

Biologia molecolare della cellula

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

30 novembre 2020

Indice

1	Introduzione	2
1.1	Microscopia	2
1.1.1	Tipi di microscopi	2
1.1.2	Tecniche di microscopia	3
1.2	Tecniche di laboratorio	4
1.2.1	Reazione a catena della polimerasi PCR	4
1.2.2	Elettroforesi	5
1.2.3	Blots	5
1.2.4	Tecniche di manipolazione del DNA	6
1.2.5	Cristallografia a raggi X	7
1.2.6	Altre che non so????	8
1.3	Figure importanti e loro lavori	8
1.3.1	Miescher	8
1.3.2	Mendel	8
1.3.3	Morgan	8
1.3.4	Griffith e Avery	8
1.3.5	Hershey e Chase	8
1.3.6	Watson e Crick	9
1.3.7	Mello e Fire	9
1.4	Cellula e genomi	9
1.4.1	Caratteristiche universali delle cellule	9
1.4.2	Differenze principali tra le forme di vita	11
2	DNA e RNA	12
2.1	Struttura del DNA	12
2.1.1	Interazioni tra basi	13
2.1.2	Conformazioni particolari	13
2.1.3	DNA superavvolto	13
2.2	Struttura del RNA	14
2.2.1	Modifiche dell'RNA	15
2.2.2	Metabolismo dello ione ferro	15
2.3	Organizzazione del DNA nel nucleo	16
2.4	Struttura cromatinica	16
2.5	Struttura del DNA	17
2.5.1	Modifiche dell'RNA	17
2.6	Struttura del DNA	18

2.7	Struttura dell'RNA	18
2.8	Interazioni tra basi	18
2.8.1	Temperatura di melting	18
2.9	Conformazioni particolari	19
2.9.1	Tripla elica	19
2.9.2	La struttura cruciforme	19
2.10	DNA superavvolto	19
2.10.1	Topoisomerasi	19
2.11	Modifiche post-traduzionali	20
2.11.1	Fosforilazione	20
2.11.2	Acetilazione	20
2.11.3	Metilazione	20
2.11.4	Ubiquitinazione	20
2.11.5	Sumoilazione	21
2.12	Come il DNA viene organizzato nel nucleo: cromatina	21
2.12.1	Cromatina	22
2.12.2	Istoni e prime fasi di compattamento del DNA	23
2.12.3	Sindrome di Rett	25
2.13	Struttura dell'RNA	26
3	Replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri	29
3.1	Mutazioni	29
3.2	Modello di duplicazione	29
3.2.1	Modello semi-conservativo	29
3.2.2	Modello conservativo	30
3.2.3	Modello dispersivo	30
3.3	Lezione 7	31
3.3.1	Formazione del complesso di prereplicazione alle origini di replicazione	33
3.3.2	Istoni	34
3.3.3	Telomeri	34
3.4	Lezione 8	35
3.4.1	Mitocondri	35
4	Trascrizione	36
4.1	Struttura delle RNA polimerasi	37
4.2	Inizio	38
4.2.1	Meccanismo di trascrizione	38
4.3	Allungamento	38
4.4	Terminazione	39
4.4.1	Terminazione in eucarioti	40
4.5	Trasporto nucleare	40
4.6	Lezione 10	41
4.6.1	Operone triptofano	42

5	Splicing	43
5.1	Capping	43
5.2	Poliadenilazione	44
5.3	Splicing	45
5.4	Introni catalitici di gruppo 1	46
5.5	Introni autocatalitici del gruppo 2	46
5.6	Introni spliceosomali del pre-mRNA nucleare	46
5.7	Minigeni	47
5.8	RNA editing	49
5.8.1	Editosoma	49
5.9	Essay per editing	50
6	Trasporto e localizzazione dell'RNA	52
7	Traduzione	56
7.1	Biogenesi dei ribosomi	57
8	Segnalazione cellulare: trasduzione del segnale	61
8.1	Effetto dell'acetilcolina sul cuore	67
8.2	Recettori del sistema olfattivo	68
8.3	Trasduzione visiva	68
8.4	Lezione 16	69
8.5	Recettori ad attività enzimatica intrinseca	72
8.5.1	recettori associati a tirosina chinasi	72
9	Membrana	74
10	Organelli	76
10.1	Trafficking tra nucleo e citoplasma	78
10.1.1	Trasporto in mitocondri e plastidi	81
10.2	Perossisomi	82
10.3	Reticolo endoplasmatico	83
10.4	Traffico intracellulare di vescicole	88
10.5	Apparato del Golgi	91
10.6	Lisosomi	92
10.7	Endosomi	93
11	Citoscheletro	97
11.1	Actina	97
11.2	Microtubuli	101
11.3	Filamenti intermedi	103
11.4	Movimento cellulare	104
12	Esperienza di laboratorio	106
12.1	Giorno 1 - esame di uno striscio di sangue	106
12.1.1	Descrizione	106
12.1.2	Allestimento di uno striscio	106
12.1.3	Qualità dello striscio	107
12.1.4	Colorazione dello striscio	107

12.1.5	Esame dei vetrini	108
12.2	Giorno 2 - estrazione di proteine e DNA	112
12.2.1	Cellule <i>Hela</i>	112
12.2.2	Estrazione di proteine	113
12.2.3	Estrazione di DNA	115
12.3	Giorno 3 - Colture cellulari	117
12.3.1	Disgregazione del tessuto	117
12.3.2	Coltura primaria	117
12.3.3	Linea cellulare	117
12.3.4	Morfologia della coltura cellulare	117
12.3.5	Età delle colture	118
12.3.6	Ottenere una coltura cellulare	118
12.3.7	Applicazioni della coltura cellulare	118
12.3.8	Ambiente cellulare - terreno di coltura	119
12.3.9	Contenitori e strumenti per le colture cellulari	119
12.3.10	Area di lavoro	120
12.3.11	Mantenimento delle cellule	122
12.3.12	Esercitazione	122
12.4	Giorno 4 - Colorazione di organelli citoplasmatici	123
12.4.1	Fluorescenza	123
12.4.2	Scopo dell'esercitazione	124
12.4.3	Reticolo endoplasmatico	124
12.4.4	Mitocondri	125
12.4.5	Membrana citoplasmatica	125
12.4.6	Citoscheletro	126
12.4.7	Nucleo	126
12.4.8	Colorazione vitale	126
12.5	Laboratorio 4	126

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Microscopia

1.1.1 Tipi di microscopi

1.1.1.1 Microscopi ottici

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

- In base al numero di lenti ingrandenti:
 - Semplici: una sola lente.
 - Composti: più lenti, in tal caso la capacità di ingrandimento totale è data dal prodotto delle capacità di ingrandimento.
- In base alla luce che utilizzano:
 - In campo chiaro: la luce attraversa direttamente il campione.
 - A contrasto di fase: permette di distinguere caratteristiche del campione senza colorarlo basandosi sui diversi indici di rifrazione tra il campione e il mezzo circostante: la luce deviata dal campione e quella no viene fatta convergere su una superficie in modo che abbia lunghezza d'onda e frequenza diverse rispetto alla luce incidente mettendo in evidenza i bordi.
 - A contrasto di interferenza differenziale: a differenza di quello a contrasto di fase il campione viene illuminato di lato, eliminando l'alone di diffrazione luminoso.
 - In campo scuro: simile a quella a contrasto di fase, ma solo la luce che ha attraversato il campione viene raccolta dall'obiettivo che appare pertanto chiaro in campo scuro.
 - A fluorescenza: si compone di:
 - * Lampada ad arco a vapori di mercurio: lampada che genera luce ultravioletta.
 - * Filtro di eccitazione: seleziona la lunghezza d'onda ultravioletta che si vuole generare.
 - * Condensatore a campo oscuro: aumenta il contrasto delle strutture legate dalle molecole fluorescenti in modo che lo sfondo sia nero.

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

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

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

1.1.1.2 Microscopi elettronici

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

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

1.1.2 Tecniche di microscopia

1.1.2.1 Microscopia in campo chiaro

1.1.2.2 Immunoistochimica

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

1.1.2.3 FRET

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

1.1.2.4 Biomolecular fluorescent complementation

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

1.1.2.5 Photobleach

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

1.1.2.6 Fotoattivazione

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

1.2 Tecniche di laboratorio

1.2.1 Reazione a catena della polimerasi PCR

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

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

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

1.2.2 Elettroforesi

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

1.2.3 Blots

1.2.3.1 Southern blot

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

1.2.3.2 Western blot

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

1.2.3.3 Northern blot

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

1.2.4 Tecniche di manipolazione del DNA

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

1.2.4.1 Sequenziamento del DNA

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

1.2.4.2 Clonaggio del DNA

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

1.2.4.3 Transfezione

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.4.4 Immunoprecipitazione

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

1.2.5 Cristallografia a raggi X

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

1.2.6 Altre che non so????

1.3 Figure importanti e loro lavori

1.3.1 Miescher

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

1.3.2 Mendel

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

1.3.3 Morgan

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

1.3.4 Griffith e Avery

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

1.3.5 Hershey e Chase

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

1.3.6 Watson e Crick

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

1.3.7 Mello e Fire

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

1.4 Cellula e genomi

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

1.4.1 Caratteristiche universali delle cellule

1.4.1.1 Dinamicità

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

1.4.1.2 Informazione

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

1.4.1.3 Riproduzione

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

1.4.1.4 Struttura

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

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

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

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

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

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

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

1.4.1.4.2.5 Lisosomi Sede della degradazione delle proteine.

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

1.4.1.5 Funzione

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

1.4.2 Differenze principali tra le forme di vita

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

1.4.2.1 Mutazioni

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

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

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

Capitolo 2

DNA e RNA

2.1 Struttura del DNA

Il DNA è la macromolecola responsabile della conservazione dell'informazione genica. Si trova nel nucleo delle cellule eucarioti e ed ancorata alla membrana delle cellule procarioti. È costituita da due catene polinucleotidiche disposte antiparallelamente. Le catene sono formate da monomeri, quattro nucleotidi legati tra di loro da un legame fosfodiesterico che libera acqua alla sua formazione. I nucleotidi sono formati dallo zucchero 2'-deossiribosio (nucleoside), un gruppo fosfato e una base azotata. La presenza del gruppo OH libero sullo zucchero in 3' permette la creazione del legame fosfodiesterico con il prossimo nucleotide nell'elemento H sul gruppo fosfato del prossimo. La catena presenta pertanto un backbone zucchero-fosfato con polarità negativa esterna e il legame forma una polarità dando alla molecola una terminazione 5' e una 3'. La base azotata è la parte che differisce per i quattro nucleotidi e pertanto conserva l'informazione, che vengono divisi in purine (Adenina e Guanina) formate da due anelli e le pirimidine (Timina e Citosina) formate da un unico anello. Ogni base azotata forma legami a idrogeno con la complementare con il polinucleotide complementare nella catena opposta: adenina con timina (2 legami a idrogeno) e guanina con citosina (3 legami a idrogeno). È la natura idrofobica delle basi e i legami a idrogeno che conferiscono stabilità alla doppia elica. Le basi possono formare appaiamenti non canonici (basi di Hoogsteen) in cui le basi non sono complanari e si formano due legami a idrogeno tra *C* e *G* a causa della rotazione dell'anello pirimidinico che rende il DNA meno stabile. Le basi non sono in posizione fissa ma possono roteare l'una sull'altra (twist), inclinarsi sull'asse maggiore (roll) o lungo l'asse minore (tilt). Le due catene disposte antiparallelamente formano una doppia elica che presenta un solco maggiore di 22Å che facilita l'accesso delle proteine e uno minore di 12angstrom. Il DNA si può osservare in tre forme in base all'ambiente in cui si trova:

- Forma A: si forma a causa della riduzione della quantità d'acqua, presenta una struttura tarchiata con 11 basi per giro e una scanalatura principale più profonda.
- Forma B: la forma canonica cristallizzata da Franklin con 10 paia di basi per giro.
- Forma Z: si forma in zone particolari ricche di *C* e *G* con 12 paia di basi per giro, la scanalatura principale è poco profonda rendendo le basi più prone alla metilazione e pertanto presente nelle zone promotrici dei geni.

2.1.1 Interazioni tra basi

2.1.1.1 Chargaff

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

2.1.1.2 Temperatura di melting

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

2.1.2 Conformazioni particolari

2.1.2.1 Tripla elica

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

2.1.2.2 Struttura cruciforme

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

2.1.3 DNA superavvolto

Il DNA tende a formare dei superavvolgimenti, ovvero ad assumere strutture spaziali particolari che pongono stress sulla doppia elica. I superavvolgimenti vengono descritti in termini matematici e lo studio dello stato di avvolgimento del DNA è di interesse in quanto va a influire sui meccanismi di trascrizione e replicazione. Lo stato di superavvolgimento si descrive attraverso due parametri: twist (frequenza) che indica quante volte un filamento si avvolge sull'altro e il writhe, il numero di superavvolgimenti che si vengono a formare. Un DNA lineare presenta un writhe pari a 0 e un twist n dipendente dalla sua lunghezza. Le misure di twist e writhe vengono combinate nel linking number, dove $Lk = Tw + Wr$. Il writhe può assumere un valore positivo o negativo a seconda che il superavvolgimento sia rispettivamente destrorso o sinistrorso. Il linking number tende a rimanere costante e pertanto variazioni di uno dei due parametri portano ad un bilanciamento nell'altro. Molti meccanismi (come replicazione e trascrizione) vanno a modificare il twist del DNA andando

pertanto ad introdurre writhe e a stressare la molecola che tenderà a superavvolgersi per tornare ad una struttura stabile ottimale. Un aumento incontrollato del writhe rende sempre più difficoltoso il procedere di questi meccanismi che pertanto richiederanno l'aiuto di enzimi che diminuiscono i superavvolgimenti in modo da poter continuare.

2.1.3.1 Topoisomerasi

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

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

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

2.2 Struttura del RNA

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

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

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

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

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

2.2.1 Modifiche dell'RNA

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

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

2.2.2 Metabolismo dello ione ferro

Le strutture secondarie dell'RNA sono importanti per la regolazione dello ione ferro. Questo va controllato in quanto molto reattivo con l'ossigeno (reazione di Fenton) e produce radicali liberi che potrebbero danneggiare il DNA. Un suo eccesso nella cellula va pertanto evitato attraverso meccanismi di regolazione. Il ferro viene introdotto nella cellula grazie a recettori per la transferrina che legano la transferrina, una molecola che si lega al ferro presente nel torrente circolatorio. Quando il recettore si lega alla transferrina viene internalizzato attraverso una vescicola endocitotica che matura in endosoma che grazie a una riduzione del *pH* permette il distacco dello ione ferro dalla transferrina che torna in membrana insieme al recettore e viene poi rilasciata nel torrente circolatorio. Lo ione ferro rilasciato nel citoplasma viene usato come attivatore o coattivatore di enzimi. Lo ione in eccesso viene legato dalla ferritina che lo mantiene silente impedendo che venga coinvolto in reazioni pericolose. Si nota pertanto come in carenza di ferro si devono aumentare i recettori per la transferrina e diminuire i livelli di ferritina nel citoplasma, mentre in eccesso il contrario.

2.2.2.1 Meccanismo di regolazione

Il meccanismo di regolazione è post trascrizionale e avviene a carico degli RNA per recettore e ferritina. L'aconitasi è una RNA binding protein e si lega nella regione a monte del gene della ferritina e a valle per la transferrina. Quando l'aconitasi si lega agli RNA va a bloccare il reclutamento dei ribosomi sull'mRNA creando una struttura a stem loop bloccando la produzione della ferritina. Contemporaneamente si lega nella regione 3' *UTR* (untranslated region) del recettore stabilizzandolo e aumentando l'efficienza della sua traduzione. In presenza di ferro l'aconitasi si stacca dall'mRNA diminuendo la stabilità del gene del recettore ed eliminando la struttura a forcina aumentando la traduzione della ferritina.

2.3 Organizzazione del DNA nel nucleo

Se i procarioti presentano un DNA circolare negli eucarioti il DNA rimane lineare separato in cromosomi. Le lunghe catene devono compattarsi per potersi trovare nel nucleo. Lo stato di compattamento del DNA deve essere necessariamente dinamico per permettere l'accesso a fattori di trascrizione e replicazione.

2.4 Struttura cromatinica

Il DNA eucariotico è molto lungo e deve stare in uno spazio molto ristretto. Si rende pertanto necessario un compattamento complesso e dinamico in quanto deve comunque permettere tutti gli eventi di trascrizione e replicazione necessari alla proliferazione della cellula.

I nucleotidi sono caratterizzati da una base azotata e zucchero (nucleoside) e dal fosfato. Si trovano quattro nucleotidi (adenina, citosina, timina e guanina), sono legati tra di loro da un legame fosfodiesterico che libera una molecola d'acqua nel momento in cui si forma. È legato alla presenza di un gruppo OH libero su un nucleotide e un gruppo H su quello adiacente. Il DNA presente in tutte le cellule si trova a doppio filamento. All'interno della catena si distingue una catena stampo e una neo sintetizzata durante il processo di duplicazione. La struttura a doppia elica è caratterizzata dalle basi azotate all'interno e lo scheletro di zuccheri e fosfati all'esterno in quanto le basi azotate sono idrofobiche e tendono ad interagire tra di loro. Il DNA è pertanto molto stabile e può essere preservato nel tempo. Le basi sono molto vicine. La stabilità rende difficile il trasferimento dell'informazione in quanto richiede il distacco dei due filamenti al fine di permettere l'introduzione di proteine dedicate alla sintesi degli RNA messaggeri. Quando una cellula va incontro a divisione deve duplicare il proprio DNA e questo avviene nel meccanismo di duplicazione del DNA semi conservativa: i due filamenti di DNA si staccano e fungono da stampo per il filamento neo-sintetizzato. Questo avviene in quanto le basi tendono a interagire tra di loro specificatamente (C-G, tre legami a idrogeno, A-T, due legami a idrogeno). Ogni cellula figlia possiede un filamento proveniente dalla cellula madre e uno di nuova sintesi. Le mutazioni possono avvenire in una qualsiasi delle cellule figlie o avvenire nella cellula madre. La replicazione permette la trasmissione delle informazioni, mentre la trascrizione permette la trascrizione di DNA in RNA. Esistono diversi tipi di RNA: messaggeri, quelli usati per la produzione delle proteine e altri RNA con una funzione regolatoria importante come i microRNA, i long-non-coding-RNA, gli RNA circolari con un ruolo nell'espressione genica e RNA coinvolti in altri processi come i tRNA che contengono attaccato un amminoacido e lo portano sui ribosomi per produrre le proteine. Esistono inoltre gli rRNA (RNA ribosomiali) che formano i ribosomi, la macchina traduttrice della cellula che unisce le proteine e funzione nella sintesi proteica (RNA molecola catalitica in grado di scindere e creare legami). Il processo trascrizionale è complesso e può andare in contro a variazioni (trascritti alternativi). Le modifiche cui l'RNA può andare incontro dopo la trascrizione sono alla base della variabilità genetica. Si possono avere diversi tipi di RNA messaggeri dalla stessa informazione nel DNA attraverso questi meccanismi e creare molti trascritti. L'RNA è una molecola a filamento singolo ma può assumere delle strutture secondarie importanti a causa della complementarità delle basi che possono interagire tra di loro e formare strutture a doppia elica accompagnate da elementi a elica singola, importante in quanto conferiscono stabilità e possono essere riconosciute da proteine che legano queste strutture per la protezione o importanti per il controllo della traduzione dell'RNA o il trasporto. L'acquisizione della struttura secondaria è importante in quanto permette la formazione del sito catalitico in cui svolgono la propria porzione. Il sito del lisozima (degrada catene polisaccaridi) in particolare lega una catena di polisaccaride che causa un cambio conformazionale che facilita la rottura e l'attività enzimatica del lisozima.

