da una combinazione di regolatori di trascrizione master che in molti casi si legano direttamente a sequenze cis-regolatorie del gene. MyiD si lega direttamente alla sequenza cis-regolatoria delle regioni di controllo sui geni specifici ai muscoli. In altri casi i regolatori master controllano l'espressione di regolatori a valle che si legano alle regioni di controllo di altri geni specifici e controllano la loro sintesi. La specifica di un particolare tipo di cellula coinvolge cambi nell'espressione di migliaia di geni: quelli richiesti dal particolare tipo sono prodotti, gli altri no.

8.3.20 Cellule specializzate devono rapidamente attivare e disattivare insieme di geni

Le cellule specializzate devono rispondere ai cambi nell'ambiente come segnali da altre cellule che coordinano il comportamento dell'intero organismo. Molti di questi segnali inducono cambi temporanei alla trascrizione dei geni. L'effetto di un singolo regolatore può avere effetto, completando la

8.4. MECCANISMI CHE RINFORZANO LA MEMORIA CELLULARE IN PIANTE E ANIMALI

combinazione necessaria per attivare o reprimere il gene. Un esempio è la proteina glucocorticoide-recettrice umana. Per elgarsi alla sua sequenza cis-regolatoria deve prima formare un complesso con un ormone glucocorticoide steriode come il cortisolo che viene rilasciato dal corpo durante periodi di fame e intensa attività ficia, stimolando le cellule del fegato ad aumentare la produzione di glucosio dagli amminoacidi. Tali cellule aumentano l'espressione di molti geni che codificano gli enzimi metabolici. Nonostante questi geni abbiano regioni di controllo diverse e complesse la loro espressione massimale dipende dal legame del complesso ormone-glucocorticoide alla sua sequenza cis-regolatoria, presente nella regione di controllo di ogni gene.

8.3.21 Cellule differenziate mantengono la loro identità

Una volta che una cellula si è differenziata generalmente rimarrà differenziata e tutta la sua progenie rimarrà dello stesso tipo. Alcune cellule altamente specializzate non si dividono più, ovvero si differenziano terminalmente. Molte altre cellule differenziate si dividono molte volte nella vita di un individuo generando progenie dello stesso tipo. Affinchè il tipo venga mantenuto (memoria cellulare) i pattern di espressione genica responsabili devono essere mantenuti e passati alle figlie durante le divisioni. Questo viene ottenuto attraverso un loop a feedback positivo, dove un regolatore di trascrizione master attiva la trascrizione per il proprio gene e a tutti gli altri specifici al sito. Ogni volta che la cellula si divide questo viene passato alle figlie.

8.3.22 Circuiti di trascrizione permettono alla cellula di compiere operazioni logiche

Semplici regolatori possono essere combinati per creare dispositivi di controllo che se ordinati in motivi di rete possono essere trovati continuamente in cellule di specie diverse. Sono comuni anelli di feedback positivi e negativi. Con più regolatori i comportamenti dei circuiti possono diventare più complessi come flip-flops, loop a feed-forward.

8.4 Meccanismi che rinforzano la memoria cellulare in piante e animali

8.4.1 Pattern di metilazione del DNA possono essere ereditati quando le cellule dei vertebrati si dividono

Nelle cellule dei vertebrati la metilazione della citosina fornisce un meccanismo attraverso cui i pattern di espressione genica possono essere passati alla progenie della cellula. La 5-metil citosina ha la stessa relazione con la citosina che la timina ha con l'uracile e la modifica non ha effetto sull'accoppiamento delle basi. La metilazione del DNA avviene principalmente in sequenze CG accoppiate alla stessa sequenza opposta all'altro filamento. Un semplice meccanismo permette a questo pattern di essere ereditato. L'enzima metil trasferasi di manutenzione agisce sulle sequenze già metilate e il pattern di metilazione serve come stampo per la metilazione del filamento figlio. Tali pattern sono dinamici durante lo sviluppo. Dopo la fertilizzazione c'è un'onda di metilazione dove la maggior parte dei gruppi metili sono persi dal DNA attraverso soppressione dell'attività della metil trasferasi o grazie a enzimi di demetilazione. Successivamente nello sviluppo nuovi pattern sono stabiliti da nuove DNA metil trasferasi direzionate al DNA da proteine specifiche alla sequenza. Una volta che i nuovi pattern sono stabiliti possono essere propagati attraverso la replicazione. La metilazione de DNA lavora in congiunzione con altri meccanismi di controllo genici

8.4. MECCANISMI CHE RINFORZANO LA MEMORIA CELLULARE IN PIANTE E ANIMALI

per stabilire una forma efficiente di repressione genica. In questo modo i geni eucariotici possono essere altamente repressi. I gruppi metili sulle citosine si trovano nella scanalatura maggiore del DNA e interferiscono direttamente con le proteine di legame richieste per l'iniziazione della trascrizione e la cellula contiene un insieme di proteine che si legano a tali citosine come enzimi di modifica degli istoni che portano a stati di cromatina repressivi dove la metilazione e la struttura cromatinica agiscono sinergicamente.

8.4.2 Isole ricche di CG sono associate con molti geni nei mammiferi

La citosina metilata tende ad essere eliminata nei genomi dei vertebrati in quanto deaminazione accidentale di un non metilato C genera U che viene riconosciuto dalla DNA glicosilasi, esportato e sostituito con un C. Deaminazione accidentale di una citosina metilata non può essere riparata in quanto il prodotto è una T. Esiste pertanto uno speciale sistema di riparazione per rimuovere queste T mutanti che non sono precisi. Le sequenze CG rimanenti sono distribuite non uniformemente nel genoma e maggiormente nelle isole CG e tipicamente includono promotori dei geni. Sono maggiormente presenti nei geni che codificano proteine necessarie alla vita della cellula. Isole CG rimangono non metilate nella maggior parte delle cellule somatiche e tale stato è mantenuto da proteine specifiche alla sequenza. Legandosi a queste sequenze proteggono il DNA dalla metiltransferasi e reclutano DNA demetilasi che converte la 5-metil C in idrossi-metil C che è successivamente sostituita da C attraverso riparazione del DNA o passivamente. Tali isole permettono ad alcune proteine che si legano alle isole di CG e le proteggono dall'enzima modificatore di istoni che recluta la metilazione e rendono l'isola amichevole ai promotori. La RNA polimerasi è pertanto spesso legata a promotori nelle isole di CG. La polimerasi si trova pertanto maggiormente rispetto ai nucleosomi. Altri passi sono necessari per iniziare la trascrizione e sono diretti da regolatori che si legano alle sequenze cis-regolatorie del DNA che rilasciano la polimerasi con i fattori di allungamento.

8.4.3 L'imprinting genomico si basa sulla metilazione del DNA

Le cellule dei mammiferi sono diplodi e l'espressione di una minoranza dei geni dipende dal fatto se sono stati ereditati dalla madre o dal padre: quando la copia del gene paterno è attiva quello materno è disattivo o viceversa. Questo fenomeno è detto imprinting genomico. L'imprinting può smascherare mutazioni coperte dall'altra coppia funzionale. Nel primo embrione i geni soggetti a imprinting sono marcati da metilazione secondo il fatto che siano derivati da un cromosoma dello sperma o dell'uovo. In questo modo la metilazione del DNA viene usata per distinguere due geni altrimenti identici. In qualche modo sono protetti dall'onda di demetilazione le cellule somatiche si ricordano l'origine parentale di ogni gene e regolano la loro espressione secondo questo. Nella maggior parte dei casi vengono silenziati geni vicini, ma in alcuni casi possono essere attivati. In altri casi l'imprinting coinvolge long noncoding RNA definiti come molecole di RNA più lunghe di 200 nucleotidi che non codificano le proteine. Nel caso del gene *Kcnq1* che codifica per un canale di calcio legato al voltaggio necessario per la funzione del cuore l'ncRNA è fatto dall'allele paterno non metilato ma non è rilasciato dalla RNA polimerasi e rimane nel sito della sintesi e recluta enzimi modificatori degli istoni e per la metilazione del DNA che direzionano la formazione di cromatina repressiva che silenzia il gene associato sul cromosoma derivato dal padre. Il gene materno è immune a questi effetti.

8.4.4 Alterazioni globali al cromosoma nella struttura cromatinica possono essere ereditate

Nei mammiferi alterazioni nella struttura cromatinica di un cromosoma possono modulare il livello di espressione della maggior parte dei geni su quel cromosoma. Maschi e femmine differiscono nei loro cromosomi sessuali: le femmine possiedono due cromosomi X mentre i maschi un X e un Y. La cellula femmina contiene pertanto il doppio delle coppie dei geni del cromosoma X, diverso dall'Y: il primo è grande e contiene più di mille geni, mentre il secondo è piccolo e ne contiene meno di 100. Si è evoluto un meccanismo di compensazione del dosaggio per equalizzare il dosaggio di prodotti dei geni del cromosoma X tra maschi e femmine. Il tasso corretto dei geni del cromosoma X a autosoma è controllato e mutazioni che lo coinvolgono sono generalmente letali. I mammiferi ottengono questa compensazione disattivando uno dei due cromosomi X nelle cellule femminili somatiche nella disattivazione-X: due cromosomi X possono coesistere nello stesso nucleo e differire completamente nella loro espressione. In un primo momento durante lo sviluppo dell'embrione femminile uno dei due cromosomi X in ogni cellula diventa altamente condensato in un tipo di eterocromatina. La scelta iniziale è casuale e una volta che viene disattivato rimane silente attraverso tutte le cellule sequenti. A causa della casualità ogni femmina è un mosaico di gruppi clonali di cellule in cui uno dei due è silenziato. Questi gruppi si trovano in piccoli cluster. La disattivazione del cromosoma X inizia e si diffonde da un sito vicino al centro del cromosoma, il centro di inattivazione X (XIC) dove è trascritto un lncRNA (Xist) che è espresso unicamente dal cromosoma inattivo. L'RNA Xist si diffonde dal XIC all'intero cromosoma e guida il silenziamento. Lo Xist che si diffonde è prima passato attraverso la base degli anelli che creano i cromosomi. Imprinting e disattivazione del cromosoma X sono esempi di espressione genetica monoallelica.

8.4.5 Meccanismi epigenetici assicurano che pattern stabili di espressione genica possono essere trasmessi a cellule figlie

Il modo più semplice per una cellula di ricordare la sua identità è attraverso loop a feedback positivo in cui un regolatore di trascrizione chiave attiva la trascrizione del proprio gene. Tali loop concatenati forniscono grande stabilità bufferando il circuito contro fluttuazioni nel livello di qualcuno dei regolatori di trascrizione. Siccome i regolatori di trascrizione sono sintetizzati nel citosol e si diffondono attraverso il nucleo i loop hanno effetto su entrambe le copie del gene nella cellula diploide, ma anche le differenze di livello di espressione tra lo stesso gene viene ereditata. L'abilità della cellula di mantenere la memoria di pattern di espressione genica è un esempio di ereditarietà epigenetica: un'alterazione nel fenotipo ereditabile che non risulta da cambi nella sequenza del DNA.

8.5 Controlli post trascrizionali

I controlli post trascrizionali operano dopo che la RNA polimerasi si è legata al promotore del gene e ha iniziato la sintesi sono cruciali per la sintesi di molti geni.

8.5.1 L'attenuazione della trascrizione causa la terminazione prematura di alcune molecole di RNA

L'espressione di alcuni geni è inibita da terminazione prematura della trascrizione, fenomeno detto attenuazione della trascrizione. In alcuni di questi casi la catena di RNA adotta una struttura che causa la sua interazione con la polimerasi in modo da abortire la sua trascrizione. Quando il gene è richiesto proteine regolatorie si legano alla catena e rimuovono l'attenuazione. Un esempio di

questo avviene durante il ciclo dell'HIV in cui il DNA virale è trascritto dalla polimerasi II che di solito termina prima di averne sintetizzato l'intero genoma. Quando le condizioni per la crescita virale sono ottime una proteina codificata dal virus Tat si lega a una struttura specifica dell'RNA che contiene una base rigonfia impedendo la terminazione prematura.

8.5.2 Riboswitches rappresentano probabilmente antiche forme di controllo genico

I riboswitches dimostrano come anche l'RNA può formare dispositivi di controllo: piccole sequenze di RNA che cambiano la loro conformazione quando si legano a piccole molecole come i metaboliti. Ogni riboswitch riconosce una piccola molecola e il cambio conformazionale viene utilizzato per regolare l'espressione dei geni. Sono spesso localizzati vicino alla terminazione 5' dell'mRNA e si piegano mentre viene sintetizzato bloccando o permettendo il progresso della RNA polimerasi. Sono comuni nei batteri, altamente specifici. Non necessitano proteine regolatorie. Controllano l'allungamento della trascrizione.

8.5.3 RNA splicing alternativo può produrre diverse forme di proteine dallo stesso gene

L'RNA splicing accorcia il trascritto di molti geni rimuovendo sequenze di introni dal precursore. Una cellula può fare splicing sullo stesso precursore in maniera diversa creando diverse catene polipeptidiche durenate RNA splicing alternativo. Quando esistono diverse possibilità di splicing un singolo gene può produrre dozzine di diverse proteine. In alcuni casi accade a causa di ambiguità nella sequenza dell'introne: lo spliceosoma standard è incapace di distinguere tra due o più coppie alternative di accoppiamenti 5' e 3' di siti di splicing e possono essere fatte scelte diverse. In molti casi viene regolato per passare dalla produzione di una proteina non funzionale a una funzionale o viceversa. Oltre a questo può produrre diverse versioni di una proteina secondo la necessità della cellula. Lo splicing può essere regolato negativamente da una molecola regolatoria che impedisce al macchinario di accedere a un sito di splice particolare all'RNA o positivamente da una che aiuta a direzionare lo splicing. Si può pensare allo splicing di una molecola di pre-mRNA come a un equilibrio tra siti di splicing in competizione.

8.5.4 La definizione di un gene è stata modificata

Fino alla scoperta che i geni eucariotici contengono introni e che le loro sequenze codificanti possono essere assemblate in vari modi il gene era definito operazionalmente come una regione del genoma che segrega una singola unità durante la meiosi e dà origine a un tratto fenotipico definibile. Successivamente si è passati a una definizione secondo cui la maggior parte dei geni corrispondono a una regione del genoma che direziona la sintesi di un singolo enzima. La giorno d'oggi un gene viene definito come una sequenza di DNA che è trascritta come una singola unità e codifica un insieme di catene polipeptidiche strettamente imparentate (proteine isoformiche).

8.5.5 Un cambio nel sito della rottura del trascritto a RNA e dell'addizione Poli-A può cambiare la terminazione C di una proteina

La terminazione di una molecola di mRNA non è formata dalla sintesi dell'RNA da parte della polimerasi, ma risulta da una reazione di rottura catalizzata da altre proteine mentre il trascritto si allunga. Una cellula può controllare il sito di questa rottura cambiando la terminazione C della

proteina risultante. In alcuni casi si produce una versione troncata, in altri rottura alternativa e siti di poliadenilazione si trovano tra le sequenze di introni e viene alterato il pattern di splicing. Questo processo può produrre due proteine che divergono solo nella sequenza alla terminazione C. Un esempio di questo è il passaggio dalla forma legata a membrana a quella di antibiotico secreto durante lo sviluppo dei linfociti B. Presto nella vita del linfocita B l'anticorpo che produce è ancorato alla membrana plasmatica dove è un recettore per antigeni la cui presenza causa una sua moltiplicazione e l'inizio della secrezione di anticorpi. La forma secreta è identica a quella legata a membrana ad eccezione della terminazione C. In questa parte si trova una lunga stringa di amminoacidi idrofobici che attraversano il bistrato lipidico della membrana, mentre la forma secreta è corta e contiene amminoacidi idrofilici. Questo passaggio avviene a causa del cambio del sito di rottura e poliadenilazione causato da un aumento di concentrazione della proteina CstF che promuove la rottura dell'RNA: il primo sito di rottura e addizione poliA viene ignorato in quanto subottimo solitamente, ma quando viene attivata per produrre anticorpi viene considerato a causa di un aumento di concentrazione di proteina CstF.

8.5.6 Modifiche dell'RNA possono cambiare il significato del messaggio RNA

Il processo di RNA editing modifica la sequenza nucleotidica dei trascritti dopo che sono stati sintetizzati. Negli animali avvengono principalmente la deamminazione dell'adenina per produrre inosina (A-to-I editing) e la deamminazione della citosina per produrre uracile (C-to-U editing). Essendo che queste modifiche cambiano le proprietà di accoppiamento delle basi hanno profondi effetti sul significato dell'RNA. Se questo avviene in una regione codificante può cambiare la sequenza di amminoacidi o produrre una proteina troncata, nella sequenza intronica modificare i pattern di splicing, il trasporto dell'mRNA, l'efficienza della traduzione o l'accoppiamento di basi tra microRNA (miRNA) e i loro obiettivi. Il processo A-to-I è prevalente negli umani e enzimi ADAR (adenina deaminasi agente sull'RNA) lo svolge riconoscendo una struttura di RNA a doppio filamento che è formata dall'accoppiamento tra le basi e una sequenza complementare in altro luogo, tipicamente un introne. La struttura a doppiofilamento specifica se l'mRNA debba essere editato e dove debba essere fatto.

8.5.7 Il trasporto di RNA dal nucleo può essere regolato

Nei mammiferi solo circa un ventesimo della massa totale dell'RNA lascia il nucleo in quanto i residui del processamento e RNA danneggiati sono degradati nel nucleo. L'esportazione dal nucleo è ritardata fino a che il processamento è terminato e meccanismi che possono annullare questo passaggio possono essere usati per regolare l'espressione genica. Questa strategia forma le basi del trasporto nucleare controllato dell'mRNA.

8.5.8 Alcuni mRNA sono localizzati in regioni specifiche del citosol

Una volta che una molecola di mRNA esce nel citosol incontra un ribosoma che la traduce in una catena polipeptidica. Una volta che passa il test di correttezza viene rapidamente tradotta. Se la proteina è destinata alla secrezione o espressa nella superficie cellulare una sequenza di segnali alla terminazione N la direziona al reticolo endoplasmatico ER in cui componenti dell'apparato di ordinamento delle proteine riconoscono la sequenza di segnale appena emerge dal ribosoma e direziona l'intero complesso all'ER dove viene sintetizzata la catena rimanente. In altri casi ribosomi liberi nel citosol sintetizzano la proteina e segnali possono poi direzionarla in altri siti della cellula. Molti

mRNA sono direzionati a specifiche locazioni intracellulari prima che inizi la traduzione permettendo alla cellula di posizionarli vicino al sito dove la proteina è necessitata. Altri vantaggi includono stabilimenti di asimmetrie nel citosol e mRNA localizzati con controlli di traduzione permettono alla cellula di regolare l'espressione genica indipendentemente in regioni diverse. Altri meccanismi di localizzazione dell'mRNA richiedono specifici segnali sull'mRNA, concentrati nella regione non tradotta 3' o UTR, che si estende dal codone di stop. La localizzazione è tipicamente accoppiata con controlli trascrizionali per garantire che l'mRNA rimane quiescente fino a che è stato mosso nel luogo corretto. Le molecole di mRNA portano numerose marcature quando escono dal nucleo che segnalano il completamento del processamento e l'UTR 3' può essere pensato come un codice postale che direziona l'mRNA in diversi luoghi.

8.5.9 Le regioni non tradotte 5' e 3' controllano la traduzione dei propri mRNA

Una volta che l'mRNA viene sintetizzato si controlla il livello di prodotto proteico controllando l'iniziazione della traduzione. Nei mRNA batterici una lunghezza di nucleotidi conservata (sequenza Shine-Dalgarno) si trova pochi nucleotidi a monte del codone AUG iniziante. I controlli traduzionali sono svolti da proteine o molecole di RNA e coinvolgono esposizione o blocco della sequenza Shine-Dalgarno. Gli mRNA eucariotici non contengono tale sequenza ma la selezione di un codone AUG dipende dalla sua prossimità al cappuccio alla terminazione 5', il sito in cui la piccola subunità ribosomica si lega all'mRNA e inizia lo scano. I repressori si possono legare a tale terminazione e inibire l'iniziazione della traduzione. Altri repressori riconoscono sequenze nucleotidiche nella 3' UTR e interferiscono con la comunicazione tra il cappuccio 5' e la coda poli-A 3' o da miRNA che si legano all'mRNA e riducono l'output di proteine.

8.5.10 La fosforilazione di un fattore di iniziazione regola globalmente la sintesi proteica

Le cellule eucariotiche diminuiscono il tasso di sintesi delle proteine in risposta a molte situazioni come privazione di fattori di crescita o nutrienti, infezioni da virus e aumenti di temperatura. La maggior parte di questa diminuzione è causata dalla fosforilazione del fattore di iniziazione di traduzione eIF2 da una proteina chinasi. eIF2 normalmente forma un complesso con CTP e media il legame dell'iniziatore metionile tRNA alla piccola subunità ribosomica che prima si lega alla terminazione 5' dell'mRNA e inizia la scansione. Quando viene riconosciuto un codone AUG eIF2 idrolizza GTP in GDP causando un cambio conformazionale nella proteina e rilasciandola dalla piccola subunità ribosomica. La grande allora si unisce formando il ribosoma completo che inizia la sintesi delle proteine. Un fattore di scambio guanina nucleotidica eIF2B è necessario per rilasciare il GDP in modo che una nuova GTP si possa legare e eIF2 possa essere riusata. Il riutilizzo è inibito quando è fosforilata in quanto si lega a eIF2B strettamente disattivando quest'ultima.

8.5.11 Iniziazione al codone AUG a monte dell'inizio di traduzione può regolare l'iniziazione della traduzione eucariotica

I nucleotidi che circondano il primo codone AUG a valle della terminazione 5' influenzano l'efficienza dell'iniziazione della traduzione. Se il sito di riconoscimento è poco efficiente la piccola subunità potrebbe ignorarlo e passare al secondo o terzo in una strategia per produrre due o più proteine strettamente imparentate. Questo processo viene utilizzato per la produzione della stessa proteina senza una sequenza di segnale che le permette di essere potrata in due posizioni diverse. Le cellule

possono regolare le concentrazioni relative. Un altro tipo di controllo usa open reading frames, corte lunghezze di DNA che cominciano con un codone di inizio ATG e finiscono con un codone di stop che si trovano tra la terminazione 5' dell'mRNA e l'inizio del gene. Spesso la sequenza di amminoacidi codificata non è importante e gli uORF servono solo per la loro funzione regolatoria. Un uORF diminuisce la traduzione del gene intrappolando il complesso della scansione di iniziazione e causando la sua traduzione e la disassociazione del ribosoma prima che raggiunga la proteina.

8.5.12 Siti di entrata interni al ribosoma forniscono opportunità per il controllo traduzionale

Una sequenza di RNA detta internal ribosome entry site (IRES) può essere utilizzata per iniziare la traduzione a posizioni distanti dalla terminazione 5' dell'mRNA. In alcuni casi due sequenze codificanti sono portate in tandem sullo stesso mRNA: la traduzione della prima accade dal meccanismo di scansione solito e la traduzione della seconda attraverso un IRES, tipicamente centinaia di nucleotidi di lunghezza e sono piegati in strutture specifiche che legano molte delle stesse proteine utilizzate per iniziare una traduzione normale dipendente dal cappuccio. IRES diversi richiedono diversi sottoinsiemi di fattori di iniziazione e possono saltare il riconoscimento del cappuccio da parte di eIF4E. Vengono utilizzati da alcuni virus in una strategia che blocca la sintesi del gene normale: durante un'infezione producono una proteasi che rompe il fattore di traduzione eIF4G che diventa inabile di legarsi a eIF4E il complesso di legame al cappuccio. Questo disattiva la maggior parte delle traduzioni e le sposta verso i macchinari delle sequenze IRES presenti sul mRNA virale.

8.5.13 Cambi nella stabilità dell'mRNA possono regolare l'espressione genica

Gli mRNA nelle cellule eucariotiche sono più stabili di quelli batterici. Esistono due meccanismi generali per distruggere ogni mRNA creato dalla cellula. Entrambi iniziano con un accorciamento graduale della coda poli-A da un esonucleasi, processo che inizia appena l'mRNA raggiunge il citosol che agisce come timer per il tempo di vita dell'mRNA. Una volta che la coda è ridotta ad una lunghezza critica i due cammini divergono. In uno il cappuccio 5' è rimosso e l'mRNA esposto è degradato da tale terminazione. Nell'altro l'mRNA continua ad essere degradato dalla terminazione 3'. Tutti gli mRNA sono soggetti ad entrambi i tipi di decadimento e la sequenza determina quanto velocemente questi passi avvengono. Sono specialmente importanti le sequenze UTR 3' in quanto hanno siti di legame per proteine che aumentano o diminuiscono il tasso del decadimento. Accorciamento poli-A e deincappucciamento competono con il macchinario che traduce l'mRNA. Alcuni mRNA possono essere degradati da meccanismi specializzati che non necessitano dell'accorciamento poli-A. In questi casi rotture da nucleasi specifiche rompono l'mRNA internamente, deincappucciando una fine e rimuovendo la coda poli-A dall'altra. Tali mRNA hanno sequenze specifiche, tipicamente nei 3' UTR che servono come sequenze di riconoscimento per le endonucleasi. Questa strategia rende semplice regolare la stabilità degli mRNA bloccando o esponendo il sito per l'endonucleasi in risposta a segnali extranucleasi.

8.5.14 La regolazione della stabilità dell'mRNA coinvolge corpi P e granuli di stress

Grandi aggregati di proteine e acidi nucleici che lavorano insieme sono tenuti in prossimità da connessioni a bassa affinità formando organelli. Gli eventi discussi in questa sezione avvengono in aggregati detti corpi di processamento o corpi P presenti nel citosol. Alcuni mRNA rimandano

intatti e ritornati nell'insieme di mRNA che possono essere tradotti. Per essere recuperati gli mRNA si muovono dai corpi P a un granulo di stress che contiene un fattore di inibizione della traduzione, proteine leganti al poli-A e la piccola subunità ribosomica.

8.6 Regolazione dell'espressione genica da RNA non codificanti

8.6.1 I trascritti di piccoli RNA non codificanti regolano molti geni animali e di piante attraverso interferenza RNA

Un gruppo di RNA corti svolgono interferenza RNA o RNAi dove RNA a singolo filamento guidano RNA che riorganizzano e legano selettivamente altri RNA nella cellula. Quando un obiettivo è un mRNA maturo la sua traduzione può essere inibita o la sua distruzione catalizzata. Se la molecola di RNA sta venendo trascritta si possono legare ad essa e guidare la formazione di certi tipi di strutture cromatiniche repressive sullo stampo di DNA. Tre classi lavorano in questa maniera: microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA) e piwi-interacting RNA (piRNA) che riconoscono l'obiettivo attraverso l'accoppiamento di basi e generalmente causano una riduzione nell'espressione genica.

8.6.2 Il miRNA regola la traduzione e stabilità dell'mRNA

I microRNA regolano almeno un terzo dei geni codificatori di proteine. Una volta creati accoppiano le basi con mRNA specifici e modificano finemente la loro stabilità e traduzione. I precursori di miRNA sono sintetizzati dalla RNA polimerasi II e incappucciati e poliadenilati. Subiscono un processo al termine del quale il miRNA è assemblato con un insieme di proteine per formare un complesso di silenziamento indotto da RNA o RISC che una volta formato cerca il proprio mRNA obiettivo cercando per la sequenza nucleotidica complementare, ricerca facilitata dalla proteina Argonata che mantiene la regione 5' del miRNA in modo che sia posizionata ottimamente per l'accoppiamento di basi. Questo accoppiamento di basi avviene principalmente nella regione 3' dell'mRNA. Una volta che l'mRNA viene legato da un miRNA se l'accoppiamento di basi è estensivo l'mRNA è rotto (sliced) da una proteina Argonata, rimuovendo la coda poli-A ed esponendolo all'esonucleasi. Successive rotture dell'mRNA causano il rilascio del RISC e dell'miRNA che può cercare altri mRNA. Se l'accoppiamento è meno estensivo la traduzione dell'mRNA viene repressa e l'mRNA viene trasportato nei corpi P dove avviene l'accorciamento della coda poli-A, deincappucciamento e degradazione. Un singolo miRNA può regolare un insieme di diversi mRNA se portano una sequenza corta comune negli UTR e la regolazione può essere combinatoria: più miRNA possono legarsi allo stesso mRNA riducendone la traduzione e occupano meno spazio genomico rispetto alle proteine.

8.6.3 L'interferenza a RNA è anche usata come un meccanismo di difesa per la cellula

Le proteine che partecipano nei meccanismi regolatori del miRNA si occupano anche di orchestrare la degradazione di molecole di RNA straniera, specialmente quelle nella forma a doppio filamento. Molti elementi trasponibili e virus producono quei filamenti almeno transientemente e l'interferenza a RNA aiuta a tenerli sotto controllo. La presenza di RNA a doppio filamento causa RNAi attraendo il complesso di proteine Dicer, la stessa nucleasi che processa miRNA e rompe l'RNA in piccoli frammenti detti small interfering RNA (siRNA), legati da Argonauti e altre componenti del RISC. Le

siRNA che non vengono scartate guidano il RISC verso molecole di RNA complementari prodotte dal virus o dagli elementi trasponibili. Ogni volta che RISC rompe una nuova molecola viene rilasciato. RNA dipendente RNA polimerasi usa siRNA come primer per produrre coppie addizionali di RNA a doppio filamento che sono rotti in siRNA, amplificazione che garantisce che una volta iniziata l'interferenza a RNA può continuare anche dopo che tutti gli RNA a doppio filamento iniziatori sono stati degradati. In alcuni organismi questa attività può essere diffusa dal trasferimento di frammenti di RNA da cellula a cellula.

8.6.4 L'interferenza a RNA può direzionare la formazione di eterocromatina

Il cammino di interferenza a siRNA può in alcuni casi selettivamente impedire la sintesi di RNA obiettivi. Affinchè questo accada i corti siRNA prodotti dal Dicer sono assemblati con un gruppo di proteine per formare i complessi RITS (RNA induced transcriptional silencing). Utilizzando siRNA a singolo filamento come guida il complesso si lega a RNA trascritti complementare mentre emergono da una RNA polimerasi II e attraggono proteine che modificano covalentemente istoni vicini e direzionano la formazione di eterocromatina prevenendo ulteriori iniziazioni di trascrizione. In alcuni casi una RNA dipendente RNA polimerasi e un enzima Dicer sono reclutati dal complesso RITS in modo da generare siRNA addizionali in sito. Questo feedback loop positivo assicura una repressione continua del gene obiettivo. Questo tipo di formazione cromatinica è un importante meccanismo di difesa in quanto limita la diffusione di elementi trasponibili mantenendo la loro sequenza in forma silente. Per esempio mantengono l'eterocromatina formata intorno ai centromeri.

8.6.5 I piRNA proteggono la linea germinale da elementi trasponibili

Un terzo sistema di interferenza a RNA si basa sui piRNA (piwi-interacting RNA, dove Piwi è una classe di proteine imparentata con l'Argonauto). Sono creati specificatamente nella linea germinale dove bloccano il movimento di elementi trasponibili. I geni che codificano essi consistono di sequenze di frammenti di elementi trasponibili. Questi cluster sono trascritti e rotti in piRNA corti e a filamento singolo. Sono più lunghi di miRNA e siRNA e non coinvolgono una proteina Argonauto ma una Piwi. Una volta formati ricercano RNA obiettivo attraverso l'accoppiamento di basi e silenziano trascrizionalmente geni di trasposoni e distruggono ogni RNA da loro prodotto.

8.6.6 I batteri usano piccoli RNA non codificanti per proteggersi dai virus

I virus dei batteri hanno generalmente genomi a DNA. Molte specie di batteri usano un repertorio di piccole molecole di RNA non codificante per cercare e distruggere il DNA dei virus invasivi. Il sistema detto CRISPR sono simili a quelle di miRNA e siRNA ma quando i batteri e archaea sono infettati da un virus hanno un meccanismo che causa piccoli frammenti del DNA virale di integrarsi nel genoma batterico. Serve come vaccinazione: diventano stampi per produrre piccoli RNA non codificanti detti crRNA che distruggono il virus se reinfetterà i discendenti della cellula originale. È simile all'immunità adattiva nei mammiferi. Un'altra caratteristica è che i crRNA si associano con proteine speciali che permettono loro di cercare e distruggere DNA a doppio filamento. Il processo CRISPR avviene in tre fasi. Nella prima sequenze di DNA virali sono integrate in speciali regioni del genoma come CRISPR (clustered regularly interspersed short palindromic repeat) loci, un CRISPR locus consiste di centinaia di ripetizioni di una sequenza ospite interspersa con una collezione di sequenze che è stata derivata da esposizioni a virus precedenti. La nuova sequenza virale è sempre integrata nella terminazione 5' del locus che trasporta un record temporale di infezioni precedenti.

Nel secondo passo il locus CRISPR è trascritto per produrre un lungo RNA che è processato in corti crRNA. Nel terzo passo crRNA viene unito a proteina Cas che cercano sequenze complementari di DNA virali e guidano la loro distruzione da parte della nucleasi. Le proteine Cas sono analoghe agli Argonauti e ai Piwi: mantengono corti RNA in una configurazione estesa ottimizzata per cercare e formare accoppiamenti con il DNA.

8.6.7 Lunghi RNA non codificanti hanno funzioni diverse nella cellula

Molte delle funzioni non conosciute dei long noncoding RNA (lncRNA). La maggior parte di questi sono trascritti da RNA polimerasi II e hanno cappucci 5' e code poli-A. A causa del fatto che la maggior parte di questi sono pensati il risultato del rumore di fondo di trascrizione e processamento dell'RNA e non forniscono nessun cambiamento al fitness e sono pertanto tollerati dall'organismo come prodotti secondari dei pattern dell'espressione genica. Per queste ragioni è difficile stimare quali lncRNA hanno funzione nella cellula e discriminarli. Esempi di lncRNA sono gli RNA nelle telomerasi, Xist RNA e quelli coinvolti nell'imprinting. Altri sono stati implicati come controllori dell'attività enzimatica delle proteine, inattivando regolatori di trascrizione, avendo effetto sui pattern di splicing e bloccando traduzione di certi mRNA. Tutti gli lncRNA possono funzionare come molecole di RNA impalcatura che legano insieme gruppi di proteine per coordinare la loro azione. Un'altra è l'abilità di servire da sequenze guida, legandosi a molecole obiettivo di RNA o DNA con specificità. In alcuni casi lavora senza proteine e si trovano nella direzione inversa in geni codificanti di proteine. Questi RNA antisense possono accoppiarsi con l'mRNA e bloccare la sua traduzione in proteina. Altri di questi alterano il pattern di slicing. Alcuni lncRNA possono agire soltanto *in cis*.

Parte III

Organizzazione interna della cellula

Capitolo 9

Struttura di membrana

Le membrane cellulari sono vitali per la vita della cellula. La membrana plasmatica definisce i limiti della cellula e mantiene le differenze essenziali tra il citosol e l'ambiente extracellulare. All'interno delle cellule eucariotiche le membrane del nucleo, il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi, i mitocondri e altri organelli racchiusi da membrana mantengono differenze caratteristiche per quanto riguarda i loro contenuti. I gradienti ionici tra le membrane generati dall'attività di proteine di membrana possono essere utilizzati per la sintesi dell'ATP, per guidare il trasporto di soluti specifici o per produrre e trasmettere segnali elettrici. Nella membrana plasmatica sono anche presenti proteine sensori che permettono alla cellula di cambiare il comportamento in base a segnali esterni. Questi recettori trasferiscono informazioni e non molecole attraverso la membrana. Tutte le membrane possiedono una struttura generale comune: sono un film di lipidi e proteine, mantenuti insieme da interazioni non covalenti. Sono strutture dinamiche e fluide e la maggior parte delle loro molecole sono libere di muoversi nel piano della membrana. Le molecole lipidiche sono ordinate in un doppio strato che serve come membrana impermeabile all'acqua. Le proteine di membrana attraversano il bistrato e mediano le funzioni della membrana. Nella membrana plasmatica alcune connettono il citoscheletro a una matrice extracellulare su cellule adiacenti.

9.1 Il bistrato lipidico

Il bistrato lipidico fornisce la struttura base per tutte le membrane cellulari e la sua struttura è attribuibile alle proprietà delle molecole lipidiche che assumono tale conformazione spontaneamente.

9.1.1 Fosfogliceridi, sfingolipidi e steroli sono i lipidi più comuni nelle membrane cellulari

Le molecole lipidiche costituiscono il 50% della massa delle membrane cellulari. Tutte le molecole lipidiche nella cellula sono anfipatiche, ovvero hanno una parte idrofila o polare e una idrofoba o non polare. I lipidi di membrana più abbondanti sono i fosfolipidi che possiedono una testa polare con un gruppo fosfato e due code idrocarburiche idrofobiche. Le code sono tipicamente acidi grassi e possono cambiare in lunghezza. Una coda contiene tipicamente uno o più legami doppi cis, mentre l'altra no ognuno dei quali forma una curva nella coda. Il fosfolipide principale negli animali è il fosfogliceride con un backbone a tre gliceroli. Due lunghe catene di acidi grassi sono legate a atomi adiacenti del carbonio attraverso legami estere e il terzo atomo di carbonio del glicerolo è legato a un gruppo fosfato che viene legato a diversi tipi di gruppo di testa. Combinando diversi acidi grassi

9.1. IL BISTRATO LIPIDICO

e gruppi di testa la cellula crea diversi fosfogliceridi come fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilcolina. Un'altra classe importante di fosfolipidi sono gli sfingolipidi che sono costruiti dalla sfingosina, una catena acile lunga con un gruppo amminico e due gruppi idrossilici a una fine. Nella sfingomielina la catena a acido grasso è legata al gruppo amminico, il gruppo fosfocolina al gruppo idrossile terminale. Oltre ai fosfolipidi nel bistrato sono contenuti glicolipidi e colesterolo, i primi sono come gli sfingolipidi ma con uno zucchero invece del gruppo di testa. La membrana plasmatica degli eucarioti contiene grandi quantità di colesterolo, uno sterolo con una struttura ad anello rigida, un gruppo idrossile polare e una corta catena idrocarburica e si orientano nel bistrato con il gruppo idrossilico vicino alle teste polari.

9.1.2 I fosfolipidi formano bistrati spontaneamente

La natura anfipatica e la forma dei fosfolipidi causa la formazione spontanea di bistrati in ambiente acquoso. Quando molecole anfipatiche sono esposte in ambiente acquoso si aggregano spontaneamente per seppellire le loro code idrofobiche all'interno dove sono separate dall'acqua e espongono le teste idrofiliche a essa. In base alla loro forma possono creare micelle sferiche o foglietti a doppio strato o bistrati con le catene idrofobiche all'interno delle teste idrofiliche. Una rottura nel bistrato causa un lato a contatto con l'acqua che essendo sfavorevole energeticamente causa i lipidi di riordinarsi in modo da eliminarlo. Il solo modo per bistrati di avere questi lati è di formare un compartimento chiuso chiudendosi su se stesso.

9.1.3 Il bistrato lipidico è un fluido bidimensionale

Molecole individuali di lipidi si possono diffondere liberamente nel piano di un bistrato lipidico. Si è notato come le molecole lipidiche migrano raramente tra un monostrato all'altro nel processo di "flip flop" che accade su tempi di ore (con il colesterolo come eccezione) ma si scambiano velocemente tra uno stesso monolivello dando origine a una diffusione laterale rapida. I lipidi ruotano inoltre velocemente sul loro asse e hanno catene idrocarburiche flessibili. Il confinamento in un monolivello causa problemi per la sintesi che avviene unicamente in uno strato, risolto da proteine di membrana dette traslocatori di fosfolipidi o flippasi che catalizzano il flip-flop rapido di fosfolipidi da un monolivello all'altro. I diversi bistrati non si fondono facilmente quando sospesi in acqua in quanto dovrebbero spostare le molecole legate ai gruppi di testa. In questo modo viene mantenuta l'integrità di molte membrane interne e prevenuta una loro fusione incontrollata.

9.1.4 La fluidità del bistrato lipidico dipende dalla sua composizione

La fluidità della membrana cellulare deve essere precisamente regolata in quanto dalla sua viscosità dipendono alcuni processi di trasporto e attività enzimatiche. La fluidità del bistrato dipende dalla sua composizione e temperatura. Esiste una temperatura detta transizione di fase in cui assume una struttura cristallina rigida o gel, più bassa rispetto più corte le catene idrocarburiche o più presenti i doppi legami. La lunghezza di coda minore riduce la tendenza delle catene idrocarburiche di interagire tra di loro e i doppi legami cis producono curve in esse che rendono la loro condensazione più difficile e la membrana rimane fluida a temperature più basse. Il colesterolo modula le proprietà del bistrato: quando mescolato con fosfolipidi aumenta le proprietà di barriera permeabile. Si inserisce in esso con il gruppo idrossile vicino alle teste polari dei fosfolipidi in modo che l'anello steroide rigido interagisca e immobilizzi parzialmente le regioni delle catene idrocarboniche più vicine alle teste polari. Diminuisce la motilità dei primi gruppi CH_2 della catena e lo rende meno deformabile.

diminuendo la permeabilità di piccole molecole solubili in acqua. Non rende la membrana meno fluida in quanto ad alte concentrazioni previene le catene idrocarburiche di interagire e cristallizzarsi.

9.1.5 Nonostante la loro fluidità i bistrati lipidici possono formare domini di composizioni diverse

Nonostante molti lipidi e proteine di membrana siano distribuiti uniformemente e segregazione di fase a larga scala si trovi raramente specifici lipidi e proteine di membrana si concentrano in maniera temporanea e dinamica facilitate da interazioni da proteine che permettono la formazione di regioni di membrana specializzata. Questi cluster aiutano a creare zattere in membrane organizzando e concentrando le proteine per trasporto o per lavorare nell'assemblaggio di proteine.

9.1.6 Goccioline di lipidi sono circondate da un monostrato fosfolipidico

La maggior parte delle cellule conservano lipidi in eccesso in goccioline di lipidi da dove possono essere recuperate. Gli adipociti sono cellule specializzate per la conservazione di lipidi. Contengono una gocciolina gigantesca di lipidi che occupa la maggior parte del citoplasma. Gli acidi grassi possono essere liberati dalle goccioline a richiesta e esportati ad altre cellule attraverso il flusso sanguigno. Tali goccioline conservano lipidi neutri come trigliceroli e colesteroli esteri che sono sintetizzati da enzimi nella membrana del reticolo endoplasmatico. Sono molecole idrofobiche e si aggregano spontaneamente in goccioline tridimensionali. Sono organelli unici in quanto sono circondati da un singolo monostrato di fosfolipidi con una grande varietà di proteine, enzimi coinvolti nel metabolismo dei lipidi.

9.1.7 L'asimmetria del bistrato lipidico è funzionalmente importante

La composizione lipidica dei due monostrati è diversa: per esempio nelle cellule eritrocite del sangue rosso tutte le molecole fosfolipidiche hanno colina nel gruppo di testa nel monostrato esterno, mentre tutte contengono un amminoacido primario terminale nel monostrato interno. In quanto il fosfatidilserina è locato nel monostrato interno si trova una differenza in carica tra le due metà del bistrato. Questa asimmetria è specialmente importante in convertire segnali extracellulari in intracellulari: molte proteine citosoliche si legano a specifici gruppi di testa lipidici e vengono attivati dai segnali che cambiano la carica del monostrato interno. In altri casi gruppi di testa devono essere modificati per creare siti di legame delle proteine a un tempo e luogo specifico. Varie chinasi lipidiche possono aggiungere un gruppo fosfato a posizione distinte sull'anello inositolo creando siti di legame che reclutano proteine specifiche dal citosol. Sono usati anche per convertire i segnali extracellulari in intracellulari attraverso fosfolipasi attivate da segnali extracellulari che rompono specifiche molecole di fosfolipidi generando frammenti che agiscono come brevi mediatori intracellulari. Questa asimmetria viene utilizzata per riconoscere le cellule vive da quelle morte in quanto alla morte la fosfatidilserina si trasloca al monostrato esterno attraverso il fosfolipide traslocatore che normalmente trasporta questo lipide al monostrato interno è disattivato e una scramblasi che trasferisce i fosfolipidi non specificatamente si attiva.

9.1.8 I glicolipidi si trovano sulla superficie di tutte le membrane plasmatiche eucariotiche

I glicolipidi sono lipidi che contengono zucchero e hanno una asimmetria estrema: si trovano esclusivamente nel monostrato dalla parte opposta del citosol. Tendono ad autoassociarsi attraverso legami

idrogeno tra gli zuccheri e forze di Van der Waals tra le catene idrocarburiche che li partiziona in fasi di zattere lipidiche. Questa distribuzione asimmetrica risulta dall'addizione dello zucchero nel lumen degli apparati di Golgi. Il compartimento in cui sono creati è topologicamente equivalente all'esterno della cellula. Quando sono portati alla membrana plasmatica gli zuccheri sono esposti alla superficie cellulare dove hanno importanti ruoli in interazioni. Si trovano anche in alcune membrane intracellulari. Il glicolipide più complesso è il ganglioside che contiene oligosaccaride con più frazioni di acidi sialici che gli danno una carica negativa. La loro funzione è quella di proteggere contro condizioni dure. Quelli carichi sono importanti a causa del loro effetto elettrico che altera la concentrazione di ioni. Hanno un ruolo nei processi di riconoscimento cellulare in cui le lectine, proteine che si legano al carbonio legate alla membrana legano ai gruppi zucchero sui glicolipidi e glicoproteine. Alcuni glicolipidi forniscono punti di entrata per tossine e virus.

9.2 Proteine di membrana

Le proteine di membrana svolgono la maggior parte delle funzioni specifiche a essa dandole le proprietà funzionali caratteristiche. La quantità e il tipo di proteine sono altamente variabili: nelle membrane mieline, che servono come isolamento elettrico per gli assoni delle cellule nervose meno del 25% della massa è proteine. Nelle membrane coinvolte nella produzione di ATP circa il 75% è composto da proteine. Essendo comunque le molecole lipidiche più piccole rispetto alle proteine sono sempre più numerose rispetto a esse.

9.2.1 Le proteine di membrana si possono associare con il bistrato lipidico in vari modi

Le proteine di membrana sono anfipatiche e molte si estendono attraverso il bistrato e sono dette proteine transmembrana, con parte della propria massa su ogni parte. La loro regione idrofobica passa attraverso le molecole lipidiche dove sono separate dall'acqua, la regione idrofila è esterna alla membrana e esposta all'acqua. L'attacco covalente di una catena acido grasso che si inserisce nel monostrato citosilico aumenta l'idrofobicità delle proteine transmembrana. Altre proteine si trovano interamente nel citosol e sono attaccate al monostrato citosilico da un α -elica anfipatica esposta sulla superficie della proteina o da catene lipidiche attaccate covalentemente. Altre proteine di membrana sono completamente esposte alla superficie esterna della cellula attaccate al bistrato da un legame covalente con un oligosaccaride specifico a un'ancora lipidica nel monostrato esterno della membrana plasmatica. Le proteine legate ai lipidi sono fatte come proteine solubili nel citosol e sono poi ancorate alla membrana da legami covalenti con il gruppo lipide, altre sono create come proteine di membrana nel reticolo endoplasmatico. Quando ancora nell'ER i segmenti transmembrana della proteina sono rotti e si aggiunge una ancora glicosilfosfatidilinositolo (GPI) lasciando la proteina legata alla superficie non citosolica della membrana ER da questa ancora. Vescicole di trasporto eventualmente trasportano la proteina alla membrana plasmatica. Le proteine associate alla membrana non si estendono all'interno idrofobico ma sono legate ad una faccia del bistrato da interazioni non covalenti con altre proteine di membrana e possono essere rilasciate da essa con interazioni gentili come esposizione di soluzioni di piccola forza ionica o pH estremo e sono dette proteine di membrana periferiche. Le proteine transmembrana e quelle mantenute nel bistrato da gruppi lipidici o regioni di polipeptide idrofobico non possono essere rimosse in questo modo.

9.2.2 Ancore lipidiche controllano la localizzazione nella membrana di alcune proteine segnalatrici

Solo le proteine transmembrana possono funzionare su tutte e due le parti del bistrato o trasportare molecole attraverso essa. I recettori della superficie di membrana sono di solito proteine di transmembrana che legano molecole di segnale nello spazio extracellulare e generano diversi segnali intracellulare sulla parte opposta della membrana. Una proteina di trasporto deve fornire un cammino per le molecole che devono attraversare la barriera di permeabilità idrofobica del bistrato, cosa ottenuta dall'architettura di proteine transmembrana multipasso. Le proteine che funzionano su solo un lato del bistrato lipidico sono associate esclusivamente con il monostrato lipidico o un dominio proteico su tale lato. Alcune proteine di segnale intracellulare che inoltrano dei messaggi sono legati alla metà citosolica della membrana plasmatica da gruppi lipidi attaccati covalentemente come acidi grassi o gruppi prenile. In alcuni casi l'acido miristico è aggiunto al gruppo N^+ terminale della proteina durante la sintesi su un ribosoma. L'attacco attraverso un'ancora lipidica non è molto forte, ma può essere rafforzato da una seconda ancora. Molte proteine si attaccano alla proteine transmembrana: alcune sono proteine periferiche che si associano da interazioni tra proteine regolate, altre si trasformano da solubili a proteine di membrana grazie a un cambio conformazionale che espone un peptide idrofobico o attacca covalentemente un'ancora lipidica.

9.2.3 Nella maggior parte delle proteine transmembrana la catena polipeptidica attraversa il bistrato lipidico in una conformazione a α -elica

Una proteina transmembrana ha un'orientamento unico nella membrana che riflette il modo asimmetrico in cui è inserita nel bistrato lipidico nell'ER durante la biosintesi e le funzioni diverse del dominio citosilico e noncitosilico. Questi due sono separati da segmenti della catena polipeptidica che attraversano la membrana che contattano l'ambiente idrofobico del bistrato e sono composti da amminoacidi con catene laterali non polari. Essendo i legami peptidici polari tutti i legami peptidici tendono a formare legami a idrogeno tra di loro. Questo è massimizzato quando la catena forma una α -elica quando attraversa il bistrato. In proteine transmembrana a singolo passaggio la catena polipeptidica attraversa solo una volta, mentre nelle proteine transmembrana a multiplo passaggio viene attraversata molte volte. Un altro modo affinché i legami peptidici soddisfino i requisiti di legami a idrogeno è di formare un β -foglietto girato in un cilindro o β -barrel, presente nelle proteine porina. La necessità di massimizzare i legami a idrogeno vuol dire che una catena polipeptidica non cambia direzione mentre attraversa la membrana, ma le proteine a passaggio multiplo possono contenere regioni che si piegano nella membrana a entrambe le estremità in spazi tra α -eliche senza toccare il nucleo idrofobico del doppio strato ed essendo che non devono interagire con il bistrato possono avere una varietà di strutture secondarie. Tali regioni sono importanti per la funzione di tali proteine.

9.2.4 α -eliche transmembrana interagiscono tra di loro

Le α -eliche transmembrana di molte proteine a singolo passaggio non contribuiscono al piegamento dei domini proteici sui lati della membrana. Nonostante questo non hanno solo la funzione di ancora e formano omo o eterodimeri che sono tenuti insieme da interazioni non covalenti ma specifiche tra due α -eliche grazie alle interazioni tra le sequenze di amminoacidi idrofobici. Tali α -eliche nelle proteine transmembrana a multipassaggio occupano posizioni specifiche nella struttura piegata della proteina determinate dalle interazioni con le loro vicine, cruciali per la struttura e funzione di molti canali e trasportatori. Eliche vicine fanno da scudo per altre eliche dai lipidi di membrana.

che nonostante questo sono composte principalmente da amminoacidi idrofobiche in quanto le α -eliche transmembrana sono inserite nel bistrato sequenzialmente da un traslocatore proteico. Dopo che ogni elica lo lascia è circondata temporaneamente di lipidi: è solo nella struttura finale che i contatti vengono fatti tra le diverse eliche e interazioni proteina-proteina sostituiscono alcuni contatti proteina-lipide.

9.2.5 Alcuni barili β formano grandi canali

Proteine di membrana a multipassaggio con i segmenti transmembrana ordinati in β -barili sono rigidi e tengono a cristallizzarsi quando isolati. Sono abbondanti nella membrana esterna dei batteri, mitocondri e cloroplasti. Alcuni formano pori con canali pieni d'acqua che permettono il passaggio di piccole molecole idrofiliche selezionate. Molti barili di tali porine sono formate da un β -foglietto a 16-filamenti antiapparalleli in una struttura cilindrica. Le catene amminoacide polari determinano il canale acquoso interno, mentre quelle esterne non polari interagiscono con i lipidi. Anelli della catena polipeptidica protrudono spesso nel lume del canale stringendolo e dandogli specificità. Non tutte queste sono proteine di trasporto: alcune funzionano come recettori o enzimi con il barile come ancora rigida.

9.2.6 Molte proteine di membrana sono glicosilate

La maggior parte delle proteine transmembrana nelle cellule animali sono glicosilate: i residui di zucchero sono aggiunti nel lume dell'ER e degli apparati di Golgi. Per questa ragione le catene oligosaccaridi sono presenti sempre sul lato noncitotossico della membrana. Inoltre l'ambiente del citosol riduce la probabilità che legami intra o inter catena disolfidi (S-S) si formano tra cisteina su tale lato. Si formano invece sul lato noncitotossico dove aiutano a stabilizzare la struttura piegata o la sua associazione con altre catene. A causa della glicosilizzazione delle proteine di membrana sul lato extracellulare i carboidrati coprono la superficie di tutte le cellule eucariotiche nella forma di catene oligosaccaridi legate covalentemente a glicoproteine e glicolipidi. Si trovano anche come catene di membrane integrali proteoglicani. I proteoglicani consistono di lunghe catene polisaccaridi legate covalentemente a un nucleo proteico e si trovano al di fuori della cellula come parte della matrice cellulare e in alcuni casi il nucleo proteico si estende attraverso il bistrato o vi è attaccato attraverso un'ancora GPI. Questo tratto di carboidrati forma zone ricche di essi dette copertura della cellula o glicocalice. Tale strato può contenere anche glicoproteine e proteoglicani e si occupa di proteggere la cellula da danni meccanici o chimici, oltre a distanziarla da altre cellule. Le grandi possibilità combinatorie degli zuccheri li rende ottimali per i processi di riconoscimento delle cellule. Molte proteine di membrana funzionano come parte di complessi a multicomponenti. La maggior parte delle proteine non fanno flip-flop attraverso il bistrato ma ruotano lungo un asse perpendicolare al piano del bistrato e sono capaci di muoversi lateralmente.

9.2.7 Le cellule possono confinare proteine e lipidi a domini specifici nella membrana

La maggior parte delle cellule confina le proteine di membrana a regioni specifiche nel bistrato continuo. Questa distribuzione asimmetrica delle proteine di membrana è essenziale per la funzione di certe molecole, con anche composizione lipidica diversa. Ci sono barriere create da specifici tipi di giunzioni intercellulari che mantengono la separazione delle molecole. Chiaramente le proteine che formano tali giunzioni non possono diffondersi lateralmente nelle membrane interagenti. I domini

possono essere creati attraverso interazioni tra proteine regolati che creano domini zattera sulla nanoscala che funzionano come segnalatori e nel trafficking della membrana.

9.2.8 Il citoscheletro corticale dà alle membrane forza meccanica e vincola la diffusione delle proteine di membrana

Un modo comune in cui una cellula vincola la mobilità laterale di proteine specifiche è legandole insieme in assemblaggi macromolecolari. Nei globuli rossi la forma biconcava è data da interazioni delle proteine derivanti da un citoscheletro, un insieme della proteina filamentosa spectrina, un bastoncello lungo, sottile e flessibile che mantiene l'integrità strutturale e la forma della membrana plasmatica. Si unisce alla membrana attraverso specifiche proteine con risultato una rete che copre l'intera superficie citosolica della membrana e che le permette di sopportare certi livelli di stress. Una rete di citoscheletro esiste nella maggior parte delle cellule. Questa rete costituisce la corteccia della cellula, è ricca di filamenti di actina attaccati alla membrana. Il rimodellamento dinamico dell'actina corticale dà forza a molte funzioni essenziali come il movimento, endocitosi e la formazione di strutture transienti come filopodi e lamellopodii. La corteccia contiene anche omologhi della spectrina e altre componenti. Tale rete vincola la diffusione delle proteine in quanto essendo apposti vicini alla superficie citosolica della membrana plasmatica possono formare barriere meccaniche che ostruiscono la diffusione libera delle proteine di membrana. Queste partizioni o corral possono essere fissi o transienti. L'impatto del confinamento dipende dall'associazione della proteina con altre e la dimensione del suo dominio citoplasmatico. Si pensa aiuti a concentrare i complessi di segnalazione aumentandone velocità ed efficienza.

9.2.9 Proteine piegatrici di membrana deformano i bistrati

Le membrane cellulari possono assumere forme diverse controllate dinamicamente con elaborate deformazioni transienti. In molti casi la forma viene influenzata da spinte dinamiche da strutture citoscheletriche o extracellulari. Una parte cruciale viene svolta da proteine piegatrici della membrana che controllano la curvatura locale e agiscono in tre possibili modi:

- Alcune inseriscono domini proteici idrofobici o attaccano ancorre lipidiche aumentando l'area di leaflets del bistrato causando il piegamento.
- Alcune formano impalcature rigide che deformano o stabilizzano una membrana.
- Alcune causano la formazione di cluster di lipidi particolare inducendo la curvatura determinata dall'area della sezione trasversale del gruppo di testa e della coda idrocarburica.

Spesso diverse proteine collaborano per arrivare a una particolare curva.

Capitolo 10

Trasporto di membrana di piccole molecole e proprietà elettriche delle membrane

A causa dell'interno idrofobico il bistrato della membrana cellulare limita il passaggio della maggior parte delle molecole polari in modo da mantenere concentrazioni di soluti nel citosol che differiscono da quelle del fluido extracellulare e in ogni compartimento intracellulare. Specifiche molecole solubili in acqua e ioni vengono trasportati attraverso le membrane in modo da digerire nutrienti, espellere scarti e regolare concentrazioni ioniche intracellulari attraverso proteine di trasporto specializzate.

10.1 Principi del trasporto di membrana

10.1.1 Bistrati lipidici liberi da proteine sono impermeabili agli ioni

Dato abbastanza tempo ogni molecola si diffonderebbe attraverso un bistrato lipidico senza proteine secondo il gradiente di concentrazione. Il tasso di diffusione varia enormemente in base alla dimensione della molecola e principalmente in base all'idrofobicità relativa. Più piccola la molecola e meno più idrofobica più si diffonde facilmente nel bistrato.

10.1.2 Ci sono due classi di proteine di trasporto di membrana: trasportatori e canali

Speciali proteine di membrana trasferiscono molecole polari attraverso la membrana. Tutte queste proteine sono a multipassaggio formando un passaggio attraverso la membrana permettono a soluti idrofilici specifici di attraversarla. I trasportatori e i canali sono le due classi principali. I trasportatori o permeasi legano il soluto che deve essere trasportato e fanno una serie di cambi conformazionali che espongono alternativamente siti di legame su un lato della membrana e trasferiscono il soluto sull'altra. I canali interagiscono con il soluto che deve essere trasportato più debolmente formando pori che si estendono per tutta la membrana e quando aperti permettono il passaggio di soluti o molecole specifiche.

10.1.3 Il trasporto attivo è mediato da trasportatori accoppiati da una fonte di energia

Tutti i canali e molti dei trasportatori permettono il passaggio dei soluti passivamente nel trasporto passivo guidato dal gradiente di concentrazione o dal potenziale di membrana che insieme formano il gradiente elettrochimico. Quasi tutte le membrane hanno un potenziale negativo all'interno favorendo l'entrata di ioni positivi. Alcune proteine svolgono il trasporto in contrasto con il gradiente elettrochimico nel trasporto attivo, mediato da trasportatori la cui attività di pompaggio è accoppiata da una fonte di energia metabolica.

10.2 Trasportatori e trasporto di membrana attivo

Il processo di trasferimento di una molecola attraverso la membrana assomiglia a una reazione tra enzima e substrato. Il trasportatore non modifica il soluto ma lo consegna uguale all'altro lato della membrana. Ogni trasportatore possiede dei siti di legame specifici per il suo soluto e lo trasferisce attraverso cambi conformazionali reversibili che espongono tale sito alternativamente su ogni lato della membrana. Si trova uno stato intermedio in cui il soluto è inaccessibile da ogni parte della membrana. Quando è saturato il tasso di trasporto è massimale che determina il tasso in cui il trasportatore può passare tra gli stati conformazionali. Ogni trasportatore possiede anche un'affinità con il soluto, indicata come la concentrazione del soluto dove il tasso di trasporto è metà del valore massimo. Il trasporto attivo avviene attraverso trasportatori accoppiati che intrappolano l'energia conservata in gradienti di concentrazione per guidare il trasporto sfavorevole, pompe guidate dall'ATP e pompe guidate da luce o redox. In molti casi ci sono similitudini tra trasportatori attivi e passivi.

10.2.1 Il trasporto attivo può essere guidato da gradienti di concentrazione ionica

Alcuni trasportatori mediano passivamente il movimento di un singolo soluto a un tasso determinato da V_{max} e K_m e sono detti uniporters. Altri funzionano come trasportatori accoppiati in cui il trasferimento di un soluto dipende dal trasporto di un secondo nella stessa direzione svolto da symporters o in direzione opposta svolto da antiporters. Questo stretto accoppiamento permette di recuperare l'energia conservata nel gradiente elettrochimico di un soluto per trasportare l'altro. L'energia libera rilasciata durante il movimento di uno ione inorganico è usata per guidare la pompa dell'altro soluto contro il gradiente. Nella membrana plasmatica delle cellule animali lo ione co-trasportatore è tipicamente Na^+ che quando entra nella cellula è trasportato fuori da una pompa ad ATP per $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ che mantenendo il gradiente di Na^+ guida il trasporto accoppiato. Tali trasportatori mediano il trasporto attivo secondario, mentre quelle guidate da ATP il primario. Questi trasportatori sono tipicamente formati da insiemi di 10 o più α -eliche che attraversano la membrana. I siti di legame per gli ioni e per il soluto si trovano a metà della membrana dove alcune eliche sono rotte o distorte. Nelle conformazioni aperte i siti di legame sono accessibili solo da un lato della membrana. Nel passaggio tra le conformazioni la proteina adotta transitoriamente una conformazione chiusa che previene l'attraversamento non accompagnato. Possono lavorare in condizione inversa con gradienti appropriati: i trasportatori sono costruiti da ripetizioni inverse e sono detti pseudosimmetrici.

10.2.2 Trasportatori nella membrana plasmatica regolano il pH citosilico

La maggior parte delle proteine operano ottimalmente ad un pH particolare e si rende pertanto necessario regolare il pH dei compartimenti intracellulari. La maggior parte delle cellule possiedono antiporter guidati da Na^+ nella membrana plasmatica che aiutano a mantenere il pH citosilico a 7.2. Usano l'energia del gradiente Na^+ per pompare fuori H^+ in eccesso trasportandolo fuori direttamente o portando all'interno della cellula HCO_3^- per neutralizzare il primo. Uno scambiatore Cl-HCO_3^- indipendente dal Na^+ aggiusta il pH nel direzione opposta. Altri trasportatori nelle membrane intracellulari regolano il pH di compartimenti specifici.

10.2.3 Una distribuzione asimetrica dei trasportatori nelle cellule epiteliali sottosta al trasporto transcellulare dei soluti

Nelle cellule epiteliali i trasportatori sono distribuiti non uniformemente nella membrana plasmatica e contribuiscono al trasporto transcellulare dei soluti muovendoli attraverso il fluido extracellulare in cui queste cellule si trovano fino al sangue. Symporter legati al Na^+ si trovano nel dominio apicale delle cellule epiteliali e trasportano attivamente i nutrienti nella cellula, creando gradienti di soluto elevati e uniporter nei domini basali e laterali permettono a questi nutrienti di lasciare la cellula passivamente. In tali cellule l'area della membrana plasmatica è aumentata da microvilli che aumentano la superficie assorbente.

10.2.4 Ci sono tre classi di pompe guidate dall'ATP

Tali pompe sono dette ATPasi di trasporto in quanto idrolizzano ATP in ADP e fosfato utilizzando l'energia liberata per pompare ioni o altri soluti. Ce ne sono di tre tipi:

- Pompe P-tipo: sono strutturalmente e funzionalmente imparente con le proteine multipassaggio, devono il nome al fatto che fosforilano loro stesse, includono molte delle pompe ioniche responsabili del mantenimento del gradiente di Na^+ , K^+ , H^+ e Ca^{2+} .
- Trasportatori APC (ATP-Binding Cassette transporters) differiscono dalle precedenti strutturalmente e pompano piccole molecole.
- Pompe V-tipo: sono proteine simili a turbine con diverse subunità, trasferiscono H^+ in organelli come i lisosomi, vescicole sinaptiche e vacuoli acidificandone l'interno.

Molto imparentate con le pompe V-tipo sono le ATPasi F-tipo o ATP sintetasi in quanto usano il gradiente H^+ per guidare la sintesi di ATP. Si trovano nella membrana plasmatica dei batteri e in quella interna dei mitocondri.

10.2.5 Una ATPasi P-tipo pompa Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmico nelle cellule muscolari

Le cellule eucariotiche mantengono una concentrazione di Ca^{2+} di $\sim 10^{-7}M$ nonostante una concentrazione extracellulare di $\sim 10^{-3}$, pertanto piccole variazioni esterne portano a una veloce variazione di gradiente. Tale flusso viene utilizzato per trasmettere rapidamente segnali extracellulari attraverso la membrana plasmatica. Si deve pertanto mantenere un ripido gradiente di Ca^{2+} attraverso trasportatori come il P-tipo Ca^{2+} ATPasi e lo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ guidato dal gradiente elettrochimico del Na^+ . La Ca^{2+} ATPasi nel reticolo sarcoplasmico (SR), una membrana nelle cellule di muscolo scheletrico fa parte della prima categoria. L'ST è un tipo di reticolo endoplasmatico che

forma una rete di sacche tubulari che servono come magazzini di Ca^{2+} . Quando un'azione potenzialmente depolarizzerebbe la membrana plasmatica della cellula muscolare Ca^{2+} viene rilasciato nel citosol dall'SR attraverso canali di rilascio che stimolano la contrazione del muscolo. La pompa Ca^{2+} fa ritornare il Ca^{2+} nell'SR. Le ATPasi P-tipo hanno strutture simili contenenti 10 α -eliche transmembrana connesse a tre domini citosilici. Nella pompa dell'ST ci sono catene laterali di amminoacidi protrudenti dalle eliche che formano siti di legame per il Ca^{2+} . Nello stato non fosforilato sono accessibili unicamente dal lato citosilico e il legame di Ca^{2+} causa una serie di cambi conformazionali che chiudono il passaggio e attivano una reazione di trasferimento del gruppo fosfato in cui viene trasferito in un aspartato altamente conservato in tutte le ATPasi di P-tipo. L'ADP si dissocia ed è ricambiato con un ATP causando un altro cambio conformazionale che apre un passaggio al lume dell'SR. I Ca^{2+} che escono sono sostituiti da due ioni H^+ e una molecola di acqua che stabilizzano il sito di legame e chiudono il passaggio verso il lume. L'idrolisi del legame forforil-aspartato fa ritornare la pompa nella condizione iniziale.

10.2.6 La pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ della membrana plasmatica stabilisce gradienti Na^+ e K^+ attraverso la membrana plasmatica

La pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ o ATPasi $\text{Na}^+\text{-K}^+$ si trova nella membrana plasmatica di tutte le cellule animali e mantiene i gradienti di K^+ e Na^+ . Fa parte della famiglia delle ATPasi P-tipo e opera come un antiporter guidato da ATP, pompando Na^+ fuori dalla cellula contro il gradiente e K^+ all'interno. Tale pompa genera il gradiente di Na^+ necessario per il trasporto della maggior parte dei nutrienti e regola il pH citosilico e pertanto un terzo dell'energia viene dedicata per questa pompa. Si dice elettrogenica in quanto porta fuori tre ioni carichi positivamente e per ogni due che porta dentro creando una corrente elettrica netta attraverso la membrana e creando un potenziale elettrico con l'interno negativo.

10.2.7 I trasportatori ABC costituiscono la più grande famiglia di proteine di trasporto di membrana

I trasportatori ABC contengono due domini ATPasi altamente conservati o cassette leganti dell'ATP sul lato citosilico della membrana. Il legame con l'ATP unisce i due domini e l'idrolisi causa la loro dissociazione. Questi movimenti sono trasmessi ai segmenti transmembrana guidando i cicli di cambi conformazionali che espongono siti di legame per il soluto su ogni lato della membrana alternativamente. Utilizzano pertanto l'energia liberata con il legame dell'ATP e la sua idrolisi per guidare il trasporto attraverso il bistrato nella direzione determinata dal cambio conformazionale determinato dal sito di legame legato all'idrolisi. Sono utilizzati dai batteri per trasportare piccole molecole e nutrienti. Nella maggior parte delle cellule dei vertebrati un trasportatore ABC del reticolo endoplasmatico o trasportatore TAP pompa peptidi dal citosol nel lume ER che sono prodotti dalla degradazione delle proteine da parte dei proteosomi. Sono poi trasportati nella superficie cellulare dove vanno sotto lo scrutinio di linfociti T citotossici che uccidono la cellula se sono derivati da virus o altri microorganismi.

10.3 Canali e le proprietà elettriche delle membrane

I canali formano pori attraverso la membrana e una classe forma gap junctions tra cellule adiacenti. Le porine formano pori permissivi in batteri, mitocondri e cloroplasti. Nella membrana plasmatica di piante e animali i pori sono altamente selettivi e si chiudono rapidamente. Sono tipicamente detti

canali ionici e non possono essere accoppiati a una fonte di energia per svolgere trasporto attivo. La loro funzione è permettere il passaggio di ioni inorganici per diffonderli lungo il loro gradiente elettrochimico.

10.3.1 Le acquaporine sono permeabili all'acqua ma impermeabili agli ioni

Essendo le cellule principalmente acqua il suo movimento attraverso le membrane è fondamentale alla vita. Le cellule contengono inoltre alte concentrazioni di soluti come molecole organiche cariche negativamente confinate nella cellula (fixed anions) e i cationi che ne bilanciano la carica. Si crea un gradiente osmotico bilanciato da un gradiente opposto generato da ioni inorganici nel fluido extracellulare. La forza osmotica rimanente tende a portare acqua nella cellula causandone il rigonfiamento fino a che le forze sono in equilibrio. A causa di questo tutte le membrane biologiche sono permeabili all'acqua. Nelle cellule animali l'osmosi ha piccolo ruolo nella regolazione del volume in quanto il citoplasma è in uno stato a gel e resiste grandi cambiamenti di volume. Oltre alla diffusione diretta alcuni eucarioti e procarioti possiedono canali acquosi o acquaporine nella membrana plasmatica che permettono un rapido movimento d'acqua. Per evitare la distruzione di gradienti ionici devono permettere il passaggio di molecole d'acqua rapido e bloccare quello di ioni. Questo accade grazie alla loro struttura tridimensionale. I canali hanno un poro stretto che permette il passaggio di una singola fila di molecole d'acqua. Sono impermeabili a H^+ , presente principalmente nella forma H_3O^+ grazie a due arginine che legano l'atomo di ossigeno della molecola di acqua imponendo una bipolarità all'intera catena.

10.3.2 Canali ionici sono selettivi degli ioni e fluttuano tra stato aperto e chiuso

I canali ionici sono selettivi e suggerisce che devono essere sottili abbastanza in posti per forzare ioni permeanti in contatto intimo con i canali del canale in modo che solo quelli con la carica e dimensione appropriata possano passare. Devono liberarsi della maggior parte delle molecole d'acqua associata per passare. La parte sottile è detto filtro selettivo e limita il tasso di passaggio e quando la concentrazione aumenta il flusso di ioni attraverso un canale aumenta proporzionalmente fino alla saturazione a un tasso massimo. Inoltre i canali ionici non sono continuamente aperti ma sono gated. Inoltre con stimolazioni prolungate vanno in uno stato inattivo in cui sono refrattari ad aperture fino alla rimozione dello stimolo. Gli stimoli sono cambi di voltaggio (canali voltage-gated), stress meccanico (canali gated meccanicamente) o il legame di un ligando (canali ligand-gated) che può essere un mediatore extracellulare come un neurotrasmettitore o uno intracellulare come uno ione o un nucleotida. La fosforilazione e defosforilazione regolano la loro attività.

10.3.3 Il potenziale di membrana nelle cellule animali dipende principalmente dai canali di leak K^+ e dal suo gradiente attraverso la membrana plasmatica

Un potenziale di membrana sorge quando si trova una differenza di carica elettrica tra i due lati di membrana causata da una differenza di concentrazione di ioni positivi e negativi. Tali differenze possono originarsi da pompaggio elettrogenetico e da diffusione di ioni passiva. Le pompe elettrogenetiche generano la maggior parte del potenziale nelle cellule di piante e funghi, mentre nelle animali questo avviene grazie al movimento ionico passivo. Il ruolo di equilibratore viene svolto dal K^+ che viene pompato attivamente nella cellula dalle pompe Na^+-K^+ e può uscire liberamente attraverso i

canali K^+ leak nella membrana plasmatica che causano quasi un equilibrio di K^+ . La condizione di equilibrio in cui non c'è flusso netto di ioni attraverso la membrana plasmatica definisce il potenziale di riposo di membrana, definito dall'equazione di Nerst.