2.5 Struttura del DNA

Le basi del DNA vengono divise in purine (Adenina e Guanina) con due anelli e le pirimidine (Citosina, Timina e uracile) con un anello. Queste sono le basi canoniche, ma ne esistono altre nell'RNA che possono modificarsi in modo che possa assumere funzioni particolari. Alcune basi del tRNA possono subire modifiche post-trascrizionali e nel mRNA che comportano cambio di proprietà e funzioni. Questo meccanismo di modifica si dice RNA editing. CRISPR Cas modifica di una o più basi all'interno del DNA. Esiste un complesso detto editosoma nei parameci che modifica l'RNA e avviene anche a livello dei mammiferi negli RNA che producono recettori nel sistema nervoso. L'editing dell'RNA non va contro il dogma centrale della biologia molecolare in quanto si modifica l'RNA dopo che è stato tradotto e non si modifica il DNA. Gli zuccheri sono diversi DNA: 2'-deossiribosio e RNA ribosio in modo che sia in grado di assumere strutture secondarie. È presente il gruppo fosfato. Le basi come Adenina e Guanina possono essere usate anche come molecole energetiche: ATP e GTP che portano avanti reazioni della cellula e sono precursori dei messaggeri secondari: cAMP e cGMP. Si tratta di molecole prodotte in particolari condizioni e aumentano il segnale. Chargaff riuscì ad osservare che il DNA aveva una composizione uguale all'interno delle cellule di uno stesso organismo anche di tessuti diversi, mentre organismi diversi avevano una composizione del DNA diversa. Il numero di residui A e T era uguale così come il numero di C e G all'interno della stessa molecola, permettendo a Watson e Crick di formare il modello e definire l'interazione tra le basi. La composizione del DNA di un organismo: percentuale di basi pirimidiniche o puriniche differisce: organismi che vivono in temperature elevate hanno un contenuto elevato hanno una percentuale maggiore di C e G in quanto la loro interazione coinvolge una formazione di un maggior numero di legami a idrogeno rispetto a A e T, pertanto il DNA è più stabile. Le regole di Chargaff non valgono per l'RNA in quanto non è a doppia elica ma a singolo filamento, ma può comunque formare strutture secondarie nella presenza di regioni con interazioni tra le basi complementari.

2.5.1 Modifiche dell'RNA

L'inosina è una base azotata che viene riconosciuta come G e può appaiarsi con la C. Un'altra modifica è la 7-metil guanosina, la metilazione della guanosina che avviene in tutti gli mRNA una volta sintetizzati nella prima base e viene riconosciuta dalla cap-binding protein che legandosi all'RNA messaggero lo stabilizza e aiuta il processo di traduzione. Altre modifiche sono la pseudouridina e la tiouridina. Si dice nucleoside la base legata allo zucchero, con un fosfato vengono detti nucleotidi. La trasformazione dell'ATP in cAMP, una molecola importante in quanto messaggero secondario portato avanti dall'adenilato ciclasi che favorisce la formazione di un anello con la liberazione di pirofosfato e l'anello dà il nome alla molecola. Il pirofosfato viene poi scisso. Un altro enzima detto fosfodiesterasi che utilizzando acqua rompe l'anello e trasforma il cAMP in AMP che non è un messaggero secondario. Un discorso analogo con guanil ciclasi forma il cGMP. Le basi dei nucleotidi vengono unite da un legame fosfodiesterico che consiste nell'interazione tra un gruppo OH e quello fosfato tra il nucleotide adiacente e libera pirofosfato. È un legame molto stabile. Si forma pertanto il legame fosfodiesterico che conferisce la polarità al filamento 5' – 3' che è importante in quanto il meccanismo di duplicazione avviene in direzione 5' – 3' con la presenza di un gruppo OH libero per avvenire. La polarità è importante anche per i fenomeni di trascrizione.

2.6 Struttura del DNA

Il DNA ha una struttura stabile, stabilità legata alla natura idrofobica tra le basi e le interazioni tra di loro grazie alla formazione di legami a idrogeno. Nel caso tra A e T si formano due legami a idrogeno, mentre tra C e G se ne formano tre. Ci sono degli accoppiamenti non canonici (coppie di basi di Hoogsteen) che interagiscono tra di loro ma non sono complanari con una rotazione dell'anello pirimidinico che forma un numero diverso di legami a idrogeno (2) per C e G che rende il DNA meno stabile. Le basi non sono fisse ma tendono a muoversi tra di loro: twist: basi adiacenti roteano l'una sull'altra, roll, si inclinano lungo l'asse maggiore e tilt inclinano lungo l'asse minore. Possono avere ruolo fondamentale nei meccanismi di trascrizione. Il giro d'elica è di circa 10 paia di basi e 34 armstrong con 10 armstrong di diametro, con un solco minore di 12 e uno maggiore di 22 armstrong. Molti fattori trascrizionali si inseriscono nel solco maggiore che facilita l'accesso alle proteine. Queste proteine sono caratterizzate da domini ad alfa elica, responsabile delle interazioni con il solco maggiore. Il DNA assume questa struttura in condizioni fisiologiche, forma B, struttura cristallizzata dalla Franklin. Vi sono altre due strutture, la struttura A più tarchiata e si forma nella riduzione della quantità di acqua e aumento della salinità, le coppie di basi sono più angolate rispetto al piano della doppia elica e ci sono 11 basi per giro, la scanalatura principale è più profonda, è poco presente nel DNA, più presente nell'RNA. La struttura Z è peculiare, identificata nelle zone con sequenze ricche in C e G che tendono a formarla che presenta 12 paia di basi per giro d'elica, molto più stretta e allungata rispetto alla B. La scanalatura principale è poco profonda. In queste zone che si trovano nelle zone promotrici dei geni, in quanto possono essere modificate con metilazioni. Ogni fosfato ha una carica negativa rendendolo polare. La specificità della relazione tra le basi garantisce la complementarità tra le basi.

2.7 Struttura dell'RNA

L'RNA assume una struttura A in quanto si trova un maggiore ingombro sterico legato al gruppo OH del ribosio che facilita l'idrolisi dei legami fosfodiesterici e si rompe più facilmente rispetto al DNA, un bene in quanto la funzione dell'RNA è la produzione di proteine e pertanto devono essere degradati. L'RNA può essere stabilizzato dal legame con proteine che impediscono la rottura del legame fosfodiesterico.

2.8 Interazioni tra basi

2.8.1 Temperatura di melting

Aumentando la temperatura si rompono i legami a idrogeno per rompere le basi. Per stabilire se due DNA sono più o meno stabili: si usa uno spettrofotometro: il DNA a doppia elica assorbe a $260nm$, mano a mano che si denatura l'assorbimento tende ad aumentare. Prendendo il DNA, mettendolo in una provetta e osservando l'assorbanza e aumentando la temperatura si osserva come questo valore cambia. La temperatura in cui metà del DNA è denaturato viene detta temperatura di melting. Attraverso questo tipo di analisi si può determinare la percentuale di legami di guanina e citosina determinando quale DNA è più stabile.

2.9 Conformazioni particolari

2.9.1 Tripla elica

2.9.2 La struttura cruciforme

Stem-loop o a forcina. Si formano dove ci sono sequenze palindromiche: sequenza di basi ripetuta e invertita nella sequenza invertite. Deleterie per i processi in quanto molto stabili. Se rendono l'mRNA e il DNA stabili possono creare problemi durante i meccanismi di duplicazione e trascrizione che comportano la dissociazione delle due catene.

2.10 DNA superavvolto

Il DNA tende a formare superavvolgimenti che sono caratteristiche del DNA e possono essere descritte in termini matematici. Questa tematica va a impattare sui meccanismi di trascrizione e duplicazione. Si dice twist (frequenza), quante volte un filamento si avvolge sull'altro. Si dice writhe l'indice del numero di superavvolgimenti che si vengono a formare. Questi due parametri stanno alla base dello studio dei meccanismi di superavvolgimento. Un DNA lineare ha un writhe pari a 0 e un twist n , ovvero quante volte un filamento si avvolge sull'altro. Twist e writhe sono legati dal linking number, $Lk = Tw + Wr$. Il DNA superavvolto ha un writhe diverso da zero. Il superavvolgimento può essere positivo (destrorso) o negativo (sinistrorso). Il DNA tende a mantenere il linking number costante quando si varia il twist introducendo del writhe. Quando aumento il linking number il DNA diventa superavvolto e si deve introdurre un writhe number negativo e viceversa. Può capitare che un DNA che si trova in condizioni stabili possa andare incontro a fenomeni che alterino il twist number e pertanto per tornare in una condizione stabile tende a superavvolgersi (aperture di bolle di trascrizione e duplicazione) in modo che ritorni ad una struttura stabile ottimale. Quando questo avviene i superavvolgimenti possono bloccare il meccanismo. Pertanto a questo punto intervengono le topoisomerasi.

2.10.1 Topoisomerasi

Sono proteine che intervengono per risolvere i superavvolgimenti indotti nel twist. Sono famiglie di proteine con il compito di tagliare il DNA. Sono di due famiglie: di tipo I presenti sia nei batteri che eucarioti che archei e il tipo II presenti negli eucarioti e hanno la capacità di rilassare il DNA che è andato incontro al superavvolgimento. Quelle di tipo I non richiedono ATP quelle di tipo II lo richiedono. Sono diverse nel modo in cui lo tagliano. Quelle di tipo I hanno un dominio di interazione del DNA (alfa elica) a pinze che si legano nel punto con il superavvolgimento, tagliano uno dei due filamenti, favoriscono il passaggio di un'estremità da una parte e poi lo rilegano. Non usano ATP in quanto la risoluzione del superavvolgimento in questo caso è favorita dal punto di vista energetico. Nel tipo II viene tagliato il doppio filamento e sono dei dimeri con due cancelli uno N e uno C e un cancello per il DNA. Una volta che è stato tagliato il doppio filamento un altro viene alloggiato nel cancello N che si chiude e causa un cambio conformazionale che fa passare il filamento sopra nel cancello C sotto, rilasciato e il doppio filamento rotto viene risaldato aumentano o diminuiscono il linking number di 2. Nelle topoisomerasi di tipo I contiene nel sito catalitico una tirosina con un gruppo OH che altamente reattivo attacca e rompe il legame fosfodiesterico ma la topoisomerasi rimane attaccata al filamento. Il superavvolgimento viene risolto e si riforma il legame fosfodiesterico usando il gruppo OH e si ha la rottura della tirosina. Alcuni dei farmaci hanno come target le topoisomerasi come la camptotecina la topoisomerasi di tipo I ed è utilizzata

per il trattamento al cancro delle ovaie e del colon. Il DNA viene tagliato e si blocca la fase di cucitura e pertanto il taglio risulta permanente e le cellule muoiono. Sensibile per le cellule tumorali in quanto hanno alti livelli di telomerasi. Possono agire anche sulle cellule normali e hanno effetti su quelle cellule con un elevato tasso di mitosi come globuli bianchi, follicoli piliferi tratto gastro intestinali.

2.11 Modifiche post-traduzionali

Sono modifiche che avvengono sulle proteine e ne modificano l'attività e funzione, localizzazione, inibire o aumentarne l'attività o il turnover. Le proteine vengono degradate con il tempo più o meno velocemente.

2.11.1 Fosforilazione

La fosforilazione è l'aggiunta di un gruppo fosfato da enzimi detti chinasi. È una modifica reversibile. L'enzima che la toglie è la fosfatasi.

2.11.2 Acetilazione

Aggiunta di un gruppo acetilico attraverso acetiltransferasi che viene rimosso da deacetilasi.

2.11.3 Metilazione

Aggiunta di un gruppo metilico attraverso metiltransferasi e una demetilasi che lo rimuove.

Normalmente queste modifiche avvengono a carico di amminoacidi particolari a carico di una lisina, fosforilazione serina, treonina, metilazione avviene alla lisina. Vi sono dei programmi che permettono di identificare dove queste modifiche possono avvenire. Queste modifiche avvengono a tutte le proteine citoplasmatiche e nucleari. Ci sono delle chinasi e acetiltransferasi nucleari e altre che si trovano nel citoplasma.

2.11.4 Ubiquitinazione

Aggiunta di un gruppo di ubiquitina, un polipeptide che viene aggiunto grazie a degli enzimi particolari e che cambia il turnover della proteina. Una proteina che va incontro a ubiquitinazione va incontro a degradazione. Questa modifica avviene grazie all'attivazione dell'ubiquitina ad opera dell'enzima E1 a cui segue l'attivazione e reclutamento di E2 e E3 con funzioni diverse. La proteina bersaglio contiene la lisina, l'unico amminoacido che va incontro a ubiquitinazione. Gli enzimi prendono l'ubiquitina e la legano alla proteina bersaglio alla lisina. Possono essere legate n molecole alla proteina (poliubiquitinata). Questa modifica cambia di molto il peso molecolare della proteina ed è possibile vedere sul gel la modifica di questo tipo. La proteina poliubiquitinata viene portata al proteasoma, un complesso 26s costituito da un nucleo (cilindro cavo), un cappuccio d'entrata e uno d'uscita. Nel cappuccio d'entrata si trova il recettore Rpn10 che riconosce l'ubiquitina e permette e forza la proteina ad entrare all'interno del proteasoma. La coda rimane al di fuori. L'ubiquitina pertanto non viene degradata e rimarrà disponibile. Gli amminoacidi escono alla fine dal cappuccio d'uscita. La isopeptidasi Ppn11 ha lo scopo di staccare la coda poliubiquitina. Si noti come l'ubiquitina è irreversibile. Non tutte le proteine contenenti lisina possono essere degradate in quanto ci devono essere a valle e a monte altri amminoacidi specifici.

2.11.5 Sumoilazione

Meccanismo analogo e simile all'ubiquitina. Si tratta dell'aggiunta del polipeptide con l'attivazione di enzimi che lo vanno attaccare alla proteina e come nel caso dell'ubiquitinazione ci può essere polisumoilazione. Questo processo non comporta necessariamente degradazione della proteina. Normalmente viene utilizzata per modificare attività o localizzazione di una proteina specifica. Si lega sempre su una lisina. I substrati di SUMO si trovano nei pori nucleari per modificare il traffico nucleare cambiando permeabilità o specificità. Nei fattori di trascrizione influisce nell'espressione genica, nelle proteine nella riparazione e replicazione del DNA influenzando sulla stabilità genomica e nel citocore e centromeri influisce sull'integrità cromosoma. La sumoilazione è reversibile e quando deregolata può essere alla base di malattie neurodegenerative, tumori, diabete, eccetera. È importante per progressione del ciclo cellulare, sopravvivenza, divisione e proliferazione cellulare, differenziamento e invecchiamento. Avvengono su domini critici: per fattori di trascrizione nei domini di legame del DNA o la sequenza che permette alle proteine di entrare nel nucleo. La sumoilazione può agire sulla funzione di una proteina coinvolta nella riparazione del DNA timina-DNA glicosilasi che scansiona il DNA e quando trova una U lo rimuove e va incontro a sumoilazione che determina il distacco con il DNA e favorisce l'introduzione di un altro fattore che va a chiudere il gap mettendo la base corretta. Sumo può essere rimosso e TDG torna a funzionare.

2.12 Come il DNA viene organizzato nel nucleo: cromatina

A differenza dei batteri con DNA circolare il DNA eucariotico è molto lungo e deve stare in uno spazio molto ristretto. Il compattamento del DNA nel nucleo è complesso dal punto di vista strutturale in quanto un DNA troppo compatto rende difficile l'accesso per i fattori trascrizionali o di replicazione. Il compattamento del DNA coinvolge una serie di eventi e proteine. Gli istoni sono una famiglia di proteine molto conservata. Quattro istoni H2-H4, H2A e H2B formano la core particle istonica attorno a cui si avvolge il filamento di DNA (due giri e mezzo). Vanno incontro a fosforilazione, acetilazione, ubiquitinazione e metilazione. Normalmente durante le prime fasi di assemblamento le code istoniche sono acetilate che impedisce a due core particles di associarsi in maniera molto stretta. Quando si vuole aumentare il grado di compattamento si deve rimuovere l'acetilazione attraverso la deacetilasi che favorisce l'avvicinamento e il compattamento dei core istonici. La struttura base istone più DNA si chiama nucleosoma. Più nucleosomi deacetilati si uniscono formando strutture che si avvolgono tra di loro riuscendo ad entrare e trovare posto all'interno del nucleo. Tutte le cellule contengono gli istoni e nel caso degli spermatozoi invece degli istoni si trovano le protammine che hanno la funzione di ultracompatte il DNA in quanto la loro funzione è quella di viaggiare per lunghe distanze in modo da facilitare questa funzione. Ci può essere compattamento a zig-zag e a solenoide. Per caratterizzare il DNA avvolto attorno al nucleosoma si tratta di una tecnica che consiste di digerire il DNA in maniera blanda preservando il DNA attaccato agli istoni. La parte proteica dei nucleosomi viene rimossa e viene sequenziato per determinare se esiste una sequenza precisa a cui si legano i nucleosomi. Gli istoni hanno legame non specifico anche se dove ci sono pezzi di DNA trascritti in maniera elevata si assiste ad una specificità di legame degli istoni con quelle regioni di DNA. Il compattamento influisce su replicazione, ricombinazione, trascrizione, riparazione e segregazione. Le modifiche post traduzionali possono avere conseguenze per questi processi, attivandoli o inibendoli.