10.3.4 Il potenziale di riposo decade lentamente quando la pompa Na^+-K^+ è fermata

Il potenziale di membrana sorge da movimenti di carica che lasciano le concentrazioni ioniche praticamente invariate con movimenti non significativi e carichi. Il potenziale di membrana, nonostante sia influenzato dalle pompe Na^+-K^+ persiste anche quando sono ferme in quanto è generato dal meccanismo di equilibrio K^+ . Dopo del tempo Na^+ , K^+ e Cl^- arrivano a un nuovo equilibrio con potenziale minore. Cambi nella permeabilità della membrana agli ioni influenzano profondamente il suo potenziale.

10.3.5 La struttura dei canali batterici K^+ motra come un canale ionico lavora

I canali sono costruiti da quattro subunità transmembrana identiche che contribuiscono ognuna due α -eliche transmembrana, inclinate verso l'esterno nella membrana e che formano un cono con la parte larga verso l'esterno dove gli ioni K^+ escono dal canale. La catena che connette le due eliche forma una corta α -elica o l'elica del poro e un anello che protrude nel cono per formare un filtro selettivo che forma un poro stretto allineato con gli atomi di ossigeno del carbossile. Uno ione K^+ deve perdere tutte le molecole d'acqua legate per entrare nel filtro dove interagisce con gli ossigeni carbossilici, distanziati in modo per accomodarlo. L'apertura e la chiusura del canale coinvolge movimenti delle eliche nella membrana in modo che ostruiscano o aprano il cammino per il movimento ionico. In base al tipo di canale le eliche si inclunano, ruotano o piegano. Tali eliche di gating sono accoppiatae allorstericamente a domii che formano cammini conduttori degli ioni e i cambi conformazionali nel gate in risposta a ligandi o cambi del potenziale di membrana creano cambi conformazionali nel cammino conduttore.

10.3.6 Canali meccanosensibili proteggono cellule batteriche contro pressioni osmotiche estreme

Tutti gli organismi devono rispondere a forze meccaniche nell'ambiente esterno e interno. Molte proteine possono svolgere questo compito e alcune creano canali meccanosensibili. Questi canali si aprono in risposta a stretching meccanico del bistrato in cui si trovano. Quando un batterio ha esperienza di un ambiente esterno con una bassa forza ionica la cellula si gonfia in risposta all'aumento di pressione ionica. Se la pressione aumenta troppo i canali vengono aperti in modo da permettere a piccole molecole di uscire.

10.3.7 La funzione di un neurone dipende sulla sua struttura allungata

Il compito principale di un neurone è ricevere, condurre e trasmettere segnali. Per far questo sono allungati. Ogni neurone consiste di un corpo cellulare che contiene il nucleo con un numero di processi sottili che si irradiano verso l'esterno da esso. Un lungo assone conduce segnali fuori dal corpo cellulare verso gli obiettivi e altri dendriti si estendono come antenne fornendo una superficie abbastanza grande per ricevere sengali dagli assioni di altri neuroni. Un assone si divide alla fine in molti rami, passando il messaggio a molti obiettivi contemporaneamente. I segnali consistono sempre

di cambi di potenziale elettrico attraverso la membrana plasmatica del neurone e si diffonde grazie a una disturbanza elettrica prodotta da una parte della membrana che si diffonde in altre parti. Si noti come l'attenuazione del segnale può essere un problema per lunghi tratti e pertanto neuroni più grandi utilizzano un meccanismo di segnalazione attivo sostenuto da amplificazioni automatiche. Questa diffusione è detta potenziale di azione o impulso nervoso.

10.3.8 Canali di cationi voltage-gated generano potenziali di azione in cellule elettricamente generate

La membrana plasmatica di una cellula elettricamente eccitabile contiene canali di cationi voltage-gated che generano l'azione di potenziale, causato da una depolarizzazione della membrana plasmatica. Nelle cellule uno stimolo che causa depolarizzazione sufficiente apre i canali voltage-gated Na^+ permettendo a una piccola quantità dello ione di entrare nella cellula lungo il gradiente. L'influsso della carica aumenta la depolarizzazione, aprendo altri canali in un processo di feedback positivo che continua fino a che il potenziale elettrico locale è variato da -40mV negli umani fino a $+50\text{mV}$. A questo punto la cellula arriva a un nuovo punto di equilibrio con i canali Na^+ aperti permanentemente. A questo punto i canali Na^+ si disattivano e canali voltage-gated K^+ si aprono in modo da ripristinare il potenziale. I canali Na^+ sono costruiti da una singola catena con quattro domini simili. Ogni dominio contribuisce al canale centrale con un sensore di voltaggio costituito da una elica transmembrana S4 che contiene molti amminoacidi positivamente carichi. Mentre la membrana depolarizza l'elica subisce una forza di pulling elettrostatico che la forza ad attrarre il lato extracellulare della membrana negativamente carico. Il cambio conformazionale apre il canale. Il meccanismo di inattivazione causa una rapida chiusura del canale. Il canale rimane nello stato inattivato fino a che il potenziale è ripristinato al valore negativo. Il tempo di recupero dei canali determina un periodo refrattario che limita il tempo di invio di ogni messaggio/

10.3.9 L'utilizzo di channelrhodopsin ha rivoluzionato lo studio di circuiti neurali

I channelrhodopsin sono canali ionici fotosensibili che si aprono in risposta alla luce. Contengono un gruppo retinico che covalentemente legato che assorbe la luce e subisce una reazione di isomerizzazione che causa un cambio conformazionale aprendo il canale ionico. Vengono utilizzati per attivare specifici neuroni negli animali.

10.3.10 La mielinizzazione aumenta la velocità e l'efficienza della propagazione del potenziale di azione nelle cellule nervose

Gli assoni di molti neuroni vertebrati sono isolati da una guaina mielina che aumenta il tasso di conduzione del potenziale di azione. È formata da una cellula specializzata non neuronale chiamata cellula gliale. Negli assoni dei nervi periferici sono le cellule di Schwann, mentre nel sistema nervoso centrale sono oligodendrociti. Queste cellule avvolgono strati della loro membrana plasmatica in una spirale attorno all'assone isolando la membrana in modo che poca corrente possa disperdersi. Viene interrotto regolarmente da nodi di Ranvier, dove sono concentrati i canali Na^+ in modo da permettere al potenziale di azione di propagarsi da nodo a nodo in conduzione saltatoria che permette un trasporto rapido e una conservazione di energia in quanto l'eccitazione attiva è confinata alle piccole regioni di membrana ai nodi di Ranvier.

10.3.11 Registrazione di morsetti mostra che canali ionici hanno uno stato binario

I canali ionici voltage-gated sono presenti nell'ordine delle migliaia e generano la corrente che attraversa la membrana. Un microelettrodo intracellulare può misurarla, ma esistono registrazioni di morsetti che permettono di misurare i canali individuali. Queste registrazioni indicano che i canali individuali non hanno stati intermedi tra aperto o chiuso e hanno sempre la stessa conduttanza.

10.3.12 Canali di cationi voltage-gated sono evolutivamente e strutturalmente imparentati

I canali di cationi voltage-gated possono essere a Na^+ o a Ca^{2+} per esempio. Si trova una grande diversità tra le classi di questi canali, generati da geni multipli e da splicing alternativi. Hanno comunque grandi somiglianze dimostrando che appartengono a una superfamiglia di proteine che condividono principi di progettazione. Le combinazioni particolari dei singoli determinano in un neurone come la cellula genera sequenze ripetitive di potenziale d'azione.

10.3.13 Diversi tipi di neuroni mostrano caratteristiche proprietà di stabile firing

Il cervello umano contiene circa 10^{11} neuroni e 10^{14} connessioni sinaptiche con un importante grado di circolarità continuamente modificata in risposta a esperienze e dalla perdita di neuroni con l'età. I neuroni si possono caratterizzare in base alla loro funzione in parte alla propensione a generare potenziale d'azione e i pattern con cui lo fanno. Le proprietà di firing sono determinate dal codice genetico e dai canali che esprime, mentre il numero di canali non è fissato ma cambia in modo da mantenere un comportamento fisso per mantenere il controllo omeostatico.

10.3.14 Canali ionici transmitter-gated convertono segnali chimici in elettrici alla sinapsi chimica

I segnali dei neuroni sono trasmessi da cellula a cellula a siti specializzati di contatto detti sinapsi. Il meccanismo di trasmissione è indiretto: la cellula presinaptica separata da una fessura sinaptica dalla postsinaptica. Quando un potenziale d'azione arriva alla cellula presinaptica la depolarizzazione della membrana apre canali voltage-gated Ca^{2+} raggruppati nella membrana. L'influsso di Ca^{2+} causa il rilascio nella fessura di neurotrasmettitori, conservati in vescicole sinaptiche e rilasciati attraverso esocitosi. I neurotrasmettitori si diffondono rapidamente e causano un cambio elettrico nella cellula postsinaptica legandosi e aprendo canali ionici transmitter-gated. Dopo che il neurotrasmettitore è secreto viene rimosso da enzimi specifici, dalla terminazione presinaptica o dalle cellule gliali. La sua ripresa è mediata da un numero di symporter di neurotrasmettitori mediati da Na^+ che permettono un loro riciclo. La rimozione rapida permette precisione spaziale e temporale della segnalazione diminuendo la possibilità che influenzi cellule vicine e liberando la fessura prima del segnale successivo. Questo metodo è più versatile ed adattabile rispetto a sinapsi elettriche alle gap junctions. Canali ionici transmitter-gated o recettori ionotropici sono costruiti per convertire rapidamente segnali chimici extracellulari in segnali elettrici alle sinapsi chimiche. Sono concentrati in regioni specializzate della membrana plasmatica e si aprono transientemente in risposta al legame dei neurotrasmettitori causando un cambio di permeabilità nella membrana. Non sono sensibili al potenziale della membrana e non possono creare un circuito a feedback. Solo se la somma delle

piccole depolarizzazioni apre un numero sufficiente di canali di cationi il potenziale d'azione può essere causato.

10.3.15 Le sinapsi chimiche possono essere eccitatorie o inibitorie

I canali ionici transmitter-gated hanno molte differenze. Come recettori hanno siti di legame selettivi per il neurotrasmettitore rilasciato dalla terminazione nervosa presinaptica e come canali sono selettivi sul tipo di ioni che lasciano passare. Questo determina la natura della risposta postsinaptica. Neurotrasmettitori eccitatori aprono canali di cationi causando un influsso di Na^+ e di Ca^{2+} , depolarizzando la membrana postsinaptica al di sotto del potenziale che genera un potenziale d'azione. Neurotrasmettitori inibitori aprono canali Cl^- o K^+ sopprimendo il firing rendendo più difficile la depolarizzazione. Molti neurotrasmettitori possono avere entrambi i ruoli in base a dove sono rilasciati, a quali recettori si legano e le condizioni ioniche che incontrano. L'apertura di canali K^+ e Cl^- contrasta la depolarizzazione in quanto il gradiente è nella direzione opposta a quella necessaria e pertanto la loro apertura tende a far rimanere la cellula vicino al potenziale di equilibrio. Non tutta la segnalazione chimica nel sistema nervoso opera attraverso questi canali ionotropici. La maggior parte dei neurotrasmettitori secreti dalle terminazioni nervose si legano a recettori metabotropici che regolano i canali ionici indirettamente attraverso l'azione di piccole molecole di segnalazione intracellulari.

- I recettori ionotropici sono canali ionici e si trovano a sinapsi chimiche veloci, acetilcolina, glicina, glutammato e GABA agiscono su canali ionici transmitter-gated mediando segnalazione eccitatori o inibitori in modo immediato, semplice e breve.
- I recettori metabotropici sono recettori accoppiati a proteine G che si legano a tutti gli altri neurotrasmettitori. Questo meccanismo di segnalazione tende a essere più lento e complesso e con conseguenze più durevoli.

10.3.16 I recettori di acetilcolina alle giunzioni neuromuscolari sono canali di cationi transmitter-gated eccitatori

Un esempio di canali ionici transmitter gated sono i recettori di acetilcolina delle cellule muscolari scheletriche. Questi canali sono aperti transientemente dall'acetilcolina rilasciata dalla terminazione nervosa alla giunzione neuromuscolare, una sinapsi chimica tra un neurone motore e una cellula muscolare scheletrica. I recettori sono composti da 5 polipeptidi transmembrana di due tipi codificati da 4 geni separati. Sono molto simili. I due polipeptidi identici formano ognuno un sito di legame per l'acetilcolina. Quando due molecole si legano al complesso pentamerico inducono un cambio conformazionale che apre il canale fino a che l'idrolisi del acetilcolina libera da parte della acetilcolinaesterasi ne abbassa la concentrazione sufficientemente. Quando questo accade il recettore si chiude. Se l'acetilcolina persiste per troppo tempo il canale è disattivato. Le 5 subunità sono disposte in un anello formando un canale acquoso formato da uno stretto poro che si allarga alle due terminazioni. Il legame apre il canale causando una rotazione verso l'esterno delle eliche rompendo un anello di amminoacidi idrofobici che bloccano il flusso di ioni. Raggruppamenti di amminoacidi carichi negativamente aiutano tale flusso. Il traffico consiste di Na^+ , K^+ e Ca^{2+} e si nota pertanto come il canale non sia selettivo e la contribuzione al flusso dipende dalla concentrazione dei cationi e dal loro gradiente. Essendo il gradiente di K^+ vicino a 0 si nota un grande netto influsso di Na^+ che causa una depolarizzazione della membrana.

10.3.17 I neuroni contengono molti tipi di canali transmitter-gated

I canali ionici contengono subunità strutturalmente simili e formano pori transmembrana nello stesso modo al recettore ionotropico di acetilcolina nonostante la loro selettività. Sono costruiti da subunità omologhe che si assemblano come un pentamero. Per ogni classi di canali ionici transmitter-gated si trovano forme alternative di ogni subunità codificate da geni distinti o generate da splicing alternativo e si assemblano in maniera diversa creando canali con differenze in affinità per il ligando, conduttanza, tassi di apertura e chiusura e resistenza a droghe e tossine.

10.3.18 La trasmissione neuromuscolare coinvolge l'attivazione sequenziale di cinque insiemi diversi di canali ionici

In questo processo un impulso nervoso stimola la contrazione di una cellula muscolare attraverso l'attivazione sequenziale di cinque insiemi di canali ionici.

1. Il processo è iniziato quando un impulso nervoso arriva al terminale nervoso e depolarizza la membrana plasmatica del terminale. La depolarizzazione apre transientemente i canali voltage-gated Ca^{2+} nella membrana presinaptica. Ca^{2+} fluisce nella terminazione nervosa. L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nel citosol causa il rilascio locale di acetilcolina attraverso esocitosi nella fessura sinaptica.
2. L'acetilcolina rilasciata si lega ai suoi recettori nella membrana plasmatica della cellula muscolare, aprendo transientemente canali cationici e l'influsso di Na^+ causa una depolarizzazione locale della membrana.
3. La depolarizzazione locale apre canali Na^+ nella membrana permettendo a più Na^+ di entrare aumentandone la depolarizzazione. Questo fa iniziare un circuito di feedback positivo per questi canali aumentando una depolarizzazione autopropagatoria o un potenziale d'azione che si diffonde nell'intera membrana plasmatica.
4. La depolarizzazione generale attiva i canali Ca^{2+} voltage-gated nei tubuli trasversali (T-tubules) della membrana.
5. Questo causa a canali di rilascio di Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmatico vicino di aprire transientemente e rilasciare Ca^{2+} nel citosol. La presenza di questi canali in una struttura specializzata causa un cambio conformazionale del canale trasmesso meccanicamente ai canali di rilascio di Ca^{2+} aprendoli e permettendo il flusso di Ca^{2+} nel citoplasma. L'aumento di concentrazione di Ca^{2+} citosilico causa la contrazione dei miofibrilli nelle cellule muscolari.

10.3.19 I singoli neuroni sono complessi dispositivi computazionali

Nel sistema nervoso centrale un neurone può ricever input da migliaia di altri neuroni e può formare sinapsi con altre migliaia di cellule. Alcune di queste trasmettono segnali dal cervello o dal midollo spinale, altri portano informazioni sensoriali da muscoli o dalla pelle. I neuroni motori devono combinare le informazioni ricevute dalle sorgenti e reagire, creando potenziali d'azione sull'assone o rimanendo silenti. Delle molti sinapsi alcune tendono ad eccitarlo, mentre altre a inibirlo. I neurotrasmettitori rilasciati a sinapsi eccitatorie causano un potenziale postsinaptico eccitatorio (excitatory PSP), mentre neurotrasmettitori a sinapsi inibitorie causano un iperpolarizzazione detta PSP inibitorio. La membrana plasmatica dei dendriti e del corpo cellulare contiene una piccola densità di canali Na^+ voltage-gated e un PSP eccitatorio è generalmente troppo piccolo per causare un potenziale d'azione, ma genera un PSP locale che diminuisce con la distanza dal sito della sinapsi. Se

il segnale arriva simultaneamente a diverse sinapsi nella stessa regione il PSP locale è più o meno la somma degli individuali. I PSP di ogni quartiere si diffondono passivamente e convergono sul corpo cellulare. Per trasmissioni a lunga distanza la magnitudine combinata del PSP è tradotta o codificata nella frequenza di generazione di potenziali d'azione. Maggiore lo stimolo, più alta la frequenza.

10.3.20 La computazione neuronale richiede una combinazione di almeno tre tipi di canali K^+

La deficienza in una trasmissione a lunga distanza avviene in una regione della membrana assonica detta segmento iniziale o axon hillock alla giunzione dell'assone con il corpo cellulare. Questa membrana è ricca di canali Na^+ voltage-gated e contiene altre classi di canali ionici: tre selettivi per K^+ e uno per Ca^{2+} , rispettivamente canali ritardati, disattivanti rapidamente e Ca^{2+} -attivati canali K^+ . I canali K^+ ritardati svolgono la funzione di far ritornare il voltaggio di membrana a un valore molto negativo, cosa che non può avvenire fino a che persiste il segnale dai PSP in modo da permettere di ripristinare i canali Na^+ dalla loro disattivazione. Questa funzione dei canali K^+ avviene in quanto la loro cinetica lenta permette la loro apertura durante la fase di abbassamento del potenziale d'azione, quando i canali Na^+ sono disattivati. La loro apertura permette un efflusso di K^+ che porta la membrana verso l'equilibrio di potenziale K^+ . La repolarizzazione richiude i canali stessi. Il segmento iniziale è pertanto riesettato in modo che lo stimolo depolarizzante dagli input sinaptici può causare un altro potenziale d'azione. I canali di K^+ rapidamente disattivanti regolano la frequenza della generazione dei potenziali d'azione. Sono anch'essi voltage-gated e si aprono alla depolarizzazione della membrana ma la loro sensibilità specifica al voltaggio e cinetica della disattivazione sono tali in modo che riducono il tasso di generazione del potenziale d'azione al livello della stimolazione appena sopra alla soglia richiesta. Rimuovono pertanto la discontinuità nella relazione tra tasso di generazione e intensità dello stimolo, generando un tasso di firing proporzionale alla forza dello stimolo di depolarizzazione. Il processo di codifica è modulato da altri due tipi di canali: canali di Ca^{2+} voltage-gated e attivati da K^+ che agiscono insieme riducendo la risposta della cellula a uno stimolo prolungato e costante in un processo detto adattamento. I canali Ca^{2+} attivati si aprono in risposta a un aumento di concentrazione di Ca^{2+} alla parte citoplasmatica del canale. Uno stimolo depolarizzante forte e prolungato causa infatti un lungo treno di potenziali d'azione ognuno dei quali permette un breve influsso di Ca^{2+} attraverso canali voltage-gated e la sua concentrazione aumenta fino ad un livello tale da aprire tali canali. L'aumento di permeabilità di K^+ rende più difficile la depolarizzazione della membrana aumentando il ritardo tra un potenziale d'azione e il successivo. Tale adattamento permette al neurone di reagire sensibilmente a cambiamenti. Una proprietà cruciale del sistema nervoso è la sua abilità di imparare e ricordare. Questa dipende in parte dalla capacità di sinapsi individuali di rafforzarsi o indebolirsi in base all'uso nella plasticità sinaptica.

10.3.21 Potenziazione a lungo termine (LTP) nell'ippocampo dei mammiferi dipende dall'entrata di Ca^{2+} attraverso canali recettori di NMDA

Nel cervello dei mammiferi l'ippocampo è la regione con un ruolo speciale nell'apprendimento. Alcune sinapsi nell'ippocampo mostrano una forma di plasticità con uso ripetuto: se un singolo potenziale d'azione non lascia traccia un corto insieme di firing ripetitivo causa long-term potentiation (LTP) in modo che altre azioni singole seguenti evocano una risposta aumentata nella cellula postsinaptica.

L'effetto dura in base al numero e intensità del burst di firing ripetitivo. SOlo le sinapsi attivate mostrano LTP. Mentre la cellula sta ricevendo un burst di stimolazione ripetitiva attraverso un insieme di sinapsi, se un singolo potenziale d'azione viene portato a un'altra sinapsi sulla sua superficie anche quest'ultima svolge LTP. Si nota come LTP avviene ad ogni occasione in cui una cellula presinaptica fires a un tempo in cui la membrana postsinaptica è fortemente depolarizzata. Questa regola riflette il comportamento di una classe di canali ionici nella membrana postsinaptica. Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel sistema nervoso dei mammiferi e i suoi canali ionici sono i più comuni nel cervello. Nell'ippocampo la maggior parte della corrente depolarizzante responsabile di PSP eccitatorie è trasportata da tali canali detti recettori AMPA. La corrente ha un secondo componente, mediato da una sottoclasse separata di canali ionici glutamate-gatede detti recettori NMDA doppiamente gated, si aprono solo quando il glutammato è legato al recettore e la membrana è fortemente depolarizzata. La seconda condizione è soddisfatta dal rilascio di Mg^{2+} che blocca un canale a riposo. Sono attivati solamente quando sono attivi anche i recettori AMPA e depolarizzano la membrana. Sono critici per LTP. Questi canali quando aperti sono altamente permeabili a Ca^{2+} che agisce come segnale intracellulare nella cellula postsinaptica, causando una cascata di cambiamenti responsabili per la LTP. Le sinapsi presentano anche long-term depression (LTD) che riduce a lungo termine i recettori AMPA (che possono venire generati da LTP), che avviene degradandolo dopo la loro endocitosi selettiva. Anche LTD richiede recettori NMDA e un aumento di Ca^{2+} . Il controllo bidirezionale della forza sinaptica dipende dalla magnitudine dell'aumento di Ca^{2+} : grandi livelli attivano la proteina chinasi e LTP, livelli modesti attivano fosfatasi e LTD.

Capitolo 11

Compartimenti intracellulari e ordinamento delle proteine

Una cellula eucariotica è divisa in compartimenti racchiusi da membrana e funzionalmente distinti. Ogni compartimento o organello contiene il proprio insieme di enzimi e altre molecole caratteristico e sistemi di trasporto specializzati distribuiscono prodotti specifici tra di essi. Le proteine danno a ogni compartimento le proprie proprietà funzionali e strutturali. Catalizzano le reazioni che avvengono in esso e trasportano selettivamente piccole molecole dentro e fuori. Per organelli racchiusi da membrana servono anche da marcatori di superficie che direzionano la consegna di nuove proteine e lipidi.

11.1 La compartimentalizzazione della cellula

11.1.1 Tutte le cellule hanno lo stesso insieme base di organelli racchiusi da membrana

Molti processi biochimici vitali avvengono nelle membrane o sulle loro superfici. Le membrane intracellulari, oltre a fornire un aumento di superficie di membrana per svolgerle forma un sistema di compartimenti chiusi separati dal citosol, creando spazi acquosi funzionalmente specializzati dove sottoinsiemi di molecole sono concentrati per ottimizzare le reazioni biochimiche in cui partecipano. Essendo il bistrato impermeabile alla maggior parte delle molecole idrofiliche si trovano proteine di trasporto per importare ed esportare metaboliti specifici. Ogni membrana dell'organello ha anche un meccanismo per importare e incorporare le proteine che lo rendono unico. Il nucleo della molecola contiene il genoma ed è il sito principale della sintesi di DNA e RNA. Il citoplasma che lo circonda consiste del citosol e organelli citoplasmatici sospesi in esso. Il citosol è il luogo principale della sintesi e degradazione delle proteine oltre a svolgere la maggior parte del metabolismo intermedio (sintesi e degradazione di piccole molecole per fornire componenti delle macromolecole). Circa metà dell'area di membrana racchiude lo spazio del reticolo endoplasmatico. L'ER ruvido possiede molti ribosomi legati alla superficie citosolica, organelli non racchiusi di membrana che sintetizzano le proteine di membrana destinate per la secrezione o per altri organelli. Ogni proteina viene trasportata nell'ER mentre viene sintetizzata. L'ER produce anche la maggior parte dei lipidi e conserva ioni Ca^{2+} . Le regioni dell'ER senza ribosomi sono dette ER liscio. Molte delle proteine e dei lipidi vengono mandati dall'ER nell'apparato di Golgi, consistente di uno stack di strutture a disco dette cisterne di

Golgi. L'apparato riceve lipidi e proteine e li invia verso varie destinazioni solitamente modificandole covalentemente nel frattempo. I mitocondri e i cloroplasti generano la maggior parte dell'ATP che la cellula usa per guidare le reazioni che richiedono un input di energia libera. I cloroplasti sono versioni specializzate di plastidi e possono anche avere altre funzioni come conservazione di nutrienti o pigmenti. I lisosomi contengono enzimi digestivi che degradano organelli defunti, macromolecole e particelle incorporate attraverso endocitosi. Quando si muove verso i lisosomi il materiale endocitato deve prima passare attraverso gli endosomi. I perossisomi sono piccoli compartimenti vescicolari che contengono enzimi utilizzati in reazioni ossidative. Ogni organello svolge lo stesso insieme di funzioni base in tutti i tipi cellulari, ma variano in abbondanza e possono avere funzioni aggiuntive specifiche al tipo. La presenza e la forma degli organelli sono regolate in modo da soddisfare le necessità della cellula. Si trovano spesso in posizioni caratteristiche. La dimensione, forma, composizione e locazione sono importanti e regolate in modo da contribuire alla funzione dell'organello stesso.

11.1.2 Origini evolutive spiegano le reazioni topologiche degli organelli

Per capire le relazioni tra i compartimenti cellulari aiuta considerare come potrebbero essersi evoluti. I precursori degli eucarioti erano cellule senza membrane intracellulari. La membrana plasmatica forniva tutte le funzioni dipendenti da essa. La profusione di membrane interne può essere considerata come un adattamento per l'aumento in dimensione della cellula in modo da fornire un sufficiente rapporto volume/superficie. L'evoluzione di membrane interne è accoppiata con la specializzazione della loro funzione. Uno schema ipotetico per l'evoluzione del nucleo e dell'ER viene dall'invaginazione e separazione della membrana plasmatica di una cellula ancestrale che crea un organello con un interno o lume topologicamente equivalente all'esterno della cellula. Questo viene mantenuto per gli organelli coinvolti nei cammini secretori e endociti come ER, apparato di Golgi, endosomi, lisosomi e perissosomi, assimilabili a membri dello stesso compartimento topologicamente equivalente. I loro lumi comunicano estensivamente tra di loro e con l'esterno attraverso vescicoli di trasporto. I mitocondri e i plastidi potrebbero essersi evoluti da batteri incorporati da altre cellule con cui avrebbero vissuto in simbiosi. Si possono pertanto raggruppare i compartimenti intracellulari in quattro famiglie:

- Il nucleo e il citosol che comunicano tra di loro attraverso complessi di pori nucleari e sono continui topologicamente.
- Gli organelli che funzionano nei cammini secretori e endociti come ER, apparato di Golgi, endosomi, lisosomi e altri intermediari di trasporto.
- Mitocondri.
- Plastidi (solo nelle piante).

11.1.3 Le proteine si possono muovere tra i compartimenti in modi diversi

La sintesi delle proteine inizia sui ribosomi nel citosol con l'eccezione di quelle sintetizzate sui ribosomi di mitocondri e plasmidi. Il loro destino seguente dipende dalla sequenza di amminoacidi che contiene segnali di ordinamento che direzionano la loro consegna alle locazioni al di fuori del citosol o a superfici di organelli. Alcune non la possiedono e rimangono nel citosol. Tali segnali possono anche direzionarli dall'ER ad altre destinazioni nella cellula. Ci sono tre modi in cui le proteine si possono muovere da un compartimento all'altro.

- Nel trasporto gated proteine e RNA si muovono tra il citosol e il nucleo attraverso complessi di pori nucleari nella membrana nucleare. Funzionano come gate selettivi che supportano il trasporto attivo di macromolecole specifiche e assemblaggi macromolecolari tra i due spazi topologicamente equivalenti, permettendo la diffusione di molecole più piccole.
- Nella traslocazione di proteine transmembrana traslocatrici direzionano il trasporto di proteine specifiche attraverso una membrana dal citosol in uno spazio topologicamente distinto. Le proteine devono solitamente spiegarsi per attraversare il traslocatore. Avviene tra il citosol nel lume dell'ER o nei mitocondri. Lo stesso meccanismo viene utilizzato parzialmente per le proteine integrali di membrana.
- Nel trasporto vescicolare intermediari di trasporto racchiusi da membrana, vescicole sferiche piccole o grandi frammenti di organelli irregolari trasportano proteine tra compartimenti topologicamente equivalenti. Le vescicole si caricano nel lume di un compartimento e si separano dalla sua membrana e si scaricano in un secondo diventando parte della sua membrana. Questo avviene per le proteine solubili tra l'ER e l'apparato di Golgi. Non attraversando una membrana può avvenire unicamente tra compartimenti topologicamente equivalenti.

Ogni modo di trasferimento è guidato da segnali di ordinamento nella proteina trasportata riconosciuti da recettori di ordinamento.

11.1.4 Sequenze di segnali e recettori di ordinamento direzionano le proteine al corretto indirizzo nella cellula

La maggior parte dei segnali di ordinamento si trova in una lunghezza di amminoacidi lunga tra i 15 e i 60. Tali sequenze si trovano spesso verso la terminazione N della catena e in molti casi peptidasi di segnale la rimuovono una volta che il processo è completo. Possono anche essere sequenze interne che rimangono parte della proteina, utilizzati nel trasporto gated nel nucleo. Possono anche essere composti da multiple sequenze di amminoacidi interne che formano una conformazione tridimensionale degli atomi di superficie. Tali aree di segnale sono utilizzate per l'importazione nucleare e nel trasporto vescicolare. Ogni sequenza specifica una destinazione particolare. Proteine destinate ad un trasferimento iniziale verso l'ER hanno una sequenza alla terminazione N che include una sequenza di 5-10 amminoacidi idrofobici. Molte di queste proteine sono continuamente passate tra gli apparati di Golgi e l'ER e alcune con una sequenza specifica alla terminazione C sono riconosciute come residenti nell'ER e ritornano ad esso. Le proteine destinate per i mitocondri hanno una sequenza di segnale in cui amminoacidi carichi positivamente si alternano con altri idrofobici. Molte proteine destinate al perissosoma hanno una sequenza di tre amminoacidi alla terminazione C. Tali sequenze sono necessarie e sufficienti per l'indirizzamento della proteina, pur essendo variabili le sequenze di proteine con la stessa destinazione sono funzionalmente intercambiabili. Tali sequenze possono essere riconosciute da recettori complementari che le guidano alla destinazione dove le scaricano. I recettori funzionano cataliticamente: dopo aver terminato un trasporto ritornano nel punto iniziale. La maggior parte riconoscono classi di proteine.

11.1.5 La maggior parte degli organelli non può essere costruita da nuovo e richiedono informazioni nell'organello stesso

Quando una cellula si riproduce per divisione deve duplicare i propri organelli oltre ai suoi cromosomi. Questo avviene incorporando nuove molecole negli organelli esistenti ingrandendoli e causando la loro divisione e distribuzione nelle cellule figlie. Ogni cellula figlia eredita un insieme completo di

membrane cellulari ereditate dal genitore. Questo è essenziale in quanto una cellula non può sintetizzarle da zero. Le informazioni richieste per costruire un organello non si trovano esclusivamente nel DNA che ne specifica le proteine. È necessaria informazione nella forma di proteine nella membrana preesistente. Inoltre alcuni organelli ne possono formare altri che non devono essere ereditati alla divisione cellulare.

11.2 Il trasporto di molecole tra il nucleo e il citosol

La membrana nucleare racchiude il DNA e definisce il compartimento nucleare e consiste di due membrane concentriche penetrate da complessi di pori nucleari. Nonostante le membrane esterne e interne siano continue mantengono distinte composizioni proteiche. La membrana nucleare interna contiene proteine che sono siti di legame per cromosomi e per la lamina nucleare, una rete di proteine che forniscono supporto strutturale oltre ad agire come ancora per cromosomi e il citoscheletro citoplasmatico. La membrana esterna circonda quella interna ed è continua con la membrana dell'ER. È costellata di ribosomi che sintetizzano proteine trasportate nello spazio tra le due membrane (spazio perinucleare), continuo con il lume ER. Avviene continuamente un traffico bidirezionale tra nucleo e citosol: molte proteine con funzione nel primo sono importate dal secondo e tutti gli RNA sintetizzati sono esportati in direzione opposta. Entrambi i processi sono selettivi.

11.2.1 Complessi di pori nucleari perforano la membrana nucleare

Grandi ed elaborati complessi di pori nucleari (NPC) perforano la membrana nucleare in tutti gli eucarioti. Ogni NPC è composto da un insieme di 30 nucleoporine. Ogni nucleoporina è presente in copie multiple. La maggior parte delle nucleoproteine sono composte da domini proteici ripetitivi. Alcune delle nucleoporine di impalcatura sono imparentate ai complessi di proteina dell'involucro delle vescicole che gli danno forma. La membrana contiene tra le 3000 e le 4000 NPC che possono trasportare ognuna fino a 1000 macromolecole per secondo in entrambe le direzioni contemporaneamente. Ogni NPC contiene passaggi acquosi che permettono il passaggio di piccole molecole solubili in acqua a un tasso pari alla diffusione libera. Le molecole più grandi devono invece essere attivamente trasportate. Il canale della nucleoporina ha regioni non strutturate che formano un ingarbuglio disordinato che restringe la diffusione delle molecole più grandi. Grazie a questo il compartimento nucleare e il citosol possono mantenere diverse composizioni proteiche. L'esportazione o importazione di grandi molecole avviene attraverso recettori specifici.

11.2.2 Segnali di localizzazione direzionano le proteine nucleari al nucleo

Segnali di ordinamento detti segnali di localizzazione nucleare (NLS) sono responsabili per la selettività del processo di importazione nucleare. In molte proteine consiste di fino a due corte sequenze ricche di amminoacidi carichi positivamente come lisina e arginina. Altre proteine nucleari contengono diversi segnali. Tali segnali si possono trovare ovunque nella catena e formano anelli o superfici sulla superficie proteica. Quando deve avvenire l'importazione le particelle si legano a fibrille che si estendono dalle nucleoporine di impalcatura al bordo dell'NPC nel citosol e poi procedono attraverso il suo centro. Le regioni non strutturate formano una barriera di diffusione e sono spostate per permettere il passaggio delle proteine. Il trasporto nucleare differisce dagli altri in quanto permette il passaggio di proteine senza modificare la loro struttura.

11.2.3 Recettori di importazione nucleare si legano sia ai segnali di localizzazione nucleare e alle proteine NPC

Per iniziare l'importo lineare la maggior parte dei segnali di localizzazione nucleare devono essere riconosciuti da recettori di import nucleare o importine. Ogni membro della famiglia dei geni codifica una proteina recettrice che può legare e trasportare il sottoinsieme contenente il segnale appropriato. Non legano sempre le proteine direttamente ma proteine adattatrici possono creare un ponte tra i recettori e i segnali di localizzazione nucleare. Alcune proteine adattatrici sono strutturalmente imparentate ai recettori. Utilizzando una grande varietà di adattatori e recettori le cellule sono capaci di riconoscere tutti i vari segnali mostrati sulle proteine nucleari. I recettori sono proteine solubili al citosol che si legano al segnale di localizzazione sul carbo e alle ripetizioni fenilalanina-glicina (FG) nei domini non strutturati delle nucleoporine canale che confinano con il poro centrale. Tali ripetizioni si trovano anche nelle fibrille citoplasmatiche e nucleari. Nel ingarbuglio non strutturato al poro tali ripetizioni interagiscono debolmente imponendo una barriera impermeabile alle grandi macromolecole e servono come siti di attracco per i recettori di import. Le ripetizioni allineano il cammino attraverso gli NPC preso dalle importine e le proteine legate. Secondo un modello di trasporto nucleare il complesso importina-cargo si muove lungo il cammino di trasporto legando, dissociandosi e riassociandosi a sequenze di ripetizioni FG. Tali legami dissolvono localmente la fase di gel dell'ingarbuglio della nucleoporina permettendo il passaggio del complesso che una volta dentro il nucleo si dissocia (cosa che non avviene nel citosol, garantendo direzionalità) una volta dissociata l'importina ritorna al citosol.

11.2.4 L'esportazione nucleare lavora come l'importazione ma in senso opposto

L'esportazione nucleare di grandi molecole avviene attraverso NPC e dipende da un sistema di trasporto selettivo che dipende da segnali di esportazione nucleare sulle macromolecole da esportare oltre a recettori di esportazione nucleare o esportine che si legano ai segnali di esportazione e a proteine NPC per guidare il loro cargo attraverso l'NPC al citosol. Sono imparentati strutturalmente alle importine e codificati dalla stessa famiglia di recettori di trasporto nucleare o karyopherins. Si nota pertanto come che i sistemi di importazione ed esportazione lavano secondo gli stessi meccanismi anche se in direzioni diverse.

11.2.5 La Ran GTPasi impone direzionalità al trasporto attraverso NPC

L'importazione di proteine nucleari attraverso NPC concentra specifiche proteine nel nucleo aumentando l'ordine della cellula. Deve pertanto essere utilizzata l'energia conservata in gradienti di concentrazione o nella forma legata al GTP monomero Ran, richiesta sia per l'esportazione che l'importazione. È uno switch molecolare che esiste in due conformazioni in base al fatto che sia legato GDP o GTP. Due proteine regolatorie specifiche al Ran causano la conversione tra le due: una GTPasi attivatrice (GAP) citosolica che causa l'idrolisi del GTP e un fattore di scambio di guanina (GEF) nucleare che promuove lo scambio di GDP per GTP e converte Ran-GDP in Ran-GTP. La localizzazione di queste due proteine crea un gradiente che guida il trasporto nucleare nella direzione appropriata. Le importine si legano alle ripetizioni FG anche se non legate al cargo ed entrano nel canale. Quando raggiungono il lato nucleare Ran-GTP si lega ad esse e causa il rilascio del cargo che avviene solo sul lato nucleare. L'importina, ora legata alla Ran-GTP è trasportata nel citosol dove Ran-GAP causa l'idrolizzazione del GTP convertendola a Ran-GDP che si dissocia dal recettore che è di nuovo utilizzabile. L'esporto avviene con un meccanismo simile tranne per il fatto che Ran-GTP

nel nucleo promuove il legame del cargo con l'esportina. Una volta che si muove nella nucleoporina viene idrolizzata e l'esportina la rilascia insieme al cargo. Esportine libere sono successivamente riportate nel nucleo.

11.2.6 Il trasporto attraverso NPC può essere regolato controllando l'accesso ai macchinari di trasporto

Alcune proteine contengono sia segnali per l'importazione che per l'esportazione e si spostano continuamente fuori e dentro il nucleo. Il tasso di importazione ed esportazione determina lo stato di localizzazione delle proteine shuttling. Cambiandolo si cambia la localizzazione di una proteina. Alcune proteine si muovono continuamente ma in altri casi il trasporto è altamente controllato. Questo avviene regolando i segnali di localizzazione nucleare ed esportazione accendendoli o spegnendoli attraverso fosforilazione di amminoacidi vicini alle sequenze di segnale. Altri regolatori di trascrizione sono legati a proteine citosoliche che le ancorano nel citosol o mascherano i segnali in modo che non possano interagire con i recettori di importazione. Uno stimolo appropriato rilascia la proteina dall'ancora citosolica o dalla maschera e permette il trasporto nel nucleo. Un esempio è una proteina che controlla l'espressione di proteine coinvolte nel metabolismo del colesterolo. La proteina viene conservata in una forma inattiva come proteina transmembrana nell'ER. Quando una cellula viene privata di colesterolo la proteina viene trasportata all'apparato di Golgi dove incontra proteasi che separano il dominio citosolico che viene importato nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni per il recupero e sintesi di colesterolo. L'esportazione di mRNA avviene come grandi assemblaggi che possono contenere centinaia di proteine. I complessi ribonucleoproteina-mRNA (mRNP) attraccano al lato nucleare degli NPC dove sono rimodellati ed esportati attraverso idrolisi dell'ATP.

11.2.7 Durante la mitosi la membrana nucleare si disassembla

La lamina nucleare locata sul lato nucleare della membrana interna è una rete di subunità proteiche connesse dette lamine nucleari. Proteine filamentose che si polimerizzano in un lattice bidimensionale che dà forma e stabilità alla membrana nucleare a cui è ancorata attraverso gli NPC e proteine transmembrana. La lamina interagisce con la cromatina e insieme a proteine della membrana interna crea collegamenti strutturali tra DNA e membrana nucleare. Quando il nucleo si disassembla durante la mitosi gli NPC e la lamina nucleare si disassemblano e la membrana si frammenta. Durante questo processo NPC si legano a recettori di import che svolgono un ruolo nel riassetto alla fine della mitosi. Le proteine della membrana nucleare si disperdono attraverso la membrana ER. Più tardi durante la mitosi la membrana nucleare si riassume sulla superficie dei cromosomi figli. La Ran GTPasi agisce come marcatore posizionale per la cromatina e rilascia le proteine NPC in prossimità dei cromosomi dalle importine.

11.3 Il trasporto di proteine in mitocondri e cloroplasti

I mitocondri e cloroplasti sono organelli racchiusi da doppia membrana che si specializzano nella sintesi dell'ATP utilizzando energia derivante da trasporto di elettroni e fosforilazione ossidativa nei mitocondri e dalla fotosintesi nei cloroplasti. Entrambi gli organelli contengono il proprio DNA, ribosomi e altri componenti per la sintesi di proteine. La maggior parte di esse sono sintetizzate nel nucleo cellulare e importate dal citosol. Ogni proteina deve raggiungere un sottocompartimento particolare in cui funziona. Esistono diversi compartimenti nei mitocondri: lo spazio di matrice e lo spazio intermembrana continuo con lo spazio cristae sono formati da due membrane mitocondriali.

concentriche. Quella interna racchiude lo spazio di matrice e forma invaginazioni dette cristae e la membrana esterna che è in contatto con il citosol. Complessi proteici danno confini alle giunzioni dove la cristae si invagina e divide la membrana interna in due domini: uno che circonda lo spazio cristae e l'altro dominio lungo la membrana esterna. I cloroplasti posseggono anch'essi una doppia membrana che racchiude uno spazio intermembrana e lo stroma, l'equivalente dello spazio di matrice. Hanno anche gli spazi tilacoidi circondati dalla membrana tilacoidi che deriva dalla membrana interna durante lo sviluppo plastide ed è pizzicata diventando discontinua. Ogni sottocompartimento contiene le proprie proteine distinte. Nuovi mitocondri e cloroplasti sono prodotti dalla crescita di organelli preesistenti seguiti da fissione. La crescita dipende dall'importazione di proteine dal citosol che devono essere trasportate attraverso diverse membrane in successione nel processo di traslocazione proteica.

11.3.1 La traslocazione nei mitocondri dipende da sequenze di segnale e traslocatori di proteine

Le proteine mitocondriali sono solitamente sintetizzate interamente come proteine mitocondriali precursori nel citosol e traslocate da un meccanismo post-traduzionale. Sequenze di segnale direzionano i precursori nei sottocompartimenti appropriati. Molte proteine che entrano nello spazio di matrice contengono una sequenza di segnale alla terminazione N^+ che una segnal-peptidasi rimuove dopo l'importazione. Altre proteine importate hanno sequenze di segnale interne che non sono rimosse. Le sequenze sono necessarie e sufficienti per l'importazione e corretta localizzazione delle proteine. Le sequenze di segnale che direzionano la proteine precursore nello spazio di matrice mitocondriale formano α -eliche anfipatiche in cui residui carichi positivamente si raggruppano su un lato dell'elica, mentre quelli non carichi sul lato opposto. Recettori specifici riconoscono tale configurazione e non la sequenza precisa. Complessi proteici a subunità multiple mediano il movimento delle proteine attraverso le membrane mitocondriali come traslocatori proteici. Il complesso TOM trasferisce le proteine attraverso la membrana esterna e due complessi TIM (22/23) attraverso la membrana interna. Questi complessi contengono recettori per i precursori e le componenti dei canali di traslocazione. Il complesso TOM è richiesto per l'importazione di tutte le proteine codificate dal nucleo. Trasporta la loro sequenza di segnale nello spazio di membrana e aiuta a inserire proteine transmembrana nella membrana esterna. β -barili sono poi passati al complesso SAM, un traslocatore che le posiziona correttamente. Il complesso TIM23 trasporta proteine solubili nello spazio di matrice e aiuta a inserire proteine transmembrana nella membrana interna. TIM22 media l'inserimento di una sottoclasse di proteine per la membrana interna come il trasportatore che muove ATP, ADP e fosfato fuori e dentro il mitocondrio. Il complesso OXA media l'inserimento delle proteine di membrana interna sintetizzate dai mitocondri.

11.3.2 I precursori mitocondriali sono importati come catene polipeptidiche non piegate

Le proteine mitocondriali rimangono non piegate nella loro conformazione nel citosol attraverso l'interazione con altre proteine come accompagnatrici della famiglia hsp70 con elementi dedicati a tali precursori che si legano direttamente alla sequenza di segnale. Le interazioni aiutano a prevenire l'aggregazione o piegamento spontaneo dei precursori prima che si leghino al complesso TOM. I recettori di TOM legano la sequenza di segnale del precursore, le proteine interagenti sono separate e la catena non piegata è portata attraverso il canale di traslocazione. Una volta che la proteina si trova nello spazio intermembrana viene separata la sequenza di segnale e si lega al complesso TIM che trasloca la proteina nello spazio di matrice o la inserisce nella membrana interna.

11.3.3 L'importazione è guidata da idrolisi dell'ATP e da potenziale di membrana

L'idrolisi dell'ATP dà potenza al sistema di importazione a due siti discreti, uno fuori dal mitocondrio e uno nello spazio di matrice. È anche necessario il potenziale di membrana. La prima richiesta di energia avviene quando la proteina si lega a TOM e si devono separare le proteine accompagnatrici attraverso idrolisi dell'ATP. Una volta che la sequenza di segnale viene passata al complesso TIM, ulteriore traslocazione richiede potenziale di membrana, il componente elettrico del gradiente di H^+ attraverso la membrana interna, mantenuto da sistemi di pompe di H^+ dallo spazio di matrice alla membrana interna. L'energia del gradiente oltre a guidare la traslocazione di tali sequenze permette la sintesi dell'ATP. hsp70 mitocondriale si lega al lato di matrice del complesso TIM23 e agisce come motore che tira il precursore nello spazio di matrice, ha una grande affinità con le proteine non piegate e si lega strettamente al precursore appena emerge nello spazio di matrice. Successivamente subisce un cambio conformazionale e si separa dal precursore in un passo dipendente dall'ATP.

11.3.4 Batteri e mitocondri utilizzano meccanismi simili per inserire porine nella membrana esterna

La membrana mitocondriale esterna contiene proteine formanti β -barili dette porine che la rendono permeabile a ioni e a metaboliti inorganici. Il complesso TOM non può integrare le porine nel bistrato lipidico: sono prima trasportate nello spazio intermembrana non piegate dove si legano transitoriamente con proteine specializzate che impediscono la loro aggregazione. Successivamente si legano al complesso SAM che le inserisce nella membrana esterna e le piega.

11.3.5 Trasporto nella membrana interna mitocondriale e nello spazio intermembrana avviene secondo diverse strade

Inizialmente lo stesso meccanismo che trasporta proteine nello spazio di matrice utilizzando i trasportatori TOM e TIM 23 media la traslocazione iniziale di molte proteine destinate alla membrana interna o allo spazio intermembrana. Nella strada più comune solo la terminazione N^+ con la sequenza di segnale entra nello spazio di matrice. Una sequenza di amminoacidi idrofobici agisce come sequenza di stop per il trasferimento, impedendo ulteriore traslocazione. Il rimanente della proteina attraversa la membrana esterna, la sequenza di segnale è rotta, la sequenza idrofobica è rilasciata da TIM23 e rimane ancorata nella membrana interna. In un'altra strada il complesso TIM 23 trasloca l'intera proteina nello spazio di matrice dove una peptidasi di segnale rimuove la sequenza di segnale nella terminazione N che espone una sequenza idrofobica che guida la proteina al complesso OXA che la inserisce nella membrana interna. Molte proteine che usano questi cammini rimangono ancorate alla membrana attraverso la loro sequenza idrofobica, mentre altre sono rilasciate nello spazio intermembrana da una proteasi che rimuove l'ancora di membrana. Molte di queste proteine rimangono attaccate alla superficie esterna della membrana interna come subunità di complessi proteici che contengono proteine transmembrana. Alcune proteine dello spazio intermembrana sono importate attraverso un altro cammino: contengono motivi di cisteina e formano un legame disulfide transiente con la proteina Mia40. Le proteine importate sono poi rilasciate in una forma ossidata con legami disolfidi nella catena. Mia40 si riduce e reossida. I mitocondri sono i siti di sintesi dell'ATP e contengono anche molti enzimi metabolici e devono trasportare piccoli metaboliti attraverso la membrana. La membrana interna non contiene le porine di quella esterna ma una famiglia di trasportatori specifici al metabolita.

11.3.6 Due sequenze di segnale direzionano le proteine a una membrana tilacoide nei cloroplasti

L'importazione di proteine nei cloroplasti è simile a quello nei mitocondri, con processi post-traduzionali con complessi separati per ogni membrana e usano segnali anfipatici alla terminazione N. Le molecole che formano i complessi differiscono e i cloroplasti non hanno un gradiente H^+ attraverso la membrana interna e pertanto usano idrolisi di GTP e ATP. I recettori di import sui cloroplasti e mitocondri di piante devono riconoscere le proprie proteine. I cloroplasti possiedono inoltre un altro compartimento il tilacoide nella cui membrana si trovano molte proteine. Molte proteine sono importate in un processo a due passaggi: prima passano nella attraverso la doppia membrana e poi nello stroma. Successivamente si traslocano nella membrana o spazio tilacoide.

11.4 Perossisomi

I perossisomi sono circondati da una singola membrana e non contengono DNA o ribosomi e tutte le proteine sono codificate nel nucleo e le acquisiscono attraverso importazione selettiva dal citosol. I perossisomi sono comuni a tutte le cellule eucariotiche, contengono enzimi ossidativi ad alte concentrazioni. Sono un sito di utilizzo di ossigeno e si pensa siano vestigia di antichi organelli che svolgevano il metabolismo dell'ossigeno. I mitocondri li hanno resi obsoleti e si occupano ora solo delle funzioni che il mitocondrio non svolge.

11.4.1 I perossisomi usano ossigeno molecolare e perossido di idrogeno per svolgere reazioni di ossidazione

Contengono degli enzimi che usano ossigeno molecolare per rimuovere idrogeno da substrati specifici in una reazione di ossidazione che produce perossido di idrogeno: $RH_2 + O_2 \longrightarrow R + H_2O_2$. La catalasi usa il perossido generato per ossidare altri substrati: $H_2O_2 + RH_2 \longrightarrow R + 2H_2O$. Quando H_2O_2 si accumula in eccesso viene convertito in acqua: $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$. Una funzione principale della reazione di ossidazione è la rottura delle molecole di acidi grassi nella β ossidazione che accorcia le catene alchili sequenzialmente convertendolo in acetil CoA che viene esportato nel citosol per le reazioni biosintetiche. I perossisomi animali si occupano di catalizzare la prima reazione nella formazione di plasmalogeni, la più abbondante classe di fosfolipidi nella mielina. Sono altamente responsivi verso l'ambiente esterno e nelle piante si occupano della fotorespirazione.

11.4.2 Una corta sequenza di segnale direziona l'importazione di proteine nei perossisomi

La sequenza di amminoacidi Ser-Lys-Leu alla terminazione C di molte proteine perossisomali funziona come un segnale di import, mentre altre ne contengono una verso la terminazione N. Una di queste causa l'importazione nei perossisomi. Sono riconosciuti da recettori solubili nel citosol e le perossine partecipano nel processo di import guidato dall'idrolisi dell'ATP. Un complesso di 6 proteine forma un complesso alla membrana che permette il passaggio alle proteine piegate. Il poro si pensa sia dinamico nella dimensione. Il recettore Pex5 riconosce il segnale di importazione perossisomale C-terminale, accompagna il cargo fino nel perossisoma, lo rilascia e ritorna nel citosol. Dopo che il cargo viene rilasciato Pex5 subisce ubiquitilazione in modo da rilasciarlo nel citosol, dove l'ubiquitina è rimossa. Un ATPasi composta da Pex1 e Pex6 cattura l'energia dell'idrolisi per il rilascio di Pex5 dal perossisoma. Molte proteine di membrana perossisomale sono create nel citosol

e inserite nella membrana di perossisomi già esistenti, ma altre sono prima integrate nella membrana ER dove sono poi impacchettate in vescicole precursori dei perossisomi.

11.5 Il reticolo endoplasmatico

Tutte le cellule eucariotiche possiedono un reticolo endoplasmatico, la cui membrana costituisce metà della membrana totale della cellula. È organizzato come un labirinto simile a una rete di tubuli ramificati e sacche appiattite interconnessi che si estendono attraverso il citosol con la membrana continua con la membrana nucleare esterna. Le membrane di ER e quella nucleare formano un foglio continuo che racchiude il lume ER o lo spazio di cisterna ER. L'ER ha un ruolo centrale nella sintesi di lipidi e proteine, come conservatore di Ca^{2+} intracellulare come segnale ed è il sito di produzione di organelli come ER, apparato di Golgi, lisosomi, endosomi, vescicole secretorie e membrane plasmatiche. La sua membrana è il sito in cui i lipidi per le membrane mitocondriali e perossisomiche sono sintetizzate. Tutte le cellule che saranno secrete all'esterno, all'apparato di Golgi o ai lisosomi sono inizialmente trasportate nel lume ER.

11.5.1 L'ER è strutturalmente e funzionalmente diverso

Se tutte le funzioni dell'ER sono fondamentali al funzionamento della cellula la loro importanza relativa dipende dal tipo cellulare e diverse regioni dell'ER sono altamente specializzate come avviene per l'ER ruvido. Le cellule mammifere iniziano l'importazione delle proteine attraverso l'ER prima della completa sintesi della catena polipeptidica (è un processo co-traduzionale). L'importo di proteine nei mitocondri, cloroplasti, nuclei e perissosomi è post-traduzionale. Nel primo tipo di trasporto il ribosoma si trova attaccato alla membrana dell'ER permettendo a una terminazione della proteina di essere traslocata nell'ER. Questi ribosomi si trovano sulla regione dell'ER ruvido. Le regioni senza ribosomi sono dette ER liscio. Aree di ER liscio in cui proteine trasportano vescicole contenenti proteine verso l'apparato di Golgi sono dette ER transizionale. In alcuni tipi di cellule l'ER liscio è abbondante e ha altre funzioni: è prominente nelle cellule che si specializzano nel metabolismo lipidico o nell'epatocita del fegato dove è il sito di produzione delle particelle lipoproteiche. Gli enzimi che sintetizzano le componenti lipidiche delle particelle si trovano nella membrana dell'ER liscio insieme ad altri che catalizzano reazioni per detossificare droghe liposolubili e altri composti creati dal metabolismo. Un'altra funzione dell'ER è il sequestro di Ca^{2+} dal citosol. Il rilascio e la ripresa avviene in risposta a segnali extracellulari. Si nota come quando le cellule si rompono per omogenizzazione l'ER si rompe in frammenti che si richiudono in piccole vescicole dette microsomi facilmente purificabili e mantengono la propria funzione.

11.5.2 Sequenze di segnale sono state scoperte prima in proteine importate nell'ER ruvido

L'ER cattura selettivamente due tipi di proteine sintetizzate: transmembrana che si incorporano nella membrana dell'ER e membrane solubili in acqua rilasciate nel lume ER. Alcune proteine transmembrana hanno funzione nell'ER ma la maggior parte sono destinate alla membrana plasmatica o di un altro organello, mentre le solubili sono destinate a secrezione o residenza nel lume di un organello cellulare. Tutte le proteine sono direzionate alla membrana ER da una sequenza di segnale ER che inizia la traslocazione. Le sequenze segnale dopo il trasporto sono separate da una peptidasi di segnale nella membrana.

11.5.3 Una particella di riconoscimento del segnale (SRP) direziona la sequenza di segnale ER a un recettore specifico nella membrana dell'ER ruvido

La sequenza di segnale ER è guidata all'ER da una particella di riconoscimento del segnale (SRP) che cicla tra la membrana ER e il citosol e si lega alla sequenza di segnale e un recettore SRP nella membrana ER. L'SRP è un grande complesso di diverse catene polipeptidiche legate a una singola molecola di RNA. Le sequenze di segnale sono varie ma possiedono almeno otto o più amminoacidi non polari al centro. Il sito di legame nell'SRP consiste di una tasca idrofobica abbastanza plastica da accomodare sequenze idrofobiche di diversa forma e dimensione. L'SRP è una struttura a bastoncino che si avvolge intorno alla maggiore subunità ribosomiale con una fune che si lega alla sequenza di segnale appena emerge dal ribosoma. L'altra terminazione blocca il sito di legame per i fattori di allungamento all'interfaccia tra le subunità ribosomiali in modo da bloccare la sintesi che dà il tempo necessario al ribosoma per legarsi alla membrana ER prima del completamento di una catena polipeptidica assicurando che la proteina non sia rilasciata nel citosol. La pausa impedisce anche il piegamento della proteina rendendo inutili le proteine accompagnatrici. Al legame con la sequenza SRP espone un sito di legame per il recettore SRP, un complesso transmembrana nella membrana ER ruvida. Il legame dell'SRP con il recettore porta il complesso SRP ribosoma a un traslocatore proteico libero nella membrana. SRP e il recettore sono rilasciati e il traslocatore trasferisce la catena polipeptidica attraverso la membrana. Si creano in questo modo i ribosomi legati a membrana sull'ER ruvido dalla parte citosolica e ribosomi liberi nel citosol. Essendo che molti ribosomi possono legarsi a una singola molecola di mRNA si forma un poliribosoma. Se questo codifica una proteina con una sequenza di segnale ER il poliribosoma si attacca alla membrana ER. I ribosomi individuali associati possono ritornare al citosol dopo la traduzione, mentre l'mRNA rimane attaccato alla membrana da ribosomi diversi.

11.5.4 La catena polipeptidica passa attraverso un canale acquoso nel traslocatore

Il traslocatore forma un canale acquoso nella membrana attraverso cui passa la catena. Il nucleo del traslocatore, il complesso Sec61 è formato da tre subunità e suggerisce che α -eliche dalla subunità maggiore circondano un canale centrale, gated da una corta α -elica che lo tiene chiuso a riposo e si muove quando sta lavorando. Il canale si apre transientemente quando una catena lo attraversa. Il canale rimane chiuso per rendere la membrana impermeabile a ioni. Quando lo attraversa la catena un anello di amminoacidi idrofobici forma un isolamento flessibile. Il poro può aprirsi lungo una fessura sul lato che permette accesso laterale in un nucleo idrofobico della membrana in modo da rilasciare peptidi di segnale separati nella membrana e per integrare le proteine transmembrana nel bistrato. Questi insieme a enzimi che modificano la catena crescente come trasferasi oligosaccaridica e la peptidasi di segnale formano il translocon.

11.5.5 Traslocazione attraverso la membrana ER non richiede sempre un allungamento della catena polipeptidica in corso

Alcune proteine sono importate nell'ER post-traduzionalmente e questo processo il traslocatore ER necessita proteine accessorie che trasportano la catena nel poro e guidano la traslocazione. Nei batteri un motore di traslocazione proteico, la SecA ATPasi si attacca al lato citosilico del traslocatore dove svolge cambi conformazionali guidati dall'idrolisi dell'ATP. Ogni volta che avviene un'idrolizzazione una porzione della proteina SecA si inserisce nel poro spingendo un piccolo segmento della proteina

passaggera con esso. In questo modo la SecA ATPasi spinge progressivamente la catena polipeptidica attraverso la membrana. Le cellule eucariote usano un insieme diverso di proteine accessorie che si associano con il complesso Sec61 e attraversano la membrana ER depositando una proteina accompagnatrice simile a hsp70 i BiP nella catena polipeptidica mentre emerge dal poro nel lume. Cicli di legame e rilascio BiP dipendenti dall'ATP guidano la traslocazione unidirezionale. Le proteine che subiscono questa traslocazione sono prima rilasciate nel citosol dove si legano a proteine accompagnatrice per impedire il piegamento.

11.5.6 Nelle proteine transmembrana a singolo passaggio una singola sequenza di segnale ER interna rimane nel bistrato lipidico come una α -elica che attraversa la membrana

La sequenza di segnale ER nella catena polipeptidica crescente causa l'apertura dei pori nel traslocatore Sec61 e dopo che la sequenza di segnale è rilasciata dall'SRP e la catena ha raggiunto una lunghezza sufficiente, la sequenza di segnale si lega a un sito specifico nel poro aprendolo. La sequenza di segnale ER è pertanto riconosciuta dall'SRP nel citosol e da un sito di legame nel poro dove serve come segnale di inizio di trasferimento che apre il poro. Questo riconoscimento doppio assicura che solo le proteine appropriate entrano nel lume dell'ER. Mentre è legata al poro di traslocazione una sequenza di segnale è anche in contatto con il nucleo idrofobico del bistrato e quando la catena è abbastanza lunga il segnale viene separato e rilasciato dal poro nella membrana dove è degradato in amminoacidi da altre proteasi. Per rilasciarlo il traslocatore si apre lungo la fessura, un altro suo gate. Si nota pertanto come il traslocatore si apre per formare un poro attraverso la membrana per il passaggio di proteine idrofiliche e lateralmente nella membrana per lasciar passare porzioni della proteina idrofobiche nella membrana. Il passaggio laterale è fondamentale per le proteine transmembrana. Ci sono tre modi possibili in cui una proteina transmembrana a singolo passaggio si inserisce nella membrana ER. In un caso una sequenza di segnale N terminale inizia la traslocazione, ma un segmento idrofobico ferma il processo di trasferimento prima che l'intera catena sia traslocata. Questo segnale di terminazione di trasferimento ancora la proteina dopo che la sequenza di segnale ER è stata separata e rilasciata dal traslocatore. Il meccanismo di gating laterale trasferisce la sequenza di stop nel bistrato dove rimane come un α -elica che attraversa la membrana. Sequenze di inizio e terminazione interne possono legare l'apparato di traslocazione in due orientamenti che determina quale segmento è mosso attraverso la membrana nel lume ER. In un caso la proteina di membrana ha la terminazione C sul lato del lume, mentre nell'altro ha la terminazione N sul lato del lume. L'orientamento dipende dalla distribuzione di amminoacidi carichi vicini.

11.5.7 Combinazioni di segnali di inizio e terminazione del trasferimento determinano la topologia delle proteine di membrana multipassaggio

Nelle proteine multipassaggio transmembrana la catena polipeptidica passa avanti e indietro ripetutamente attraverso il bistrato lipidico come α -eliche idrofobiche. Una sequenza di segnale interna serve come segnali di inizio di trasferimento per iniziare la traslocazione che continua fino a che si incontra una sequenza di terminazione. Nelle proteine a multipassaggio una seconda sequenza di inizio di trasferimento causa un rilascio di polipeptidi nella membrana che si blocca alla successiva sequenza di stop e così via. Le sequenze di segnale determinano la topologia della proteina nella membrana bloccandosi nella membrana come α eliche e possono farlo in qualsiasi orientamento. Se una sequenza idrofobica è una sequenza di inizio o fine dipende dalla sua posizione nella catena in quanto la sua funzione può essere invertita cambiandola. La distinzione tra le sequenze di inizio e

fine risulta dall'ordine relativo nella catena. L'SRP inizia la scansione di una catena non piegata per segmenti idrofobici dalla terminazione N, riconoscendo il primo segmento appropriato che emerge dal cromosoma. L'SRP determina il reading frame per l'integrazione di membrana dopo l'inizio della traslocazione: il traslocatore riconosce il prossimo segmento appropriato come una sequenza di terminazione causando la regione tra i due di essere svolta attraverso la membrana. Il processo continua fino a che tutte le regioni idrofobiche nella proteina sono inserite nella membrana come α -eliche transmembrana. Tutte le copie della stessa catena hanno lo stesso orientamento nel bistrato. Questo genera asimmetria in cui i domini proteici esposti su un lato sono diversi rispetto agli altri e viene mantenuta durante gli eventi di fusione e avvicinamento nell'ER a altre membrane cellulari. Il modo in cui una proteina appena sintetizzata è inserita nella membrana ER determina l'orientamento delle proteine in tutte le altre membrane. L'asimmetria dipende unicamente dal processo di inserimento.

11.5.8 Proteine ancorate a ER con la coda sono integrate nella membrana ER con un meccanismo speciale

Molte proteine di membrana sono ancorate ad essa da una α -elica transmembrana idrofobica C terminale. Queste proteine ER ancorate dalla coda includono subunità di proteine che guidano il traffico vescicolare. Quando tale proteina si inserisce nella membrana ER dal citosol solo pochi amminoacidi seguenti all' α -elica sono traslocati nel lume ER mentre la maggior parte della proteina rimane nel citosol. La posizione unica dell' α -elica la traduzione termina mentre gli amminoacidi C terminali non sono ancora emersi dal ribosoma. Il riconoscimento da SRP non è possibile. Un macchinario specializzato è coinvolto e potenziato da idrolisi dell'ATP. Nonostante le componenti e i dettagli siano diversi opera in maniera analoga al meccanismo di individuazione dipendente da SRP. Non tutte le proteine ancorate alla coda sono inserite nell'ER: possono contenere nell'ancora un'ulteriore informazione di ordinamento che le dirige verso i mitocondri o i perossisomi.

11.5.9 Catene polipeptidiche traslocate si piegano e assemblano nel lume dell'ER ruvido

Molte proteine nell'ER sono in transito verso altre destinazioni ma risiedono lì in alte concentrazioni. Queste proteine ER residenti contengono segnali di ritenzione ER di quattro amminoacidi alla loro terminazione C responsabile del riteminimento delle proteine nell'ER. Alcune di queste funzionano come catalizzatori dell'ossidazione del gruppo sulfidrilico sulla cisteina per formare legami disolfuro che avvengono raramente nel citosol a causa dell'ambiente riduttore. Un'altra proteina residente nell'ER è l'accompagnatore BiP che oltre a importare proteine post-traduzionalmente nell'ER riconosce le proteine piegate incorrettamente e subunità che non sono state assemblate nei complessi oligomerici finali. Lo fa legandosi a sequenze amminoacidiche che normalmente sarebbero all'interno di proteine correttamente piegate. Un esempio di un sito di legame per BiP è una lunghezza di amminoacidi alternativamente idrofobici e idrofilici che normalmente sarebbero all'interno di un β -foglietto. Il BiP legato previene l'aggregazione della proteina e aiuta a mantenerla nell'ER. BiP idrolizza ATP per variare tra conformazioni ad alta e bassa affinità in modo da catturare e rilasciare proteine in un ciclo dinamico.

11.5.10 La maggior parte delle proteine sintetizzate nell'ER rugoso sono glicosilate dall'addizione di un oligosaccaride comune legato a N

L'addizione covalente di oligosaccaridi a proteine è una delle principali funzioni dell'ER. Durante la forma più comune di glicosilazione proteica nell'ER un oligosaccaride precursore è trasferito alle

proteine alla catena laterale NH_2 di un asparagina nelle proteine è collegato N. Il trasferimento è catalizzato da un complesso enzimatico legato alla membrana, un oligosaccaril-trasferasi con il sito attivo esposto al lato del lume ER della membrana. Un dolicolo ancora il precursore alla membrana ed è trasferito all'asparagina obiettivo in un singolo passaggio dopo che questo raggiunge il lume attraverso un legame pirofosfato ad alta energia che la fornisce per attivare la reazione di glicosilazione. Una copia di oligosaccaril-trasferasi è associata con ogni traslocatore di proteina permettendolo di scansionare e glicosare le catene polipeptidiche in arrivo efficientemente. L'oligosaccaride precursore è costruito da zuccheri sul lipide dolicolo e poi trasferito alla membrana. Gli zuccheri sono attivati nel citosol dalla formazione di intermediari nucleotidi-zucchero (UDP o GDP) che donano lo zucchero al lipide in maniera ordinata. Durante questo processo l'oligosaccaride è invertito dal lato citosilico a quello del lume. La diversità delle strutture degli oligosaccaridi collegati N dipende da modificazioni successive. Quando si trova nell'ER tre glucosi e un mannosio sono rimossi dagli oligosaccaridi della maggior parte delle glicoproteine.

11.5.11 Gli oligosaccaridi sono utilizzati come marcature per lo stato del piegamento della proteina

Lo studio di calnexina e calreticolina, proteine accompagnatrici nell'ER che richiedono Ca^{2+} per la loro attività ha permesso di determinare il ruolo della glicosilazione nel piegamento delle proteine. Queste accompagnatrici sono proteine che si legano a carboidrati o lectine che si legano a oligosaccaridi su proteine non piegate e le mantengono nell'ER. Prevengono l'aggregazione immediata di proteine piegate in maniera errata e promuovono l'associazione con altri accompagnatori che legano alla cisteina che non ha formato legami disolfidi. Calnexina e calreticolina riconoscono oligosaccaridi legati N che contengono un singolo glucosio terminale e legano proteine solo dopo che due dei tre glucosi nel polisaccaride precursore sono stati rimossi. Il riconoscimento delle proteine non piegate correttamente è dovuto a un altro enzima ER, una glucosil-trasferasi che continua ad aggiungere un glucosio agli oligosaccaridi che l'hanno appena perso e che sono attaccati a proteine non piegate.

11.5.12 Proteine piegate non correttamente sono esportate dall'ER e degradate nel citosol

Molte proteine traslocate nell'ER falliscono di raggiungere lo stato oligomerico o appropriamente piegato. Tali proteine sono esportate nel citosol dove sono degradate nei proteasomi. Il meccanismo di retrotraslocazione è simile a altri modi di traslocazione post-traduzionale: sono necessari proteine accompagnatrici per mantenere la catena in uno stato non piegato prima e durante la traslocazione, una fonte di energia per mantenere la direzionalità del trasporto e un traslocatore. La selezione delle proteine dall'ER per la degradazione avviene grazie agli oligosaccaridi legati N, che funzionano come timer per la presenza di una proteina nell'ER. La rimozione di un mannosio da una mannosidasi crea una nuova struttura riconosciuta dalle lectine ER-lumenali dell'apparato di retrotraslocazione. Le proteine che si piegano ed escono dall'ER più facilmente di quanto la mannosidasi può rimuovere il mannosio sfugge alla degradazione. Accompagnatori e proteine disulfide isomerasi si associano con la proteina che deve essere degradata in modo da impedire ulteriore aggregazione e la rottura dei legami disolfidi incorretti in modo che una catena lineare possa essere traslocata nel citosol. Complessi di traslocatori multipli muovono diverse proteine dalla membrana ER nel citosol. Contengono un enzima E3 ubiquitina ligasi che attacca un tag alle proteine non piegate mentre emergono dal citosol marcandole per la distruzione. Grazie all'idrolisi dell'ATP un ATPasi esomerica della famiglia delle AAA-ATPasi tira la proteina attraverso il traslocatore nel citosol e una N-glicanasasi rimuove il suo oligosaccaride.

11.5.13 Proteine malpiegate nell'ER attivano una risposta di proteine non piegate

Le cellule monitorano la quantità di proteine malpiegate nei compartimenti. Un accumulo di proteine malpiegate nell'ER causa una risposta di proteine non piegate che include un aumento della trascrizione di geni coinvolte nella retrotraslocazione e nella degradazione proteica nel citosol, accompagnatori ER e altre proteine che aumentano l'abilità di piegamento delle proteine dell'ER. Il segnale avviene per tre cammini paralleli. Nel primo le proteine malpiegate causano una proteina transmembrana chinasi nell'ER o IRE1 che causa una oligomerizzazione e fosforilazione dell'IRE1 che attivano un dominio di endoribonucleasi nella porzione citosolica della molecola che rompe una molecola di mRNA citosolico a due posizioni eliminando un introne. Gli esoni separati sono uniti da un'RNA ligasi generando mRNA spliced, che tradotto produce una proteina regolatoria della trascrizione attiva che attiva la trascrizione dei geni che codificano la proteina che aiuta a mediare la risposta necessaria. Le proteine malpiegate attivano una seconda chinasi transmembrana nell'ER, PERK, che inibisce un fattore di iniziazione della traduzione fosforilandolo e riducendo la sintesi di nuove proteine che riduce il flusso di proteine nell'ER e il carico di esse che devono essere piegate. Altre sono tradotte quando il fattore di iniziazione è scarso e una di queste è il regolatore di trascrizione che aiuta ad attivare la trascrizione di geni che codificano proteine coinvolte nella risposta. Un terzo regolatore di trascrizione ATF6 è inizialmente sintetizzato come una proteina transmembrana ER. In quanto è incorporato nella membrana non può attivare la trascrizione di geni nel nucleo. Quando proteine malpiegate si accumulano viene trasportato nell'apparato di Golgi dove incontra una proteasi che rompe il lato citosolico che migra nel nucleo dove aiuta ad attivare la trascrizione dei geni coinvolti nella risposta.