2.12.1 Cromatina

In base al compattamento della cromatina si distingue in eucromatina e eterocromatina divisa in costitutiva o facoltativa. L'eucromatina si trova in uno stato di scarsa compattezza a differenza dell'eterocromatina in uno stato più elevato di condensazione. Si dice costitutiva l'eterocromatina sempre compatta e rappresenta la funzione di genoma senza capacità codificante che non viene mai espressa e si parla di cromatina con ruolo strutturale nei cromosomi. L'eterocromatina facoltativa è in uno stato molto condensato e in determinate condizioni ha capacità condensanti. Vi sono regioni che durante lo sviluppo passano da eucromatina ad eterocromatina facoltativa. Il cromosoma X in una delle coppie viene in parte condensato in eterocromatina. Uno dei due cromosomi X viene parzialmente inattivato e si forma il corpo di Bar nelle cellule femminili. L'eterocromatina appare molto più scura alla microscopia elettronica. L'eterocromatina è più presente nella periferia attaccata alla membrana nucleare mentre l'eucromatina nella parte più interna. Il genoma dei procarioti è costituito da un genoma circolare che assume strutture secondarie. Forma strutture detti nucleoidi. Non si trova libero nel citoplasma ma ancorato su un punto della membrana detto mesosoma. Si trova associato a delle proteine con funzione simile agli istoni (HU, IHF, H1, P) e tendono a fargli assumere una struttura maggiormente compatta. Si nota come il cromosoma è costituito da anse (sottodomini) indipendenti in modo che è possibile compattare una regione lasciando decompattata un'altra riflettendo la capacità di trascrizione di un'ansa rispetto ad un'altra. Ci sono delle topoisomerasi o girasi che risolvono i ripiegamenti favorendo la separazione delle due catene quando necessario. Si nota come il DNA di organismi evoluti contiene una certa quantità di informazione con una certa lunghezza. Si trova grande differenza tra genoma umano e di altri organismi più semplici si trova una relazione inversa tra complessità dell'organismo e densità genica: $DG = \frac{1}{\alpha}$, con α la complessità o il rapporto tra geni e numero di basi. Questa diminuzione è dovuta in due modi: aumentando le dimensioni dei geni tramite sequenze intrageniche (sequenze introniche spesso) o aumentando la quantità di DNA esistente tra i geni (sequenze intergeniche) più del 60% del genoma umano è costituito da sequenze intergeniche. Questa porzione è stata considerata come DNA spazzatura ma in realtà è una sequenza che in parte trascrive con importante ruolo strutturale. Le sequenze uniche si trovano i pseudogeni, geni che nel corso dell'evoluzione hanno perso la capacità di essere trascritti in proteine e il secondo gruppo di sequenze intergeniche è il DNA ripetuto: DNA microsatellite ripetizioni di nucleotidi (analisi di paternità), durante la replicazione si possono allungare e quando questo avviene in zone geniche o promotrici allora possono nascere problemi e può causare il blocco della trascrizione. Il DNA altamente ripetuto come le sequenze ALU che si ripetono tante volte all'interno del genoma umano con funzione sconosciuta. Tra le sequenze intergeniche ci sono anche le porzioni di DNA che codificano per microRNA. Il DNA degli eucarioti contiene sequenze con ruolo regolatorio e vengono trascritti in molti casi. Quando il DNA si replica deve replicare tutte queste sequenze. Tra le regioni ripetute senza ruolo trascrizionale con caratteristiche di compattamento e struttura si trova la regione centromerica che si tratta di una regione presente a metà dei cromosomi circa ed è costituita da DNA e proteine che formano il cinetocore, la struttura importante durante il processo di divisione cellulare in quanto qua si legano i microtubuli e durante il processo di mitosi permette la separazione dei due cromatidi nelle cellule figlie nei lati opposti. La sequenza centromerica ha determinate caratteristiche di sequenza e compattamento. Il lievito si presta a questi studi in quanto facile da crescere e semplice. Nel lievito è di circa 100 – 120 paia di basi (vertebrati anche milioni) e prende il nome di CEN. È costituita da tre domini CDE-I, CDE-II e CDE-III, il secondo è centrale (90 nucleotidi), non ha sequenza specifica ma molto ricca in T e A. Questa sequenza è fiancheggiata dalle altre due sequenze. La sequenza viene riconosciuta da proteine che riconoscono la sequenza e permettono la costruzione del cinetocore. Sono riconosciuti da una che si lega a CDE-II (CSE4P), mentre le due periferiche vengono riconosciuti

dal fattore CBF3 e CBF1 che va a reclutare un complesso trimerico Ctf9, Mcm21 e un altro. La sequenza è importante in quanto in presenza di mutazioni si può compromettere il riconoscimento causando ripercussioni durante il processo di divisione cellulare e ci possono essere delle partizioni asimmetriche dei cromosomi durante il processo di divisione. Queste regioni sono regioni in cui la cromatina assume una struttura particolare: eterocromatico costitutivo. Il maggior grado di compattazione avviene durante il processo di mitosi, quando appare sotto forma di cromosomi, la forma più estrema di impacchettamento. La mitosi è preceduta da altre fasi G1, S e G2 che costituiscono l'interfase, la parte del ciclo cellulare tra una mitosi e l'altra. In questa fase le proteine che si legano al DNA e ne permettono il compattamento vengono sintetizzate. Le cellule che non si dividono come i neuroni rimangono nella fase G0. La cromatina nella fase M appare come cromosomi (22 somatici e 2 sessuali), hanno diverse forme e dimensioni. I cromosomi possono essere colorati tramite bandeggio di gemsa e si caratterizzano da due braccia P e Q, un centromero e una serie di bande che definiscono la posizione dei geni all'interno del cromosoma. Non sempre la duplicazione avviene in maniera canonica: in alcuni organismi può avvenire una divisione incompleta: politenia, le replicazioni non vengono seguiti da segregazione e i cromosomi rimangono attaccati tra di loro e formano strutture molto grandi. È tollerata in alcune specie e cellule come le cellule salivari della *Drosophila*, per trascrivere elevata quantità di RNA.

2.12.2 Istoni e prime fasi di compattamento del DNA

Il primo step di avvolgimento di DNA prende il nome di nucleosoma, più nucleosomi si compattano tra di loro formando fibre con conformazione a zigzag o solenoide. Esiste un modo per misurare il grado di compattamento: il rapporto di impacchettamento: il rapporto tra la lunghezza del DNA e la lunghezza della struttura che lo contiene. È possibile capire quanto compatta è la cromatina in determinate condizioni. Il compattamento è cruciale in quanto svolge un ruolo importante nei processi di replicazione, ricombinazione, trascrizione, riparazione e segregazione. Il processo di compattamento è dinamico: gli istoni si muovono lungo il DNA stesso. Le proteine che si legano al DNA e hanno un ruolo nella formazione della cromatina sono le proteine istoniche e non istoniche (facilitazione del compattamento e nel reclutare istoni sul DNA o nel processo di trascrizione o duplicazione), associano con il DNA e con la cromatina ma non necessariamente hanno ruolo nel suo compattamento. La struttura del nucleo base del primo livello di interazione DNA-istoni è il nucleosoma, è costituito dagli istoni H2A H2B, H3 e H4 che si associano tra di loro costruendo il nucleo ottamerico, il DNA si lega intorno al nucleo (147 nucleotidi) formando il nucleosoma. H3 e H4 hanno code istoniche che hanno ruolo cruciale nella regolazione del compattamento. Gli istoni sono altamente conservati in quanto svolgono un ruolo molto importante nei processi. Sono proteine non eccessivamente grandi e sono caratterizzate da una coda N terminale e un dominio di ripiegamento istonico. Le code sono diverse in lunghezza e struttura ma il dominio di ripiegamento istonico è conservato, costituito da tre α -eliche che sono uniti da delle anse. La formazione dell'ottamero: si formano i dimeri H3 e H4 che si combinano tra di loro formando un tetramero H3-H4 che inizia il primo contatto con il DNA. Successivamente il complesso si unisce a due dimeri H2A-H2B formando il core istonico e il nucleosoma. L'assemblamento non richiede energia e proteine che aiutano il folding e l'interazione tra i monomeri (chaperons). Tutte le code N terminali sono esposte all'esterno, cosa importante in quanto sono le modifiche agli amminoacidi in questa regione hanno ruolo nel regolare il compattamento della cromatina in quanto permettono ai nucleosomi di interagire diversamente tra di loro. Ci sono metilazioni, acetilazioni (facilita l'avvicinamento tra due nucleosomi). L'interazione tra ottamero e il DNA per formare il nucleosoma avviene tra l'ossatura degli amminoacidi istonici e l'ossatura dei fosfati e dagli zuccheri del DNA, in particolare amminoacidi degli istoni come lisina e arginina (basici) facilitano l'interazione con le cariche negative presenti nello scheletro del DNA

facilitando la formazione del legame. Pertanto l'interazione dell'ottamero è aspecifica anche se in molti casi c'è una forte presenza di AA, TT e TA in quanto presenti nella maggior parte del solco minore con una maggiore compressione del solco minore all'interno. Sul DNA sono presenti proteine che facilitano il reclutamento in zone dell'ottamero istonico. Ci sono proteine che impediscono la formazione di nucleosomi tra di loro legandosi in un numero minore di basi. La formazione non dipende da sequenze specifiche ma da fattori che possono determinare la formazione di nucleosomi in determinati punti del DNA. Questo può essere valutato usando enzimi come DNAasi che degrada il DNA: in una cromatina poco condensata la DNAasi può digerire tra un nucleosoma e l'altro, in una cromatina più condensata l'accesso all'enzima del DNA è bloccato dall'elevato compattamento dei nucleosomi. Questo permette di capire se un gene (o il promotore che attiva la trascrizione del gene) verrà trascritto oppure no. Si pensava che la struttura del nucleosoma che si venisse a formare fosse un qualcosa di fisso a causa della forte interazione DNA-proteine. Si è visto come questa sia una struttura dinamica: il nucleosoma si svolge 4 volte al secondo lasciando esposto il DNA per 10 millisecondi prima che si riformi a monte o a valle di dove si fosse formato prima il nucleosoma. Questo è importante in quanto rende più dinamico e muovendosi il nucleosoma permette al DNA di separarsi e dare accessibilità a fattori proteici trascrizionali o replicazionali. Il nucleosoma è reso dinamico dal complesso di rimodellamento della cromatina, costituito da un ATPasi che lega e idrolizza ATP, un dominio che lega DNA e uno che lega l'ottamero istonico. Si trova un dominio elicastico che è quello che aiuta il DNA a staccarsi e a rimuoversi dall'ottamero e a muoversi a monte o a valle. Questi complessi sono importanti in quanto svolgono questo ruolo in diversi momenti: processo trascrizionale o di duplicazione. Sono fattori importanti e oltre a questi complessi esistono altri fattori detti chaperons degli istoni che cooperano con il rimodellatore della cromatina. La funzione di questi fattori è quella di facilitare la dissociazione o associazione dei monomeri o dimeri di istoni durante il rimodellamento della cromatina. Sono complessi proteici grandi e riconoscono delle sequenze specifiche presenti all'interno dei singoli istoni. Quando il DNA si duplica si duplicano gli istoni: le catene neosintetizzate contengono in parte istoni provenienti dal vecchio e altri nuovi. Alcuni di questi rimangono associati durante la replicazione e devono andare incontro a un deposizionamento. Questi chaperoni facilitano la rimozione e uno scambio tra le subunità di istoni neosintetizzati inseriti nella catena neosintetizzata. I due nucleosomi adiacenti tendono a compattarsi dove le code istoniche sono andate incontro a modifiche post traduzionali a capo di amminoacidi, quella che facilita la compattazione è la deacetilazione che avviene a carico di DACH deacetilase histon e la proteina che acetila l'istone è HAC histon acetylase. Queste sono modifiche post traduzionali reversibili, la seconda facilita il compattamento la prima il compattamento. Vi sono altri istoni che contribuiscono alla formazione della compattazione della cromatina come l'istone H1, il più grande degli istoni e detto istone linker e si posiziona tra il DNA a doppio strand non legato al nucleosoma e interagisce col DNA presente sull'istone. Fa assumere al DNA non nel nucleosoma un'angolazione che favorisce il compattamento tra un nucleosoma e l'altro. È quello meno conservato dal punto di vista evolutivo. Volendo vedere se un gene è espresso in diversi tessuti un controllo per vedere se ci sono proteine nei campioni si usano gli istoni in quando sono espressi da tutte le cellule in qualsiasi condizione. Un altro istone importante ma coinvolto nella riparazione del DNA è l'H2AX si tratta di un istone reclutato nelle zone dove c'è danno al DNA il reclutamento di questi istoni permette la riparazione del DNA danneggiato a carico di entrambe le catene. Il danno può essere fatto tramite sostanze usate come antitumorali o un laser. Ci sono pertanto altri istoni coinvolti in altri processi come la riparazione. La dinamicità del nucleosoma ne esiste una anche nell'eterocromatina e nell'eucromatina. Il processo di formazione della prima se non bloccato tende a prendere il sopravvento e a trasformare zone eucromatiche in eterocromatiche. Ci sono pertanto delle barriere costituite o da elementi proteici che bloccano il richiamo di modifica degli istoni o zone di DNA che fanno da barriera. Questo fenomeno sta alla base del silenziamento di geni durante lo sviluppo. Vi sono delle

mutazioni a carico dei fattori proteici che possono far prendere il sopravvento e va a silenziare zone eucromatiche di geni che devono essere espressi. I geni per le globine vengono prodotti in diverse fasi dello sviluppo: la gamma alla nascita e poi il beta prende il sopravvento. Questi geni si trovano in cluster e vanno incontro a un silenziamento dovuto all'eucromatina e poi all'eterocromatina per i geni per la globulina gamma. Le regolazioni avvengono in quanto le code di istoni vanno incontro a modifiche che creano un codice detto codice istonico che viene riconosciuto dal complesso che lo legge e ne interpreta il significato. Ci sono diverse modifiche e a carico dello stesso amminoacido ci possono essere più modifiche che possono dare un significato diverso da un punto di vista funzionale. L'interpretazione di queste modifiche dipende da chi le legge: per l'istone H3 una trimetilazione della lisina determina la formazione di eterocromatina e silenziamento, una acetilazione e la trimetilazione di un'altra determina l'espressione genica. Il codice istonico viene riconosciuto da proteine in grado di leggerlo e possono apportare modifiche successive agli istoni promuovendo il compattamento o il decompattamento della cromatina. Questi meccanismi di modifica stanno alla base dell'epigenetica, che consiste nelle modifiche post traduzionali a carico di proteine istoniche che possono comportare delle modifiche a livello di espressione genica che vengono resettate con la formazione della cellula uovo e dello spermatozoo in quanto questo richiede l'attivazione di queste modifiche. Una modifica post trascrizionale può essere ereditata anche dalla progenie.

2.12.3 Sindrome di Rett

La malattia si manifesta precocemente dopo un periodo apparente di sviluppo normale dopo di che iniziano a comparire segni di sviluppo alterato come una riduzione delle capacità motorie, lo sviluppo del cervello viene rallentato. Le caratteristiche a livello morfologico: una riduzione della grandezza del cervello legata a neuroni iposviluppati. Si tratta di una patologia non legata alla morte cellulare ma si tratta di una malattia dello sviluppo. La mutazione avviene a carico di MeCP2, membro di una famiglia che riconoscono le regioni CG metilate e serve come repressore della trascrizione genica in regioni del DNA metilate. Questa proteina controlla la trascrizione: la cromatina attiva presenta acetilazione delle code istoniche e queste code non sono metilate. La metilazione a livello di regioni ricche di C e G è legata alla presenza di metil trasferasi che vengono reclutate nelle zone promotrici di questi geni e metilano le regioni del DNA ricche di questi elementi. Le code istoniche sono ancora acetilate: la cromatina è in uno stato eucromatico. Si reclutano il complesso NURD e Sin3A che fanno parte di un complesso che contiene le acetilasi, cosa che comporta il compattamento interiore della cromatina e la metilazione da parte delle isole ricche di sequenze C e G il compito di MeCP2 favorisce la trasformazione da stato eucromatico ad eterocromatico, lo fa quando riconosce zone metilate nelle regioni ricche di C e G. Siccome MeCP2 favorisce la trasformazione da uno stadio eucromatico a eterocromatico quando non è presente non si forma eterocromatina silente ma uno stadio eucromatico con una certa capacità trascrizionale. Mecp2 è pertanto un inibitore trascrizionale. Questo vuol dire che se si blocca un inibitore si attiva e i pazienti che soffrono della sindrome di Rett hanno cellule che continuano a trascrivere geni normalmente disattivati. La zona del DNA non è bloccata e si esprimono geni che non devono essere più espressi. Questi geni sono coinvolti nella crescita delle cellule nervose (NGF nerve grow factor) che causa problemi in quanto altri fattori che vengono over espressi comportano l'alterata morfologia e sono fattori che impediscono il differenziamento delle cellule nervose e i neuroni funzionano male: non formano sinapsi e dendriti, pertanto funzionano meno rispetto a cellule nervose normali. La modifica da eucromatica a eterocromatica avviene grazie al reclutamento di enzimi che modificano gli istoni a livello post trascrizionali. Questa modifica viene letta da proteine che reclutano proteine che modificano gli istoni. Questa onda si propaga con le modifiche dei cromosomi che causa la formazione di eterocromatina. L'onda viene bloccata per zone eucromatiche attraverso proteine barriera ancorate a pori nucleari. Le zone eucromatiche ed

eterocromatiche sono distribuite con le seconde localizzate verso la periferia, un modo per ancorare porzioni di DNA vicino alla membrana. Un altro meccanismo sono proteine che svolgono ruolo di barriera verso modifiche a monte e infine proteine che vanno a bloccare la modifica a monte e impediscono la propagazione dell'onda. Queste proteine che leggono il codice e interpretano il codice istonico contengono dei domini particolari: si trova il bromodominio caratteristico delle proteine che aggiungono gruppi acetile agli istoni, tipico delle HAT, un altro dominio presente in proteine che riconoscono e modificano per l'aggiunta dei gruppi metilici è il cromodominio. Questi domini riconoscono e amplificano le modifiche a carico degli istoni. Si passa da una condizione poco compatta collana a perle -solenoidi - anse cromosomiche - cromosomi mitotici. Si trova un'altra situazione osservata nei cromosomi degli oociti dello xenopus, rana utilizzata per esperimenti dello sviluppo con oociti molto grandi. Queste anse sono organizzazioni ultrastrutturali che fuoriescono dal cromosoma e si tratta di cromatina in grado di trascrivere. Si tratta di un'organizzazione che permette alla cromatina di formare anse in grado di trascrivere. I cromosomi nell'interfase non si trovano sparsi all'interno del nucleo ma presentano domini distinti. I cromosomi presentano anche nella fase di non compattamento dei domini discreti. L'ibridazione in situ è una tecnica in cui si prende una sonda di DNA a filamento singolo specifica per un determinato cromosoma e la si rende radioattiva o fluorescente. A questo punto si ibrida, ovvero si permette alla sonda complementare di ibridare all'interno del nucleo e va a ibridare dove va a trovare la sequenza complementare. I cromosomi normalmente sono mobili e possono modificare la posizione all'interno del nucleo in base allo stato trascrizionale. Geni non attivi localizzano in periferia e mentre si attivano queste regioni tendono a muoversi verso zone più interne nel nucleo. Si ipotizza che questo movimento avvicini i geni in trascrizione alle strutture per la modifica degli mRNA come per lo splicing (rimozione introni) o il nucleolo dove avviene di fatto il controllo qualità dell'RNA che viene processato ma viene legato da proteine RNA binding protein che lo stabilizzano e facilitano il trasporto dal nucleo al citoplasma. L'incontro è mediato dal nucleolo. Questo spiega il cambio posizionale delle regioni del DNA che da eterocromatiche si muovono verso il centro nel momento in cui diventano attive dal punto di vista trascrizionale. Un altro aspetto è legato agli istoni durante il processo di replicazione che deve essere coordinato in quanto si devono far scivolare gli istoni o rimuoverli e quando la catena si è sintetizzata si deve fare in modo che gli istoni tornino a interagire con il DNA. Il processo di duplicazione durante la fase S è preceduta dalla sintesi degli istoni. Il meccanismo della distribuzione degli istoni. La modifica degli istoni presenti può avere conseguenze sull'accessibilità dei geni. Si sono marcati in maniera selettiva le subunità istoniche per capire cosa succede loro durante il processo di replicazione. Il tetramero H3-H4 rimane legato casualmente a uno dei due filamenti senza mai staccarsi e i dimeri H2A e H2B vengono rilasciati e vanno a far parte del pool di dimeri presenti nella cellula. Si mischiano e vengono ripartiti in maniera random tra le due catene. Questo è mediato da proteine che facilitano l'assemblamento dei nucleosomi e fattori di modifiche degli istoni che promuovono le modifiche della struttura della cromatina. Questa macchina è associata e interagisce con la macchina coinvolta nella duplicazione del DNA.

2.13 Struttura dell'RNA

L'RNA non interagisce con istoni ma normalmente è associato a proteine la maggior parte delle quali appartengono alle RNA binding protein che lo stabilizzano, controllano il trasporto e controllano la traduzione. L'RNA fa da tramite tra l'informazione del DNA e le proteine trasportandola fuori dal nucleo. L'RNA differisce dal DNA in quanto contiene il ribosio che possiede un gruppo OH che ha un ingombro sterico che gli impedisce di assumere determinate forme e assume la forma A. A differenza del DNA le basi possono andare in contro a maggiori modifiche che hanno ruoli diversi:

maggior stabilità, proprietà biologiche diverse: la modifica di un microRNA che interagiscono con l'mRNA si modifica la capacità di interagire con la base complementare e una modifica post trascrizionale può cambiare la loro funzione biologica. L'RNA può assumere strutture a doppia elica, la struttura ad ansa a forcina con stelo a doppia elica e un loop a singolo strand ci possono essere appaiamenti non canonici in queste strutture. Sono importanti in quanto conferiscono stabilità all'RNA e possono essere riconosciute da proteine che svolgono diversi ruoli. La struttura secondaria a stem loop dell'RNA può avere un ruolo importante nel metabolismo dello ione ferro. Lo ione ferro è molto reattivo e tende a reagire con l'ossigeno (reazione di Fenton) e produce radicali che possono danneggiare il DNA. Pertanto lo ione ferro nonostante sia utile (importante fattore nei globuli rossi), un eccesso di ioni ferro a causa di prodotti legati al metabolismo cellulare può dare origine a specie reattive pericolose. Il meccanismo viene regolato pertanto. Ci sono dei recettori sulla membrana detti recettori per la transferrina che lega la transferrina, la molecola che si lega al ferro presente nel torrente circolatorio che si lega al suo recettore sulla membrana. Una volta che il recettore si lega alla transferrina viene internalizzato si forma una vescicola endocitotica che quando presente nel citoplasma diventa un endosoma che al suo interno grazie a determinati trasportatori va incontro a una riduzione del pH che causa il distacco dello ione ferro dal suo recettore. Questo determina il rilascio dello ione nel citoplasma e il recupero dell'endosoma e della transferrina scarica e torna in membrana dove si dissocia e la transferrina vuota può tornare nel circolo sanguigno. A questo punto allo ione ferro rilasciato nel citoplasma in parte viene utilizzato dove necessario come attivatore o coattivatore di enzimi e proteine. Quello in eccesso viene legato dalla ferritina che di fatto blocca lo ione ferro libero non necessario per reazioni e lo mantiene silente e ne impedisce che venga coinvolto in reazioni pericolose. Quando si ha poco ferro si devono aumentare i recettori di membrana e ridurre i livelli di ferritina presenti nel citoplasma. In carenza di ferro si aumentano i recettori e diminuiscono i livelli di ferritina, in condizioni di eccesso di ferro avviene il processo inverso. Questo meccanismo di regolazione è post trascrizionale e avviene a carico degli RNA per il recettore e la ferritina una volta che sono stati generati. Una proteina è un RNA binding protein aconitasi che lega l'RNA e lo lega riconoscendo la struttura a stem loop presente nel 5' non codificante per la ferritina e 3' non codificante (UTR untranslated region) per il recettore. Un mRNA possiede a monte e a valle sequenze più o meno lunghe che non vengono tradotte in proteine e servono per il controllo e regolazione. Possono trovarsi in 5' o 3'. Quando l'aconitasi riconosce questa struttura a monte per il gene della ferritina e a valle per la transferrina. L'aconitasi si lega alle strutture in condizioni di bassi livelli di ferro. Quando non c'è ferro l'aconitasi si lega agli RNA e per la ferritina va a bloccare il reclutamento dei ribosomi sull'mRNA bloccando la traduzione della ferritina. Contemporaneamente si lega alla 3' UTR a valle del gene del recettore e lo stabilizza e può essere tradotto in maniera più efficiente e avviene la produzione del recettore, cosa che ci serve per internalizzare più ferro. La stessa struttura a monte o a valle può dare origine a due effetti biologici diversi. Con elevati livelli di ferro si vuole inibire il recettore e aumentare la ferritina. Il ferro si lega all'aconitasi che cambia conformazione e non è più legata alla struttura a forcina permettendo la traduzione dell'RNA per la ferritina e dall'altra parte destabilizza l'RNA che codifica l'RNA per il recettore che può andare incontro a una più rapida degradazione. L'aconitasi è un sensore per il ferro. L'elemento a forcina prende il nome di iron responsive element IRE. Questo meccanismo viene sfruttato per creare un sistema fluorescente atto a misurare i livelli di ferro all'interno della cellula questo si svolge utilizzando la GFP: prendendo la GFP come reporter si mette l'RNA a valle della sequenza dell'IRE, che trascrive per l'RNA ibrido con IRE e il reporter. Nella condizione senza ferro la ferritina non deve essere prodotta e l'aconitasi si lega all'IRE e blocca la traduzione e non si dovrebbe osservare espressione di GFP. In condizioni di presenza di ferro questo si lega all'aconitasi questa si stacca dalla sequenza a forcina e ne permette la traduzione. Le strutture secondarie si possono formare in maniera spontanea e la stabilità dipende dalla sequenza e dall'appaiamento delle basi. Può essere quantificata in base

alla quantità di energia usata per formare gli accoppiamenti delle basi. Tanto più negativo il valore di ΔG tanto più stabili le strutture. In alcuni casi possono intervenire proteine che permettono all'RNA di assumere strutture proteiche. Questo è uno dei problemi della previsione delle strutture secondarie. In molti casi infatti le strutture predette possono non essere veritiere a causa delle proteine presenti. I tRNA hanno una struttura a trifoglio importante per la funzione: il tRNA che porta l'amminoacido nella zona 3' con una struttura a forcina che forma l'anticodone che riconosce il codone sull'mRNA che determina l'introduzione dell'amminoacido specifico sulla proteina.

Capitolo 3

Replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri

Nella duplicazione del DNA si identifica un filamento stampo e uno di nuova sintesi. I due filamenti si identificano anche per la loro polarità $3' - 5'$ e viceversa. I filamenti stampo hanno polarità diverse, importante per il funzionamento della DNA polimerasi. Utilizzando il filamento stampo e l'appaiamento delle basi. Utilizzando un filamento primer la DNA polimerasi introduce le basi complementari creando un nuovo filamento utilizzando quello parentale come stampo e va a promuovere la formazione del legame fosfodiesterico tra il gruppo fosfato del nucleotide libero e quello OH presente al $3'$ viene scisso ATP con la liberazione di pirofosfato.

3.1 Mutazioni

Il processo di replicazione è accurato ma non perfetto. Senza mutazioni non ci potrebbe essere evoluzione. Il processo può funzionare in maniera non del tutto precisa. Nei batteri si possono introdurre errori ogni 10^{10} nucleotidici di 3 – 4 cambi. Le mutazioni possono essere geniche (singoli basi), cromosomica e genomica. Mutazione genica che normalmente avvengono a carico dei singoli nucleotidi, possono essere sinonima o di sostituzione: cambiamento di una base che non comporta un cambio amminoacidico, mutazioni di senso errato: il codone viene sostituito con uno che codifica per un altro amminoacido, mutazioni non senso: si forma un codone di stop prematuro, mutazioni frameshift: si sposta l'ordine di lettura, mutazioni per frequenze ripetute che presenti nelle zone promotrici e la duplicazione della DNA polimerasi e aumenta il numero delle sequenze ripetute e può portare problemi in quanto può rompere i meccanismi di replicazione (causare Corea di Huntington e la sindrome dell'X fragile). La mutazione cromosomica si riarrangiano parti di cromosoma con traslocazioni Inter cromosomiche, tipico di tumori e leucemie (poco tollerata), nelle mutazioni genomiche varia il numero di cromosomi (sindrome di Down, trisomia 21, 18).

3.2 Modello di duplicazione

3.2.1 Modello semi-conservativo

La cellula figlia riceve una catena neosintetizzata e una parentale.

3.2.2 Modello conservativo

La cellula madre duplica l'intera catena del DNA e dà origine a due cellule figlie una con il filamento parentale e una con il filamento neosintetizzato.

3.2.3 Modello dispersivo

Ciascun filamento è un mosaico tra il DNA parentale e quello neosintetizzato. Per la conferma sperimentale si usano colonie batteriche contenenti azoto pesante ^{14}N i batteri venivano cresciuti in presenza di ^{15}N per una generazione in modo che tutte le cellule lo introdussero, dopo di che vengono messe in un terreno con azoto leggero. Alla duplicazione si incorpora azoto leggero. Utilizzando tecniche di centrifugazione si possono discriminare quelle contenenti azoto leggero e pesante. Si osserva che nella prima generazione si ha una miscela costituita da azoto leggero e pesante e nella generazione successiva scompare quella pesante e compare quella leggera e la miscela, risultato che conferma il modello semi-conservativo.

La duplicazione del DNA avviene in un'origine nei batteri nell'origine di replicazione dove vengono reclutate la macchina per la duplicazione, si forma la bolla di replicazione: le due catene si separano, viene reclutata la macchina di duplicazione e la duplicazione inizia e si forma la struttura theta che si allarga sempre di più fino a creare due catene di DNA costituite da una catena parentale e una neosintetizzata. A livello di microscopia elettronica si può dare un analogo radioattivo (timina triziata) incorporata nel DNA di nuova sintesi che rende visibile dove avviene la sintesi e incorporazione. L'origine di replicazione è caratterizzata attraverso esperimenti che comportano la digestione da un enzima di restrizione che taglia e i frammenti vengono legati e si va a vedere se il frammento del plasmide va incontro a duplicazione oppure no. Isolando il frammento e sequenziandolo è possibile capire la struttura del DNA responsabile dell'origine di replicazione. Negli eucarioti ci sono diverse origine di replicazione, alcune precoci nel ciclo cellulare, altre attivate più tardivamente in base alla struttura in cui si trova il DNA nel tempo di duplicazione: livello di compattazione. Ci sono diverse origine in quanto il DNA è molto lungo. Attivando più origini di replicazione si riduce il tempo che la polimerasi impiega a completare la replicazione. Le bolle di replicazione si fonderanno successivamente tra di loro. Le origini di replicazione o fabbriche di replicazione. L'apparato deputato alla replicazione è complesso ed è detto di cui l'attore principale è la DNA polimerasi a forma di mano in cui il DNA si lega al palmo con strutture che permettono l'entrata dei nucleotidi incorporati e permette alle due catene di rimanere separate e domini di controllo della qualità della duplicazione permettendo di notare incorporazioni errate. La DNA polimerasi lavora in modo processivo; una volta che si attacca al DNA va a replicare lo stampo in maniera continuativa. Un enzima non processivo si attacca, incorpora, si stacca e si riattacca. La DNA polimerasi per la duplicazione del DNA lavora in maniera processiva. La DNA polimerasi è un enzima complesso e si dice oloenzima, costituito da subunità con ruoli diversi. Aggiunge nucleotidi attività polimerasica corrispondenti a quelli presenti sulla catena stampo, ha attività esonucleasica $3' - 5'$ ed esonucleasica $5' = 3'$ che permettono alla polimerasi di riconoscere errori. Esonucleasica: quando viene introdotto un nucleotide non complementare viene rimosso e questa avviene in entrambe le direzioni. Il ruolo maggiore di duplicazione è data dalla DNA polimerasi I mentre le altre hanno ruolo in altri processi, in particolare nella riparazione del DNA rotture a singolo o doppio strand, cosa vera anche negli eucarioti. Considerando la bolla di replicazione la duplicazione del DNA non può avvenire in entrambe le direzioni in quanto può incorporare nucleotidi solo in direzione $5' - 3'$ solo un filamento viene duplicato. Mentre un filamento viene duplicato in maniera duplicativa sull'altro si formano dei piccoli frammenti di piccola dimensione detti frammenti di Okazaki, frammenti di DNA duplicato in direzione $5' - 3'$. Si identificano uno strand leading o duplicato in maniera continuativa e uno in maniera discontinuativa con i frammenti o lagging. Questi frammenti sono formati preceduti dalla

formazione di primer a innesco costituiti da RNA importanti in quanto la DNA polimerasi è in grado di introdurre i nucleotidi solo se trova un gruppo OH libero a livello del primo nucleotide. Non è in grado di iniziare la sintesi da sola ma necessita di un filamento primer che permette l'inizio del processo di replicazione (a differenza dell'RNA polimerasi). La DNA polimerasi necessita di un innesco fornito da primer prodotti da una DNA primasi che si lega =, forma un innesco, brevi frammenti di RNA che forniscono il gruppo OH alla DNA polimerasi che si lega e inizia a polimerizzare in direzione $3' - 5'$. La DNA polimerasi produce un filamento di Okazaki, poi viene rimosso da un enzima dall'una primer e dopo al gruppo OH libero la polimerasi può riempire il buco. Il complesso è unico, uno per la duplicazione del filamento continuo e uno per il filamento discontinuo. In quello discontinuo forma una ansa che forma il modello a trombone. Ci sono nel complesso pertanto due DNA polimerasi, una primasi per il primer e il filamento discontinuo, le proteine che si legano al DNA a filamento discontinuo lo proteggono e impediscono la formazione di strutture secondarie che bloccano la polimerasi. Ci sono le elicasi che svolgono il DNA e le topoisomerasi che risolvono i superavvolgimenti e vengono reclutate tutte le proteine coinvolte nella formazione dei nucleosomi e dell'ottamero istonico.

3.3 Lezione 7

La maggior parte delle DNA polimerasi sono coinvolte nella riparazione dei danni del DNA che possono essere di diversi tipi. Esistono dei danni legati alla rottura delle catene del DNA e la cellula fa intervenire dei meccanismi specifici per questi tipi di danno, meccanismo fondamentale in quanto può portare a mutazioni che se non riparate possono in alcuni casi portare all'apoptosi della cellula. Questo sta alla base dell'azione di molti farmaci tumorali che creano multiple rotture che possono portare alla morte cellulare e alla morte della cellula tumorale. Il modello utilizzato che corrisponde a quello semi conservativo in cui la catena parentale si divide e funzionano da stampo, le cellule figlie ricevono un filamento parentale e uno stampo. L'inizio della duplicazione del DNA avviene durante la fase S dove il DNA viene duplicato, si trova la preparazione che avviene nella fase G1 in cui si preparano i siti di replicazione, i punti in cui le due catene iniziano a separarsi e viene reclutata la macchina di replicazione. Nel caso dei procarioti inizia nell'origine di replicazione, mentre negli eucarioti ci sono più origini di replicazione. Le forcelle di replicazione non sono distribuite omogeneamente ma sembrano raggrupparsi in foci di replicazione che contengono ad alte concentrazioni i fattori coinvolti nella replicazione del DNA. Il bromodiossiuridina è un analogo della timina che viene accoppiato con una molecola fluorescente attraverso un anticorpo. Ci sono più forcelle di replicazione distanziate da circa 50-70 kilobasi e gli esseri umani possono avere dalle 100000 ai 1000000 origini di replicazione. Non sono determinate da una sequenza specifica ma sono ricche di A e T in quanto possiedono meno legami a idrogeno e sono pertanto più facili da separare. L'enzima principale coinvolto nella duplicazione è la DNA polimerasi un enzima composto da una componente enzimatica (attività polimerasica) accompagnato da altri cofattori che lo aiutano a duplicare il DNA e conferiscono altre caratteristiche: correggere gli errori un nucleotide incorporato in maniera errata l'enzima lo riconosce, rompe il legame fosfodiesterico e rimuovere la base scorretta. È molto efficiente: $10^9 - 10^{10}$ basi per un errore. La DNA polimerasi comune anche all'RNA polimerasi che produce RNA è che sono processive: una volta che si attacca al DNA copia la catena stampo in maniera continuativa. La DNA polimerasi non ha una grande affinità: tenderebbe a staccarsi dopo poche basi. Questa viene aumentata dalla pinza scorrevole che scorre sul DNA durante la duplicazione consentendo alla DNA polimerasi di rimanere attaccata al DNA. La funzione della DNA polimerasi è legata alla sua struttura a mano con l'alloggiamento del DNA, un punto in cui gli ATP entrano e un punto in cui le catene escono. Il compito è di polimerizzare e aggiungere nucleotidi in $5' - 3'$

usando un gruppo OH libero in 3' di un filamento primer di innesco usa un dNTP con un trifosfato con un legame fosfodiesterico e il pirofosfato. La formazione di legame è spinta dalla scissione del pirofosfato con la formazione di due fosfati. La DNA polimerasi è in grado di sintetizzare in una sola direzione: pertanto per sintetizzare il filamento in direzione opposta si formano i frammenti di Okazaki con dimensioni variabili: da 1000-2000 per eucarioti e 100-200 per procarioti, creati attraverso la primasi che aggiunge degli inneschi formati da RNA, primer di dimensioni ridotte 10-20-30 che forniscono il gruppo 3' OH su cui la polimerasi si inserisce. Si formano frammenti con il DNA sintetizzato e una sequenza formata da RNA che viene rimossa grazie all'RNAasi H che degrada l'RNA e riconosce l'ibrido e degrada rimuovendo i primer. A questo punto si trova un buco dove c'era il primer colmato dalla DNA polimerasi e i frammenti vengono legati tra di loro da una DNA ligasi. In questo modo il filamento lagging produce un filamento duplicato continuo. Ci sono altri componenti reclutati durante la formazione dell'origine della forcella: nel caso di *Escherichia coli* la DNA polimerasi III a cui si aggiungono altre DNA polimerasi per ruoli accessori. Il riconoscimento dell'*Escherichia coli* dell'origine di replicazione che è caratterizzata e riconosciuta da parte della DNAa, una proteina che contiene quattro ripetizioni di nove nucleotidi e tre ripetizioni di tredici paia di basi a monte delle ripetizioni. La DNAa si attacca alle ripetizioni di nove e si lega a quelle di 13 facilitando la denaturazione del DNA e permettendo l'assemblaggio delle proteine replicative: la DNAb e la DNAc che formano il complesso di preinnesco. La DNAb è un'elicasi che legando l'ATP ha il ruolo di svolgere e aprire le due catene di DNA che permette il reclutamento della DNA primasi che crea i primer a RNA sui filamenti. Infine viene reclutata la DNA polimerasi.