11.5.14 Alcune proteine di membrana acquisiscono un'ancora glicosilfosfatidilinositolo (GPI) covalentemente attaccata

Un processo catalizzato da enzimi dell'ER attacca covalentemente un'ancora glicosilfosfatidilinositolo (GPI) alla terminazione C di alcune proteine di membrana destinate per la membrana plasmatica. Questo legame si forma nel lume dell'ER dove i segmenti transmembrana della proteina è rimosso. Grandi numeri di proteine della membrana plasmatica sono modificate in questo modo. Siccome sono attaccate all'esterno della membrana solo dall'ancora GPI possono essere rilasciate dalla cellula in forma solubile in risposta a segnali che attivano una fosfolipasi specifica nella membrana plasmatica. Vengono anche utilizzati per direzionare proteina della membrana plasmatica in zattere lipidiche segregandole da altre proteine di membrana.

11.5.15 L'ER assembla la maggior parte dei bistrati lipidici

La membrana ER è il sito della sintesi di quasi tutti le classi di lipidi della cellula come i fosfolipidi e il colesterolo richiesti per la produzione di nuove membrane cellulari. Il fosfolipide maggiormente sintetizzato è il fosfatidilcolina, formato dalla colina, due acidi grassi e glicerol-fosfato. Ogni passaggio è catalizzato da enzimi nella membrana ER con siti attivi verso il citosol dove si trovano i metaboliti. La sintesi dei fosfolipidi avviene esclusivamente nel lato citosolico della membrana ER. Essendo gli acidi grassi non solubili in acqua sono trasportati dai siti di sintesi all'ER da proteine nel citosol. Dopo l'arrivo nella membrana e attivazione con CoA, l'acil-trasferasi aggiunge due acidi grassi al glicerol-fosfato producendo acidi fosfatidici, abbastanza insolubili in acqua da rimanere nel bistrato. Questo primo passo ingrandisce il bistrato dell'ER. I passi successivi determinano il gruppo di testa della molecola lipidica e la natura chimica del bistrato ma non causano un aumento della membrana.

Il fosfatidiletanolamina e il fosfatidilserina e altri fosfolipidi minori sono sintetizzati in questo modo. In quanto la sintesi dei fosfolipidi avviene nel lato citosolico un meccanismo deve trasferire alcuni fosfolipidi nel lato luminale e il movimento di “flip-flop” avviene mediato da un traslocatore detto scramblasi che equilibra i fosfolipidi non selettivamente tra i due lati della membrana. La membrana lplasmatica contiene diversi tipi di traslocatori fosfolipidici che appartengono alla famiglia delle pompe a P-tipo che riconoscono i fosfolipidi che contengono amminoacidi liberi nei gruppi di testa e li trasferiscono dal lato extracellulare al citosolico utilizzando l'idrolisi dell'ATP. L'ER produce anche colesterolo e ceramide, la seconda prodotta condensando la serina con un acido grasso formando l'amminoalcol sfingosina, un secondo amminoacido è successivamente aggiunto formando ceramide, che è poi esportata all'apparato di Golgi dove serve come precursore per la sintesi di glicosfingolipidi e sfingomielina. I mitocondri e i plastidi non fanno parte del sistema di membrane formato da tutte le altre membrane presenti e devono importare lipidi dall'ER direttamente o indirettamente. Questo avviene grazie a proteine trasportatrici solubili in acqua. Inoltre la membrana esterna dei mitocondri si trova in prossimità di quella dell'ER.

Capitolo 12

Traffico di membrana intracellulare

Le cellule per nutrirsi, comunicare e rispondere a cambi nell'ambiente aggiustano la composizione della loro membrana plasmatica e compartimenti interni in risposta alle loro necessità. Usano un sistema di membrane interne per aggiungere e rimuovere proteine di superficie come recettori, canali ionici e trasportatori. Attraverso esocitosi i cammini secretori portano nuovi proteine, carboidrati e lipidi sintetizzati alla membrana plasmatica o allo spazio extracellulare. Attraverso endocitosi rimuovono componenti della membrana plasmatica e li portano verso endosomi dove posano essere riportati a regioni della membrana plasmatica o verso i lisosomi per la degradazione. L'esocitosi viene utilizzata per catturare nutrienti. Il lume di ogni compartimento lungo i cammini secretori o endocitici è equivalente al lume di altri compartimenti o all'esterno cellulare. I contenitori di trasporto sono formati dal compartimento donatore e da vescicole sferiche piccole o altre larghe e irregolari o tubuli, riferite come vescicole di trasporto. In una cellula eucariotica le vescicole di trasporto si separano da una membrana per unirsi a un'altra trasportando componenti di membrana e molecole lumenali dette cargo. Il traffico vescicolare fluisce lungo cammini organizzati che permettono secrezione, nutrimento e rimodellamento della membrana plasmatica e degli organelli. Il cammino secretorio porta fuori dal reticolo endoplasmatico verso l'apparato di Golgi e la superficie cellulare, mentre il cammino endocitico porta all'interno dalla membrana plasmatica. In ogni caso cammini di riporto equilibrano i flussi delle membrane nelle direzioni opposte riportando indietro certe molecole. Per far questo sono necessarie vescicole di trasporto selettive.

12.1 I meccanismi molecolari di trasporto di membrana e il mantenimento della diversità compartimentale

Il trasporto attraverso vescicole media uno scambio continuo di componenti tra i più di 10 compartimenti chimicamente distinti che comprendono i cammini secretori ed endocitici. Ogni compartimento è capace di mantenere la propria identità grazie alla composizione della membrana: marcatori sul lato citosilico servono come guida per il traffico in arrivo e una loro combinazione dà ad ogni compartimento il suo indirizzo molecolare. Le operazioni di separazione e trasferimento di parti specifiche delle membrane permettono di mantenere alte o basse concentrazioni di marcatori su un compartimento.

12.1.1 Ci sono vari tipi di vescicole incapsulate

La maggior parte delle vescicole si forma da regioni di membrana specializzate. Si separano come vescicole incapsulate, con una specifica gabbia proteica che copre la superficie citosolica. Prima che le vescicole si fondano con una membrana questa gabbia viene eliminata. La capsula ha una struttura a due strati che riflette le due funzioni: uno strato interno concentra proteine di membrana in superfici specializzate che danno origine alla membrana vescicolare in modo da selezionare le molecole di membrana appropriate per il trasporto. Lo strato esterno si assembla in un lattice curvo che deforma la superficie di membrana e dà forma alla vescicola. Ci sono tre tipi di vescicole incapsulate: incapsulata da clatrina, da COPI e da COPII. Ogni tipo è utilizzata per diversi passi del trasporto. Le vescicole incapsulate da clatrina mediano il trasporto dall'apparato di Golgi e dalla membrana plasmatica, mentre quelle incapsulate da COPI e da COPII il trasporto dall'ER e dalle cisterne di Golgi.

12.1.2 L'assemblaggio di una capsula di clatrina guida la formazione della vescicola

Le vescicole incapsulate da clatrina trasportano materiale dalla membrana plasmatica e tra compartimenti endosomiali e di Golgi. Quelle incapsulate da COPI e COPII trasportano materiale presto nei cammini secretori: la prima si separa dai compartimenti di Golgi, mentre la seconda dall'ER. Il maggior componente proteico delle vescicole incapsulate da clatrina è la clatrina che forma lo strato esterno. Ogni subunità clatrinica consiste di tre grandi e tre piccole catene polipeptidiche che formano una struttura a tre gambe detta triskelion che a sua volta si assembla in una struttura di esagoni e pentagoni simile a un cesto che forma pozzi incapsulati sulla superficie citosolica della membrana. Sotto appropriate condizioni i triskelioni isolati si assemblano in gabbie poliedriche e determinano la geometria della gabbia clatrinica.

12.1.3 Proteine adattatrici selezionano il cargo nelle vescicole incapsulate a clatrina

Le proteine adattatrici sono un altro componente della capsula formano uno strato interno della capsula tra la gabbia clatrinica e la membrana. Legano la gabbia alla membrana e intrappolano varie proteine transmembrana come recettori che capturan le molecole di cargo all'interno della vescicola e permettono la selezione di un insieme di proteine transmembrana e delle proteine che interagiscono con loro e le impacchettano all'interno della nuova vescicola di trasporto. Ci sono diversi tipi di proteine adattatrici, quelle meglio caratterizzate possiedono quattro subunità proteiche, altre proteine a singola catena. Ogni tipo è specifico a un insieme di recettori di cargo. L'assemblaggio di proteine adattatrici è strettamente controllato dalla loro interazione con altre componenti della capsula. AP2 quando si lega a un lipide fosfatidilinositolo fosforilato altera la sua conformazione esponendo siti di legame per recettori di cargo nella membrana. Il legame simultaneo ai recettori di cargo e al gruppo di testa lipidico aumenta il legame di AP2 alla membrana. La proteina agisce come un individuatore di coincidenze che si assembla solo al tempo e spazio giusto. Quando si legano inducono curvatura di membrana che rende causa un circuito a feedback positivo amplificato dal legame della clatrina che porta alla formazione e separazione della vescicola.

12.1.4 I fosfolipidi marcano gli organelli e i domini di membrana

I fosfolipidi inositoli hanno un'importante funzione regolatoria in quanto possono svolgere rapidi cicli di fosforilazione e defosforilazione alle posizioni 3', 4' e 5' dei gruppi di testa inositolo e produrre vari

tipi di fosfoinositidi (PIP). L'interconversione di fosfatidilinositolo e PIP è diversa tra i compartimenti e la distribuzione, regolazione e equilibrio determina lo stato di distribuzione di ogni specie di PIP che varia tra gli organelli e spesso tra regioni continue di membrana. Molte proteine coinvolte nel trasporto vescicolare contengono domini che si legano ai gruppi di testa di particolari PIP. Il controllo locale di PI, PIP chinasi e PIP fosfatasi può essere usato per controllare il legame di proteine a una membrana. La produzione di un PIP recluta proteine contenenti domini leganti a PIP corrispondenti che aiutano a regolare la formazione di vescicole e altri passi nel loro traffico.

12.1.5 Proteine piegatrici della membrana aiutano a deformare la membrana durante la formazione delle vescicole

La forza generata dall'assemblaggio della clatrina non è sufficiente per dare forza e separare la vescicola dalla membrana: altre proteine partecipano a ogni passo del processo: proteine piegatrici della membrana che contengono domini a mezzaluna o domini BAT legano e impongono la loro forma alla membrana sottostante attraverso interazioni elettrostatiche e aiutano AP2 a nucleare endocitosi dando una forma alla membrana plasmatica in modo che la vescicola si formi. Contengono eliche anfipatiche che inducono una curvatura di membrana dopo essere state inserite nel lato citoplasmatico della membrana.

12.1.6 Proteine citoplasmatiche regolano la separazione e decapsulamento delle vescicole

Mentre la bolla incapsulata da clatrina cresce la dinamina si assembla al collo di ogni bolla. Dinamina contiene un dominio che si lega a $PI(4,5)P_2$ che unisce la proteina alla membrana e un dominio GTPasi che regola il tasso di separazione delle vescicole dalla membrana. Il processo di separazione unisce i due lati non citosilici della membrana in prossimità e li fonde isolando la vescicola che si sta formando. La dinamina recluta altre proteine al collo della bolla che aiutano a riparare la membrana distorto o cambiando la sua composizione lipidica o entrambe le cose. Una volta rilasciata la vescicola perde la capsula di clatrina: una fosfatasi PIP co-impacchettata nelle vescicole esaurisce $PI(4,5)P_2$ dalla membrana che indebolisce il legame delle proteine adattatrici. Oltre a questo una proteina hsp70 accompagnatrice che funziona come un'ATPasi decapsulatrice, usando l'idrolisi dell'ATP. Il rilascio non deve avvenire prematuramente e si rendono necessari controlli ausiliari in modo che non venga rimossa prima che abbia formato una vescicola completa.

12.1.7 GTPasi monomeriche controlla l'assemblaggio della capsula

Per equilibrare il traffico da e per un compartimento le proteine di capsula si devono assemblare solo quando necessario. Se la produzione locale di PIPs ha un ruolo centrale nella regolazione dell'assemblaggio delle capsule di clatrina sulla membrana plasmatica e sugli apparati di Golgi la cellula superimpone modi addizionali di regolare la formazione della capsula. GTPasi di reclutamento della capsula controllano l'assemblaggio di capsule di clatrina sugli endosomi e le capsule CPOI e COPII sulle membrane ER e di Golgi. Molti passaggi del trasporto vescicolare dipendono da una varietà di proteine che si legano a GTP regolano la maggior parte dei processi nelle cellule eucariotiche. Agiscono come interruttori molecolari tra due stati con quello attivo con GTP legato e inattivo con GDP legato. Il cambio di stato è regolato da fattori di scambio del nucleotide guanina (GEF) che attivano la proteina catalizzando lo scambio di GDP per GTP e le proteine attivatrici GTPasi disattivano la proteina causando l'idrolisi del GTP in GDP. Le GTPasi di reclutamento della capsula sono membri

di una famiglia di GTPasi monomeriche come le proteine ARF, responsabili per l'assemblaggio di COPII e della capsula clatrina alle membrane di Golgi e la proteina Sar1, responsabile per l'assemblaggio delle capsule COPII alla membrana ER. Si trovano ad alte concentrazioni nel citosol in stato inattivo. Quando una vescicola incapsulata in COPII deve separarsi dalla membrana ER una Sar1-GEF lega al Sar1 citosolico causando il suo cambio di GDP in GTP. In questo stato Sar1 espone un'elica anfipatica che si inserisce nel lato citoplasmatico del bistrato della membrana ER. Sar1 ora strettamente legata recluta subunità di proteine adattatrici alla membrana ER per iniziare la separazione. Le GTPasi di reclutamento della capsula hanno anche un ruolo nel disassemblaggio della capsula: l'idrolisi di GTP causa un cambio conformazionale che causa un'uscita della sua coda idrofobica dalla membrana causando un disassemblaggio della capsula. COPII accelera l'idrolisi del GTP in Sar1 e una vescicola completamente formata viene prodotta solo quando la formazione del sistema di separazione avviene più velocemente rispetto al processo di disassemblaggio temporizzato. Una volta che la vescicola si separa l'idrolisi del GTP rilascia Sar1 ma la capsula isolata è abbastanza stabilizzata da interazioni cooperative in modo che sia presente fino a che la vescicola arrivi alla membrana obiettivo dove una chinasi fosforila la capsula proteica che la disassembla e prepara la vescicola per la fusione. Le vescicole incapsulate da clatrina e da COPI perdono la capsula poco dopo che si separano. Per le seconde la curvatura della membrana della vescicola causa l'inizio del decapsulamento. Un ARF-GAP viene reclutato alla COPI mentre si assembla e interagisce con la membrana percependo la densità di impacchettamento dei lipidi. Si attiva quando la curvatura raggiunge quella di una vescicola di trasporto e disattiva ARF, causando il disassemblaggio della capsula.

12.1.8 Non tutte le vescicole di trasporto sono sferiche

Ogni membrana risponde diversamente alla creazione di vescicole: nella membrana plasmatica, piatta e rigida a causa del colesterolo, l'azione coordinata di capsule di clatrina e di proteine che piegano la membrana deve produrre forza sufficiente per l'introduzione di curvatura, specialmente al collo. Per le membrane intracellulari avviene invece in regioni già curve dove la funzione primaria della capsula è catturare il cargo appropriato. Le vescicole di trasporto sono create in varie forme e dimensioni. Molte vescicole COPII sono richieste per il trasporto di grande molecole di cargo come il collagene che non entra nelle normali vescicole: la molecola di cargo si lega a proteine di impacchettamento nell'ER che guidano l'assemblaggio di vescicole COPII molto più grandi che permettono l'entrata di un cargo molto più grande. Negli endosomi e nella rete di Golgi trans si trovano lunghi tubuli che reclutano cargo e si separano con un grande rapporto superficie/volume e sono ricchi di proteine di membrana.

12.1.9 Le proteine Rab guidano le vescicole di trasporto alle loro membrane obiettivo

Le vescicole di trasporto sono estremamente selettive verso la membrana obiettivo, caratteristica assicurata in quanto tutte presentano marcatori superficiali che le identificano secondo la loro origine e il loro cargo e le membrane obiettivo presentano recettori complementari che li riconoscono. Prima di tutto proteine Rab e effettori Rab portano la vescicola a posti specifici sulla membrana obiettivo e proteine e regolatori SNARE mediano la fusione del bistrato lipidico. Le proteine Rab causano la specificità del trasporto vescicolare e sono GTPasi monomeriche e ognuna di essa è associata con uno o più organelli racchiusi da membrana dei cammini endocitici o secretori che ne possiede almeno una sulla sua superficie. L'alta selettiva distribuzione su queste membrane le rende ideali come marcatori per identificare i tipi di membrana e guidare il traffico di vescicole tra di loro. Possono funzionare

sulle vescicole di trasporto, sulle membrane obiettivo o entrambi. Ciclano tra la membrana e il citosol e regolano l'assemblaggio reversibile di complessi proteici sulla membrana. Nello stato legato a GDP sono inattive e legate ad altre proteine come i Rab-GDP dissociation inhibitor (GDI) che le mantiene solubili nel citosol. Nello stato legato a TP sono attive e associate strettamente con la membrana di un organello o un vescicola di trasporto. Rab-GEF legate a membrana attivano le proteine Rab sulle vescicole e sulle membrane obiettivo e per alcune fusioni sono richieste entrambe. Nello stato legato a GTP e legate a membrana attraverso un ancora si legano ad altre proteine o Rab effettori che sono i mediatori a valle del trasporto vescicolare, filamento di proteine e fusione di membrane. Il tasso dell'idrolisi del GTP determina la concentrazione di Rab attive e degli effettori sulla membrana. Le strutture degli effettori sono varie e le stesse proteine possono legarsi a diversi effettori. Alcuni effettori sono proteine motrici, altre leganti che possono collegare due membrane. Il complesso che fa attraccare vescicole COPII contiene una chinasi che fosforila la capsula per completare il processo di decapsulamento. L'accoppiamento del decapsulamento con la consegna delle vescicole aiuta ad assicurare la direzionalità e la fusione con la propria membrana. Gli effettori Rab possono anche interagire con SNARE per accoppiare il filamento della membrana alla fusione. L'assemblaggio delle proteine Rab e i loro effettori è il risultato di aree di membrana: Rab5 concentra il processo di legame che catturano vescicole in arrivo. Il suo assemblaggio comincia quando un complesso Rab5-GDP/GDI incontra un Rab-GEF: GDI è rilasciato e viene convertito in Rab5-GTP. Rab5-GTP attivo si ancora alla membrana e recluta più Rab-GEF all'endosoma. Attiva inoltre una PI 3-chinasi che converte PI in PI(3)P che lega alcuni effettori Rab come proteine di legame stabilizzando il loro legame con la membrana.

12.1.10 Cascade di Rab possono cambiare l'identità di un organello

Un dominio Rab può essere sostituito cambiando l'identità di un organello: tale reclutamento di proteine Rab sequenziale è detto cascata di Rab: i domini Rab5 sono sostituiti da domini Rab7 sulle membrane endosomiche, trasformandolo da endosoma giovane a vecchio alterandone le dinamiche di membrana e la sua posizione (maturazione endosomica), in un processo irreversibile e unidirezionale.

12.1.11 Le SNARE mediano la fusione di membrana

Una volta che una vescicola di trasporto è stata legata alla membrana obiettivo scarica il cargo attraverso fusione di membrana in cui i bistrati si avvicinano fino a che possono unirsi. Quando le membrane si trovano a $1.5nm$ i lipidi possono fluire tra un bistrato all'altro e l'acqua deve essere spostata dalla superficie idrofila grazie a proteine di fusione che superano la barriera energetica necessaria. Le proteine SNARE catalizzano le reazioni di fusione di membrana, sono specifiche all'organello, sono proteine transmembrana che esistono come insiemi complementari: v-SNARE sulle vescicole e t-SNARE su quelle obiettivo. v-SNARE sono singole catene polipeptidiche, mentre t-SNARE sono composte da tre proteine. Hanno entrambe domini elicali e quando interagiscono (con alta specificità) si arrotolano tra di loro formando un insieme di quattro eliche molto stabile. Il complesso trans-SNARE risultante blocca insieme le due membrane e catalizza la fusione utilizzando l'energia liberata dall'interazione e arrotolamento delle eliche per portare le membrane insieme facendo contemporaneamente uscire l'acqua. Nella catalizzazione cooperano anche effettori Rab. Le proteine Rab possono regolare la disponibilità di t-SNARES che sono associate con proteine inibitorie che devono essere prima rilasciate grazie a un segnale di una proteina Rab e del suo effettore.

12.1.12 SNARE interagenti devono essere separati prima che possano funzionare ancora

I complessi trans-SNARE devono disassemblarsi prima di mediare nuovi round di trasporto. NSF cicla tra membrane e il citosol e catalizza il processo di disassemblaggio. È una ATPasi esamERICA della famiglia delle AAA-ATPasi che usano l'idrolisi per svolgere le interazioni tra i domini elicali delle proteine SNARE accoppiate. La richiesta di questo catalizzatore aiuta ad impedire una fusione indiscriminata delle membrane.

12.2 Trasporto dall'ER attraverso l'apparato di Golgi

Le proteine sintetizzate attraversano la membrana ER dal citosol per entrare nel cammino secretorio. Durante il trasporto seguente dall'ER attraverso l'apparato di Golgi fino alla superficie cellulare le proteine sono modificate mentre passano attraverso una serie di compartimenti: il trasferimento da uno all'altro coinvolge un equilibrio tra cammini di trasporto in avanti e all'indietro. Alcune vescicole di trasporto selezionano il cargo e lo muovono nel prossimo compartimento, mentre altre recuperano proteine sfuggite e le riportano a un compartimento precedente. L'apparato di Golgi è il sito principale della sintesi di carboidrati e una stazione di ordinamento per i prodotti dell'ER. Una grande percentuale di carboidrati sono attaccati come oligosaccaridi a molte proteine e lipidi inviati dall'ER in modo da marcarli verso vescicole per i lisosomi, mentre la maggior parte sono riconosciute in altri modi per trasportarle verso altre destinazioni.

12.2.1 Le proteine lasciano l'ER in vescicole di trasporto incapsulate in COPII

Per iniziare il viaggio lungo il cammino secretorio le proteine che entrano la membrana ER e sono destinate per l'apparato di Golgi o dopo di esso sono incapsulate in vescicole di trasporto incapsulate da COPII che si separano dal sito di uscita ER la cui membrana manca ribosomi e sono distribuite su tutta la superficie. L'entrata nelle vescicole può essere uno processo selettivo o Può accadere di default. Molte proteine di membrana sono reclutate attivamente nella vescicola dove si concentrano e mostrano segnali di uscita sul lato citosilico che la proteina adattatrice interna alla COPII riconosce. Alcune di questi componenti agiscono come recettrici di cargo e sono riciclate nell'ER dopo il trasporto. Proteine di cargo solubili nel lume ER hanno segnali di uscita che le attaccano a recettori di cargo transmembrana. Nella vescicola possono anche entrare proteine senza il segnale di uscita come le proteine ER residenti alcune delle quali sfuggono lentamente dall'ER e sono trasportate all'apparato di Golgi. Proteine di cargo diverse entrano nelle vescicole a tassi diversi a causa di diverse piegature, efficienze di oligomerizzazione e cinetica. Il passo di uscita è il punto di controllo sulle proteine che la cella secerne. Il segnale di uscita che porta fuori le proteine solubili dall'ER non sono compresi: alcuni recettori del cargo sono lectine che legano gli oligosaccaridi sulla mannosio della proteina secreta.

12.2.2 Solo proteine appropriatamente piegate e assemblate possono lasciare l'ER

Per uscire dall'ER le proteine devono essere piegate e se sono proteine di complessi multi-proteici devono essere completamente assemblati. Quelle che non lo sono rimangono nell'ER dove sono legate da proteine accompagnatrici come BiP o calnexina che possono coprire i segnali di uscita o ancorarle nell'ER. Tali proteine sono trasportate nel citosol dove sono degradate da proteosomi in modo da

prevenire ulteriore trasporto in avanti di proteine errate che possono interferire nel comportamento di quelle corrette. In molti casi la cellula crea delle proteine in gran eccesso in modo che alcune possano piegarsi, assemblarsi e funzionare in maniera corretta.

12.2.3 Raggruppamenti vescicolari tubulari mediano il trasporto dall'ER all'apparato di Golgi

Dopo che le vescicole di trasporto si sono separate dal sito di uscita ER e hanno perso la loro capsula cominciano a fondersi tra di loro attraverso fusione omotipica che richiede un insieme di SNARE complementari. In questo caso l'interazione è simmetrica con entrambe contribuenti v-SNARE e t-SNARE. La struttura che si forma è detta di raggruppamenti vescicolari tubulari a causa delle loro apparenza. Questi raggruppamenti costituiscono un compartimento separato dall'ER e a cui mancano molte delle proteine che vi si trovano. Sono continuamente generati e funzionano come contenitori di trasporto che portano materiale dall'ER all'apparato di Golgi. I raggruppamenti si muovono velocemente lungo microtubuli verso l'apparato di Golgi con cui si fondono. Appena si formano cominciano a separare da loro vescicole di trasporto incapsulate da COPI uniche in quanto i componenti che creano gli strati della capsula sono reclutati come un unico elemento (coatomero). Funzionano come cammini di recupero trasportando proteine residenti nell'ER che sono sfuggite come recettori del cargo e SNARE che partecipano nella separazione e fusione delle vescicole. L'assemblaggio COPI inizia secondi dopo la separazione della capsula COPII e non si sa come venga controllato. Il trasporto inverso continua mentre i raggruppamenti si muovono verso l'apparato di Golgi. I raggruppamenti maturano continuamente cambiando la propria composizione mentre le proteine selezionate sono ritornate all'ER, cosa che continua dall'apparato di Golgi.

12.2.4 Il cammino di recupero all'ER usa segnali di ordinamento

Il cammino per far ritornare proteine nell'ER dipende da segnali di recupero ER: le proteine residenti nell'ER contengono segnali che si legano direttamente alle capsule COPI e sono impacchettate in vescicole di trasporto incapsulate da COPI per la consegna inversa all'ER. Il segnale meglio caratterizzato consiste di due lisine e qualsiasi altra coppia di amminoacidi alla terminazione C della proteina di membrana ER o una sequenza KKXX. Inoltre proteine solubili come BiP contengono un corto segnale di recupero alla terminazione C con una sequenza Lys-Asp-Glu-Leu o simile. Questa sequenza KDEL causa il ritorno efficiente della proteina nell'ER dove è accumulata. Le proteine residenti nell'ER solubili devono legarsi a recettori come il recettore KDEL, una proteina transmembrana a multipassaggio che si lega alla sequenza e la impacchetta nelle vescicole per il trasporto inverso. Tale recettore cicla tra l'ER e l'apparato di Golgi con diverse affinità per la sequenza: più alta nei raggruppamenti di vescicole tubulari e nell'apparato di Golgi e più bassa nell'ER. Il cambio di affinità è dovuto al minor pH nell'apparato di Golgi regolato da pompe H^+ . Nel cammino inverso entrano anche le proteine che funzionano da interfaccia tra l'ER e l'apparato di Golgi.

12.2.5 Molte proteine sono selettivamente trattenute nei compartimenti dove funzionano

Sembra esista un meccanismo indipendente dal segnale KDEL che trattiene le proteine residenti nell'ER. Un meccanismo ipotizzato è che le proteine residenti si leghino tra di loro formando complessi troppo grandi per entrare nelle vescicole.

12.2.6 L'apparato di Golgi consiste di una serie ordinata di compartimenti

L'apparato di Golgi consiste di cisterne racchiuse da membrana appiattite organizzate in stack da 4 a 6 elementi. Nelle cellule animali connessioni tubulari tra cisterne corrispondenti collegano gli stack formando un complesso singolo vicino a nucleo e al centrosoma, localizzazione che dipende dai microtubuli. Durante il passaggio attraverso l'apparato di Golgi le molecole subiscono una serie di modifiche covalenti: ogni stack possiede una faccia di entrata (cis) e una di uscita (trans), entrambe sono associate con compartimenti composti di una rete di strutture microtubulari e cisternali: la rete cis Golgi (CGN) e la rete trans Golgi (TGN). La prima è una collezione di raggruppamenti tubulari vescicolari fusi che arrivano dall'ER. Proteine e lipidi entrano dalla rete cis Golgi ed escono dalla rete trans Golgi verso un altro compartimento o la superficie cellulare. Entrambe le reti ordinano le proteine: quelle che entrano nel CGN possono andare avanti o essere ritornate nell'ER e quelle uscenti dal TGN si muovono in avanti e sono ordinate rispetto alla loro direzione: endosomi, vescicole secrete, la superficie cellulare o un compartimento precedente. Alcune proteine di membrana sono trattenute nella parte dell'apparato dove funzionano. Si nota come un oligosaccaride legato a N è legato a molte proteine nell'ER e rifilato mentre vi risiede. Gli oligosaccaridi intermedi aiutano il piegamento delle proteine e il trasporto di quelle mal piegate al citosol per la degradazione. Una volta che le proteine escono l'oligosaccaride viene utilizzato dall'apparato di Golgi per generare strutture oligosaccaride eterogenee viste nelle proteine mature. Dopo l'arrivo nel CGN le proteine entrano nella cisterna cis Golgi per un primo processamento. Sono poi mosse alla cisterna mediale e infine alla cisterna trans dove viene completata la glicosilazione. Il lume della cisterna trans è continuo con il TGN. Il processamento degli oligosaccaridi avviene per passi in una sequenza ordinata nello stack, con ogni cisterna contenente un insieme caratteristico di enzimi. Le proteine sono modificate in stati successivi mentre passano attraverso lo stack in modo che formi un'unità di processamento a multi stato.

12.2.7 Le catene oligosaccaridi sono processate nell'apparato di Golgi

Le proteine residenti nell'apparato di Golgi sono tutte legate dalla membrana: tutte le glicosidasi e glicosil-trasferasi sono proteine transmembrana a singolo passaggio, molte organizzate in complessi multienzima. Due vaste classi di oligosaccaridi legati a N, gli oligosaccaridi complessi e gli oligosaccaridi a mannosio alto sono attaccati alle glicoproteine mammifere. I primi sono generati quando nell'ER l'oligosaccaride originale è rifilato e altri zuccheri sono aggiunti e contiene una carica negativa, mentre i secondi sono rifilati ma senza addizioni di zuccheri. Il passaggio da oligosaccaride ad alto mannosio a complesso dipende dalla sua posizione sulla proteina: se l'oligosaccaride è accessibile agli enzimi nell'apparato di Golgi viene convertito nella forma complessa, altrimenti no.

12.2.8 I proteoglicani sono assemblati nell'apparato di Golgi

Molte proteine sono ulteriormente modificate mentre passano attraverso l'apparato di Golgi: ad alcune vengono aggiunti zuccheri ai gruppi idrossili di serine o treonine, o come nel collagene a proline o lisine idrossilate. Questa glicosilazione legata a O è catalizzata da una serie di glicosil-trasferasi che usano zuccheri nucleotidi nel lume dell'apparato per aggiungerli uno alla volta. Tipicamente è aggiunta prima N⁻acetilgalattosamina, seguita da un numero di zuccheri addizionali. La glicosilazione legata a O più pesante avviene sulle mucine e sulle proteine del nucleo proteoglicano che modifica per produrre proteoglicani attraverso la polimerizzazione di catene di glicosamminoglicano su serine di una proteina nucleo. Molti di questi sono secreti e diventano parte della matrice extracellulare, mentre altri rimangono ancorati alla superficie extracellulare della membrana plasmatica. Gli zuccheri aggiunti sono solfati dopo la creazione dei polimeri dando loro una forte carica negativa.

12.2.9 Il ruolo della glicosilazione

I carboidrati complessi richiedono più enzimi diversi ad ogni passo, ognuno riconosciuto unicamente come il substrato esclusivo per il passo successivo. La glicosilazione legata a N è prevalente in tutti gli eucarioti e promuovono il piegamento delle proteine rendendo gli intermedi più solubili prevenendo ulteriori aggregazioni e le modificazioni sequenziali creano un codice che marca la progressione del piegamento e media il legame di proteine ad accompagnatori e lectine. In quanto le catene di zuccheri hanno una flessibilità limitata possono limitare l'avvicinarsi di altre macromolecole alla superficie proteica rendendole più resistenti alla digestione attraverso enzimi proteolitici. Le catene di zuccheri servono anche come protezione di patogeni nella forma di coperture di muco nelle cellule di polmoni e intestinali. Il riconoscimento di catene cellulari da parte della lectina nello spazio extracellulare serve nel processo di sviluppo e nel riconoscimento tra cellule. La presenza di oligosaccaridi può modificare la funzione e proprietà antigenica di una proteina. Può avere anche ruoli regolatori.

12.2.10 Il trasporto attraverso l'apparato di Golgi potrebbe accadere attraverso maturazione cisternale

È ancora incerto come l'apparato di Golgi mantenga la sua struttura polarizzata e come le molecole si muovano tra una cisterna e l'altra. Un'ipotesi del modello di maturazione cisternale vede le cisterne come strutture dinamiche che maturano ottenendo e perdendo specifiche proteine residenti del Golgi. Le nuove cis cisterne si formano continuamente come raggruppamenti vescicolari tubulari che arrivano dall'ER e maturano per diventare cisterne mediali e poi trans. Una cisterna si muove attraverso lo stack con il cargo nel suo lume. Il trasporto inverso attraverso separazione di vescicole inasolate da COPI spiega la distribuzione caratteristica. Secondo il modello di trasporto di vescicole il flusso di vescicole retrograde recupera le proteine e le ritorna nel compartimento a monte. Il flusso direzionale è ottenuto attraverso l'impacchettamento di molecole di cargo che si muovono in avanti in vescicole specifiche. Le due vescicole diverse sono riconosciute attraverso proteine adattatrici diverse. Probabilmente aspetti di entrambi i modelli sono veri.

12.2.11 La matrice di proteine del Golgi aiuta ad organizzare lo stack

L'architettura dell'apparato di Golgi dipende dal citoscheletro di microtubuli e dalle proteine citoplasmatiche della matrice di Golgi che formano un'impalcatura tra cisterne adiacenti e danno l'integrità strutturale allo stack. Alcune di queste dette golgine formano lunghi filamenti composti di domini rigidi a bobina tra regioni cariche intersperse, insieme formano un insieme di tentacoli che aiutano a mantenere vicino al Golgi vescicole di trasporto attraverso interazioni con proteine Rab. Quando la cellula si prepara a dividersi proteine chinasi mitotiche fosforilano tali proteine causando la frammentazione dell'apparato e la sua dispersione nel citosol. I frammenti sono poi distribuiti nelle cellule figlie in ugual misura dove sono defosforilate permettendo il riassetto dello stack.

12.3 Il trasporto dalla rete trans Golgi ai lisosomi

La rete trans Golgi ordina tutte le proteine che passano attraverso l'apparato secondo la destinazione attraverso un processo selettivo come avviene per quelle destinate al lume dei lisosomi.

12.3.1 I lisosomi sono il sito principale della digestione intracellulare

I lisosomi sono organelli chiusi da membrana riempiti da enzimi idrolitici che digeriscono macromolecole, contengono proteasi, nucleasi, glicosidasi, lipasi, fosfolipasi, fosfopatasi e sulfatasi. Sono tutte idrolasi acide (lavorano a pH acidi). Per attività ottima devono essere attivati attraverso rottura proteolitica che richiede anche un ambiente acido. Il lisosoma mantiene un pH di 4.5 – 5.0. I contenuti del citosol sono protetti attraverso attacchi dal sistema digestivo: la membrana del lisosoma mantiene gli enzimi digestivi fuori dal citosol ma, anche in caso di uscita possono fare pochi danni al pH citosolico (7.2 pH). Anche la membrana è caratteristica, la maggior parte delle proteine sono altamente glicosilate in modo da proteggerle dalle proteasi nel lume. Le proteine di trasporto portano fuori dal lisosoma i prodotti finali della digestione delle macromolecole (amminoacidi, zuccheri e nucleotidi) al citosol dove vengono utilizzati dalla cellula o secreti. Un H^+ ATPasi vacuolare nella membrana del lisosoma usa l'energia dell'idrolisi dell'ATP per pompare H^+ nel lisosoma mantenendo il lume al pH acido. Tali pompe appartengono alle ATPasi v-tipo e lavorano solo pompando H^+ nell'organello. Pompe simili acidificano tutti gli organelli endocitici o esocitici. Oltre a creare l'ambiente acido il gradiente di H^+ fornisce una fonte di energia per guidare il trasporto dei piccoli metaboliti attraverso la membrana.