Negli eucarioti le cose sono più complicate: si ha una DNA polimerasi, fattori elicasi, primasi eccetera. Il processo di duplicazione è differente dalla tempestica in quanto il DNA presenta un compattamento della cromatina accentuato e le zone molto compatte devono essere duplicate alla fine della fase S, molto tardive in quanto si devono decompattare le zone e intervengono fattori che decompattano la cromatina, rimuovono le modifiche post traduzionali e gli istoni stessi. I complessi che vengono nella forcella di replicazione: la DNA polimerasi, con subunità α che polimerizza, due componenti con attività di proofreading a cui si aggiunge il complesso γ o pinza di caricamento e il complesso β che è la pinza scorrevole. L'apparato che duplica il DNA è un dimero, con due DNA polimerasi, due *audio corrotto* che vengono duplicati in maniera asincrona. Il legame delle due DNA assicura che la velocità sia singola. Queste subunità τ rende dimerica la macchina deputata alla replicazione.

La pinza scorrevole è la componente che permette alla DNA polimerasi di aumentare l'affinità con il DNA. È fondamentalmente un anello che in condizioni di non interazione con DNA si trova aperto: due subunità. Quando si lega al DNA si chiude e forma un anello attorno al DNA che permette l'interazione e il mantenimento della DNA polimerasi al DNA e la segue durante la replicazione. La pinza si carica sul DNA grazie al caricatore della pinza, che interagisce con le due DNA polimerasi. un ATPasi utilizza ATP, prende la pinza scorrevole, la carica sul DNA, cambia conformazione, si stacca e lascia la pinza scorrevole favorendo il mantenimento della DNA polimerasi sul DNA. L'attività della pinza scorrevole mantiene la DNA polimerasi e promuove l'attività della DNA polimerasi stessa che ha una sintesi molto rapida e viene mantenuta dalla presenza del fattore. Due filamento che si duplicano in maniera diversa ha prodotto il modello a trombone in cui si formano anse in virtù del fatto in cui uno dei due filamenti viene replicato diversamente. L'elicasi è un esamero di sei subunità che legano l'ATP in maniera diversa: due opposte legano ATP, altre ADP e altre sono vuote: le elicasi separano i filamenti idrolizzando ATP si trovano sei subunità identiche ma schiacciato l'anello: delle sei due opposte legano ATP, due ADP e due sono vuote. Questi tre stati si interscambiano cambiando la schiacciatura dell'anello e gli anelli che legano il DNA oscillano e possono portare DNA nell'anello centrale svolgendolo. L'elicasi è uno dei primi fattori in quanto la sua funzione è quella di separare i due filamenti permettendo il reclutamento della macchina di replicazione e deve

svolgere le due catene a monte. È precoce ma rimane associata. L'altra proteina è una proteina SSB che lega il DNA a singolo strand e impedisce che forme delle strutture secondarie stabili in modo che nel filamento discontinuo con la formazione dell'innesco a primer e quello a valle reso a singolo grazie all'elicasi che potrebbe assumere delle strutture secondarie stabili che renderebbe difficoltosa l'attività della polimerasi. Questo viene pertanto lasciato lineare e dopo le proteine si staccano e le strutture secondarie del DNA sono molto stabili e possono bloccare la macchina di duplicazione.

Nel caso degli eucarioti arrivati in fondo al filamento la duplicazione termina, nel caso dei procarioti la situazione è semplice: la terminazione dell'*Escherichia coli* è terminata da sequenze Ter molto brevi che sono poste a 180 gradi rispetto all'origine di replicazione. Quando le forcelle raggiungono questa zona la DNA polimerasi viene separata e vengono separate le due catene di DNA che si sono formate e sono legate a proteine che favoriscono la separazione. Nel caso degli eucarioti la situazione è più complessa in quanto è presente cromatina compatta: occorre rimuovere gli istoni dalle origini di replicazione, formare un complesso di pre replicazione presente alle origini di replicazione e tutto questo viene orchestrato da una macchina più complessa rispetto ai procarioti e viene coordinata da fattori dette cicline, che attivano la duplicazione del DNA durante la fase del ciclo cellulare specifico. Queste proteine controllano che l'attivazione avvenga nel momento corretto. Il reclutamento della macchina può avvenire prima della fase S: le cicline impediscono che questo reclutamento dia origine immediata alla duplicazione del DNA. Il reclutamento non può avvenire prima della fase S e agisce sulle proteine che fosforilano elementi appartenenti alla macchina di replicazione.

3.3.1 Formazione del complesso di prereplicazione alle origini di replicazione

Alcune proteine hanno nomi diversi con funzioni uguali: PCNA pinza scorrevole, polimerasi epsilon - polimerasi III, MCM 2-7 elicasi, polimerasi α , primasi e SSB RPA. Il complesso è comunque conservato. Esistono un numero maggiore di polimerasi con un ruolo importante nella riparazione del DNA. La duplicazione inizia negli eucarioti: un ruolo importante nel processo di controllo di inizio è svolto dalle CDK che fosforilano chinasi - dipendenti dalle cicline, che vengono attivate dalle cicline che quando vengono prodotte attivano chinasi e danno il via al processo di duplicazione. All'origine di replicazione vengono reclutati i primi attori come Orc 1 - 6 formato da sei subunità e recluta altri due fattori Cdt1 e Cdc6 e questo complesso permette il reclutamento delle due elicasi MCM 2 - 7. Quest'ultimo complesso viene detto complesso di pre replicazione che non è in grado di duplicare il DNA e non è ancora attivo. Viene reso attivo grazie al reclutamento di chinasi CDK che fosforila Cdc6 e Cdt1 che vengono rilasciate favorendo il reclutamento del caricatore della pinza, della pinza scorrevole, della DNA polimerasi, DNA primasi e così via. Senza l'attività della chinasi il complesso di pre replicazione non inizierebbe a reclutare fattori e non inizia la replicazione del DNA. L'attività delle cicline è importante per attivare la chinasi. Senza la sintesi delle cicline la duplicazione non ha inizio. *audio corrotto* nei complessi di prereplicazione non funzionanti in quanto attività CDK è bassa. Andando a fosforilare i complessi dei siti di prereplicazione li vanno ad attivare. L'attività delle cicline sono quattro famiglie di cicline che interagiscono con quattro CDK e sono attivate in punti strategici durante il ciclo cellulare e contribuiscono a controllare le varie fasi del ciclo cellulare. Altri fattori associati alla macchina di replicazione sono le topoisomerasi, la replicazione del DNA con differenze legate a tempi, attivazione e componenti è simile tra eucarioti e batteri.

3.3.2 Istoni

La maggior parte delle proteine istoniche viene sintetizzata nella fase G1 e la produzione degli istoni è massiccia, facilitata dal fatto che gli RNA sono molto stabili e che la maggior parte degli eucariote possiede geni multipli per ciascun istone. Gli istoni vengono anche sintetizzati durante la fase S. Alcuni degli istoni rimangono associati e vengono distribuiti in maniera randomica tra i due filamenti.

3.3.3 Telomeri

I telomeri sono le estremità dei cromosomi, caratterizzati da una sequenza ripetuta di GGGTTA. La problematica non è presente nei batteri in quanto hanno DNA circolare. Mentre la loro problematica è presente dove non è presente DNA circolare ma lineare. Fu scoperta da Barbara McClinton nel mais e i cromosomi rotti tendono ad unirsi tra di loro formando strutture non canoniche. I telomeri è il risultato della duplicazione non perfetta alle estremità dei cromosomi. I telomeri sono originati e mantenuti, permettono di mantenere la stabilità del cromosoma e li stabilizzano rendendoli incapaci di interagire con altre estremità. Sono originati e mantenuti dalla telomerasi che scoprono questa attività detta transferasi terminale telomerasica. La telomerasi è un complesso con una componente proteica detto TerT e una componente a RNA detta TerC. Di fatto questo complesso si posiziona nelle RNP. Ha una componente proteica a mano semi aperta e una a RNA all'interno del palmo. È necessaria in quanto l'ultima parte del cromosoma nel filamento lagging non possiede primer e non può pertanto essere sintetizzata in quanto non si trova l'OH necessario. La telomerasi usa a componente a RNA per allungare il filamento parentale e grazie alla sua attività di retrotrascrizione lo allunga con le sequenze ripetute n volte aumentando lo spazio affinché la primasi possa creare un primer e la polimerasi possa copiare la sequenza. Se non si aggiungessero si perderebbero informazioni. Questo processo perde efficienza con il numero di divisioni in quanto la lunghezza dei telomeri è inferiore. Correlazione tra invecchiamento cellulare e numero di telomeri. L'attività delle telomerasi è alta in cellule caratterizzate da un'elevata duplicazione come cellule germinali, cellule epiteliali, linfociti. Meno attiva nelle cellule staminali adulte e fibroblasti. La telomerasi aggiunge sequenze telomeriche e la polimerasi copia il segmento non copiato, si riforma la struttura a doppio filamento riconosciuta da TRF1 e proteina POT (protection of telomers) che si associano alle porzioni terminali neosintetizzate. Il meccanismo non è ancora chiaro ma l'attività della telomerasi è bloccata quando questi segmenti diventano abbastanza grandi inibendo l'attività della telomerasi. Un'attività della telomerasi alta permette alle cellule di sopravvivere in maniera continua. Prendendo le cellule e mettendole in coltura mano a mano che si dividono vanno incontro a una fase esponenziale di crescita fino alla raggiunta di un plateau detto fase di senescenza, alterata potenziando l'attività delle telomerasi, questo limite prende il nome di limite di Hayflick, in cui le colture cellulari vanno in un processo di senescenza. È possibile modificando l'attività delle telomerasi modificare questo limite. Nel caso dei fibroblasti con il gene della telomerasi non si ha perdita dei telomeri e la proliferazione continua in maniera indefinita e le cellule non vanno incontro a senescenza. Si è scoperto che non è possibile andare incontro a immortalità in quanto overesprimendo la telomerasi le cellule durante la proliferazione accumulano errori che continuando a proliferare si aggiungono e aumenta la probabilità del destino tumorale e che ci sono cellule senza attività telomerasica come le cellule del sistema nervoso che non vanno incontro a mitosi. Il ripristino dell'attività telomerasica è importante per l'aumento delle capacità rigenerative. La discheratosi congenita per perdita delle funzioni della telomerasi causa pigmentazione anomala, distrofia ungueale, ingrignimento precoce, cirrosi epatica e disordini intestinali, il gene è localizzato sul cromosoma X e il gene mutato è la discherina, una chinasi che si lega a piccoli RNA nucleolari coinvolta nei processi di modifica dell'RNA ribosomiale.

3.4 Lezione 8

3.4.1 Mitochondri

* Non ha registrato *

La struttura del sistema di creste del mitocondrio e la prossimità con il sistema vescicolare del reticolo endoplasmatico. Non c'è continuità di membrana e contenuti ma sono in stretta prossimità. Questo avviene in quanto i mitocondri sono un buffer per lo ione calcio contenuto all'interno dell'ER liscio e rilasciato nell'ambiente intracellulare e svolge il ruolo di messaggero secondario. Quando non è più necessario rientra nel ER o nei mitocondri. I mitocondri possono dividersi (duplicazione del DNA) per fissione e possono fondersi tra di loro, regolato da una serie di meccanismi che risponde alle esigenze della cellula. I mitocondri sono strutture molto mobili, vengono trasportati utilizzando i microtubuli come binari. Le molecole del trasporto sono chinesine e dineine, molecole motrici che si attaccano ai mitocondri e microtubuli permettendo il trasporto dalla periferia alla parte centrale e viceversa. Il DNA mitocondriale è costituito da una molecola a doppio filamento circolare. Non porta molti geni in quanto la maggior parte sono stati trasferiti all'interno del genoma della cellula ospita. Contiene 37 geni all'interno degli introni per l'rRNA, per il tRNA e 13 per gli mRNA che vengono tradotti in proteine. Si distingue una catena H heavy e complementare L low con asimmetria dei geni localizzati sulle due catene. Ci sono 5 - 10 molecole di DNA per mitocondrio con un codice genetico ridondante interpretato in maniera diversa rispetto alla traduzione citoplasmatica. Vi sono patologie associate alla funzione dei mitocondri, un'eredità materna che non segue le leggi di Mendel. L'insorgenza della malattia dipende dalla percentuale di mitocondri che contengono quella mutazione. Recentemente è stato visto che alcuni RNA prodotti dal nucleo della cellula per i mitocondri vengono trasportati in prossimità dei mitocondri, circondati da ribosomi della cellula e si localizzano in prossimità dei mitocondri, esistono delle sequenze negli mRNA che trasportano l'RNA dal citoplasma in prossimità dei mitocondri e quando lo raggiungono vengono tradotti e producono proteine e direttamente incorporate nei mitocondri e usano il sistema di trasporto TOM e TIM. La sequenza di segnale è poi rimossa dalle proteine da una peptidasi. Senza il peptide segnale la proteina non interagisce e non entra nei mitocondri. I chaperoni che si legano alla proteina entrante e impediscono che assuma una struttura secondaria durante il trasporto in modo da facilitare il passaggio durante il trasporto. Quando questo è finito si separano. Conoscendo la sequenza del peptide segnale si possono inserire proteine nel mitocondrio artificialmente.

Capitolo 4

Trascrizione

La trascrizione è il meccanismo attraverso cui l'informazione trascritta nel DNA viene trasportata nell'RNA. Si consideri che la trascrizione è un meccanismo generale che porta alla traduzione di RNA: mRNA (codifica proteine), tRNA (codifica amminoacidi), rRNA (nei ribosomi), microRNA (ruolo regolatorio, bloccano la traduzione di mRNA), snRNA (piccoli RNA nucleari processi nucleari come lo splicing), snoRNA (piccoli RNA nucleolari, processare e modificare rRNA, maturazione degli rRNA), siRNA (piccoli RNA interferenti che spengono l'espressione genica promuovendo la degradazione di mRNA specifici), piRNA (piwi interacting RNA, piccoli RNA che interagiscono con proteine piwi che proteggono la linea germinale dagli elementi trasponibili), lncRNA (long non coding RNA impalcatura per la regolazione di processi cellulari come inattivazione del cromosoma X). Il processo di trascrizione è ampio ma a tutta una serie di RNA con un ruolo strutturale, funzionale e di regolazione. Il processo di trascrizione si attua a una serie di fasi e l'enzima che svolge il ruolo principale è l'RNA polimerasi, una complessa macchina molecolare caratterizzata da diverse subunità come nella DNA polimerasi è un oloenzima ma a differenza della DNA polimerasi è in grado di iniziare la trascrizione senza bisogno di inneschi. Utilizzando un filamento di DNA come stampo. A differenza dei procarioti gli eucarioti presentano 5 RNA polimerasi: RNA polimerasi I, II e III rispettivamente per rRNA tranne 5s, mRNA microRNA e snRNA e snoRNA, tRNA e rRNA 5s. Una sola nei procarioti. Il processo mediante cui la cellula trascrivendo un mRNA vuole produrre quantità di proteine: ci sono geni trascritti con un alto grado di trascrizione con una certa quantità di proteine e geni trascritti con efficienza più bassa e minore quantità di proteine. È semplificativo in quanto un'unico mRNA può produrre più proteine in quanto da un'unica molecola di mRNA ci sono diverse molecole proteiche legato alla stabilità dell'RNA e meccanismi che possono inibire la traduzione del pool di RNA può ridurre il numero di proteine prodotte. Una cellula può produrre una quantità di RNA bassa ma tradotto con efficienza elevata. Quando si vuole bloccare la traduzione è comodo avere poche copie di RNA in giro. In quanto lo spegnimento potrebbe richiedere più tempo. Fattori: efficienza di traduzione e stabilità di RNA, numero di RNA. Gli mRNA possiedono una sequenza 5' UTR untranslated region, una CR, coding region che inizia con ATG per metionina, triplette per amminoacidi e la tripletta di stop: TAA, TGA o TAG, poi la regione 3' UTR, analoga alla 5' con dimensioni differenti di solito più lunga in quanto ci sono sequenze regolatorie con sequenze di stabilizzazione o di trasporto a cui si legano RNA binding protein. I due filamenti di DNA uno è quello stampo che funge da stampo e uno è quello edificante alla fine un trascritto ha una sequenza complementare al filamento stampo ed equivalente a quello codificante.

4.1 Struttura delle RNA polimerasi

Le RNA polimerasi eucariotiche e procariotiche sono simili anche se le prime contengono altri cofattori. La struttura ricorda una mano aperta che ha la funzione di creare un solco per l'alloggiamento del DNA e poi ha domini per accogliere i nucleotidi, per riconoscere la sequenza sul DNA e domini che servono alla molecola di RNA in fase di sintesi di lasciare e uscire dall'enzima. Nei batteri ci sono di due subunità alfa, due beta e una omega, lo stesso per la polimerasi I, II e III a cui si aggiungono altre componenti. In particolare la II contiene una coda, un dominio C terminale soggetta a modifiche importanti per le fasi di maturazione per l'mRNA. Le RNA polimerasi possono essere inibite da delle sostanze che vengono utilizzate durante gli esperimenti e sono l'actinomomicina B e l'alpha aminitina prodotta dal fungo *amanita muscaria*. Queste sostanze bloccano l'attività dell'RNA polimerasi e bloccano la trascrizione impedendo all'RNA polimerasi di camminare lungo il DNA e di copiare il filamento stampo. Queste sostanze inibiscono sia specificamente I o II. A basse concentrazioni l'alpha aminitina solo l'attività della polimerasi I. Mentre a concentrazioni elevate sia rRNA che mRNA o tRNA. E permettono di fare degli esperimenti per analizzare la stabilità degli RNA. Gli inibitori della sintesi di RNA come della sintesi proteica possono essere utilizzati per capire la stabilità di RNA o della proteina. Le fasi importanti del processo di trascrizione sono tre: l'inizio in cui l'RNA polimerasi interagisce con il DNA, la fase di allungamento e la terminazione. La fase più lunga è quella di inizio in cui l'RNA polimerasi deve riconoscere dove posizionarsi sull'RNA riconoscendo i promotori, forma una bolla di trascrizione piccola simile alla bolla di replicazione, inizia a produrre i primi nucleotidi creando una piccola catena e se tutto è andato bene inizia la fase di allungamento. La fase di inizio è quella più critica. L'allungamento è una polimerizzazione con enzima processivo e il processo di terminazione che si conclude con il distacco dell'RNA polimerasi e della catena di RNA. Dopo di che la polimerasi può iniziare il ciclo. Queste tre fasi avvengono sia per procarioti che eucarioti. La differenza sta che nei procarioti il processo di trascrizione precede di poco il processo di traduzione: appena sintetizzato l'mRNA viene legato dai ribosomi in quanto l'RNA non va incontro a modifiche come lo splicing per gli eucarioti. L'RNA contiene delle sequenze dette introni che devono essere rimosse. La rimozione di queste sequenze avviene nel nucleo, va nel citoplasma dove viene tradotta. L'RNA polimerasi deve posizionarsi in un punto preciso in quanto deve attaccarsi in maniera specifica e iniziare a copiare in una determinata posizione in modo che il trascritto abbia senso biologico. Queste sequenze sono sequenze promotrici e l'RNA polimerasi una sequenza a -35, una a -10 prima dell'inizio della trascrizione. Si posiziona a -35 o -40 prima dell'inizio della trascrizione. La sintesi dell'RNA non fa partire subito la polimerizzazione e allungamento ma avviene lentamente: la polimerasi inizia a fare un filamento di fino a 9 nucleotidi che spesso abortisce, si riforma un altro piccolo frammento e inizia la fase di allungamento. L'inizio della trascrizione è lento. Il riconoscimento di queste sequenze che permettono l'attacco specifico a monte dei geni. Ci sono due domini β e β' , RPB1 e RPB2 per gli eucarioti hanno alta affinità per il DNA l'RNA polimerasi ha una affinità ed è in grado di legarsi al DNA in maniera forte, si attacca in maniera specifica grazie ad un'altra subunità le subunità alpha mantengono insieme le altre subunità e il dominio ω promuove e mantiene stabile il complesso. Un altro dominio, il fattore o dominio σ costituito da una serie di domini che formano anse e strutture. Il dominio più famoso è il sigma 70 (dal peso molecolare) che conferisce specificità e riconosce le sequenze a monte del sito di trascrizione, importante in quanto permette all'RNA polimerasi di riconoscere le zone promotrici. L'RNA polimerasi possiede un solco centrale di 55 Å con una larghezza di 25 Å che può contenere la doppia elica e all'interno del solco sono presenti 15 - 20 nucleotidi. Il fattore sigma 70 è il più espresso e permette la trascrizione dei geni house keeping che mantengono la struttura cellulare. È un requisito per la normale crescita cellulare. Altri sigma 5, 32 che vengono utilizzati in particolari condizioni. L'interazione dell'RNA polimerasi con il DNA avviene grazie a un dominio a scanalatura

he alloggia il DNA e incontra il timone che mantiene aperta la bolla di trascrizione * audio corrotto
* se si vanno a digerire il DNA con degli enzimi vanno a digerire la DNA polimerasi, conoscendo la sequenza rimanente estraendola e sequenziandolo si capiscono quanti nucleotidi vengono riconosciuti dall'RNA polimerasi il footprinting permette di capire quanti nucleotidi vengono protetti da una determinata proteina.