12.3.2 I lisosomi sono eterogenei

I lisosomi hanno una morfologia eterogenea che riflette le varie funzioni digestive che le idrolasi acide mediano e il modo in cui si formano. Gli endosomi maturi contenenti materiale ricevuto dalla membrana plasmatica e nuove idrolasi lisosomiali si fondono con lisosomi preesistenti per formare endolisosomi che si fondono poi tra di loro. Quando il materiale endocitato è stato digerito dall'endolisosoma questo ritorna un lisosoma classico, organelli piccoli, densi e sferici che possono ricominciare il ciclo di fusione con gli endosomi. Per questa ragione sono visti come un insieme eterogeneo di organelli distinti con la caratteristica comune di avere un alto contenuto di enzimi idrolitici.

12.3.3 I vacuoli delle piante e dei funghi sono lisosomi versatili

La maggior parte delle cellule delle piante e dei funghi contengono grandi vescicole riempite da liquido dette vacuoli, imparentati con i lisosomi animali e contenenti un gran numero di enzimi idrolitici, pur avendo funzione diversa. Il vacuolo della pianta può agire come un organello di conservazione per nutrienti e prodotti di scarto, un compartimento degradatorio, un modo per aumentare la dimensione della cellula e come controllore della pressione di turgore. È un importante dispositivo omeostatico che rende la pianta capace di sopportare cambi dell'ambiente.

12.3.4 Multipli cammini portano materiali ai lisosomi

I lisosomi sono punti in cui vari flussi di traffico intracellulare converge. La maggior parte degli enzimi digestivi arrivano dall'apparato di Golgi, mentre almeno quattro cammini portano sostanze per la digestione. Il più studiato è il cammino di degradazione delle macromolecole catturate dal fluido extracellulare attraverso endocitosi. Si trova un cammino simile nelle cellule fagocitiche è dedicato alla cattura o fagocitosi di grandi particelle e microorganismi per formare fagosomi. Un terzo cammino detto macropinocitosi si specializza nel recupero non specifico di fluidi, membrane e particelle attaccate alla membrana plasmatica. Un quarto cammino detto autofagia viene utilizzato per digerire il citosol e gli organelli consumati.

12.3.5 L'autofagia degrada proteine ed organelli non voluti

Tutti i tipi cellulari si liberano di parti obsolete grazie ad un processo dipendente dai lisosomi: l'autofagia. È importante per la ristrutturazione delle cellule differenzianti e in risposte adattive ad eventi esterni. Può rimuovere grandi oggetti come organelli. Nel passo iniziale dell'autofagia il cargo citoplasmatico viene circondato da una doppia membrana che si assembla per fusione di piccole vescicole detta autofasogioma. Il processo avviene in 5 passi:

1. Induzione da attivazione di molecole di segnale: chinasi proteiche (complesso mTOR 1) che inoltrano informazioni riguardo lo stato metabolico della cellula, si attivano e segnalano al macchinario autofago.
2. Nucleazione ed estensione di una membrana delimitante in una forma a coppa, le vescicole di membrana, caratterizzate da ATG9 sono reclutate a un sito di assemblaggio dove nucleano la formazione dell'autofasogioma. ATG9 viene rimossa da un cammino di recupero.
3. Chiusura della coppa di membrana intorno all'obiettivo per formare un autofasogioma isolato da una doppia membrana.
4. Fusione con lisosomi catalizzata da SNARE.
5. Digestione della membrana interna e dei contenuti del lume dell'autofasogioma.

L'autofagia può essere selettiva o no. In quella non selettiva una porzione del citoplasma viene sequestrata da autofasogiomi. Può accadere in condizioni di mancanza di nutrienti. In quella selettiva viene isolato un cargo specifico che tende a contenere poco citosol, con una forma che riflette quella del cargo, media la degradazione di mitocondri, perossisomi, ribosomi e ER non voluti o consumati (anche per microbi invadenti).

12.3.6 Un recettore mannosio 6-fosfato ordina le idrolasi lisosomiali nella rete trans Golgi

Si considera ora il cammino che porta le idrolasi lisosomiali dal TGN ai lisosomi. Gli enzimi sono prima portati a endosomi in vescicole di trasporto selettive che si separano dal TGN. Il riconoscimento di tali idrolasi avviene grazie a un marcatore nella forma di gruppi di mannosio 6-fosfato, aggiunti esclusivamente a oligosaccaridi legati a N di questi enzimi mentre passano attraverso il lume della rete cis Golgi. Proteine recettrici M6P riconoscono tali gruppi e legano al lato lumenale della membrana e a proteine adattrici in capsule di clatrina che si stanno costruendo sul lato citosolico. I recettori impacchettano le idrolasi in vescicole incapsulate da clatrina che si separano dal TGN e portano i loro contenuti a giovani endosomi. La proteina recettrice di M6P si lega a esso a pH di 6.5–6.7 nel TGN e si rilascia a pH 6, presente nel lume degli endosomi. Dopo che il recettore arriva in esso le idrolasi lisosomiali si dissociano da esso e il recettore viene ritrasportato indietro da vescicole che si separano dagli endosomi incapsulate da un retromero. Il trasporto in entrambe le direzioni richiede segnali nella coda citosolica del recettore M6P che direziona la proteina verso l'endosoma o il TGN: sono riconosciuti da un complesso retromero che recluta i recettori in vescicole di trasporto che si separano dall'endosoma. Il riciclo assomiglia a quello del recettore KDEL. Alcune molecole di idrolasi marcate raggiungono il lisosoma: alcune sfuggono al processo di impacchettamento nella rete trans Golgi e vengono portate nel fluido extracellulare. Alcuni recettori M6P possono arrivare alla membrana plasmatica dove ricatturano le idrolasi lisosomiali e le ritornano attraverso endocitosi mediata da recettore ai lisosomi attraverso endosomi giovani o maturi. Affinchè funzionino i gruppi M6P devono essere aggiunti solo alle glicoproteine appropriate nell'apparato di Golgi, che richiede

12.4. IL TRASPORTO NELLA CELLULA DALLA MEMBRANA PLASMATICA: ENDOCITOSI

un riconoscimento specifico dell'idrolasi dagli enzimi che aggiungono M6P. Tale segnale deve essere presente nella catena polipeptidica di ogni idrolasi come raggruppamento di amminoacidi vicini sulla superficie della proteina.

12.3.7 Alcuni lisosomi e corpi multivescicolari subiscono esocitosi

La secrezione lisosomiale di contenuto non digerito permette alla cellula di eliminare detriti non digeribili. Alcune cellule contengono lisosomi specializzati con il macchinario necessario per la fusione con la membrana plasmatica come i melanociti nella pelle. In alcune circostanze questo può accadere anche a corpi multivescicolari che rilasciano le vescicole dalle cellule. Si osservano questi esosomi nel sangue e si pensa che trasportino componenti tra le cellule.

12.4 Il trasporto nella cellula dalla membrana plasmatica: endocitosi

Il percorso che porta all'interno dalla superficie cellulare inizia attraverso endocitosi, in cui la cellula recupera componenti della membrana plasmatica, fluidi, soluti, macromolecole e sostanze particolari. Il cargo degli endociti comprende complessi di recettori, nutrienti e loro trasportatori, componenti della matrice extracellulare, detriti cellulari, batteri, virus e in alcuni casi altre cellule. Attraverso l'endocitosi si regola la composizione della membrana plasmatica in risposta al cambiamento delle condizioni extracellulari. Il materiale che deve essere ingerito viene progressivamente chiuso da una piccola porzione della membrana plasmatica che si invagina e si separa formando una vescicola endocitica attraverso pinocitosi oltre a cammini dedicati per catturare larghe particelle su richiesta attraverso fagocitosi. Una volta generate le vescicole endocitiche si fondono in un endosoma giovane dove il cargo internalizzato è ordinato. Il materiale ritorna alla membrana plasmatica direttamente o attraverso un endosoma di riciclo o designato per la degradazione includendolo in un endosoma maturo. Questi ultimi formano una porzione vacuolare attraverso maturazione endosomica. Il processo di conversione cambia la composizione delle proteine della membrana endosomica, aree della membrana si invaginano formando vescicole intralumenali mentre l'endosoma si sposta verso il nucleo. Mentre matura l'endosoma smette di riciclare materiale e lo destina tutto alla degradazione. Ogni passaggio della maturazione è connesso attraverso cammini di trasporto vescicolare al TGN, cammini che permettono l'inserimento di materiale appena sintetizzato e il recupero di componenti.

12.4.1 Vescicole pinocitiche si formano da pozzi incapsulati nella membrana plasmatica

Tutte le cellule eucariotiche ingeriscono continuamente porzioni della loro membrana plasmatica per formare piccole vescicole pinocitiche. Il tasso di pinocitosi varia in base al tipo cellulare ma è sempre alto. La stessa quantità di membrana rimossa viene aggiunta attraverso esocitosi, in legame con l'endocitosi nel ciclo di endocitosi-esocitosi. Tale accoppiamento è particolarmente rigido in strutture caratterizzate da un alto turnover di membrana. La parte endocitica del ciclo inizia a pozzi incapsulati da clatrina con vita corta: si invaginano velocemente formando una vescicola incapsulata da clatrina. Tali vescicole sono ancora più transienti rispetto ai pozzi: si fondono con gli endosomi giovani.

12.4.2 Non tutte le vescicole pinocitiche sono incapsulate da clatrina

Oltre a tali vescicole si formano altre vescicole pinocitiche come le caveole sono presenti nella membrana plasmatica della maggior parte dei tipi cellulari e si formano da fessure lipidiche nella membrana plasmatica ricche di colesterolo, glicosfingolipidi e proteine GPI ancorate alla membrana. Le maggiori proteine strutturali nelle caveole sono le caveoline, proteine integrali di membrana che inseriscono un anello idrofobico nella membrana dal lato citosilico senza estendersi attraverso essa. Le caveoline sono legate al lato citosilico a grossi complessi di proteine che si pensa stabilizzano la curvatura di membrana. Le caveole sono tipicamente strutture statiche, ma possono essere indotte a separarsi e servire come vescicole endocitiche per trasportare cargo agli endosomi giovani o alla membrana plasmatica sul lato opposto di una cellula polarizzata (transitosi). La macropinosi è un altro meccanismo indipendente dalla clatrina che può essere attivato in tutte le cellule animali. Viene indotto per un tempo limitato in risposta ad attivazione di recettori sulla superficie cellulare in risposta a cargo specifici come fattori di crescita che attivano una serie di segnali che cambiano le dinamiche dell'actina e formano protrusioni sulla superficie cellulare che quando collassano nella cellula formano grandi vescicole piene di liquido dette macropinosomi che aumentano il recupero di fluido della cellula. Sono dedicate a un cammino degradativo: si acidificano e uniscono con endosomi maturi o endolisosomi senza riciclare il loro cargo alla membrana plasmatica.

12.4.3 Le cellule usano endocitosi mediata da recettori per importare macromolecole selezionate extracellulari

Nella maggior parte delle cellule animali i pozzi incapsulati da clatrina e le vescicole forniscono un cammino efficiente per il recupero di macromolecole: l'endocitosi mediata da macromolecole, in cui queste ultime si legano a proteine recettrici transmembrana complementari che si accumulano nei pozzi di clatrina e dopo entrano nella cellula come complessi recettore-macromolecola in vescicole incapsulate da clatrina. Essendo i ligandi catturati selettivamente mette a disposizione un meccanismo di concentrazione che aumenta l'efficienza di internalizzazione di ligandi particolari. Molte cellule animali recuperano colesterolo in questo modo. Se il recupero è bloccato il colesterolo si accumula nel sangue e può formare pareti di placche arteriosclerotiche. La maggior parte del colesterolo è trasportato nel sangue come colesteril estere nella forma di particelle di lipide-proteina dette lipoproteine a bassa densità. Quando una cellula necessita di colesterolo per la sintesi crea recettori transmembrana per LDL e le inserisce nella membrana plasmatica dove si diffondono fino a che si associano con pozzi a clatrina che si stanno formando dove un segnale di endocitosi nella coda citoplasmatica dei recettori LDL si lega con la proteina adattatrice AP2 dopo che la sua conformazione è stata sbloccata localmente da legame con PI(4, 5) P_2 sulla membrana plasmatica. Le vescicole formatesi da questi pozzi, dopo aver perso la propria capsula portano il loro contenuto agli endosomi giovani. LDL è rilasciato dal recettore e portato ai lisosomi dove il colesteril estere è idrolizzato in colesterolo libero e reso disponibile per la sintesi di nuove membrane. In eccesso di colesterolo la cellula blocca la sintesi interna di colesterolo e di recettori LDL. Tutti i recettori conosciuti usano strade di internalizzazione dipendenti da clatrine e sono guidati da segnali nella coda citoplasmatica che si lega alla proteina adattatrice nella capsula clatrinica. Molti di questi recettori come LDL entrano nel pozzo anche se non hanno legato un ligando. I pozzi servono come filtri molecolari, collezionando certe proteine recettrici rispetto ad altre.

12.4.4 Proteine specifiche sono recuperate dagli endosomi giovani e ritornate alla membrana plasmatica

Gli endosomi giovani sono i punti principali per l'ordinamento nei cammini endocitici: nel loro ambiente leggermente acido molte proteine recettrici cambiano la loro conformazione e rilasciano il ligando marcandolo per distruzione nel lisosoma con altri contenuti solubili dell'endosoma. Altri ligandi rimangono legati ai loro recettori e condividono il loro destino. Nell'endosoma giovane il recettore LDL si dissocia con il ligando ed è riciclato alla membrana plasmatica. Il recettore trasferina segue un cammino simile al recettore LDL ma ricicla anche il proprio ligando. La trasferina è una proteina solubile che trasporta il ferro nel sangue. I recettori superficiali di trasferina la portano con il ferro legato a un endosoma giovane attraverso endocitosi mediata dal recettore. Il pH basso nell'endosoma causa il rilascio del ferro, ma la trasferina stessa rimane legata al recettore e il complesso entra nell'estensione tubulare dell'endosoma giovane dove è riciclata alla membrana plasmatica, dove si dissocia dal recettore e ritorna libera di recuperare altro ferro e iniziare il ciclo.

12.4.5 I recettori segnalanti nella membrana plasmatica sono regolati da degradazione nei lisosomi

Un secondo cammino che i recettori endocitati possono seguire è seguito da molti recettori come quelli che legano i fattori di crescita epidermici (EGF), una piccola proteina di segnale che stimola la divisione di molti tipi di cellule. Tali recettori si legano in pozzi solo dopo che si sono legati al ligando e la maggior parte sono degradati nel lisosoma insieme all'EGF che pertanto attiva il cammino di segnale e poi porta a una diminuzione nella concentrazione di recettori EGF sulla superficie cellulare o sottoregolazione di recettore che riduce la seguente sensibilità a EGF. Tale meccanismo è altamente regolato: i recettori attivati sono prima modificati covalentemente sulla faccia citosilica con ubiquitina che aggiunge una o poche singole molecole di ubiquitina alla proteina nella monoubiquitilazione o multiubiquitilazione. Tal iproteine riconoscono l'ubiquitina e aiutano a direzionarla nei pozzi. Dopo la consegna altre proteine che si legano a ubiquitina parte dei complessi ESCRT (complesso di ordinamento di endosomi richiesto per il trasporto) che riconoscono e ordinano i recettori ubiquitilati in vescicole intralumenali che sono ritenute negli endosomi maturi. In questo modo l'addizione di ubiquitina blocca il riciclo di recettori.

12.4.6 Gli endosomi giovani maturano in endosomi maturi

La nascita degli endosomi giovani è causata da vescicole endocitiche che si fondono tra di loro, sono relativamente piccoli e si trovano nel citoplasma sotto la membrana plasmatica dove si muovono lungo microtubuli catturando vescicole in arrivo. Gli endosomi giovani hanno domini tubulari e vacuolari: la maggior parte della superficie è nei tubuli e la maggior parte del volume è nei vacuoli. Durante la maturazione endosomica le porzioni vacuolari sono trasformate negli endosomi maturi mentre la porzione tubulare si restringe. Gli endosomi in maturazione o corpi multivescicolari migrano lungo i microtubuli verso l'interno della cellula perdendo tubuli e vescicole che riciclano materiale verso la membrana plasmatica e TGN e ricevono nuove proteine sintetizzate. Mentre si concentrano alla regione perinucleare si fondono tra di loro e con endolisosomi e lisosomi. Durante il processo di maturazione avvengono molte variazioni: l'endosoma si sposta e cambia forma, le proteine Rab, lipidi fosfoinositidi, macchinari di fusione e microtubuli cambiano la superficie citosilica dell'endosoma cambiandone la funzione. Una ATPasi v-tipo pompa H^+ dal citosol nel lume e acidifica l'organello che rende le idrolasi lisosomiche più attive e influenza le interazioni tra recettore e ligandi,

vescicole intralumenali sequestrano recettori di segnale endocitati nell'endosoma bloccando l'attività di segnalazione, le proteine del lisosoma sono portate dal TGN all'endosoma in maturazione.

12.4.7 Complessi proteici ESCRT mediano la formazione di vescicole intralumenali nei corpi multivescicolari

Mentre un endosoma matura aree della sua membrana si invaginano nel lume e si separano formando vescicole intralumenali, per questo motivo gli endosomi in maturazione vengono anche chiamati corpi multivescicolari. Questi ultimi trasportano proteine di membrana endocitate che devono essere degradate che vengono selettivamente partizionate in membrane che si stanno creando in modo da sequestrare recettori e proteine di segnale fortemente legate al citosol dove potrebbero continuare la segnalazione. Sono totalmente accessibili agli enzimi digestivi che le degradano. I corpi multivescicolari includono contenuto solubile dell'endosoma giovane destinato alla digestione. L'ordinamento nelle vescicole intralumenali richiede marcature di ubiquitina, aggiunte ai domini citosilici delle proteine di membrana che aiutano inizialmente a guidare le proteine in vescicole incapsulate da clatrina nella membrana plasmatica. Una volta portate alla membrana endosomiale sono ancora riconosciute da una serie di complessi di proteine ESCRT citosiliche (ESCRT-0, -II e -III) che legano sequenzialmente e mediano il processo di ordinamento nelle vescicole intralumenali. Le invaginazioni dipendono anche su una chinasi lipidica che fosforila fofatidilinositolo per produrre PI(3)P che serve come un sito di attracco per i complessi ESCRT. ESCRT-III forma grandi assemblaggi multimerici sulla membrana che la piegano.

12.4.8 Endosomi riciclatori regolano la composizione della membrana plasmatica

La maggior parte dei recettori sono riciclati e ritornati allo stesso dominio della membrana plasmatica da cui sono arrivati, alcuni procedono a un dominio diverso attraverso transitosi, mentre altri ancora sono degradati nei lisosomi. I recettori sulla superficie delle cellule epiteliali polarizzate possono trasferire macromolecole specifiche da uno spazio extracellulare all'altro attraverso transitosi. Il cammino transcitico non è diretto: i recettori si muovono prima dall'endosoma giovane all'endosoma riciclatore. Da questo si evince che oltre ai siti di legame per i ligandi e per i pozzi molti recettori possiedono segnali di ordinamento che li guidano nel cammino di trasporto appropriato. Le cellule possono regolare il rilascio di proteine di membrana dagli endosomi riciclatori modificando il flusso di proteine attraverso i percorsi transcitotici in modo da controllare la concentrazione di specifiche membrane plasmatiche in risposta a segnali.

12.4.9 Cellule fagocitiche specializzate possono ingerire grandi particelle

La fagocitosi è una forma speciale di endocitosi in cui una cellula usa grandi vescicole endocitiche dette fagosomi per ingerire grandi particelle come microorganismi e cellule morte. Nei protozoi è una forma di nutrimento: le particelle finiscono in lisosomi e i prodotti della digestione passano nel citosol. Poche cellule sono capaci di ingerire grandi particelle efficientemente: nello stomaco degli animali processi extracellulari rompono le particelle di cibo e le cellule importano i piccoli prodotti dell'idrolisi. La fagocitosi è importante per la maggior parte degli animali per altri motivi e avviene grazie a i fagociti specializzati come due classi di cellule del sangue bianco : i macrofagi e i neutrofili che si sviluppano da cellule staminali emopoietiche che ingeriscono microorganismi invasivi per proteggere contro infezioni. I macrofagi inoltre cercano cellule morte per apoptosi. Il diametro di un fagosoma è determinato dalla dimensione della particella ingerita, che possono anche essere

grandi quasi come le cellule ingerenti. Si fondono poi con i lisosomi dove il materiale ingerito è degradato. Le sostanze indigeste rimangono nei lisosomi formando corpi residui che vengono secreti attraverso esocitosi. La fagocitosi è un processo causato dal cargo: richiede l'attivazione di recettori che trasmettono segnali all'interno della cellula e le particelle per essere fagocitate devono prima legarsi alla superficie del fagocita che possiedono vari recettori uniti funzionalmente al macchinario fagocitico. Gli attuatori meglio caratterizzati sono gli anticorpi che iniziano una serie di eventi che culminano con la fagocitazione dell'organismo invadente. Inizialmente il patogeno viene incapsulato con molecole di anticorpi che legano a recettori Fc sulla superficie di macrofagi e neutrofilii attivando i recettori per indurre l'estensione pseudopoda della cellula che racchiude la particella e fonde alle estremità per formare un fagosoma. La polimerizzazione di actina locale iniziata dalla famiglia di GTPasi Rho e le Rho-GEF attivanti dà forma allo pseudopoda. La Rho GTPasi attivata attiva l'attività chinasi di PI chinasi locali per produrre $PI(4, 5)P_2$ nella membrana che stimolano la polimerizzazione di actina. Per isolare il fagosoma e completare l'ingestione l'actina è depolimerizzata da una chinasi PI 3 che converte $PI(4, 5)P_2$ in $PI(3, 4, 5)P_3$ richiesto per la chiusura del fagosoma e per la riformazione della rete di actina in modo da guidare l'invaginazione del fagosoma formante. Altre classi di recettori riconoscono componenti complementari altre riconoscono oligosaccaridi sulla superficie di certi patogeni altri riconoscono cellule morte per apoptosi che perdono la distribuzione asimmetrica di fosfolipidi nella membrana plasmatica causando un'esposizione di cariche negative. I macrofagi non fagocitano le cellule viventi in quanto sono presenti segnali affinché questo non avvenga nella forma di proteine sulla superficie della cellula dei macrofagi. I recettori inibitori reclutano tirosina fosfatasi che antagonizza gli eventi di segnalazione intracellulare richiesti per l'inizio della fagocitosi inibendo localmente tale processo. La fagocitosi dipende pertanto da un equilibrio tra segnali positivi che attivano il processo e segnali negativi che lo inibiscono.

12.5 Il trasporto dalla rete trans Golgi all'esterno cellulare: esocitosi

Le vescicole di trasporto normalmente destinate per la membrana plasmatica lasciano il TGN in un flusso costante come tubuli irregolari. Le proteine di membrana e i lipidi forniscono nuove componenti per la membrana plasmatica, mentre le proteine solubili all'interno sono secrete nello spazio extracellulare. La fusione delle vescicole con la membrana plasmatica è detto esocitosi. Tutte le cellule richiedono questo cammino secretorio costitutivo che opera continuamente, mentre cellule specializzate ne possiedono un altro in cui proteine solubili e altre sostanze sono prima conservate in vescicole secretorie per rilascio successivo nel cammino secretorio regolato.

12.5.1 Molte proteine e lipidi sono trasportate automaticamente alla rete trans Golgi alla superficie extracellulare

Una cellula capace di secrezione deve separare almeno tre classi di proteine prima che lascino il TGN: quelle destinate per i lisosomi, quelle per le vescicole secretorie e quelle che vanno portate immediatamente alla superficie cellulare. Le proteine secretorie sono trasportate in vescicole secretorie attraverso segnali. Il cammino di secrezione costitutivo non è selettivo e trasporta la maggior parte delle altre molecole direttamente alla superficie cellulare e in quanto non richiede segnale è detto il cammino di default. In una cellula non polarizzata ogni proteina nel lume dell'apparato di Golgi viene automaticamente trasportata verso la superficie se non è specificato altrimenti, mentre nelle cellule polarizzate ci sono opzioni più complesse.

12.5.2 Le vescicole secretorie si separano dalla rete trans Golgi

Le cellule specializzate per la secrezione di alcuni prodotti rapidamente su richiesta li concentrano in vescicole secretorie o granuli secretori a nucleo denso che si formano dal TGN e rilasciano il loro contenuto all'esterno in risposta a segnali specifici. Il secreto può essere una piccola molecola o una proteina. Le proteine secretrici sono impacchettate in un meccanismo che coinvolge aggregazione specifica di esse. I segnali che le direzionano non sono ben definiti. Le vescicole secretorie hanno proteine uniche nelle loro membrane, alcune delle quali potrebbero servire come recettori per aggregazioni nel TGN. Il recupero degli aggregati nelle vescicole secretorie assomiglia al processo di fagocitosi a causa della loro dimensione. Inizialmente le vescicole che lasciano il TGN circondano debolmente l'aggregato e queste vescicole secretorie immature assomigliano morfologicamente a cisterne trans Golgi dilatate che hanno lasciato lo stack. Mentre le vescicole maturano si fondono tra di loro e concentrano i loro contenuti come risultato del continuo riciclo di membrana al TGN e della continua acidificazione del lume della vescicola (aumento di ATPasi v tipo). Le proteine di membrana e secretorie si concentrano mentre si muovono dall'ER attraverso l'apparato di Golgi a causa di un esteso processo di recupero mediato da vescicole di trasporto incapsulate da COPI che trasportano proteine residenti nell'ER indietro escludendo le proteine secretorie e di membrana. Il riciclo di membrana è importante per ritornare al Golgi i suoi componenti e per concentrare i contenuti delle vescicole secretorie. A causa della grande densità di contenuti le vescicole secretorie possono espellere grandi quantità di materiale prontamente.

12.5.3 I precursori di proteine secretorie sono processate proteoliticamente durante la formazione di vescicole secretorie

Molte proteine secrete sono sintetizzate come precursori inattivi e la proteolisi è necessaria per liberare le molecole attive da questi precursori. La rottura avviene nelle vescicole secretorie e a volte dopo la secrezione. Oltre a quello molti precursori possiedono un propeptide N terminale rotto per creare la proteina matura e sono sintetizzate come pre-pro-proteine con il prepeptide consistente di un segnale ER che viene rotto nell'ER rugoso. In altri casi le molecole di segnale sono create come poliproteine con molte coppie di una sequenza di amminoacidi, inoltre una varietà di peptidi di segnale sono sintetizzati come parte di una singola poliproteina che agisce come un precursore di diversi prodotti finali che sono rotti singolarmente dalla catena iniziale. Questi metodi oltre a permettere il trasporto della proteina garantiscono un ritardo nella sua attivazione fino a che questa è richiesta.

12.5.4 Vescicole secretorie aspettano vicino la membrana plasmatica fino a che vengono segnalate di rilasciare i loro contenuti

Una volta cariche le vescicole secretorie devono raggiungere il sito della secrezione e per farlo proteine motrici le muovono lungo microtubuli il cui orientamento guida la vescicola nella direzione corretta. Le vescicole qui aspettano un segnale per secernere e successivamente si fondono.

12.5.5 Per esocitosi rapida le vescicole sinaptiche sono preparate alla membrana plasmatica presinaptica

Le cellule nervose possiedono due tipi di vescicole secretorie che impacchettano proteine e neuropeptidi in vescicole secretorie nel modo standard e una classe di piccole vescicole secretorie dette vescicole sinaptiche che conservano neurotrasmettitori che mediano la segnalazione tra cellule nervose e i loro

12.5. IL TRASPORTO DALLA RETE TRANS GOLFI ALL'ESTERNO CELLULARE: ESOCITOSI

obiettivi: l'arrivo di un potenziale d'azione causa un influxo di Ca^{2+} che causa la fusione della vescicola sinaptica con la membrana plasmatica e rilasciare il suo contenuto nello spazio extracellulare. La velocità del rilascio indica che la fusione è un processo veloce e quando le vescicole attraccano alla membrana plasmatica subiscono un passo di preparazione che le prepara per una fusione rapida: le SNARE sono accoppiate parzialmente attraverso complessine che bloccano i complessi SNARE nello stato metastabile. La rottura della complessina è rilasciata dalla sinaptotagmina con domini leganti a Ca^{2+} . A una sinapsi tipica solo un piccolo numero di vescicole attraccate sono preparate per l'esocitosi in modo da permettere più round di segnali.

12.5.6 Vescicole sinaptiche si possono formare direttamente da vescicole endocitiche

Affinchè il terminale nervoso risponda rapidamente e ripetutamente le vescicole sinaptiche devono essere ripristinate velocemente dopo che si scaricano. Per questo la maggior parte delle vescicole sinaptiche sono generate da riciclo locale dalla membrana plasmatica nel terminale nervoso e similmente nuove componenti della vescicola sinaptica sono inizialmente portate alla membrana plasmatica da cammini di secrezione ; che si scaricano. Per questo la maggior parte delle vescicole sinaptiche sono generate da riciclo locale dalla membrana plasmatica nel terminale nervoso e similmente nuove componenti della vescicola sinaptica sono inizialmente portate alla membrana plasmatica da cammini di secrezione costitutiva e recuperati attraverso endocitosi. I componenti della membrana di una vescicola sinaptica includono trasportatori specializzati per il recupero di neurotrasmettitori dal citosol dove sono sintetizzati. Una volta riempita la vescicola può essere riutilizzata.

12.5.7 I componenti della membrana di una vescicola secretoria sono velocemente rimossi dalla membrana plasmatica

Quando una vescicola secretoria si fonde con la membrana plasmatica i suoi contenuti sono scaricati attraverso esocitosi e la membrana diventa parte della membrana plasmatica, aumentandone la superficie transientemente in quanto le componenti sono successivamente rimosse dalla superficie attraverso endocitosi. Dopo la loro rimozione sono riciclate o trasportate in lisosomi per la degradazione. Il controllo del traffico di membrana ha un ruolo centrale nel mantenere la composizione delle varie membrane della cellula.

12.5.8 Alcuni eventi di esocitosi regolata servono per ingrandire la membrana plasmatica

Un compito dell'esocitosi regolata è di portare più membrana per aumentare la superficie della membrana plasmatica di una cellula quando necessario. Un esempio è il processo di cellularizzazione in cui una singola cellula contenenti diversi nuclei si separa in cellule distinte con un nucleo ognuna attraverso aggiunta di membrana ottenuta dalla fusione di vescicole citoplasmatiche. Molte cellule animali soggette a stress meccanico subiscono piccole rotture nella loro membrana plasmatica in un processo che coinvolge fusione tra vescicole omotipiche ed esocitosi viene aggiunta rapidamente una pezza che oltre a isolare la cellula riduce la tensione di membrana sull'area ferita. Questo processo è causato da un improvviso aumento di Ca^{2+} .

12.5.9 Cellule polarizzate direzionano le proteine dalla rete trans Golgi al dominio appropriato della membrana plasmatica

La maggior parte delle cellule nei tessuti sono polarizzate con domini nella membrana plasmatica distinti. Deve pertanto esistere un meccanismo per la consegna di membrana dal Golgi in modo da mantenere le differenze tra i domini. Una tipica cellula epiteliale contiene un dominio apicale verso il mondo esterno e un dominio basolaterale che copre il resto della cellula separati da giunzioni che impediscono la diffusione dei lipidi nei due domini. In principio le componenti potrebbero essere consegnate indistintamente e rimosse se necessario, ma in molti casi la consegna avviene specificatamente al dominio appropriato. Sono presenti pertanto segnali nelle proteine e nei lipidi di membrana che direzionano le vescicole nel dominio appropriato.

Capitolo 13

Conversione energetica: mitocondri e cloroplasti

NON NEL CORSO

Capitolo 14

Segnalazione cellulare

Ogni cellula monitora l'ambiente extra e intracellulare, processa le informazioni che raccoglie e risponde appropriatamente. Al cuore di questo sistema ci sono proteine regolatorie che producono segnali chimici inviati da un posto all'altro nei corpi o nella cellula, processati lungo la via e integrati con altri.

14.1 Principi di segnalazione cellulare

Molti organismi unicellulari primordiali avevano sviluppato meccanismi per rispondere alla presenza di altre cellule. Molti batteri rispondono a segnali chimici secreti dai loro vicini e si accumulano ad alte densità di popolazione e attraverso questo quorum sensing permette ai batteri di coordinare i propri comportamenti. Durante l'evoluzione degli organismi multicellulari la comunicazione intercellulare è diventata estremamente complessa: essi sono società di cellule i cui il benessere del singolo è messo da parte per il beneficio dell'organismo. La comunicazione tra cellule in organismi multicellulari è mediata da molecole di segnale extracellulare, alcune delle quali operano a grandi distanze, altre solo tra vicini immediati. La maggior parte delle cellule sono sia mittenti che destinatari. La ricezione dipende da proteine recettrici che si legano alla molecola di segnale. Il legame attiva il recettore che attiva sistemi o cammini di segnalazione intracellulare che dipendono da proteine di segnalazione intracellulare che processano il segnale all'interno della cellula e lo distribuiscono agli obiettivi. Gli obiettivi alla fine di questi sistemi sono proteine effettrici che sono alterate dal segnale e implementano il cambio appropriato nel comportamento cellulare. Le caratteristiche fondamentali della segnalazione sono conservate nell'evoluzione degli eucarioti nonostante per alcuni organismi siano diventate molto più elaborate. Il genoma umano contiene più di 1500 geni per codificare proteine recettrici.

14.1.1 Segnali extracellulari possono agire lungo distanze corte o lunghe

Molte molecole di segnalazione extracellulare rimangono legate alla superficie della cellula segnalatrice e influenzano solo la cellula a contatto, importante durante lo sviluppo e nella risposta immunitaria. Nella maggior parte dei casi le cellule di segnale secernono mediatori locali che agiscono solo sull'ambiente locale nella segnalazione paracrina in cui tipicamente le cellule mittente e destinatarie sono di tipo diverso, ma può accadere che le cellule rispondano a un segnale che loro stesse hanno mandato (segnalazione autocrina). Negli organismi multicellulari grandi si rendono necessari meccanismi di segnalazione a lungo raggio per coordinare il comportamento delle cellule in parti remote

del corpo e si sono evoluti tipi di cellule specializzate per comunicazione intercellulare lungo grandi distanze come i neuroni che estendono lunghi assoni ramificati che permettono loro di contattare cellule obiettivo distanti attraverso sinapsi chimica. Quando un neurone è attivato da uno stimolo invia un potenziale d'azione lungo l'assone che quando raggiunge la sinapsi causa la secrezione di un segnale chimico detto neurotrasmettitore. Un'altra strategia sono le cellule endocrine che secernono gli ormoni nel flusso sanguigno che le trasporta in lontananza.

14.1.2 Molecole di segnale extracellulare si legano a recettori specifici

Le cellule negli animali multicellulari comunicano attraverso centinaia di tipi di molecole di segnale come proteine, piccoli peptidi, amminoacidi, nucleotidi, steroidi, retinoidi, derivati degli acidi grassi e gas disciolti. Queste molecole di segnale sono rilasciate nello spazio extracellulare attraverso esocitosi dalla cellula segnalatrice, mentre alcune sono emesse per diffusione attraverso la membrana cellulare, mentre altre rimangono attaccate alla superficie esterna della cellula. Le proteine di segnale transmembrana possono operare in questo modo o possono possedere domini che possono rilasciare attraverso rottura proteolitica e agire a distanza. La cellula obiettivo risponde in ogni caso attraverso un recettore che lega la molecola di segnale e inizia una risposta. Il sito di legame ha una struttura complessa che gli dona alta specificità e alta affinità. Nella maggior parte dei casi i recettori sono proteine transmembrana sulla superficie. Quando legano il segnale si attivano e generano segnali intracellulari che alterano il comportamento della cellula. In altri casi si trovano all'interno e la molecola di segnale deve entrare nella cellula, cosa che richiede che il segnale sia piccolo e abbastanza idrofobico da diffondersi attraverso la membrana plasmatica.

14.1.3 Ogni cellula è programmata per rispondere a specifiche combinazioni di segnali extracellulari

Una cellula è esposta a centinaia di segnali diversi e risponde selettivamente esprimendo solo i recettori che rispondono ai segnali richiesti per la regolazione di sé. La maggior parte delle cellule rispondono a molti segnali diversi e alcuni segnali influenzano la risposta ad altri segnali. In principio le molecole di segnale possono essere usate in combinazioni illimitate per controllare i diversi comportamenti della cellula con alta specificità. Una molecola di segnale ha diversi effetti in base al tipo della cellula obiettivo.