4.2 Inizio

L'inizio della trascrizione prevede una fase iniziale in cui la RNA polimerasi sintetizza e poi rilascia dei corti frammenti di RNA fino al raggiungimento di 10 - 12 nucleotidi in modo di spiazzare il loop del dominio sigma che occupa il canale di uscita. Il meccanismo mediante cui avviene il meccanismo ha tre modelli proposti:

- Passaggio transiente: l'RNA polimerasi riconosce le sequenze promotrici, si attacca, avanza e sintetizza un frammento abortivo e torna indietro.
- A bruco: l'RNA plimerasi si attacca, cambia conformazione, si allunga e favorisce la fomraizione della bolla di trascrizione, trascrive il frammento.
- Ad accorciamento in cui l'RNA polimerasi si attacca ingloba una parte del DNA e trascrive dei primi frammenti.

Non si escludano a vicenda e il modello che rispetti le osservazioni sperimentali sia il terzo. Le prime fasi non sono ben comprese. L'inizio no nè continuo ma c'è un tentativo che abortisce e ritenta.

4.2.1 Meccanismo di trascrizione

L'enzima si lega al promotore riconoscendo le posizioni a -35 e a -10 i domini sono il dominio sigma 2 e 4. Questi domini riconoscono le sequenze a monte dall'inizio di trascrizione. L'interazione dei domini sul DNA forma il complesso chiuso, chiamato così in quanto il DNA non è ancora aperto. La formazione di questo complesso è reversibile. A questo punto si passa al complesso in cui le due catene sono separate, si ha la formazione della bolla di trascrizione e uno dei due domini sigma 1, 1 che prima bloccava l'entrata del DNA si apre e facilita l'inserimento della doppia elica nel canale, si stabilizza la bolla di trascrizione ed iniziano ad entrare i primi dntp e formarsi i primi nucleotidi di RNA. QUesto complesso si dice complesso aperto. A questo punto si ha la clearance del promotore, cambi conformazionali: il dominio sigma 4 ruota e favorisce la formazione e apertuare del canale per l'uscita dell'RNA che inizia a essere sintetizzato in maniera continuativa.

4.3 Allungamento

L'allungamento avviene grazie alla formazione di un legame fosfodiesterico tra i ribonucleotidi, reazione facilitata dalla lisi del pirofosfato, uno degli ioni importanti è il magnesio importante in quanto tampona le cariche negative che si originano dal pirofosfato e dalla scissione in fosfato. L'RNA polimerasi è meno precisa rispetto alla DNA polimerasi. Esistono meccanismi di controllo della qualità ma c'è un certo grado di errore. I fattori che promuovono l'attività polimerizzatrice sono fattori diversi e alcuni sono coinvolti nei meccanismi di riparazione (GreA, GreB), TFSII o I o III, vuol dire transcription factors associati alla RNA polimerasi II, I o III rispettivamente. Il meccanismo è simile in eucarioti e procarioti.

4.4 Terminazione

La terminazione differisce tra eucarioti e procarioti. Nei procarioti si trovano due meccanismi: uno intrinseco che non dipende da Rho: Rho-indipendente e uno Rho-dipendente. Un terminatore intrinseco è un DNA ricco di sequenze palindromiche ricco in C e G seguito da un tratto di 8-10 nucleotidi ricco in A e T, una struttura che trascritta forma una struttura a forcina (stem loop) che prodotta dall'RNA polimerasi durante la trascrizione destabilizza l'interazione tra RNA polimerasi, DNA e RNA, pertanto la polimerasi si stacca e la terminazione ha termine. La regione ricca in A a seguire sembra abbia un ruolo a stabilizzare la struttura e destabilizzare la bolla di trascrizione. Il meccanismo Rho-indipendente è legato alla trascrizione di una sequenza che forma una struttura secondaria che destabilizza l'oloenzima. Quella Rho-dipendente è legata alla presenza di un fattore detto Rho e legata alla sua capacità di accedere all'RNA. Riconosce una sequenza specifica all'interno del DNA a forcina riconosciuta dalla RNA binding protein Rho che nel momento in cui viene trovata destabilizza l'RNA polimerasi promuovendone il rilascio e la fine della trascrizione. La proteina Rho si lega all'RNA lo scannerizza fino a quando trova la sequenza dove si blocca causando il rilascio dell'RNA polimerasi. La proteina si lega a valle dei ribosomi che stanno traducendo i fattori in quanto se si legasse all'inizio verrebbe bloccata dai ribosomi.

Negli eucarioti invece ci sono tre RNA polimerasi sono presenti altri fattori addizionali e l'RNA polimerasi II ha una coda C terminale caratterizzato dall'avere una sequenza ricca in tirosina serina treonina e prolina le quali vanno incontro a meccanismi di modifica post traduzionale come fosforilazione con ruolo nell'attività dell'RNA polimerasi e di richiamo dei fattori che vanno a modificare l'RNA in fase di trascrizione in quanto va incontro a processi di maturazione e modifica. Il meccanismo di trascrizione ad opera dell'RNA polimerasi I, II e III. La formazione del complesso per l'RNA polimerasi I, di geni che trascrivono per rRNA si trova il complesso UBF1 (upstream binding factor) che, questi due si legano a monte e formano dei dimeri che ripiegano il DNA. Il tetramero forma il complesso SL1, multiproteico che comprende la TATA box binding protein, altri fattori detti TAF in quanto TBP associated factor che si associano alla TATA box binding protein i fattori UBF riconoscono una sequenza a monte della zona promotrice, si legano, formano un tetramero che facilita il reclutamento della TBP e fattori associati alla proteina il tutto forma SL1 e tutto facilita il reclutamento dell'RNA polimerasi I in maniera corretta sul promotore. Se questo complesso si forma in una posizione errata determina un reclutamento errato dell'RNA polimerasi sull'RNA. Per l'RNA polimerasi III per la trascrizione per i geni dei tRNA in questo caso si trova un complesso simile alla TBP e un fattore Transcription factor III C che riconosce sequenze a valle del promotore detto Box A e Box B a cui si lega il TFIIC che permette il reclutamento di TFIIB che promuove il reclutamento dell'RNA polimerasi III e la trascrizione dei geni per il tRNA, per i geni degli rRNA si trova anche il riconoscimento di un altro BoxB tra BoxA e BoxC. Nel caso dell'RNA polimerasi III per l'rRNA 5s si trova un altro fattore TFIIA che riconosce una sequenza detta BoxC a valle della zona promotrice e viene reclutato che facilita il reclutamento di TFIIC che facilita il reclutamento di TFIIB che recluta l'RNA polimerasi III, basta un fattore in più per rendere la trascrizione specifica per il gene per rRNA 5s. Utilizzando un fattore in più che riconosce un boxC presente solo nei geni 5s. Per gli RNA messaggeri la situazione è complessa riguardo le sequenze nel promotore: si trova la TATA box, delle sequenze comuni come le sequenze BRE e altre riconosciute dai TFIID che si trovano a valle della zona promotrice e ci sono delle sequenze enhancer che si trovano molto distanti anche su cromosomi diversi che facilitano la trascrizione di geni specifici, i meccanismi di regolazione è complesso. l'RNA polimerasi II coinvolge 20 proteine. Il primo complesso che si lega alla TATA box è la TFIID che ha la TBP e fattori ad esso associati, grande 700 kilodalton e è costituito da 11 fattori che riconoscono e si legano al DNA la struttura della TBP presenta dei domini ricchi di foglietti beta come una sella che quando riconosce la sequenza TATA si lega al DNA e gli fa fare

una curva, importante in quanto avvicina delle sequenze presenti nelle regioni al DNA facilitando il reclutamento di fattori importanti per la trascrizione: TFIID che stabilizza l'interazione tra TFIIB e il DNA e il fattore TFIIB la cui funzione è quella di marcare in maniera corretta il sito dove l'RNA polimerasi II va a legarsi al DNA. Permette all'RNA polimerasi di trascrivere partendo dal giusto nucleotide. Una volta formato il complesso TFIID-A-B si ha il reclutamento dell'RNA polimerasi II con il fattore TFIIF che ha un ruolo simile al fattore sigma dei procarioti e si lega all'RNA polimerasi II quando l'enzima è libero e gli impedisce di legare altre regioni del DNA e stabilizza le interazioni tra RNA polimerasi e i fattori TFIIB-D. La coda rimane libera in quanto può andare incontro a modifiche ad opera di fattori reclutati successivamente come il fattore TFIIF, una chinasi con la funzione di fosforilare alcuni amminoacidi presenti sulla coda che rende favorevole la clearance del promotore, il meccanismo con cui l'RNA Polimerasi abbandona il promotore e inizia l'attività di allungamento.

4.4.1 Terminazione in eucarioti

Sono stati proposti dei modelli in quanto non è ancora chiaro come possa avvenire:

- Modello alloterico: o antiterminatore è un modello che ricorda il modello nel meccanismo di blocco trascrizionale nei procarioti Rho indipendente: si forma una struttura a stem loop che favorisce la dissociazione del complesso di trascrizione.
- Modello a torpedo: l'RNA trascritto una volta che è stata trascritta la regione di poliadenilazione viene tagliato un'enzima che la riconosce e lo taglia. L'RNA tagliato può andare incontro a modifiche e l'RNA polimerasi una volta tagliato l'RNA interviene una esonucleasi che inizia a degradare l'RNA rimanente e arriva a un certo punto in cui comporta il distacco e dissociazione dell'RNA polimerasi e il blocco della trascrizione.

Vi sono sequenze comuni a livello della 3' UTR detto sito di poliadenilazione AAUAA nella 3' UTR, sequenza presente in tutti gli mRNA che hanno aggiunta di poli A importante in quanto legata alla proteina PABP (poly A binding protein che si lega alla coda e stabilizza l'RNA), a livello della 5' UTR va incontro ad una modifica detta capping con l'aggiunta di una modifica nel primo nucleotide normalmente un A gli si aggiunge una 7 metil guanosina con il compito di stabilizzare il trasporto e la traduzione. In 5' e 3' ci sono segnali comuni ma altre specifiche al gene. RNA messaggeri con sequenze riconosciute da proteine che stabilizzano l'RNA.

* NON C'E registrazione, suppongo inizio di NES e NLS *

4.5 Trasporto nucleare

La sequenza NES (nuclear export sequence) permette alle proteine localizzate nel nucleo di uscire da esso. Una proteina con un NLS (nuclear localization sequence) andrà dentro e fuori dal nucleo. Proteine con solo NLS vanno nel nucleo e vi rimangono. Può essere vero in proteine che legano RNA hanno NLS ma non NES in quanto entrano nel nucleo grazie all'NLS e escono in quanto esportate insieme all'RNA. Molto spesso la predizione bioinformatica può dire se la proteina contiene un NLS e un NES (meno accurata) tuttavia si deve sempre verificare se la predizione è corretta oppure no. Una proteina contiene un NLS e un NES. Per verificare se queste due sequenze sono funzionali si prova a vedere dove si trova la proteina attraverso l'immunostaining con anticorpo. Si può trovare nel nucleo, nel citoplasma o in entrambi. Se la si trova esclusivamente nel nucleo si trova un NLS funzionante, se la si trova solo nel citoplasma NES è più efficiente o l'NLS non funziona in quanto può necessitare di modifiche. se si trova in entrambi i compartimenti presenta entrambe le sequenze.

È importante per chiarire il trafficking all'interno della cellula. Il movimento nucleo citoplasma avviene grazie alla presenza di fattori detti importine ed esportine. L'importina è responsabile del trasporto dal citoplasma al nucleo di proteine che contengono l'NLS. Si lega al cargo il complesso importina cargo passa il poro nucleare, nel nucleo l'importina lega la RanGTP, una GTPasi che determina il distacco dell'importina dal cargo che rimane nel nucleo, l'importina e la Ran viene esportata, si idrolizza GTP la Ran GTP si separa. L'esportina lega il RanGTP che permette al complesso esportina RanGTP di legarsi alla proteina cargo che contiene il NES che lascia il nucleo e va al citoplasma. RanGTP viene idrolizzato, cambio conformazionale, dissociazione del complesso trimetrico e distacco dell'esportina dal cargo e l'esportina può ritornare nel nucleo. Per legarsi al cargo l'esportina deve legarsi a RanGTP. La leptomomicina B è utilizzata per lo studio di questo trafficking in quanto va a competere con l'esportina, con il cargo per il legame all'esportina legandosi ad essa che non lega più il cargo e avendo proteine esportate dal nucleo al citoplasma aggiungendo la leptomomicina B la proteina rimane nel nucleo. Tutte le proteine vengono esportate anche in altri modi e questo avviene in quanto le proteine nucleari vanno incontro a degradazione per il turnover. Il trafficking nucleo-citoplasma è regolato da importine ed esportine ma può avvenire in altri modi anche attraverso diffusione. Inibendo l'importazione di proteine nel nucleo non si trovano nel citoplasma. La sequenza NLS è ricca in arginina e lisina. Per essere sicuri che le sequenze funzionino come NLS si provano con dei mutanti andando a modificare delle sequenze. La sequenza di NES tipica è caratterizzata da una leucina seguita da tre amminoacidi, una leucina, due amminoacidi, leucina, un amminoacido e isoleucina o leucina. Il motivo di questa complicazione è che questi amminoacidi in mezzo possono variare in numero. Con molta più variabilità.

* NON C'È LA REGISTRAZIONE DIO BONINO * Regolazione della trascrizione dell'operone lac e come la cellula batterica regola la trascrizione con i livelli di lattosio e glucosio utilizzando la repressione e il lattosio come induttore e il repressore come lac e la proteina K che lega cAMP e i cui livelli sono legati alla quantità di glucosio presenti all'interno della cellula. La zona promotrice del gene policistronico per gli enzimi del metabolismo del lattosio presenta un sito di legame per la proteina CAP a monte della sequenza riconosciuta dall'RNA polimerasi e si trova la regione di DNA che viene riconosciuta dal repressore LAC che legandosi nella regione impedisce il legame dell'RNA polimerasi bloccando la trascrizione. Questo sistema è stato utilizzato utilizzando cellule parzialmente diploidi per l'operone lac: mutazioni a carico dell'operatore e del repressore cercando di complementare il fenotipo utilizzando un DNA circolare plasmide inserendolo nelle cellule mutanti e andando a vedere se il plasmide è in grado di ripristinare il sistema di controllo. Si è visto che mutazioni a carico dell'operatore e della regione riconosciuta dal repressore non possono essere salvate con questo meccanismo in quanto queste mutazioni avvengono sul DNA e agiscono in cis a valle sullo stesso filamento e mutazioni dell'operatore il plasmide inserito non è in grado di rendere il batterio normale e rispondente al lattosio. A differenza di mutazioni che avvengono a carico del gene che codifica il repressore in quanto il plasmide codifica per un repressore il quale poi si lega alla sequenza dell'operatore. Il gene che trascrive per il repressore stesso agisce in trans.

4.6 Lezione 10

Sono state isolate altre mutazioni che accadono sulla proteina CAP a cui si lega il cAMP che possono essere artificiali o naturali possono andare a colpire diverse regioni della proteina come N terminale che caratterizza le sequenze ad alpha elica che interagiscono con il solco maggiore o minore del DNA, mutazioni a questo livello impediscono alla proteina di legare al DNA, nella zona C terminale la rendono incapace di legare il cAMP, un mutante dominante repressivo e non in grado di legare il cAMP e di legare il DNA e regolare e potenziare la trascrizione in assenza di glucosio.

4.6.1 Operone triptofano

Per il metabolismo del triptofano, un amminoacido importante per il funzionamento della cellula e il batterio va ad attivare un'operone detto operone del triptofano che trascrive un RNA messaggero con almeno 5 geni la cui funzione è di sintetizzare il triptofano in cui c'è carenza dell'amminoacido anche nel caso del lattosio che viene scisso e la cellula diventa in grado di produrre una serie di enzimi che producono l'amminoacido. In questo caso l'operone triptofano possiede un operatore legato da un fattore di regolazione e a monte del operone si trova una sequenza leader che si tratta di una sequenza di 140 nucleotidi caratterizzata da una piccola regione codificante per un peptide leader, quattro regioni trascritte e caratterizzate da una certa complementarità e in grado di creare strutture a doppie filamento (1-2, 3-4), una coda di poli U e una terminazione del peptide leader e l'inizio del mRNA che codifica per gli enzimi coinvolti nel metabolismo del triptofano. Il peptide leader ha funzione regolatoria e contiene almeno due amminoacidi triptofano di conseguenza viene prodotto quando il triptofano è presente con livelli di triptofano sufficienti. In presenza di scarsa quantità di triptofano il peptide ha problemi ad essere tradotto. In assenza di sintesi proteica le sequenze 1 e 2 e 3 e 4 interagiscono tra di loro. 3 e 4 funziona come terminazione Rho indipendente. Questa struttura di 3 e 4 si comporta come terminazione Rho indipendente destabilizzando l'RNA polimerasi. L'RNA viene trascritto e in presenza di triptofano il ribosoma inizia a tradurre il peptide leader e lo traduce il ribosoma non va in stallo e impedisce la formazione dell'ansa 1 e 2 ma non di 3 e 4, si trova un ribosoma in fase traduzionale la cui traduzione avviene contemporaneamente con la trascrizione e l'RNA polimerasi incontra il segmento 3 e 4 e si stacca e non trascrive per i geni coinvolti nel metabolismo del triptofano non trascrivendo per l'operone. Per basso triptofano il ribosoma si blocca in quando il peptide leader non avendo triptofano non continua e favorisce la formazione di una struttura a stem loop tra 2 e 3 e la terminazione 3 4 non si forma e l'RNA polimerasi non viene stabilizzata e trascrive l'RNA per l'intero operone e vengono prodotti gli enzimi per la sintesi del triptofano. Un meccanismo diverso che sottolinea l'importanza delle strutture secondarie che l'RNA può assumere in quanto la struttura può regolare un meccanismo.