14.1.4 Ci sono tre classi principali di proteine recettrici sulla superficie cellulare

La maggior parte delle molecole di segnale extracellulari si legano a proteine recettrici specifiche sulla superficie e non entrano nel citosol. Questi recettori agiscono come trasduttori di segnale convertendo il legame in un segnale intracellulare che altera il comportamento della cellula. Tali proteine appartengono a tre categorie definite dal loro meccanismo di trasduzione. I recettori accoppiati a canali ionici o canali ionici transmitter-gated o recettori ionotropici sono coinvolti nelle rapide segnalazioni sinaptiche, mediato da neurotrasmettitori che aprono o chiudono transitoriamente un canale ionico formato da una proteina con cui si legano, cambiando la permeabilità della membrana plasmatica e l'eccitabilità della molecola postsinaptica. La maggior parte di questi appartengono a una famiglia di proteine transmembrana a multipassaggio omologhe. I recettori accoppiati a G agiscono regolando indirettamente l'attività di una proteina obiettivo legata alla membrana, un enzima o un canale ionico. Una proteina legata a GTP trimerica (proteina G) media l'interazione tra il recettore attivato e la proteina obiettivo. L'attivazione della proteina obiettivo può cambiare la

concentrazione di più molecole di segnalazione intracellulare o la permeabilità ionica della membrana plasmatica, le prime agiscono in turni per cambiare il comportamento di altre proteine segnalatrici nella cellula. I recettori accoppiati da enzimi funzionano come enzimi o si associano direttamente con gli enzimi che attivano. Sono proteine transmembrana a singolo passaggio con il sito di legame all'esterno e il sito catalitico all'interno. Sono eterogenei in struttura, ma la maggior parte sono proteine chinasi che fosforilano insieme di proteine specifiche quando attivati.

14.1.5 Recettori di superficie cellulare inoltrano segnali attraverso molecole di segnale intracellulare

Molte molecole intracellulari inoltrano il segnale ricevuto dai recettori nell'interno della cellula generando una catena di eventi di segnalazione che altera proteine effettrici responsabili del cambio di comportamento della cellula. Alcune sono piccole e dette messaggeri secondari, generati in grandi quantità in risposta all'attivazione del recettore e si diffondono diffondendo il segnale ad altre parti della cellula, alcune come AMP ciclico e Ca^{2+} sono solubili in acqua e si diffondono nel citosol, mentre altre come i diacigliceroli si diffondono nel piano della membrana plasmatica. La maggior parte di queste molecole sono proteine che inoltrano il segnale generando messaggeri secondari o attivando il successivo segnale o effettore. Si comportano come interruttori molecolari: quando ricevono il segnale passano in una forma attiva fino a che un altro processo le spegne. La classe più grande di questi consiste di proteine attivate o inattivate da fosforilazione. Lo stato è cambiato da una proteina chinasi che aggiunge covalentemente dei gruppi fosfato ad amminoacidi specifici e da una proteina fosfatasi che lo rimuove. Esistono due gruppi di chinasi: il principale sono le chinasi a serina o treonina, le altre chinasi a tirosina. Molte proteine di segnale intracellulare controllate da fosforilazione sono esse stesse chinasi e sono spesso organizzate in cascate di chinasi in cui una proteina chinasi fosforilata fosforila la prossima chinasi nella sequenza e così via. Un'altra classe di interruttori molecolari consiste di proteine leganti a GTP che si accendono quando GTP è legato e spengono quando è legato GDP. Nello stato attivo hanno un'attività di GTPasi intrinseca e si disattivano da sole idrolizzando il GTP legato in GDP. Di queste ne esistono due tipi: più grande trimerice o proteine G che inoltrano il segnale da recettori accoppiati a esse che le attivano e piccole GTPasi monomeriche che inoltrano segnali da molte classi di recettori di superficie cellulare. Specifiche regolatorie specifiche controllano entrambi i tipi delle proteine leganti a GTP: le proteine GTPasi attivanti (GAP) disattivano il segnale aumentando il tasso di idrolisi di GTP legato e i fattori di scambio del nucleotide guanina (GEF) le attivano promuovendo il rilascio di GDP che permette il legame di un nuovo GTP. Nel caso delle proteine G il recettore attivato serve come GEF. Altri interruttori molecolari sono attivati e disattivati dal legame con un messaggero secondario come AMP ciclico o Ca^{2+} o altre modifiche covalenti. La maggior parte dei cammini di segnale contengono passi inibitori e possono accadere attivazioni da due segnali inibitori diversi.

14.1.6 I segnali intracellulari devono essere specifici e precisi nel citoplasma rumoroso

Le molecole di segnale intracellulare condividono il citoplasma con molte molecole di segnale molto simili che controllano altri insiemi di processi cellulari. Si devono pertanto limitare le interazioni errate e difendersi da eventuali errori. Un modo per cui questo accade viene dall'alta affinità delle interazioni tra le molecole di segnale e i loro partner. Un altro sistema dipende dall'abilità di molte proteine a valle del segnale di ignorare interazioni non volute: queste rispondono a un segnale solo quando il segnale a monte raggiunge alte concentrazioni o livello di attività. Molecole individuali in una grande popolazione variano la loro attività o interazione con altre molecole. Questa variabilità

di segnale introduce altro rumore che il sistema di segnale riesce a gestire. Tale robustezza dipende dalla presenza di un meccanismo di cammini ridondanti.

14.1.7 Complessi di segnalazione intracellulare si formano sui recettori attivati

Un modo per aumentare la specificità delle interazioni è di localizzarle nella stessa parte della cellula o in grandi complessi proteici, assicurandosi che interagiscono solo le parti corrette. Tali meccanismi coinvolgono proteine di impalcatura che uniscono gruppi di proteine segnalanti in complessi segnalanti che a causa della prossimità delle proteine interagenti permettono risposte a segnali extracellulari sequenziali rapide, efficienti e selettive, evitando comunicazioni non volute tra cammini diversi. In altri casi i complessi di segnale si formano transientemente in risposta a un segnale extracellulare e si disassemblano quando il segnale termina, spesso intorno un recettore dopo che la molecola extracellulare lo ha attivato. In molti casi la coda del recettore viene fosforilata e l'amminoacido funge da sito di attracco per l'assemblaggio delle proteine di segnale. In altri casi l'attivazione del recettore produce di molecole di fosfolipidi modificate (fosfoinositidi) nella membrana plasmatica adiacente che recluta poi proteine specifiche e le attiva.

14.1.8 Domini di interazione modulari mediano le interazioni tra proteine di segnale intracellulari

La prossimità indotta viene utilizzata per inoltrare i segnali da proteina a proteina lungo il cammino. L'assemblaggio di tali complessi dipende da piccoli domini di interazione che si trovano in molte proteine di segnale intracellulare e si lega a un particolare motivo strutturale (catena peptidica, modifica covalente o dominio proteico) su un'altra proteina o lipide. Ci sono molti tipi di domini interagenti come domini Src omologia 2 (SH2) e leganti fosfotirosina (PTB) che si legano a tirosine fosforilate in una particolare sequenza specifica. I domini Src omologia 3 (SH3) si legano a sequenze ricche di prolina e plestrina omologia (PH) si legano alle teste cariche di fosfoinositidi specifici. Alcune proteine di segnale consistono di domini di interazione e funzionano solo come adattori. Un altro modo per unire recettori e proteine di segnale è di concentrarli in una specifica regione della cellula come nel ciglio primario.

14.1.9 La relazione tra segnale e risposta varia in cammini di segnale diversi

- Il tempo di risposta varia in diversi sistemi di segnale in base alla velocità richiesta.
- La sensibilità al segnale extracellulare è controllata cambiando il numero o l'affinità dei recettori. Nell'amplificazione un piccolo numero di recettori causa una grande risposta intracellulare creando grandi quantità di messaggeri secondari o attivando molte copie di una proteina di segnale a valle.
- L'intervallo dinamico di attivazione è simile alla sensibilità: in alcuni sistemi sono responsivi solo a uno stretto intervallo di concentrazioni di segnale. Questo si ottiene attraverso meccanismi di adattamento che modificano la responsività del sistema in base al segnale.
- La persistenza della risposta varia grazie a vari meccanismi come circuiti a feedback positivo.
- Il processo dei segnali può convertire un segnale semplice in una risposta complessa attraverso feedback.

- L'integrazione permette a una risposta di essere governata da diversi segnali e dipende da rilevatori di coincidenze che agiscono come gate AND.
- La coordinazione di risposte multiple può essere ottenuta da un singolo segnale e dipende dal meccanismo di distribuzione di esso a diversi effettori che permettono la modulazione della forza della risposta.

14.1.10 La velocità di una risposta dipende dal turnover delle molecole di segnale

La velocità di ogni risposta dipende dalla natura delle molecole di segnali intracellulari che la svolgono e può cambiare da pochi millisecondi a molte ore. Si deve considerare pertanto anche considerare cosa succede quando il segnale viene a mancare. Nella maggior parte dei tessuti adulti la risposta diminuisce quando un segnale finisce con un effetto transiente in quanto il segnale altera la concentrazione di molecole instabili che vengono continuamente cambiate e quando il segnale cessa la degradazione elimina le tracce della sua azione. La velocità di risposta alla rimozione di un segnale dipende dal tasso di distruzione o turnover della molecola che il segnale modifica. Il turnover può anche determinare la prontezza della risposta quando arriva il segnale extracellulare. Nella maggior parte dei casi esistono proteine con vite corte con ruolo regolatorio la cui concentrazione è rapidamente concentrata dalla cellula cambiando il tasso di sintesi. Molte risposte ai segnali dipendono dalla conversione di proteine da una forma inattiva in attiva, la cui attivazione deve essere rapidamente e continuamente annullata per permettere segnalazioni rapide. Il processo di attivazione ha un ruolo centrale in determinare la magnitudine, rapidità e durata della risposta.

14.1.11 Le cellule possono rispondere improvvisamente a un segnale in graduale aumento

Alcuni sistemi di segnalazione sono in grado di generare risposte graduate su un largo intervallo di concentrazioni di segnale extracellulare, mentre altri generano risposte significative solo quando tale concentrazione supera un valore di soglia con una risposta sigmoidale in cui basse concentrazioni di stimolo non hanno grande effetto ma poi la risposta aumenta rapidamente e continuamente a livelli di stimolo intermedi. Tali sistemi filtrano per ridurre risposte inappropriate a rumore ma rispondono con alta sensibilità quando il segnale arriva a un piccolo intervallo di concentrazione. Un secondo tipo è detto discontinuo o binario in cui la risposta è completamente accesa (a volte irreversibilmente) quando il segnale raggiunge la concentrazione di soglia e sono utili per controllare la scelta rispetto a due stati cellulari e coinvolgono feedback positivi. La risposta sigmoidale viene raggiunta grazie a vari meccanismi. In uno più di una molecola di segnale intracellulare deve legarsi alla sua proteina obiettivo a valle per indurre una risposta, quando una proteina deve venir fosforilata a più siti e quando molecole che attivano un enzima inibiscono un altro che catalizza la reazione inversa.

14.1.12 Il feedback positivo può generare una risposta binaria

La maggior parte dei sistemi di segnalazione incorporano circuiti a feedback in cui il risultato di un processo regola lo stesso. Quelli che regolano la segnalazione cellulare possono operare esclusivamente nella cellula obiettivo o coinvolgono la secrezione di segnali extracellulari. Il feedback positivo in un cammino di segnalazione può trasformare il comportamento della cellula rispondente: se ha forza moderata rende più ripida la forza del segnale, ma se è forte abbastanza può produrre una risposta binaria e spesso la cellula può autosostenere questa condizione di risposta che può persistere anche

dopo che il segnale è terminato. In quest'ultimo caso il sistema è detto bistabile: può esistere solo in uno stato attivo o inattivo e uno stimolo temporaneo può invertire tale stato. Grazie a questo circuito si possono indurre cambi nella cellula a lungo termine che possono persistere anche nella progenie.

14.1.13 Il feedback negativo è un motivo comune nei sistemi di segnalazione

Il feedback negativo agisce contro l'effetto di uno stimolo abbreviando e limitando il livello della risposta rendendo il sistema meno sensibile a perturbazioni. Si possono ottenere diverse risposte quando il feedback opera con più forza. Un feedback negativo abbastanza ritardato può produrre risposte oscillatorie che possono persistere anche fino a quando lo stimolo è presente o possono generarsi spontaneamente senza segnali esterni. La presenza di feedback positivi all'interno di tali sistemi generano oscillazioni più ripide. Se il feedback negativo opera con un breve ritardo il sistema si comporta come un rivelatore di cambiamento: da una forte risposta allo stimolo che crolla rapidamente anche se lo stimolo persiste e varia solo con le sue variazioni nel fenomeno di adattamento.

14.1.14 Le cellule possono variare la loro sensibilità a un segnale

Rispondendo a diversi stimoli le cellule e gli organismi sono in grado di individuare la stessa percentuale di cambi in un grande intervallo di forze di stimolo attraverso adattamento o desensibilizzazione dove esposizione prolungata a uno stimolo diminuisce la risposta della cellula a tale livello di stimolo. L'adattamento permette alla cellula di rispondere a cambi nella concentrazione di segnali extracellulari in un grande intervallo di concentrazioni. Il meccanismo alla base è un feedback negativo che opera con breve ritardo: una risposta forte modifica il macchinario di segnale coinvolto in modo che questo si resettì in modo da diventare meno responsivo allo stesso livello di segnale. L'adattamento può derivare dall'inattivazione dei recettori attraverso endocitosi e distrutti in receptor down-regulation o la loro inattivazione fosforilandosi dopo essere stati attivati. Può accadere anche a valle dei recettori cambiando proteine coinvolte nella trasduzione o attraverso la produzione di un inibitore.

14.2 Segnalazione attraverso recettori accoppiati a proteine G

I recettori accoppiati alle proteine G (GPCR) formano la più grande famiglia di recettori sulla superficie cellulare e mediano la maggior parte delle risposte dal mondo esterno e da altre molecole come ormoni, neurotrasmettitori e mediatori locali. Le molecole di segnale che agiscono sui GPCR variano in struttura e funzione e includono proteine, piccoli peptidi, derivati di amminoacidi e acidi grassi, fotoni e tutte le molecole che generano gusto o odore. Esistono diversi recettori per lo stesso segnale che generano risposte diverse e sono espressi in diversi tipi di cellule. Tutti i GPCR hanno una struttura simile: consistono di una singola catena polipeptidica che attraversa il bistrato sette volte formando una struttura cilindrica con un sito profondo di legame al centro e tutti usano le proteine G per inoltrare i segnali all'interno della cellula. La famiglia include la rodopsina, la proteina attivata dalla luce negli occhi dei vertebrati e un grande numero di recettori olfattori nel naso. Altre si trovano anche in organismi unicellulari.

14.2.1 Proteine G trimeriche inoltrano i segnali da GPCR

Quando un segnale extracellulare si lega a un GPCR il recettore subisce un cambio conformazionale che gli permette di attivare una proteina trimerica legante GTP o proteina G che accoppia il recettore all'enzima o al canale ionico nella membrana. In alcuni casi è associata fisicamente, mentre in altri si lega al recettore solo dopo la sua attivazione. Le proteine G sono composte da tre subunità α , β e γ . Nello stato inattivo α ha legato GDP e quando GPCR viene attivato agisce come un GEF che induce la liberazione del GDP permettendo il legame con GTP che poi causa un cambio conformazionale in α rilasciando la proteina dal recettore e causando la dissociazione di α da $\beta\gamma$ che poi interagiscono con vari obiettivi inoltrando il segnale. L'attività di GTPasi e pertanto la velocità dell'idrolisi viene aumentata da un regolatore di segnalazione di proteine G segnalanti (RGS) che agiscono come GAP specifiche alla subunità α e aiutano a chiudere la risposta in tutti gli eucarioti.

14.2.2 Alcune proteine G regolano la produzione di AMP ciclico

L'AMP ciclico (cAMP) agisce come un messaggero secondario in alcuni cammini e un segnale extracellulare può produrre grandi variazioni di cAMP. Questa risposta rapida richiede l'equilibrio di sintesi e degradazione della molecola. AMP ciclico è sintetizzato dall'ATP da un adenilil ciclasi e degradato da AMP ciclico fosfodiesterasi. La prima è una grande proteina transmembrana a multi passo con il dominio catalitico sul lato citosolico. La maggior parte dei suoi isoformi sono regolati da proteine G e Ca^{2+} . Molti segnali extracellulari aumentano la concentrazione di cAMP nella cellula attivando GPCR accoppiate a proteine G stimolatorie (G_s). La subunità α di G_s attivate lega e attiva adenilil ciclasi. Altri segnali riducono tale concentrazione attivando proteine G inibitorie (G_i) che inibiscono l'adenilil ciclasi. Tipi cellulari diversi rispondono diversamente a un aumento nella concentrazione di cAMP: le cellule grasse attivano adenilil ciclasi in risposta a multipli ormoni che stimolano la degradazione di trigliceridi in acidi grassi.

14.2.3 La proteina chinasi dipendente da AMP ciclico (PKA) media la maggior parte degli effetti dell'AMP ciclico

cAMP effettua la sua funzione attivando PKA che fosforila serine o treonine specifiche su proteine obiettivo come proteine di segnalazione extracellulare e proteine effettrici regolando la loro attività. In uno stato inattivo PKA consiste di un complesso di due subunità catalitiche e due regolatorie. Il legame di cAMP alle subunità regolatorie altera la loro conformazione facendole dissociare. Le subunità catalitiche ora sono attivate per fosforilare specifiche proteine obiettivo. Le subunità regolatorie o A-chinasi sono importanti per la sua localizzazione: una proteina di ancoraggio di A-chinasi lega le subunità regolatorie e componenti del citoscheletro o una membrana bloccando il complesso enzimatico in un particolare compartimento cellulare. Se alcune risposte mediate da cAMP possono accadere in secondi, mentre altre dipendono da cambi della trascrizione di geni specifici e possono arrivare ore. Su molti geni controllati da cAMP si trova una sequenza cis-regolatoria detta elemento di risposta a AMP ciclico (CRE) e il regolatore di trascrizione proteina legante a CRE (CREB) la riconosce. Quando PKA si attiva fosforila CREB su una singola serina che poi recluta un coattivatore trascrizionale detto proteina legante a CREB (CBP) che stimola la trascrizione dei geni obiettivo.

14.2.4 Alcune proteine G segnalano attraverso fosfolipidi

Molti GPCR svolgono i loro effetti attraverso proteine G che attivano l'enzima legato a membrana plasmatica fosfolipasi C- β (PLC β) che agisce un fosfolipide inositolo fosforilato (fosfoinositide) detto fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PI(4,5) P_2). Tali recettori lo fanno attraverso G_q che attiva la

fosfolipasi che rompe il $PI(4, 5)P_2$ per generare inositolo 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo e il cammino di segnale si divide in due rami. IP_3 è una molecola solubile in acqua che lascia la membrana plasmatica e si diffonde nel citosol e quando raggiunge l'ER si lega e apre canali di rilascio di Ca^{2+} IP_3 -gated o recettori IP_3 nella membrana ER. Il Ca^{2+} nell'ER viene rilasciato aumentando la sua concentrazione nel citosol che propaga il segnale influenzando proteine intracellulari a lui sensibili. Allo stesso tempo l'altro prodotto il diacilglicerolo agisce come un messaggero secondario ma rimane inglobato nella membrana plasmatica con diversi ruoli di segnalazione, uno dei quali è di attivare una proteina chinasi C (PKC) dipendente da Ca^{2+} l'aumento iniziale in Ca^{2+} causato da IP_3 altera la PKC in modo che si traslochi dal citosol alla membrana plasmatica dove è attivata da Ca^{2+} , diacilglicerolo e la fosfatidilserina negativamente carico. PKC fosforila proteine in base al loro tipo cellulare. Il diacilglicerolo può essere ulteriormente rotto per rilasciare acido arachidonico che può agire come segnale o essere usato nella sintesi di eicosanoidi che partecipano in risposte infiammatorie e del dolore.

14.2.5 Ca^{2+} agisce come un mediatore intracellulare onnipresente

Molti segnali extracellulari causano un aumento nella concentrazione citosolica di Ca^{2+} che ha molte funzioni in diversi tipi cellulari è effettivo in quanto la sua concentrazione nel citosol è bassa mentre nel fluido extracellulare e nel lume dell'ER è elevata con un grande gradiente che tende a spostarlo verso il citosol. Quando un segnale apre transientemente canali di Ca^{2+} questo si sposta velocemente nel citosol attivando proteine a lui sensibili. Alcuni stimoli causano un influxo dal fluido extracellulare mentre altri agiscono attraverso recettori IP_3 indiretti che lo rilasciano dall'ER. La membrana dell'ER contiene anche un secondo tipo di canale Ca^{2+} regolato detto recettore rianodina che si apre in risposta a un aumento dei livelli di Ca^{2+} amplificando il segnale. Molti meccanismi terminano velocemente il segnale Ca^{2+} e sono responsabili per mantenere la sua concentrazione bassa nella condizione di riposo. Si trovano pompe per esso nella membrana plasmatica e dell'ER che idrolizzano l'ATP per pomparlo fuori dal citosol.

14.2.6 Il feedback genera onde e oscillazioni di Ca^{2+}

I recettori IP_3 e rianodina nella membrana ER sono stimolati da concentrazioni moderate di Ca^{2+} e il rilascio di calcio indotto da Ca^{2+} (CICR) causa feedback positivo. Quando una molecola stimola la produzione di IP_3 si notano piccole uscite di Ca^{2+} in regioni discrete della cellula che riflettono aperture dei canali locali. Il segnale può rimanere localizzato a causa di buffer che restringono la sua diffusione, ma se il segnale è abbastanza forte e persistente le concentrazioni locali raggiungono un livello sufficiente per attivare recettori IP_3 causando onde rigenerative di rilascio di Ca^{2+} che si muove attraverso il citosol. I recettori IP_3 e rianodina sono inibiti dopo un ritardo da alte concentrazioni di Ca^{2+} e il suo declino rallenta questo feedback negativo che risulta in un'oscillazione di concentrazione dello ione. La frequenza e ampiezza dell'oscillazione possono essere modulate da altri meccanismi di segnalazione.

14.2.7 Proteine chinasi dipendenti da Ca^{2+} e da calmodulina mediano molte risposte a segnali di Ca^{2+}

Varie proteine leganti a Ca^{2+} aiutano a inoltrare il segnale di Ca^{2+} citosolico e la più importante è la calmodulina che funziona come un recettore multiscopo di Ca^{2+} , governando molti processi da esso regolati. Consiste di una singola catena polipeptidica con quattro siti di legame per Ca^{2+} . Quando viene attivata subisce un cambio conformazionale e in base al fatto che due ioni si devono

legare prima che acquisisca la conformazione attiva la proteina mostra una risposta sigmoidale all'aumento di concentrazione di Ca^{2+} . In alcuni casi serve come subunità permanente regolatoria di un complesso enzimatico, ma di solito il legame le permette di legare diverse proteine obiettivo nella cellula alterando la loro attività. Quando la calmodulina si lega alla proteina obiettivo cambia la sua conformazione. Tra i molti obiettivi si trovano enzimi e proteine di trasporto. Molti effetti del Ca^{2+} sono indiretti e mediati dalla fosforilazione catalizzata da proteine chinasi dette Ca^{2+} /calmodulina dipendenti (CaM-chinasi) che fosforilano regolatori di trascrizione come CREG e attivano o inibiscono la trascrizione di geni specifici.

14.2.8 Alcune proteine G regolano direttamente canali ionici

In alcuni casi le proteine G attivano o disattivano canali ionici nella membrana plasmatica alterandone la sua permeabilità agli ioni. Lo possono fare con un legame a essi attraverso le subunità $\beta\gamma$ o stimolando la fosforilazione del canale o distruggendo i nucleotidi ciclici che attivano o disattivano i canali direttamente.

14.2.9 Olfatto e vista dipendono su GPCR che regolano canali ionici

Gli odori vengono riconosciuti attraverso neuroni olfattori recettori che utilizzano GPCR dette recettori olfattori che agiscono attraverso cAMP. Quando stimolati dal legame con la sostanza attivano una proteina G_{olf} che attiva adenilil ciclasti. L'aumento di cAMP apre canali cationici permettendo un flusso di Na^+ che depolarizza il neurone recettore e inizia un impulso nervoso che viaggia dal suo assone fino al cervello. Ogni diverso neurone produce solo un recettore specifico che aiuta a direzionare l'assone a specifici neuroni obiettivo con cui si connette nel cervello. Un diverso insieme di GPCR agisce similmente per mediare la risposta a feromoni. La vista usa un processo simile: sono coinvolti canali ionici gated da nucleotidi ciclici come GMP ciclico di cui una continua rapida sintesi e degradazione controllano la concentrazione del citosol. Nelle risposte di trasduzione della vista l'attivazione del recettore stimolata dalla luce causa una diminuzione nel livello del nucleotide ciclico. I fotorecettori bastoncelli nella retina sono responsabili per la visione senza colore con poca luce, mentre i fotorecettori a cono sono responsabili per la visione a colori con molta luce. I primi sono cellule altamente specializzate con un segmento interno, uno esterno, un corpo cellulare e una regione sinaptica dove vengono inviati segnali chimici a una cellula nervosa retinale che inoltra il segnale a un'altra cellula nervosa nella cellula e poi al cervello. L'apparato di fototrasduzione si trova nel segmento esterno del bastoncello che contiene uno stack di dischi formato da un sacco chiuso da membrana pieno di rodopsine sensibili alla luce. La membrana plasmatica di questo segmento contiene canali cationici gated da GMP ciclico che legato a questi canali li lascia aperti nel buio. La luce causa un'iperpolarizzazione nella membrana plasmatica in quanto l'attivazione delle rodopsine diminuisce la concentrazione di GMP ciclico e chiude i canali cationici. Ogni rodopsina contiene un cromoforo, 11-cis retinale che isomerizza a trans retinale quando assorbe un singolo fotone. L'isomerizzazione cambia la forma della retina causando un cambio conformazionale nell'opsina e della proteina G trasduttore G_t la cui subunità α attiva GMP ciclica fosfodiesterasi che idrolizza GMP ciclico in modo che i suoi livelli diminuiscono. Questo abbassamento permette ai canali sensitivi al GMP ciclico di chiudersi in modo da far passare velocemente il segnale dalla membrana del disco a quella della membrana plasmatica e il segnale elettrico viene convertito in uno elettrico. I bastoncelli usano diversi circuiti a feedback negativo per convertirsi velocemente in uno stato di riposo: la rodopsina chinasi RK fosforila la coda citosolica della rodopsina attivata inibendo parzialmente la sua capacità di attivare la trasduttore. L'arrestina si lega poi alla rodopsina inibendo la sua attività ulteriormente. Contemporaneamente all'arrestina una proteina RGS si attiva alla trasduttore stimo-

lando l'idrolizzazione del suo GTP in GDP disattivandola. Oltre a questo i canali cationici chiusi sono permeabili a Ca^{2+} e a Na^+ e quando chiudono si inibisce l'influsso di questi ioni diminuendo la loro concentrazione stimolando guanilil ciclasi in modo che faccia ritornare il GMP ciclico ai livelli di riposo. I meccanismi di feedback aiutano anche l'adattamento del bastoncello diminuendo la sua risposta a un'esposizione continua con la luce.

14.2.10 L'ossido nitrico è un mediatore di segnalazione gassoso che passa tra le cellule

Alcune molecole sono abbastanza piccole e/o idrofobiche per passare attraverso la membrana plasmatica e trasportare il segnale a cellule vicine come l'ossido nitrico NO. Nei mammiferi una delle sue funzioni è di rilassare i muscoli lisci nelle pareti dei capillari. L'acetilcolina stimola la sintesi di NO attivando una GPCR sulla membrana di cellule endoteliali che si trovano all'interno del capillare. Il recettore causa la sintesi di IP_3 e rilascio di Ca^{2+} stimolando l'enzima che sintetizza NO che si diffonde fuori dalla cellula verso le cellule di muscolo liscio che rilassa e la dilatazione del capillare. Agisce localmente in quanto ha vita breve. NO viene sintetizzato dalla damminazione dell'arginina catalizzato dall'NO sintetasi (NOS) che nelle cellule endoteliali è detto eNOS, in quelle nervose nNOS, entrambi stimolati da Ca^{2+} . I macrofagi producono un NOS inducibile (iNOS), continuamente attivo ma sintetizzato solo quando la cellula è attivata. Il NO si lega reversibilmente al ferro nel sito attivo della guanilil ciclasi stimolando la sintesi di GMP ciclico.

14.2.11 Messaggeri secondarie e cascate enzimatiche amplificano i segnali

I diversi cammini di segnalazione intracellulare causati da GPCR dipendono tutti da catene di inoltro di proteine di segnalazione intracellulare e messaggeri secondarie che forniscono molte opportunità per l'amplificazione della risposta al segnale. Una singola molecola attivata può catalizzare l'attivazione di centinaia di molecole a valle della catena amplificando la risposta di diversi ordini di grandezza in quanto questi messaggeri hanno la funzione di effettori allosterici che attivano enzimi specifici o canali ionici un singolo segnale extracellulare può alterare migliaia di molecole obiettivo nella cellula obiettivo. Tali meccanismi di amplificazione richiedono meccanismi di ripristino per ricondurre il sistema allo stato di riposo quando la stimolazione cessa.

14.2.12 La desensibilizzazione di GPCR dipende dalla fosforilazione dei recettori

Un importante classe di adattamento dipende dall'alterazione della quantità o della condizione dei recettori. Per GPCR ci sono tre modi di adattamento: sequestro dei recettori, dove sono temporaneamente mossi all'interno della cellula, nella down regulation sono distrutti dai lisosomi e nell'attivazione si alterano in modo che non possano più interagire con le proteine G. In ogni caso la desensibilizzazione dipende dalla loro fosforilazione da parte di PKA, PKC o una famiglia delle GPCR chinasi GRK che fosforilano multiple serine e treonine su una GPCR solo dopo che il legame con il ligando ha attivato il recettore che allostericamente attiva GRK. In alcuni casi il recettore è defosforilato e riciclato alla membrana plasmatica, in altri è ubiquitilato, endocitato e degradato nei lisosomi. L'endocitosi non causa una terminazione della segnalazione in alcuni casi.

14.3 Segnalazione attraverso recettori accoppiati da enzimi

I recettori accoppiati a enzimi sono proteine transmembrana con il sito di legame sulla superficie esterna della membrana plasmatica e il loro dominio citosilico ha un'attività enzimatica intrinseca o si associa direttamente con un enzima. Ogni subunità di tali recettori ha un segmento transmembrana.

14.3.1 I recettori tirosina chinasi (RTK) attivati si autofosforilano

Molti segnali extracellulari agiscono attraverso il recettore tirosina chinasi RTK che includono molte proteine della superficie e secrete che controllano il comportamento negli animali adulti e in via di sviluppo. Ci sono circa 60 RTK umane classificate in 20 sottofamiglie strutturali dedicate a una famiglia di ligandi complementari. In tutti i casi il legame della proteina di segnale attiva il dominio citosilico chinasi che porta a una fosforilazione della tirosina sulla parte citosilica del recettore creando siti di attracco di fosfotirosina per varie proteine intracellulari che inoltrano il segnale. Per la maggior parte delle RTK il legame causa la dimerizzazione del recettore che unisce i domini chinasi in modo che si fosforilino tra di loro su tirosine specifiche e promuovendo cambi conformazionali che attivano entrambi i domini chinasi. In altri casi come per EGF la chinasi è attivata da cambi conformazionali portati dalle interazioni tra i due domini chinasi esterni al sito attivo.

14.3.2 Le tirosine fosforilate sugli RTK servono come siti di attracco per proteine di segnalazione intracellulari

I domini chinasi attivati fosforilano siti addizionali nella parte citosilica in regioni disordinate fuori da essi che creano siti di attracco ad alta affinità per proteine di segnale intracellulare che si lega a un particolare sito fosforilato sul recettore attivato in quanto riconosce, oltre alla fosfotirosina anche le caratteristiche della catena intorno. Una volta legata a un'RTK una proteina di segnale si può fosforilare sulle tirosine ed essere attivata, ma in molti casi il legame è sufficiente per l'attivazione inducendo un cambio conformazionale o portandola vicino alla proteina successiva nel cammino di segnalazione. La fosforilazione del recettore serve come interruttore per causare l'assemblaggio di un complesso di segnalazione intracellulare che inoltra il segnale.

14.3.3 Le proteine con domini SH2 si legano a tirosine fosforilate

Una grande varietà di proteine si possono legare alle fosfotirosine e aiutano a inoltrare il segnale attraverso catene di interazioni proteina-proteina mediate da domini di interazione modulari, alcune di esse sono enzime come le fosfolipasi C- γ (PLC γ) che attivano i cammini a inositolo. Attraverso questo cammino si aumenta il livello citosilico di Ca^{2+} e attivano PKC. Un altro enzima è la Src tirosina chinasi che fosforila altre proteine di segnale sulle tirosine. Un altro è la fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-chinasi) che fosforila i lipidi che servono come siti di legame per attrarre varie proteine di segnalazione alla membrana plasmatica. Le proteine di segnale intracellulare presentano domini di legame per le fosfotirosine che possono essere domini SH2 (per le regioni di omologia Src) o domini PTB (legame con fosfotirosina). Riconoscendo tirosine fosforilate specifiche le deboli interazioni di questi domini permettono alle proteine di legarsi a RTK attivati e altre proteine di segnale transientemente fosforilate sulle tirosine. Ci sono anche altri domini di interazione che le permettono di interagire con altre proteine come SH3 che lega a motivi ricchi di prolina. Alcune proteine che si legano a RTK attraverso SH2 diminuiscono il processo di segnalazione fornendo feedback negativo come la proteina c-Cbl che catalizza l'ubiquitilazione dei recettori per la loro endocitosi.

e degradazione. Se le RTK sono endocitate con il segnale ancora legato continuano a segnalare. Alcune proteine di segnale sono composte quasi interamente di domini SH2 e SH3 e funzionano come adattatori per accoppiare proteine fosforilate alla tirosina a altre proteine senza il proprio dominio SH2.

14.3.4 La GTPasi Ras media la segnalazione per la maggior parte delle RTK

La superfamiglia Ras consiste di varie famiglie di GTPasi monomeriche ma solo le famiglie Ras e Rho inoltrano il segnale dai recettori della superficie cellulare interagendo con diverse proteine di segnale intracellulare possono diffondere coordinatamente il segnale lungo diversi cammini a valle agendo come hub di segnalazione. Ci sono tre proteine Ras principali negli umani: H-, K- e N-Ras con funzioni diverse ma lo stesso funzionamento. Ras contiene dei gruppi lipidici che la ancorano alla faccia citoplasmatica della membrana dove inoltra segnali al nucleo per stimolare la proliferazione o differenziazione della cellula. La Ras funziona come interruttore molecolare in base al fatto che sia legata a GTP o GDP, due classi di proteine di segnale possono regolare la sua attività influenzando la transizione tra lo stato attivo (Ras-GEF) e quello inattivo (Ras-GAP). Le RTK attivano Ras attivando Ras-GEF o inibendo Ras-GAP, se le seconde si legano direttamente a RTK attivate attraverso il loro dominio SH2, le Ras vengono attivate dal legame indiretto del recettore a un Ras-GEF. Il GEF particolare determina la membrana in cui è attivata la GTPasi e quale proteina a valle attiva.

14.3.5 Ras attiva una molecola di segnale MAP chinasi

Fosfatasi specifiche alla tirosina invertono velocemente la fosforilazione delle RTK e le Ras-GAP inducono la disattivazione delle Ras. Per stimolare eventi duraturi questi eventi devono pertanto essere convertiti in altri più duraturi attraverso meccanismi come il modulo di chinasi attivata dal mitogeno (modulo chinasi MAP) con tre componenti che formano una molecola di segnale utilizzata in diversi contesti. Le tre componenti sono chinasi: sequenzialmente sono MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK) che viene attivata dal Ras, MAP chinasi chinasi (MAPKK) e MAP chinasi (MAPK). Nel cammino di segnalazione dei mammiferi Ras-MAP-chinasi sono dette Raf, Mek e Erk. Una volta attivata la MAP chinasi inoltra il segnale fosforilando altre proteine nella cellula come regolatori di trascrizione e altre chinasi. Erk entra nel nucleo e fosforila componenti di un complesso di regolazione della trascrizione che attiva la trascrizione di un insieme di geni immediati che codificano regolatori di trascrizioni che attivano altri geni. Tra questi geni ce ne sono alcuni che stimolano la proliferazione della cellula. I segnali extracellulari attivano le MAP chinasi transientemente e il tempo in cui rimane attiva influenza la risposta. Molti fattori influenzano la durata e altre caratteristiche della risposta di segnalazione come circuiti di feedback positivo e negativo che si possono combinare.

14.3.6 Proteine di impalcatura aiutano a prevenire la comunicazione tra moduli MAP chinasi paralleli

Alcuni moduli di MAP chinasi possono usare le stesse chinasi e pertanto si deve evitare la loro comunicazione. Questo si ottiene attraverso proteine di impalcatura che legano le chinasi in complessi in modo da garantire la specificità. Nei mammiferi possono operare almeno 5 moduli paralleli e se l'impalcatura fornisce precisione riduce la capacità di amplificazione e la diffusione del segnale ad altre parti della cellula.