Capitolo 5

Splicing

Negli eucarioti la sequenza del DNA non corrisponde a quella dell'mRNA in quanto sono contenute sequenze rimosse dette introni. L'RNA trascritto detto trascritto primario che viene fatto dall'RNA polimerasi deve andare incontro a una serie di modifiche per la rimozione di introni: splicing. Ci sono altre modifiche il capping, aggiunta di un cappuccio nel primo nucleotide nella zona 5' che normalmente è un adenina, l'RNA splicing e la poliadenilazione, l'aggiunta di una coda nella zona 3' una volta che sono avvenute l'mRNA può essere tradotto o andare incontro ad altri destini. Il meccanismo di processamento dell'RNA può avvenire a livello trascrizionale o post-trascrizionale. Tutti questi meccanismi che vanno alla formazione della proteina attiva sta alla base dell'espressione genica. Può andare incontro a una serie di modifiche che regolano la produzione della proteina. Si può controllare la trascrizione dell'RNA, regolare le sue modifiche splicing o splicing alternativo producendo mRNA messaggero diverso che lascia il nucleo che può essere tradotto o degradato, post trascrizionale controllando la sua traduzione in proteina degradandolo oppure può produrre una proteina già attiva o può essere inattiva fosforilandola o acetilandola o modificandola post traduzionalmente. Una volta che l'RNA messaggero è presente nel citoplasma può essere tradotto, degradato o trasportato in una zona della cellula un meccanismo di controllo post trascrizionale che sta alla base del controllo dell'espressione di determinati geni. Un esempio di trasporto è quello dei mitocondri. Un'altra modifica post trascrizionale è l'editing che consiste in una modifica di basi dell'RNA, modifica alla base che contribuisce la variabilità genetica senza andare contro il postulato della biologia molecolare. In quanto l'informazione nel DNA non viene modificata. L'editing è presente anche negli eucarioti e contribuisce a variare l'espressione genica.

5.1 Capping

Il capping 5' è una delle prime modifiche tutti gli mRNA vanno incontro a capping ma anche alcuni RNA non codificanti possono andare incontro a questa modifica. Avviene subito durante l'RNA polimerasi sta trascrivendo ed è attivata da fosforilazioni di specifici amminoacidi della coda dell'RNA polimerasi II, la fosforilazione a seguito di chinasi e altri fattori reclutati durante la trascrizione determina il richiamo di fattori legati al capping che consiste nell'aggiunta di una 7 metil guanosina al primo nucleotide normalmente A nel trascritto primario. Questo avviene in maniera precoce durante la trascrizione (20 nucleotidi) e è importante per un trasporto efficiente e per la traduzione in quanto i fattori coinvolti nella traduzione riconoscono la struttura a CAP e promuove il processo traduzionale, importante per la stabilità dell'RNA in quanto può essere degradata da enzimi che lo degradano da testa o coda che se protetti gli enzimi hanno meno accesso all'RNA e importante per

i meccanismi di splicing. A livello chimico il cap consiste nell'aggiunta di una 7 metil guanosina al 5' del primo nucleotide. Sono coinvolti tre passaggi e tre enzimi. Il primo è una RNA trifosfatasi che va a tagliare il fosfato 5' dell'RNA in crescita lasciando un gruppo bifosfato. Successivamente la guanil transferasi che va ad attaccare un GMP guanosina monofosfato al l'estremità dell'RNA formando un legame 5' 5' infine interviene la guanina 7 metil transferasi che trasferisce il gruppo CH₃ alla guanosina. Questo viene detto CAP 0 in quanto l'unico metile aggiunto viene aggiunto alla guanosina. Ci sono altre modifiche al primo nucleotide detto Cap 1, poi i Cap n che avviene negli RNA virali. Il capping non consiste solo nell'aggiunta della 7 metil guanosina ma viene aggiunta in quanto viene riconosciuta da un complesso Cap binding complex costituito da una CBP20 e CBP80 (pesi molecolari) che si legano ad esso in quanto riconoscono la modifica e proteggono l'RNA che risulta più stabile in quanto protetto da proteine e viene degradato difficilmente e svolgono un ruolo importante in quanto interagiscono con i meccanismi di esporto e sono coinvolti nel processo traduzionale. Queste proteine si legano al Cap nel nucleo e una volta che arriva nel citoplasma vengono sostituiti da fattori che prendono ruolo nel processo traduzionale detti eIF4E, eucariotic initiation factor 4E, coinvolti nell'inizio della traduzione, importanti per un'efficiente traduzione. Il Cap svolge anche un ruolo sia nel nucleo che nel citoplasma dove può essere riconosciuto e legato a fattori che promuovono la traduzione.

5.2 Poliadenilazione

La poliadenilazione avviene nella coda e consiste nell'aggiunta di una coda di A ripetute alla fine del trascritto il cui numero varia a seconda del destino dell'RNA per un'intensa traduzione intensa poliadenilazione. Avviene durante la trascrizione alla fine della 3' UTR una sequenza ricca in A presente a tutti gli RNA incontro a questo meccanismo detta sequenza di poli adenilazione caratterizzata AAUAA seguita da sequenza ricca in GU. Nella trascrizione degli eucarioti un modello prevede che un enzima taglia alla regione ricca in GU e il reclutamento di altre RNAasi che lo degradano l'RNA e determinano il distacco dell'RNA polimerasi. Questo è quello che avviene: gli enzimi riconoscono la sequenza GU. Quando l'RNA viene tagliato in questa zona si ha la possibilità di aggiungere la coda di poliA e avviene grazie a fattori come CPSF (fattore di specificità e riconosce la zona da tagliare) che permette l'attacco della poliA polimerasi che attacca la coda di A. I fattori CPSF (cleavage and polyadenylation specific factor) e CstF (stimola il taglio) e CFIIm CFIIm (fattori di taglio). CPSF riconosce AAUAA e recluta la PAP (polimerasi) che aggiunge le code di A e vengono riconosciute da una proteina RNA binding proteine PAPB PolA binding protein. La modifica determina poi l'associazione con proteine e questa protezione rende più stabile l'RNA e ne impedisce la degradazione. Sono importanti per il riconoscimento di proteine specifiche. Le polyA binding proteine sono la PABPN nucleare e la PABPC citoplasmatica. Come nel caso del capping proteine che si legano nella modifica a livello nucleare e altre che si legano all'RNA nel citoplasma in cui l'RNA può andare incontro a degradazione e pertanto queste proteine si legano all'RNA nella coda del citoplasma. La PAP poliA polimerasi contiene due NLS, un dominio che lega l'RNA e due NLS. Sono state identificate una patologia legata a problemi legati alla produzione della polyA binding protein nucleare detta distrofia muscolare oculo-faringea determinata da abbassamento delle palpebre, difficoltà di deglutizione, debolezza muscolare e paralisi legata all'accumolo di RNA nel nucleo e un accumulo in foci specifiche della poliA polimerasi legata ad una mutazione a carico della proteina che lega la coda di poliA. I foci intrappolano la PAP e l'RNA non viene più esportato in maniera corretta e tende ad accumulare nel nucleo. compare intorno ai 40 - 60 anni e va a colpire il sistema muscolare e neuronale (motoneuroni), interessante che una patologia colpisca questo apparato.

5.3 Splicing

Il fatto che l'informazione scritta nel DNA non veniva portata tal quale negli mRNA maturi si deve a Roberts e Sharp che dimostrarono che i geni contengono delle informazioni e sequenze che non vengono trovate negli mRNA che codificano le proteine. Queste sequenze che vengono trascritte ma rimosse sono gli introni e si distinguono da quelle trascritte e mantenute nell'mRNA e vengono detti estroni. Sono stati considerati come parte del junk RNA ma all'interno degli introni sono contenuti altri geni che vengono trascritti con ruolo strutturale e regolatorio per la produzione dei microRNA o dei lncRNA. Gli introni se presentano un reading frame, sequenza codificata da specifici amminoacidi possono essere fonti della variabilità genica. Molte delle mutazioni che avvengono nel genoma possono andare a colpire gli introni che non vanno a interferire con la funzionalità della proteina. La reazione di splicing è favorita in quanto si ha un guadagno netto di entropia in quanto si creano diverse molecole di RNA da una e gli introni rimossi vengono degradati e lo spostamento verso la formazione di un RNA messaggero splicato è favorita. I meccanismi molecolari che la rendono possibili sono due reazioni di transesterificazione: nella prima si ha un attacco nucleofilo del gruppo OH di un'adenina presente in un sito particolare dell'introne che è diretto al gruppo fosfato 5' della guanina del nucleotide GU e questo attacco nucleofilo determina la rottura del legame fosfodiesterico e la formazione di una struttura a cappio. Il secondo attacco nucleofilo è portato dalla base G nei confronti di un'altra G presente nella doppietta AG e l'attacco nucleofilo determina la rottura del legame fosfodiesterico. In alcuni splicing l'attacco nucleofilo è portato da un'adenina esterna. Questa reazione di transesterificazione che portano la rottura del legame fosfodiesterico in due punti. Le regioni di GU e AG sono le sequenze conservate nei punti di passaggio tra esone e introne. La sequenza AG è la sequenza accettore e la GU è la sequenza donatore. Lo studio dello splicing è complesso in quanto ci sono tantissimi fattori per la regolazione dello splicing, fattori che lo promuovono lo splicing e la rimozione degli introni e fattori che inibiscono lo splicing e mantengono le sequenze introniche all'interno dell'mRNA maturo. Questi fattori sono regolati e lo splicing ha una componente legata al tipo cellulare in cui avviene. Ci sono proteine che legano l'RNA e svolgono ruolo regolatorio in questo contesto. Lo splicing avviene nel nucleo in zone dette regioni detti nuclear speckles dove avviene il meccanismo di splicing. Lo splicing può creare un'enorme variabilità l'RNA primario che contiene le sequenze introniche possiede tanti esoni i quali possono andare incontro a splicing alternativi. Alcune sequenze introniche e altre mantenute. Alla fine da un unico pre-mRNA si generano un gran numero di trascritti alternativi. Da un'unica molecola si ottiene un grande aumento del disordine legato al numero di molecole. Circa il 90% dei trascritti della cellula vanno incontro a splicing alternativo che consiste nel mantenimento o rimozione di sequenze introniche o esoniche. Questo meccanismo molto regolato presenta sequenze con GU e AG mantenute non modificate in quanto altrimenti lo splicing può avvenire in maniera aberrante creando problemi in alcune patologie in cui modifiche degli esoni causano la formazione di uno splicing aberrante con la formazione di un'RNA messaggero e proteina non funzionale. La mutazione nella Distrofia muscolare di Duchenne avviene nell'esone 31 che causa uno splicing aberrante e la rimozione dell'esone 31 con la formazione di una proteina trunca. Altre mutazioni coinvolgono i siti GA o GU causando un non splicing della regione e inserimento di un introne con la creazione di una proteina trunca o aberrante. Ci sono cinque classi di introni: autocatalitici di gruppo I, di gruppo II introni dei tRNA, introni degli archei, introni spliceosomali del pre-mRNA nucleare. La scoperta dell'attività autocatalitica degli introni di gruppo I la si deve a Chech e Sidney Altman che stavano studiando la *tetrahymena thermophila* e videro che la capacità di questi introni di andare incontro a splicing rompendo e formando legami in presenza di determinati fattori, in particolare magnesio e ATP un'RNA era in grado di produrre versioni più corte e di tagliarsi riformando legami. Fino ad allora sembrava che l'RNA sembrasse una molecola di passaggio e grazie a questi esperimenti si è visto che l'RNA possiede una attività

catalitica.

5.4 Introni catalitici di gruppo 1

Questi introni effettuano l'autosplicing grazie ad una serie di passaggi che comportano alla cui base si trova l'attacco nucleofilo e reazione di transesterificazione. L'attacco nucleofilo viene portato da una guanosina esterna usata come fattore. Il tutto determina un ripiegamento della sequenza intronica e la guanosina porta un attacco nucleofilo alla prima nucleotide dell'introne che determina la rottura del legame fosfodiesterico, l'altra guanina presente nella base dell'altro introne porta il secondo attacco nucleofilo, si forma un legame, i due esoni si legano e si libera l'introne che può andare incontro a degradazione. La struttura secondaria e primaria sono indispensabili per l'attività catalitica di questi introni. Alla base si trova una reazione di transesterificazione con l'attacco nucleofilo portato da una guanosina esterna.

5.5 Introni autocatalitici del gruppo 2

Parzialmente presenti nei genomi di alcuni mitocondri e plasmidi delle piante. Lo splicing avviene in maniera simile solo che l'attacco nucleofilo è portato da un'adenina presente all'interno dell'introne, simile al gruppo I. L'attacco nucleofilo viene portato dalla A al sito accettore e si ha la formazione di una struttura a cappio e il secondo attacco nucleofilo simile a prima, l'aggiunzione dei due esoni, rilascio dell'introne a cappio e degradazione. I tRNA vanno incontro a splicing e vengono trascritti come pre-tRNA e la rimozione di un introne.

5.6 Introni spliceosomali del pre-mRNA nucleare

Il meccanismo con cui la maggior parte delle nostre cellule regola il processo di splicing. Questo meccanismo è portato avanti dallo spliceosoma composto da proteine che riconoscono la coppia di siti di splicing tra siti simili i siti di splicing sono regioni conservate GU e AG e la macchina è in grado di riconoscere i siti donatori e accettori all'interno della sequenza e permette l'avvicinamento e il posizionamento nel sito catalitico per far avvenire in modo efficiente le due reazioni di transesterificazione. Facilita l'avvicinamento dei due esoni, ripiega l'introne avvicinando l'introne dell'attacco nucleofilo ai siti donatori e accettori. Nel caso degli eucarioti gli introni hanno lunghezze notevoli (2000 paia di basi) lo spliceosoma facilita l'avvicinamento dei nucleotidi per portare l'attacco nucleofilo in maniera efficiente. Si veda nel dettaglio cosa compone le componenti dello spliceosoma, sono proteine e RNA, in particolare quelli snRNA, piccola con ruolo particolare di regolare e permettere uno splicing corretto, formano dei complessi ribonucleoproteici detti SNRNP questi small nuclear RNA sono di 5 tipi: U1, U2, U4, U5 e U6 in quanto U3 non è componente dello splicing. Questi formano complessi con proteine specifiche e tra queste quella presente è detta proteine SN che formano un anello importante in quanto permette l'assunzione di strutture secondarie stabili importanti durante il processo di splicing. Si deve considerare due siti importanti: il sito GU o donatore e il sito AG o sito accettore. Il primo è quello che si trova nell'introne 5' mentre l'accettore 3' un altro elemento importante è il nucleotide A che si posiziona in una regione specifica detta branching point o punto di ramificazione seguita da una serie di nucleotidi conservati importanti in quanto riconosciuti dai fattori coinvolti nello splicing. Lo splicing mediato dallo spliceosoma inizia con l'appaiamento di U1 con il sito donatore GU, contemporaneamente si lega BBP branching point binding protein che si lega con il sito di branchin con l'adenina origine dell'attacco nucleofilo, poi attacco del dimero di

U2 una a 65 l'altra a 35 kilodalton e una si lega nel punto di passaggio esone sito accettore e l'altra si lega al tratto a valle del branching point. L'interazione di U1 con il sito donatore è mediata dalla componente a RNA presente nella SNRNP e sottoplinea l'importanza della conservazione dei nucleotidi donatore e di alcuni nucleotidi a valle, mutazioni di questi siti determina un allineamento non corretto che può bloccare lo splicing. La formazione di questo complesso nell'introne si chiama complesso precoce E (early), il passaggio dal complesso early al complesso A prevede l'inserimento di U2 che va a rimuovere BBP e comporta un'appaiamento specifico di basi tra U2 e la sequenza nel branching point. Complesso A. Il complesso B1 si forma al reclutamento degli altri tre fattori U4 U6 e U5 che è legato alla rimozione U2AF65-35 e si forma il complesso B1 in cui l'introne viene piegato avvicinando branching point del punto donatore. Si passa al complesso B2 che si forma quando viene scalzato U1, U6 interagisce con l'esone 5' con una sequenza complementare con la regione al 5'. Si passa a B* con la rimozione di U4 e la formazione del complesso C1 è il complesso in cui avviene l'attacco nucleofilo portato da A nei confronti del sito donatore e la rottura del legame fosfodiesterico con la formazione del complesso C1, l'introne forma il cappio e rimane associato grazie a U2, U6 e U5 a questo punto il secondo attacco nucleofilo a carico del sito accettore, legame dei due esoni, rilascio dell'introne a cappio e sua degradazione. La componente U4 di fatto è una componente che impedisce il legame e si interpone tra U5 e U2 e fintanto che si trova U4 il primo attacco nucleofilo non avviene, questo avviene solo quando U4 viene rimosso.