14.3.7 La famiglia di GTPasi Rho accoppia funzionalmente recettori della superficie cellulare al citoscheletro

La famiglia Rho è formata da GTPasi monomeriche che regolano l'actina e i microtubuli del citoscheletro controllando l'adesione, polarità, forma e motilità della cellula, la progressione del suo ciclo, la trascrizione dei geni e il trasporto di membrana. Tre membri sono Rho, Rac e Cdc42 che hanno effetto su molte proteine a valle. Sono attivate da GEF e disattivate da GAP che possono avere diversi gradi di specificità. Sono spesso legate a inibitori di dissociazione del nucleotide guanina nel citosol che impedisce la loro interazione con i GEF alla membrana plasmatica. La segnalazione attraverso epifrine fornisce un esempio di come RTK possono attivare una GTPasi Rho: questa si lega e attiva membri della famiglia di Eph RTK che lo attiva. La risposta dipende dall'efexina, associata alla coda citosolica del recettore Eph. Quando viene attivato il recettore attiva una tirosina chinasi che fosforila l'efexina su una tirosina aumentando l'abilità di essa di attivare la proteina RhoA che attivata regola varie proteine obiettivo come quelle che controllano l'actina.

14.3.8 La PI 3-chinasi produce siti di attracco per lipidi nella membrana plasmatica

Una delle proteine che si lega alla coda degli RTK è il fosfoinositide 3-chinasi (PI 3-chinasi) che fosforila inositoli e gioca un ruolo centrale nella promozione della sopravvivenza e crescita della cellula. Il fosfatidilinositolo può subire fosforilazione reversibile in vari siti sul gruppo di testa generando vari fosfoinositidi. Quando attivata la PI 3-chinasi catalizza la fosforilazione alla posizione 3 dell'anello inositico generando diversi fosfoinositidi come $PI(3, 4, 5)P_3$ centrale come sito di legame per varie molecole di segnale che si assemblano in complessi che inoltrano segnali nella cellula. $PI(3, 4, 5)P_3$ rimane nella membrana plasmatica fino a che specifici fosfoinositide fosfatasi lo defosforilano come la PTEN fosfatasi. Le PI 3-chinasi attivate da RTK e GPCR appartengono alla classe I e sono eterodimeri composti da una subunità comune catalitica e diverse subunità regolatorie. RTK attivano la classe Ia, in cui le subunità regolatorie sono proteine adattatrici che legano due fosfotirosine in RTK attivati attraverso i suoi due domini SH2, mentre GPCR attivano la classe di Ib PI 3-chinasi con subunità regolatorie che legando al complesso $\beta\gamma$ sulle proteine trimeriche G attivate. Le proteine di segnale intracellulare si legano a $PI(3, 4, 5)P_3$ attraverso il dominio di omologia a pleckstrina (PH) che funziona come dominio di interazione proteina-proteina.

14.3.9 Il cammino di segnalazione PI-3-chinas-Akt stimola la sopravvivenza e crescita delle cellule animali

Segnali extracellulari sono richiesti alle cellule animali per crescere, dividersi e sopravvivere. Membri della famiglia dei fattori di crescita simili a insulina (IGF) stimolano molti di pi di cellule legandosi a RTK specifici che attivano PI 3-chinasi per produrre $PI(3, 4, 5)P_3$ che recluta due proteine chinasi alla membrana plasmatica attraverso i loro domini PH: Akt (proteina chinasi B o PKB) e chinasi proteica 1 fosfoinositide dipendente (PKK1) che porta all'attivazione di Akt. Una volta attivato fosforila varie proteine nella membrana plasmatica, nel citosol e nel nucleo. Ha principalmente un ruolo inibitorio. Il controllo della crescita cellulare da parte di questo cammino dipende da una grande proteina chinasi detta TOR, mTOR nei mammiferi, dove esiste in due complessi funzionalmente distinti: complesso mTOR 1 che contiene la proteina raptor e sensitivo alla rapamicina, stimola la crescita cellulare promuovendo la produzione dei ribosomi e la sintesi proteica, inibendo la degradazione delle stesse, oltre a stimolare il recupero di nutrienti. Il complesso mTOR 2 contiene la proteina rictor e aiuta ad attivare Akt, regola il citoscheletro actinico.

14.3.10 RTK e GPCR attivano cammini di segnalazione sovrapposti

RTK e GPCR possono attivare gli stessi cammini di segnalazione o comunque cammini che a un certo punto possono convergere sulle stesse proteine. Le interazioni tra i cammini permettono diverse molecole di segnale di modulare e coordinare gli effetti reciproci.

14.3.11 Alcuni recettori accoppiati ad enzimi si associano con la chinasi tirosina citoplasmatica

Molti recettori sulla superficie cellulare dipendono dalla fosforilazione della tirosina per la loro attività ma non possiedono un dominio di tirosina chinasi e pertanto agiscono attraverso tirosine chinasi citosoliche, associate con il recettore e che fosforilano diverse proteine obiettivo come i recettori quando si legano al ligando. Questi recettori funzionano pertanto in maniera analoga alle RTK tranne per il fatto che il dominio chinasi è codificato da un gene diverso. Appartengono a questa classe i recettori per gli antigeni e per le interleuchine sui linfociti, integrine e recettori per citochine e ormoni. Sono dimeri o portati in una forma dimerica quando si legano al ligando. Alcuni di questi recettori dipendono da membri della famiglia Src che contengono domini SH2 e SH3 sul lato citoplasmatico della membrana, tenuti lì da interazioni con le proteine recettrici e catene lipidiche attaccate covalentemente. Diversi membri sono associati con diversi recettori e fosforilano insieme sovrapposti ma distinti di proteine. Un tipo di tirosina chinasi citoplasmatica si associa con le integrine, il recettore che la cellula usa per legarsi alla matrice extracellulare il cui legame causa l'attivazione di cammini di segnalazione che influenzano il comportamento della cellula. Quando si raggruppa nei siti del contatto con la matrice aiutano a causare l'assemblaggio di giunzioni dette adesioni focali in cui è presente la chinasi di adesione focale (FAK) che si lega alla coda citosolica di una delle subunità dell'integrina dove si fosforilano tra di loro creando siti di legame dove la chinasi Src si può legare. In questo modo i due segnali di tirosina chinasi arrivano alla cellula che ha aderito al substrato. Tali segnali sono inoltrati nella cellula da recettori citochina.

14.3.12 I recettori citochina attivano il cammino di segnalazione JAK-STAT

La famiglia di recettori citochina include recettori per molti mediatori locali e per ormoni. Tali recettori sono associati stabilmente con tirosine chinasi citoplasmatiche dette giaco chinasi (JAK) che fosforilano e attivano il regolatore di trascrizione STAT (trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione) che si trovano nel citosol e sono anche detti regolatori di trascrizione latente in quanto migrano nel nucleo e regolano la trascrizione genica solo dopo la loro attivazione. Il cammino JAK-STAT è uno dei più diretti per la regolazione genica. I recettori citochina sono dimeri o trimeri associati con fino a due tra JAK1-2-3 e Tyk2. Il legame della citochina altera la conformazione avvicinando i due JAK in modo che si fosforilino tra di loro e aumentando l'attività dei loro domini tirosina chinasi. I JAK poi fosforila le tirosine sulle code citoplasmatiche dei recettori citochina creando siti di legame fosfotirosina per STAT e proteine adattatrici e accoppiare i recettori ai cammini di segnalazione Ras-MAP-chinasi. Ogni STAT ha un dominio SH2 che media il legame di STAT a una fosfotirosina sul recettore attivato (una volta legato il JAK fosforila le sue tirosine causandone la dissociazione) e sullo STAT rilasciato media il suo legame a una fosfotirosina a un'altra STAT formando un omo o eterodimero. Il dimero si trasloca poi nel nucleo dove si lega a una sequenza cis-regolatoria con specificità in combinazione con altre proteine regolatorie della trascrizione. La risposta mediata da questo cammino è regolata da feedback negativo. I dimeri STAT possono anche

attivare geni che codificano proteine inibitorie che aiutano a terminare la risposta, ma la terminazione completa richiede la defosforilazione delle loro fosfotirosine.

14.3.13 La proteina tirosina fosfatasi inverte la fosforilazione delle tirosine

In tutti i cammini di segnalazione che usano la fosforilazione della tirosina la fosforilazione è invertita da proteine tirosina fosfatasi che sono presenti in grande quantità. Le tirosine fosfatasi si trovano in forme transmembrana e citosiliche e hanno alta specificità per il substrato in e fanno in modo che le fosforilazioni della tirosina abbiano vita breve che il livello generale di fosforilazione della tirosina nella cellula rimanga basso. Sono in ogni caso regolate ed agiscono solo quando necessario.

14.3.14 Le proteine di segnale della superfamiglia $TGF\beta$ agiscono attraverso recettori serina/treonina chinasi e Smads

La superfamiglia di fattori di crescita trasformanti- β ($TGF\beta$) consiste di proteine dimeriche secrete strutturalmente simili. Agiscono come ormoni o come mediatori locali per regolare un gran numero di funzioni biologiche. Consiste della famiglia di $TGF\beta$ /attivine e di proteine morfogenetiche delle ossa (BMP). Tutte queste proteine agiscono attraverso recettori accoppiati da enzimi che sono proteine transmembrana a singolo passaggio con un dominio di serina/treonina chinasi nel lato citosilico. Ce ne sono due classi: tipo I e tipo II, strutturalmente simili omodimeri. Ogni membro della superfamiglia si lega a una combinazione caratteristica di dimeri recettori di tipo I e tipo II e uniscono i domini chinasi insieme in modo che il recettore di tipo II può fosforilare e attivare il tipo I, formando un complesso tetramerico attivo. Il recettore tipo-I attivato si lega e fosforila un regolatore di trascrizione latente della famiglia Smad. I recettori $TGF\beta$ /attivina fosforilano Smad2 o Smad3, mentre i BMP fosforilano Smad1, Smad5 o Smad8. Una volta che queste R-Smad sono fosforilate si dissociano dal recettore e si legano a Smad4 (co-Smad) e il complesso risultante si trasloca nel nucleo dove si associa con altri regolatori di trascrizione. I recettori e il loro legame sono endocitati da due diverse strade, una che aumenta l'attivazione e un'altra che la inibisce. La strada di attivazione dipende da vescicole incapsulate da clatrina e porta agli endosomi giovani dove le Smad vengono attivate. Una proteina ancora SATA (ancora Smad per l'attivazione del recettore) è concentrata negli endosomi giovani e si lega ai recettori $TGF\beta$ attivati e Smad aumentando l'efficienza della fosforilazione mediata da Smad. La strada di disattivazione dipende da calveole e porta all'ubiquitilazione del recettore e alla sua degradazione nei cromosomi. Durante la risposta al segnale Smad si muove tra il citoplasma e il nucleo: nel secondo sono defosforilate ed esportate nel citoplasma dove possono essere rifosforilate. In questo modo l'effetto sui geni riflette la concentrazione del segnale extracellulare e il tempo che il segnale agisce sui recettori. Come in altri sistemi il cammino è regolato da feedback negativo: tra i geni attivati dai complessi Smad si trovano quelli che codificano Smad inibitorie: Smad6 o Smad7 che si legano alle code citosiliche dei recettori attivati inibendo la sua capacità di segnalazione competendo con le R-Smad per i siti di legame sul recettore diminuendone la sua fosforilazione, recluta una ligasi ubiquitina Smurf che ubiquitila il recettore portando alla sua internalizzazione e degradazione e recluta una fosfatasi che defosforila e inattiva il recettore. Le Smad inibitorie si legano anche al co-Smad inibendolo impedendo il suo legame con R-Smad o promuovendo la sua ubiquitilazione.

14.4 Strade di segnalazione alternative nella regolazione genica

NON SO SE È DA FARE

14.5 Segnalazione nelle piante

NON SO SE È DA FARE

Capitolo 15

Il citoscheletro

In modo che la cellula funzioni correttamente deve organizzarsi nello spazio e interagire meccanicamente con le altre nell'ambiente: devono avere la forma corrette, essere robuste e possedere una propria struttura interna. Le funzioni spaziali e meccaniche che forniscono queste proprietà alla cellula (che è capace di modificare) dipendono dal citoscheletro, un sistema di filamenti. Le sue funzioni dipendono da tre famiglie di filamenti proteici: i filamenti di actina, i microtubuli e i filamenti intermedi. Ogni tipo ha proprietà meccaniche, dinamica e ruoli biologici distinti ma condividono delle caratteristiche fondamentali. Normalmente agiscono insieme in modo da dare alla cellula le proprietà precedenti.

15.1 Funzione e origine del citoscheletro

I tre filamenti del citoscheletro sono responsabili per diversi aspetti dell'organizzazione spaziale della cellula e delle sue proprietà meccaniche. I filamenti di actina determinano la forma della superficie cellulare e sono necessari per la sua locomozione oltre a guidare la sua separazione durante la divisione cellulare. I microtubuli determinano la posizione degli organelli, direzionano il trasporto intracellulare e formano il mandrino mitotico che segrega i cromosomi durante la divisione cellulare. I filamenti intermedi forniscono forza meccanica. Tutti questi filamenti interagiscono con centinaia di proteine accessorie che regolano e uniscono i filamenti con altre componenti cellulari e tra di loro. Sono essenziali per l'assemblaggio controllato dei filamenti in posti particolari e includono le proteine motrici che convertono l'energia dell'ATP in forza meccanica che muove gli organelli o i filamenti.

15.1.1 I filamenti del citoscheletro si adattano per formare strutture dinamiche o stabili

I sistemi del citoscheletro sono dinamici e adattabili, in modo che possano cambiare o persistere in base alle necessità. Le componenti macromolecolari sono in un continuo stato di flusso in modo che un riordinamento richieda poca energia in più al cambiare delle condizioni. La regolazione del comportamento dinamico e assemblaggio dei filamenti permette la costruzione di strutture varie. I filamenti di actina sottostanno alla membrana plasmatica, fornendo forza e forma al bistrato lipidico oltre a formare proiezioni sulla superficie cellulare come strutture dinamiche come lamellipodia e filopodia che la cellula usa per esplorare il territorio e muoversi. Strutture più stabili permettono alla cellula di unirsi a un substrato e permette alle cellule muscolari di contrarsi. I microtubuli possono riordinarsi per formare un mandrino mitotico bipolare durante la divisione cellulare e cilia,

che funzionano come fruste motili o dispositivi sensoriale sulla superficie cellulare, oltre a percorsi per il trasporto di materiali. I filamenti intermedi formano una gabbia protettiva per il DNA cellulare e nel citosol sono avvolti in cavi in modo da formare forti appendici. Durante la divisione cellulare avviene una drammatica e rapida riorganizzazione del citoscheletro: dopo che i cromosomi si sono replicati il vettore di microtubuli interfase che si diffonde attraverso il citoplasma è riconfigurato nel mandrino mitotico che segrega le due coppie di ogni cromosoma nei nuclei delle figlie. Allo stesso tempo strutture di actina specializzate si riordinano in modo che la cellula smette di muoversi e assume una dimensione più sferica. L'actina e la miosina formano una cintura intorno al centro della cellula (anello contrattile) che la costringe fino a che si separa. Quando la divisione è completa il citoscheletro delle due cellule figlie si riordina nelle strutture interfase.

15.1.2 Il citoscheletro determina l'organizzazione cellulare e la sua polarità

Nelle cellule con una morfologia stabile e differenziata gli elementi dinamici del citoscheletro devono anche fornire strutture stabili per l'organizzazione cellulare: su cellule epiteliali negli intestini e nei polmoni protrusioni basate sul citoscheletro come microvilli e cilia vengono mantenute durante tutta la vita della cellula. Oltre a questo il citoscheletro è responsabile della polarità cellulare in modo che le cellule siano capaci di distinguere le diverse terminazioni, cosa mantenuta per l'intera vita della cellula.

15.1.3 I filamenti si assemblano da subunità proteiche che impartiscono proprietà fisiche e dinamiche specifiche

I filamenti possono allungarsi lungo tutta la dimensione della cellula a causa del fatto che sono costruiti assemblando grandi numeri di piccole subunità che possono diffondersi rapidamente nel citosol in modo che le reorganizzazioni strutturali siano rapide. I filamenti di actina e i microtubuli sono costruiti da subunità compatte e globulari (rispettivamente subunità di actina e di tubulina) mentre quelli intermedi da subunità più piccole allungate e fibrose. Tutti formano come assemblaggi elicali di queste subunità che si associano da sole usando una combinazione di contatti tra terminazioni e tra lati. La diversità e forza delle interazioni fornisce diversa stabilità e diverse proprietà meccaniche per ogni filamento. Le subunità sono tenute insieme da interazioni non covalenti che ne permettono un rapido assemblaggio e disassemblaggio. Le subunità di filamenti di actina e dei microtubuli sono asimmetriche e si legano tra di loro testa a coda con lo stesso orientamento, polarità che causa diversi comportamenti in ogni terminazione. Le subunità sono inoltre enzimi che catalizzano l'idrolisi di un nucleoside trisofato, rispettivamente ATP e GTP la cui energia permette rapidi rimodellamenti. Controllandone l'assemblaggio la cellula controlla le proprietà dinamiche e polari dei filamenti per generare forza in direzione specifica. Le subunità dei filamenti intermedi sono simmetriche e non catalizzano l'idrolisi dei nucleotidi pur riuscendo ad avere una rapida dissociazione. Per fornire forza e adattabilità i microtubuli si assemblano da 13 protofilamenti, stringhe lineari che si associano tra di loro formando un cilindro vuoto, molto più resistente a rotture centrali e più adatto alla perdita e al guadagno di subunità alle terminazioni. I filamenti sono tenuti insieme da legami non covalenti e interazioni idrofobiche il cui tipo e luogo dipende dal tipo di filamento: quelli intermedi si assemblano formando forti contatti laterali tra bobine di α -eliche.

15.1.4 Proteine accessorie e motrici regolano i filamenti del citoscheletro

La cellula regola la lunghezza, stabilità, forma e numero dei filamenti regolando come si attaccano tra di loro e con le altre componenti della cellula in modo che i filamenti possano formare una grande varietà di strutture di alto livello. Modifiche covalenti dirette dei filamenti regolano alcune delle proprietà, ma la maggior parte della regolazione è svolta da centinaia di proteine accessorie che determinano la distribuzione spaziale e il comportamento dinamico dei filamenti, convertendo segnali in azioni citosiliche. Queste si legano ai filamenti per determinare i siti di assemblaggio di nuovi filamenti, per regolare il partizionamento dei polimeri, per cambiare la cinetica dell'assemblaggio, per recuperare energia e per unire i filamenti tra di loro e ad altri compartimenti. Questi processi avvengono sotto il controllo di segnali extra e intracellulari. Tra le proteine che si associano al citoscheletro si trovano le proteine motrici che si legano a un filamento polarizzato e utilizzano ripetuti cicli di idrolisi dell'ATP per muoversi lungo il filamento. Molte di queste trasportano organelli, mentre altre causano tensione tra i filamenti generando la forza necessaria per il movimento. Sono simili alle polimerasi o elicasi nel senso che si muovono lungo una pista lineare.

15.1.5 La divisione e organizzazione di cellule batteriche dipende da omologhi di proteine citoscheletrali eucariotiche

15.2 Actina e proteine leganti all'actina

Il citoscheletro actina svolge diverse funzioni e ogni subunità (G-actina o actina globulare) è formata da un polipeptide lungo 375 amminoacidi associato con una molecola di ATP o ADP. Nei vertebrati si trovano tre isoformi dell'actina: α , β e γ con distinte funzioni: la prima nelle cellule muscolari, le altre in tutte le altre.

15.2.1 Le subunità di actina si assemblano testa a coda per creare filamenti flessibili e polari

Le subunità di actina si assemblano testa a coda per formare una elica a destra e una struttura di $8nm$ detta actina filamentosa o F-actina, filamenti polari con diverse terminazioni: una che cresce lentamente o terminazione meno e una più velocemente o più. La prima si dice anche a punta e l'altra spinata. Le subunità sono posizionate con la fessura legante i nucleotidi verso la terminazione meno. I filamenti individuali sono flessibili, cosa ridotta da proteine che uniscono e legano incrociandoli creando strutture più grandi e rigide.

15.2.2 La nucleazione è il passo limitante nella formazione dei filamenti di actina

Il regolamento della formazione dei filamenti di actina è importante per controllare la forma e il movimento cellulare. Piccoli oligomeri di actina si possono assemblare spontaneamente, ma sono instabili e si disassemblano prontamente. Per creare strutture durature le subunità si devono assemblare in un aggregato iniziale o nucleo stabilizzato da contatti tra subunità multipli che può allungarsi rapidamente attraverso l'aggiunta di altre subunità nel processo di nucleazione del filamento. L'instabilità dell'actina piccola crea una barriera cinetica alla polimerizzazione che causa una fase di ritardo in cui pochi aggregati riescono a formare la transizione ad una forma più stabile che poi porta alla fase di allungamento rapida in cui le subunità sono aggiunte velocemente. Quando la concentrazione di monomeri diminuisce il sistema raggiunge uno stato di equilibrio in cui il tasso

di aggiunta è uguale a quello di dissociazione. La concentrazione di subunità libere a questo punto è detta concentrazione critica C_C .

15.2.3 Filamenti di actina hanno due terminazioni distinte che crescono a tassi diversi

A causa delle differenze alle terminazioni i filamenti hanno comportamenti diversi alle terminazioni: alla terminazione più sono molto maggiori i tassi di associazione e dissociazione. Hanno comunque la stessa affinità per le subunità. La dinamica e polarità dei filamenti viene sfruttata per generare lavoro meccanico: essendo che l'allungamento genera energia quando la concentrazione di subunità eccede la concentrazione critica può essere accoppiato con un movimento di un carico attaccato.

15.2.4 L'idrolisi dell'ATP tra filamenti di actina porta a routine in uno stato di equilibrio

L'actina può idrolizzare ATP, cosa che avviene più rapidamente quando si trova in filamenti. Poco dopo l'idrolisi il gruppo fosfato è rilasciato e l'ADP rimane nella subunità e possono pertanto esistere forme di actina con legato ATP (forme T) e con legato ADP (forme D). L'energia liberata dall'idrolisi viene conservata nel polimero aumentando l'energia libera per la degradazione di esso alla stessa concentrazione rispetto alla forma T. La concentrazione di subunità in forma T nel filamento aumenta nel tempo. Nel caso in cui si trovano concentrazioni intermedie è possibile che l'aggiunta di subunità sia più veloce dell'idrolisi alla terminazione più e più lenta alla terminazione meno in modo che il filamento subisca una netta aggiunta di subunità alla terminazione più, mentre perde subunità dalla terminazione meno. Alla concentrazione di equilibrio l'aggiunta e la rimozione si eguagliano e le subunità ciclano rapidamente tra lo stato libero e quello filamentoso che richiede un consumo costante di energia attraverso idrolisi di ATP. L'azione di proteine che alterano la stabilità della polimerizzazione del filamento mostrano come la funzione di esso dipende dall'equilibrio dinamico tra filamento e monomero.

15.2.5 Proteine leganti all'actina influenzano la dinamica e l'organizzazione del filamento

In una cellula il comportamento dell'actina è regolato da proteine accessorio che possono legarsi al monomero o al filamento. Questo avviene grazie al controllo spaziale e temporale di disponibilità di monomeri, allungamento del filamento, nucleazione e depolimerizzazione.

15.2.6 La disponibilità dei monomeri controlla l'assemblaggio dei filamenti di actina

Si nota come nelle cellule non muscolari solo una piccola parte dell'actina polimerizza a causa di proteine che si legano al monomero e rendono il processo meno favorevole. La più abbondante è la timosina che si lega ai monomeri portandoli ad uno stato bloccato in cui non si possono associare con le terminazioni del filamento o idrolizzare o scambiare il nucleotide legato. Il reclutamento di questi monomeri avviene grazie alla profilina che si lega al monomero di actina dal lato opposto della fessura legante all'ATP bloccando il lato del monomero che si associa alla terminazione meno lasciando esposto il legame per la terminazione più. Quando polimerizza la profilina si stacca, lasciandola libera di competere con la timosina per la prossima subunità. Diversi meccanismi regolano la profilina

come la fosforilazione e il legame al fosfolipide inositolo in modo da definire i siti di azione di questa proteina.

15.2.7 Fattori di nucleazione dell'actina accelerano la polimerizzazione e generano filamenti dritti o ramificati

Un secondo prerequisito per la polimerizzazione è la nucleazione dei filamenti. Le proteine che contengono motivi di legame per i monomeri di actina si uniscono in tandem per mediare i meccanismi di nucleazione. Tali proteine uniscono diverse subunità per formare un seme. La nucleazione è catalizzata da il complesso Arp 2/3 o formina. Il primo è un complesso formato da due proteine imparentate a actina o ARP, che nucleano i filamenti dalla terminazione meno permettendo una rapida crescita alla terminazione più. Il complesso può anche unirsi al lato di un altro filamento creando una struttura ramificata. Le formine sono proteine dimeriche che nucleano la crescita di filamenti lunghi e non ramificati che possono essere uniti da altre proteine per formare unioni parallele. Ogni subunità di formina ha un sito di legame per l'actina monomerica e il dimero nuclea la polimerizzazione catturando due monomeri. Mentre il filamento cresce il dimero formina rimane associato alla terminazione più permettendo l'addizione di nuove subunità. Tale crescita è fortemente aumentata da monomeri associati con profilina. La nucleazione avviene principalmente alla membrana plasmatica dove si forma la cortecchia cellulare e i filamenti di actina in questa regione determinano forma e movimento della superficie cellulare.

15.2.8 Proteine che si legano a filamenti di actina alterano la dinamica del filamento

Il comportamento dei filamenti è regolato da due classi di proteine di legame: quelle che si legano ai lati di un filamento e quelle che si legano alle terminazioni. Le proteine leganti ai lati includono la tropomiosina, una proteina che lega sei o sette subunità adiacenti lungo due scanalature del filamento elicale. Oltre a stabilizzare e irrigidire il filamento tale legame può impedire l'interazione con altre proteine. Un filamento di actina che smette di crescere e non è stabilizzato nella cellula depolimerizza rapidamente una volta che le molecole di actina idrolizzano il loro ATP. Il legame con proteine di incappucciamento o proteine CapZ stabilizzano il filamento alla terminazione più rendendola inattiva e riducendo il tasso di crescita e depolimerizzazione. Alla terminazione meno un filamento di actina può essere incappucciato dal complesso Arp 2/3. La tropomodulina si lega alla terminazione meno di filamenti incapsulati e stabilizzati da tropomiosina. Può incappare filamenti puri transientemente. Proteine che si legano al lato dei filamenti devono incapsulare l'intero filamento e pertanto essere presenti ad alte concentrazioni.

15.2.9 Proteine di separazione regolano la depolimerizzazione del filamento di actina

Un altro meccanismo di regolazione dipende da proteine capaci di rompere un filamento in filamenti più piccoli generando un grande numero di nuove terminazioni. Il destino di queste dipende dalla presenza di altre proteine accessorio. Sotto alcune condizioni le terminazioni nucleano l'allungamento, sotto altre la separazione promuove la depolimerizzazione. Oltre a questo la separazione rende il citoplasma più fluido. Una classe di tali proteine è la superfamiglia di gelsoline che sono attivate da alti livelli di Ca^{2+} citosolico. Le gelsoline interagiscono con il lato del filamento e contengono sottodomini che si legano a un sito esposto sulla superficie e uno nascosto tra subunità adiacenti. Secondo un modello la gelsolina si lega al lato del filamento fino a che una fluttuazione termica crea

un piccolo spazio tra subunità vicine in cui la gelsolina si inserisce per rompere il filamento. Dopo la rottura la gelsolina rimane attaccata al filamento e incappuccia la nova terminazione. In altra proteina destabilizzatrice è la cofilina che si lega lungo il filamento forzando un suo avvolgimento causando stress meccanico in modo che movimenti termici lo rompano più facilmente. La cofilina si lega principalmente a filamenti contenenti ADP in modo che i nuovi filamenti siano resistenti ad essa. Il filamento può essere protetto da essa grazie al legame con tropomiosina.

15.2.10 Insiemi di filamenti di actina di alto livello influenzano le proprietà meccaniche e la segnalazione della cellula

I filamenti di actina nelle cellule animali sono organizzati in diversi tipi di insiemi: reti dendritiche, fasci e reti simili a ragnatele. Le strutture sono iniziate dall'azione di distinte proteine nucleatrici: i filamenti delle reti dendritiche sono nucleate dal complesso Arp 2/3, mentre i fasci da formine. L'organizzazione strutturale delle reti dipende da proteine accessorio specializzate: strutture sono assemblate dalle proteine infascianti che uniscono i filamenti in insiemi paralleli e proteine formanti gel che uniscono due filamenti insieme ad un grande angolo creando una mesh più allentata. Entrambe le classi hanno siti di legame per l'actina simili formate da catene singole o dimeri. La separazione e ordinamento di questi domini determina il tipo di struttura di actina che la proteina forma. Ogni tipo di proteine infasciante determina quali altre molecole possono interagire con i filamenti di actina uniti. La miosina II è una proteina motrice che permette a fibre di stress e ad altri insiemi contrattili di contrarsi. L'impacchettamento di filamenti causato da fimbrina esclude la miosina rendendo il fascio non contrattile. La α -actinina unisce filamenti polarizzati in fasci allentati permettendo il legame di miosina. Queste due proteine sono mutualmente esclusive. Le proteine che legano filamenti possono avere connessioni flessibili o piegate tra i domini di legame, permettendo la formazione di reti o gel. Un esempio di queste è la spectrina.

15.3 Miosina e actina

Il citoscheletro ad actina può formare strutture contrattili che incrociano e fanno scorrere filamenti di actina tra di loro attraverso l'azione della miosina.

15.3.1 Proteine motrici basate sull'azione sono membri della superfamiglia miosina

La miosina II è una proteina allungata formata da due catene e due copie di due catene leggere. Ogni catena pesante ha un dominio globulare alla terminazione -N che contiene il macchinario che genera la forza seguito da una lunga sequenza che forma una bobina estesa che media la dimerizzazione delle catene pesanti. Le due catene leggere si legano strettamente alla testa -N terminale mentre le code creano fasci con le altre molecole di miosina. Queste interazioni coda a coda formano filamenti spessi con centinaia di teste di miosina orientate in senso opposto. Ogni testa idrolizza ATP per spostarsi verso la terminazione più di un filamento di actina. L'orientamento opposto delle teste causa lo scivolamento di filamenti di actina opposti verso di loro accorciando il muscolo. Nei muscoli scheletrici filamenti di actina si trovano in filamenti sottili circondati da miosina e lo scivolamento causa contrazioni potenti.

15.3.2 La miosina genera forza accoppiando l'idrolisi dell'ATP a cambi conformazionali

Le proteine motrici causano cambi strutturali nei siti leganti all'ATP per produrre interazioni cicliche con un filamento del citoscheletro. Ogni ciclo di legame con ATP, idrolisi e rilascio le propelle avanti in una singola direzione a un nuovo sito di legame lungo il filamento. Per la miosina II ogni passo è generato dall'agitazione di un' α -elica o braccio di leva stabilizzato dal legame delle catene leggere. Alla base del braccio vicino alla testa si trova un'elica simile a un pistone che connette i movimenti alla fessura che lega l'ATP nella testa a piccole rotazioni del dominio convertitore. Questi cambi conformazionali sono accoppiati a cambi dell'affinità per l'actina, permettendo alle teste di rilasciare il filamento per legarsi un punto successivo.

15.3.3 Lo scivolamento di miosina II lungo un filamento di actina causa la contrazione muscolare

Tutte le contrazioni muscolari dipendono dallo scivolamento guidato da ATP di insiemi di actina contro insiemi di filamenti di miosina II. Le fibre muscolari sono singole cellule grosse che si formano dalla fusione di diverse cellule. La grande cellula muscolare mantiene i molti nuclei che si trovano sotto la membrana plasmatica. Il citoplasma è formato da miofibrille, l'elemento contrattile. Le miofibrille sono strutture cilindriche lunghe come l'intera cellula muscolare che consiste di una catena ripetuta di unità contrattili dette sarcomeri. Ogni sarcomero è formato di un insieme di paralleli e in parte sovrapposti filamenti sottili e spessi. I filamenti sottili sono composti di actina e proteine associate e sono attaccati alla terminazione più a un disco Z alla fine di ogni sarcomero. La terminazione meno incappucciata si estende verso il centro del sarcomero dove si sovrappone ai filamenti spessi, assemblaggi bipolari formati da isoformi di miosina II. I filamenti di miosina sono ordinati in un reticolo di esagoni e sono spazati regolarmente. L'accorciamento del sarcomero è causato dai filamenti di miosina che scivolano lungo il filamento di actina senza cambi nella lunghezza di nessun filamento. I filamenti spessi bipolari camminano verso la terminazione più di due insiemi di filamenti sottili in direzioni opposti guidati da dozzine di teste indipendenti. Lo stretto legame con l'actina è fondamentale per una contrazione efficiente. Le proteine accessorio formano grande uniformità nell'organizzazione, lunghezza e distanza nel sarcomero. Le terminazioni più sono legate al disco Z creato da CapZ e α -actinina e incapsulano i filamenti impedendo depolimerizzazione mantenendoli in un insieme specifico. La lunghezza di ognuno di essi è determinata da nebulina che si allunga dal disco Z verso la terminazione meno di ogni filamento incappucciato e stabilizzato da tropomodulina. I filamenti di actina nei sarcomeri sono particolarmente stabili. Coppie opposte di titina posizionano i filamenti spessi a metà strada tra i dischi Z agendo come una molla molecolare e mantiene tali filamenti al centro del sarcomero permettendo alla fibra muscolare di ritornare alla posizione di riposo.

15.3.4 Un aumento nella concentrazione citosolica di Ca^{2+} inizia la contrazione muscolare

Le interazioni molecolari nei sarcomeri iniziano solo quando il muscolo è stimolato dal nervo. All'arrivo del segnale la cellula deve contrarsi molto rapidamente. Questo è permesso dal fatto che le teste motrici di miosina passano poco tempo del ciclo di ATP attaccate al filamento e generando forza attivamente, pertanto molte teste possono agire in rapida successione senza interferire. IN secondo luogo un sistema di trasporto inoltra il segnale all'intera cellula. Il segnale dal nervo causa un potenziale d'azione nella membrana plasmatica che si diffonde nei tubuli T che si estendono

verso l'interno lungo ogni miofibrilla. Il segnale è poi inoltrato lungo una fessura al reticolo sarcoplasmatico, un foglio di Er modificato che circonda ogni miofibrilla. L'azione di potenziale attiva un canale di Ca^{2+} nella membrana del T-tubulo e l'influsso di Ca^{2+} causa l'apertura di canali di rilascio di Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmatico che entra nel citosol dove inizia la contrazione di ogni miofibrilla. Successivamente il Ca^{2+} è velocemente ripompato nel reticolo sarcoplasmatico da una Ca^{2+} -ATPasi nella sua membrana. La concentrazione viene ripristinata dopo 30ms permettendo il rilassamento della miofibrilla. La dipendenza della contrazione dai comandi nervosi è dovuta a un'insieme di proteine accessorio come la forma muscolare di tropomiosina, la proteina che si lega lungo la fessura dell'elica dei filamenti di actina. Un'altra è la troponina, un complesso che si lega all'actina interferendo con il legame con le teste di miosina fino a che il livello di Ca^{2+} non si alza.

15.4 Microtubuli

I microtubuli sono filamenti altamente dinamici con diversi ruoli nella cellula. Sono polimeri della tubulina, un eterodimero formato da un α -tubulina e una β -tubulina globulari ognuno con un sito di legame per GTP. Quello nell' α -tubulina non può essere idrolizzato o scambiato, mentre l'altro monomero possiede un GTP o un GDP scambiabile. La tubulina si trova in isoformi multipli con diverse locazioni nella cellula e tessuti con diverse funzioni.

15.4.1 I microtubuli sono tubi vuoti fatti da protofilamenti

Un microtubulo è una struttura cilindrica vuota fatta da 13 protofilamenti paralleli composti da eterodimeri di $\alpha\beta$ -tubulina uniti testa a coda e poi piegati in un tubo. L'assemblaggio dei microtubuli crea due tipi di contatti proteina-proteina. Lungo l'asse longitudinale del microtubulo il top di una β -tubulina forma un'interfaccia con il sotto di una α -tubulina nell'eterodimero adiacente, interazione molto forte. Perpendicolarmente a queste i protofilamenti vicini formano contatti laterali principalmente tra monomeri dello stesso tipo. Un piccolo ritardo in contatti laterali crea un reticolo elicale di microtubuli. L'addizione e la perdita avviene quasi esclusivamente alle terminazioni dei microtubuli. Il gran numero di contatti tra le subunità rende i microtubuli rigidi e difficili da piegare. Tutte le subunità puntano nella stessa direzione e i protofilamenti sono allineati in parallelo. Il reticolo di microtubuli ha una polarità strutturale con le α -tubuline alla terminazione meno e le β alla terminazione più.

Capitolo 16

Il ciclo cellulare