5.7 Minigeni

È una tecnica utilizzata per studiare alterazioni nello splicing. Data la complessità del fenomeno è utile. Si utilizza per studiare se si trovano alterazioni nello splicing si coinvolgono minigeni, si fa esprimere alla cellula un plasmide che trascrive per un minigene, un gene artificiale, una parte di un gene presente nella cellula semplificato che in questo caso è costituito da una serie alternata di 3 isoni e introni. Con questo meccanismo è possibile studiare se lo splicing del minigene avviene in maniera corretta attraverso la PCR. Contando poi il numero di nucleotidi dei frammenti amplificati. La proteina Smn (survival motor neuron) si tratta di una proteina la cui mutazione causa l'atrofia muscolare spinale e si tratta di una proteina di 40 kilodalton e quando è mutata causa questa patologia frequente e presente in 1 su 10000 nati dovuta a mutazioni dovute al gene Smn1 e se ne trova Smn2 di cui si trovano due o tre copie, importante ai fini della patologia. Modifiche di Smn1 causa patologia che causa una degenerazione dei motoneuroni. Sezionando il midollo spinali si trovano le corna dorsali e quelle ventrali che contengono il corpo cellulare dei motoneuroni che comandano la contrazione muscolare. Questa patologia colpisce i motoneuroni nella zona alta del midollo. Come conseguenza degenerano dei neuroni e determinano l'atrofia dei muscoli in quanto permettono al muscolo di avere una certa quantità di fibre e la mancanza di segnali causa una paralisi conseguenza vita tragica. La proteina Smn fa parte del complesso che si lega all'importina SN delle SNRNP e la formazione del complesso con la proteina SMN è importante nella maturazione dello spliceosoma con ricadute sullo splicing. Questa proteina localizza nel nucleo all'interno di alcune strutture e anche nel citoplasma. È una proteina che va avanti e indietro dal citoplasma con NLS e NES. Oltre a questo contiene domini che legano RNA e altri importanti con le interazioni con altre proteine per formare il complesso dello spliceosoma o fattori importanti per il trasporto da nucleo a citoplasma e viceversa. Sue mutazioni vanno a colpire i motoneuroni probabilmente in quanto sono molto più sensibili ad alterazioni nello splicing. Fatto sta che uno si aspetterebbe che mutazioni in una proteina così critica dovrebbe avere ricadute generali ma in realtà va a colpire soprattutto i motoneuroni. Tra le funzioni ci sono l'esporto nucleare degli snRNA, assemblaggio nucleare del complesso Sm, metilazione del cappuccio 5' e la formazione delle gemins, complessi che vengono

reclutate nel complesso dello spliceosoma costituite da diverse proteine indicate con Gemin1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 interferisce con queste in quanto l'assenza di Smn determina l'assenza di gemin2, 4, 5 presente, 6, 7 assenza. L'assenza di Smn interferisce con l'espressione di alcune queste proteine, può farlo in due modi: o agendo a livello trascrizionale bloccando la trascrizione per i geni che codificano queste proteine o a livello post traduzionale interferendo con la stabilità di queste proteine (che sembra il motivo) in quanto molto probabilmente non vengono reclutate in un solo complesso e sono degradate più velocemente. Pazienti con mutazione di Smn1 ma con più copie del gene Smn2 hanno sintomi della malattia più lievi rispetto a pazienti con bassi livelli di espressione di Smn2 si pensa che avere un gene che trascrive ad alti livelli aiuta questi pazienti, si cerca di utilizzare questa strada per rallentare la patologia overespresso il gene per compensare difetti nel gene Smn1, che disolto cadono nell'esone 7 che in molti casi comportano la formazione di un RNA aberrante o la proteina non viene fatta. La formazione degli snRNA che vengono trascritti come precursori e pur non venendo tradotti e possono essere modificati (capping) e ha attività regolatoria, questo in quanto è importante per reclutare fattori per mantenerne la stabilità e per interagire con i fattori di esporto. Una volta che lo snRNA assembla con fattori nella stabilità dell'esporto, viene esportato nel citoplasma dove lega con Sm e le gemins e si forma un complesso che va incontro a metilazione, interagisce con le importine, viene importato nel nucleo nei corpi di Cajal dove forma le SNRNP matura. Le gemins e le proteine SN permettono l'assemblamento corretto dei fattori coinvolti dello splicing che avviene in parte nel nucleo ma per la maggior parte nel citoplasma. Va incontro a modifiche per gli RNA sottolineando l'importanza della regolazione dello splicing che può avvenire in molti modi: splicing alternativo: da un'unico RNA alternativo si possono formare n RNA messaggeri maturi che contengono introni, possono perdere esoni. Può avvenire un exon skipping in cui si rimuove un esone. Ci sono casi di intron retention, ritenzione dell'introne che viene mantenuto nell'mRNA maturo. Lo splicing può creare un RNA che può rimuovere porzioni di RNA ed andare incontro ad una sintesi proteica diversa creando proteine più corte usando siti di traduzione diversi. La complessità è legata a fattori che si legano a RNA che possono promuovere l'eliminazione di un esone o il mantenimento di un introne o viceversa. Queste RNA binding protein alcune sono nella famiglia delle hnRNP, altre sono SM. Lo splicing alternativo può dare origine a proteine con funzioni diverse. Uno di questi è quello della chinasi CamKII δ , una chinasi che dipende dai livelli di calcio un messaggero secondario che aumenta la concentrazione nella cellula in risposta a un segnale esterno che arriva ad aprire dei canali di calcio sul reticolo endoplasmatico liscio e in questo caso attiva altre proteine come la CaMKII δ che fosforila nel momento in cui viene legata al calcio e va a fosforilare altre proteine. A carico di questa chinasi la rimozione dell'esone 14 che contiene un NLS che rimangono citoplasmatiche la rimosione dell'esone che contiene una sequenza che porta la proteina ad entrare nel nucleo in questo caso da origine ad una proteina citoplasmatica e in questi due casi sono chinasi che fosforilano proteine nucleari o citoplasmatiche. Lo splicing non modifica l'attività chinasi ma la localizzazione intracellulare e una sua funzione. Vi sono altri esempi di splicing alternativi che influiscono sul comportamento, geni che vengono modificati e vanno incontro a splicing nel sistema nervoso con conseguenze comportamentali come mutanti fruitless della drosophila la cui mutazione a carico dello splicing di un gene comporta un comportamento aberrante: nella riproduzione normale il maschio agita l'ala facendo un suono che indica la femmina che vuole accoppiarsi, questo deriva da un gene presente nel maschio e quando questo va incontro a uno splicing aberrante causa il comportamento aberrante durante la fase riproduttiva: in questi mutanti fruitless i maschi si incatenano tra di loro cercando di accoppiarsi. Questi meccanismi stanno alla base della diversità dell'espressione genica: da un unico RNA eterogeneo che va incontro a splicing alternativo si creano proteine diverse.

5.8 RNA editing

Studiato per la prima volta nei tripanosoma brucei e consiste in modifiche di basi a carico dell'RNA, modifica post trascrizionale che consistono o in una conversione di una base di un'altra o inserzione e delezione di nucleotidi. È un meccanismo utilizzato da organismi dove la variabilità genetica non è portata avanti dallo splicing e modificando una base in un'altra si può modificare un amminoacido e creare una proteina che funziona in un modo diverso. Si può introdurre un cambio che determina una proteina tronca dando variabilità alla sua funzione. L'editing non va contro il paradigma della biologia molecolare perché è una modifica post trascrizionale e non viene cambiata l'informazione nel DNA. È stato identificato nel tripanosoma brucei andando che produceva degli RNA la cui sequenza era diversa dalla sequenza presente nel loro DNA che riguardava aggiunta o rimozione di nucleotidi, in particolare nucleotidi. Il complesso coinvolto è l'editosoma. L'editing avviene grazie alla presenza di RNA che vengono trascritti dall'organismo detti RNA guida con una sequenza parzialmente complementare all'mRNA e si lega ad esso con delle zone con un perfetto allineamento e vi sono regioni in cui questo appaiamento non avviene. Nel primo nucleotide spaiato avviene il primo passo del processo di editing iniziato da un'endonucleasi che taglia in corrispondenza della regione non appaiata. A questo punto interviene un'enzima che aggiunge paia di basi complementari, dopo la sequenza si appaia attraverso una ligasi. L'enzima che aggiunge le basi è una TUTasi. Alla fine si trova un RNA messaggero con nucleotidi in più che modifica la proteina corrispondente. L'aggiunta di queste basi va a modificare la proteina risultante. I tripanosomi sono eucarioti e possono infettare l'uomo, parassiti ma a livello biologico sono eucarioti protozoi come l'ameba, organismi unicellulari con flagelli e motilità.

5.8.1 Editosoma

Nei mammiferi l'editing avviene in maniera diversa e non comporta inserimento e delezione ma modifiche di basi: sono due i meccanismi la trasformazione di adenosina in inosina (A → I editing), e dalla citosina si trasforma in uracile (C → U editing) e non comporta l'inserimento o delezione che possono causare proteine aberranti e più corte e nei mammiferi l'editing si basa su una modifica a carico di un nucleotide che comporta un riconoscimento a livello di codone diverso. La trasformazione da adenosina a inosina viene riconosciuto come C complementare anche se l'inosina può avere appaiamenti anche con G (inosina maggiore variabilità) può comportare l'inserimento di un amminoacido diverso. La modifica A → I si trova negli mRNA che codificano per dei recettori dalle cellule nervose. C → U invece spesso porta alla formazione di un codone di stop e una proteina tronca. La modifica può portare una diversa permeabilità ad un recettore. Modificando gli amminoacidi si può modificare il diametro del passaggio e lo ione che prima veniva bloccato può passare, variazioni di permeabilità e selettività o il canale si apre o si chiude più o meno velocemente. La struttura dell'inosina è uguale all'adenosina con un gruppo amminico in meno. L'enzima coinvolto in A → I editing è una proteina ADAR che lega l'RNA e lega l'RNA a doppio strand riconoscendo strutture a forcina a doppia elica dell'mRNA e dopo aver riconosciuto queste strutture riconosce una loro adenosina e la modifica andando ad attuare una deaminazione rimuovendo il gruppo amminico trasformando l'adenosina in inosina. Un esempio che avviene all'interno di un recettore per il glutammato la modifica ad opera di ADAR determina un cambio amminoacidico e proprietà diverse. L'editing può avvenire a più adenine con conseguente modifica dell'amminoacido (AUA che diventa AUI da lisina a metionina, AUU a IUU da isoleucina a valina). Per l'editing C → U si prende come esempio l'editing per l'apolipoproteina B o ApoB, una proteina plasmatica con ruolo cruciale nel trasporto, assemblaggio e metabolismo delle lipoproteine plasmatiche che sequestrano il colesterolo. Esistono due forme di ApoB una di 100 kilodalton (ApoB100) prodotta dalle cellule

epatiche e componente delle lipoproteine a bassa densità (LDL) che sono quelle che misurano il colesterolo cattivo le altre sono le lipoproteine a bassissima densità per il colesterolo buono. L'isoforma da ApoB48 viene prodotta dalle cellule dell'intestino. La 100 viene riconosciuta da un recettore con cui si lega e viene internalizzata, mentre la 48 viene internalizzata da altra via. Vengono prodotte a partire dallo stesso RNA che va incontro ad editing che quando avviene si forma l'ApoB48. Questo perché il gene da 43 kilobasi con 29 esoni e l'isoforma viene prodotta a seguito di un editing di una citosina in CAA che diventa pertanto UAA che causa dalla codifica di un amminoacido a una tripletta di stop. Nel fegato senza editing l'RNA non viene modificato e genera ApoB100, nell'intestino avviene l'editing e si trasforma in UAA e lo stop codon prematuro genera ApoB48. Il meccanismo di editing avviene grazie all'APOBEC1, il fattore che compie e porta avanti la deamminazione o la trasformazione da C a U accoppiato al fattore ACF fattore di complementazione. Il primo compie la deamminazione riconoscendo la tripletta ma non in maniera specifica che viene data dal fattore di complementazione. Non necessariamente tutti gli stop codon prematuri danno origine alle proteine tronche in quanto non è detto che l'introduzione di uno stop codon prematuro dia origine a una proteina troncata in quanto le tronche possono essere più instabili e prone ad essere degradate in quanto non interagiscono con il complesso e una proteina che non fa parte di un complesso può essere libera e subire maggiore degradazione. Le cellule hanno inoltre in meccanismo di controllo che quando trova uno stop codon prematuro non canonico l'RNA viene degradato per eliminare gli RNA con stop codon prematuri. Quello visto non viene degradato da NMD (non sense mediated decay) che viene attivata in condizioni particolari, quando lo stop codon si trova all'interno di un esone. Sono presenti nell'RNA delle proteine legate all'RNA fino alla sua traduzione e costituiscono l'exon junction complex (EJC) e un RNA maturo è fatto da RNA di esoni separati dagli EJC che marciano le zone che sono andate incontro a splicing. Normalmente uno stop codon normale si trova alla fine prima della 3' UTR che non va incontro a splicing uno stop codon canonico ha a monte un EJC e a valle nulla. Uno prematuro si trova invece tra EJC. Il meccanismo di controllo che la cellula ha per riconoscere stop codon prematuri riconosce come prematuro uno stop codon compreso tra due EJC. In questo caso la macchina lo riconosce e lo degrada. La macchina non lo riconosce se si trova molto vicino all'EJC. Le proteine ADAR che deamminano l'adenosina in inosina, sono una famiglia di quattro componenti (tre, una uno splicing alternativo) e legano l'RNA a doppio strand dsRBM identifica un dominio che lega un RNA a doppio strand (double strand RNA binding motif / domain) ADAR ne ha due e un dominio deamminasico. Negli umani si esprimono tre ADAR1, 2, 3 e la prima va incontro a uno splicing alternativo con due isoforme a 150 e 110 kilodalton possono avere un dominio deamminasico, due o tre dsRBM e sono distinte dal numero di domini dsRBD e dai domini terminali che possono avere per legare RNA e altri con funzione non nota. I due domini interagiscono con struttura a doppio strand permettendo alla proteina di legarsi all'RNA e di avvicinare il dominio catalitico alla base che va incontro ad editing. Le ADAR possono fare cambi da polare a non polare e portare delle modifiche che vanno a colpire i siti critici nello splicing. Eliminando il branching point o creando i siti di splice a 5' o a 3'. Possono determinare pertanto ritenzione degli introni, nel sito accettore lo distrugge il sito di splicing al 3'. Le conseguenze possono essere diverse. a livello di splicing o di amminoacidi. Possono anche modificare i microRNA che non codificano ma si legano agli mRNA e ne bloccano la traduzione, modificandoli si può modificarne la sequenza e l'RNA messaggero a cui questo si lega.

5.9 Essay per editing

Questo sistema serve per studiare fattori e proteine coinvolti nell'editing dell'RNA è analogo a quello dello splicing con minigene, plasmide all'interno del gene che viene espresso nella cellula. Si tratta

di un costrutto trascritto grazie a un promotore e questo costrutto trascrive un RNA costituito da tre proteine di fusione e il trascritto contiene due potenziali siti di traduzione e tra i due si trova un uag che consiste in una sequenza di stop e la A è quella che va incontro a editing. Se non c'è editing il trascritto viene fatto. la traduzione inizia e si blocca. Come secondo si fa a tradurre una parte del trascritto che viene tradotta come fosfatasi alcalica e una GFP mettendo queste cellule si vede verde e con un anticorpo specifico avviene una reazione e non si vede la regione prima non si vede. I blocchi HA sono dei tag come la EGFP, sequenze amminoacidiche artificiali visualizzabili da un anticorpo.

Capitolo 6

Trasporto e localizzazione dell'RNA

È un meccanismo di modifica post trascrizionale, l'RNA può essere complessato da proteine e fattori che ne impediscono la traduzione e possono trasportarlo in altri compartimenti all'interno della cellula. Il cambio delle sinapsi in risposta all'apprendimento è determinato da restringere proteine a sinapsi specifiche localizzando gli mRNA. Le proteine devono essere trasportate e trasportare mRNA e poi tradurre solo localmente l'RNA producendo proteine in loco che modificano localmente determinati compartimenti. Scoperta da ibridazione in situ. Un esempio di due RNA uno che produce la subunità beta di una chinasi la cui attività dipende dal calcio costituita da una subunità alpha e una beta che si uniscono tra di loro e formano l'enzima funzionante che in presenza di calcio fosforila altre molecole. Nell'ippocampo, trasformazione da memoria a breve termine a quella a lungo termine. Questa regione dell'ippocampo è ricca di cellule nervose. Si nota come l'RNA è presente nel corpo cellulare dei neuroni, quello per la subunità alpha è presente nei corpi cellulari e nei dendriti. Sono stati identificati altri RNA come per la MAP2 (associata ai microtubuli per il riarrangiamento) recettori, l'RNA per l'actina (citoscheletro), RNA non codificanti ma con ruolo strutturale di regolazione (microRNA). Il trasporto e localizzazione di RNA nella cellula è stato studiato in particolare nella drosophila. Come dall'uovo fertilizzato si forma l'embrione e infine la drosophila adulta. L'oocita di drosophila possiede cellule nutrici nurse che forniscono materiali all'oocita di drosophila che verrà fecondato e formerà embrione e la drosophila. Il nucleo dell'oocita si trova nella parte superiore. Il fatto che alcuni RNA localizzano in particolari compartimenti è stato studiato nella drosophila e si nota come oskar localizza nella parte posteriore dell'oocita di drosophila. Oskar viene preso e trasportato nella parte posteriore. Un altro RNA bicoid localizza nella parte anteriore in uno stato di sviluppo più tardivo. I nomi vengono dati dal nome di mutanti: bicoid prende il nome da un mutante che se non lo possiede non sviluppa la testa, oskar deriva da un altro significato e gurken (cetriolo) e assume una forma a cetriolo e così via. Sono nomi originali che alla cui base si trova una mutazione legata al fenotipo. Bicoid localizza nella parte anteriore dell'embrione di drosophila. Gurken localizza nella parte apicale. Esempi di localizzazione e trasporto di RNA si trovano anche nel lievito come RNA ASH1 per un fattore trascrizionale che passa dalla cellula madre alla figlia quando il lievito si divide per gemmazione. L'RNA per l'actina si trova nella parte anteriore del leading edge dei fibroblasti, zona che indica la direzione del movimento, le cellule si muovono in quella direzione e serve alla cellula per sentire il substrato e serve alla cellula per muoversi, ricca in actina in quanto conferisce al citoscheletro estrema motilità. L'RNA per l'actina tende ad accumularsi in questa zona e lo si trova anche nella parte terminale del cono di crescita e nei dendriti. Esempi di localizzazione dell'RNA in compartimenti o in maniera specifica di oocita o embrione sono numerosi. Uno dei modelli utilizzati per lo studio del trasporto di RNA e studiare le

ripercussioni e le proprietà biologiche sono le cellule nervose. Le cellule nervose possono essere isolate o dalla corteccia (colture corticali) o da una zona a forma di banana detta ippocampo, una regione molto interna del sistema nervoso centrale e sono quelle più vecchie e antiche e la si trova nei pesci e rettili ed è connessa riceve informazioni dal bulbo olfattivo e sottolinea l'importanza dell'olfatto nei meccanismi di memoria. Mantenuta la funzione di essere di relay e trasformare memorie a breve termine a lungo termine. Il paziente HM si tratta di un signore che cadendo dalla bicicletta subì un trauma con attacchi epilettici (inizio 1920) e a seguito sviluppò crisi epilettiche ricorrenti trattate con la rimozione dell'ippocampo. Il paziente a seguito perse la capacità di trasformare memoria a breve termine a lungo termine. Non poteva formare nuove memorie ma riusciva a mantenere quelle antecedenti all'operazione. Gli studi successivi confermarono il ruolo della struttura nella trasformazione a breve a lungo termine. È possibile farle crescere con il modello murino (ratto o topo), con bulbi olfattori, due emisferi e il cervelletto. Occorre dividere in due il cervello, aprirlo e rimuovere l'ippocampo, si rimuove il substrato per separare le cellule e vengono messe in coltura. Si usa questo modello in quanto una volta messe in coltura subiscono fasi di sviluppo precise: appena messe in colture la cellula è simmetrica e dopo un giorno inizia a produrre dei prolungamenti e uno diventa più sottile e cresce di più diventando l'assone e infine si ha lo sviluppo dei dendriti. Buon modello per lo studio dei fattori coinvolti nella formazione di assoni, dendriti e sinapsi. Ciascuna modifica può essere facilmente evidenziata e lo sviluppo facilmente monitorato. Il sistema è in vitro. La struttura ordinata dell'ippocampo viene persa in vitro e di conseguenza la struttura organizzativa viene persa e inoltre il sistema in vitro è bidimensionale e non tridimensionale. Il sistema in vitro non rispecchia la composizione cellulare in vivo in quanto mancano molte cellule gliali che aiutano i neuroni nella loro attività. Una coltura arricchita di neuroni facilita lo studio del loro sviluppo. Si può trasfettare facilmente usando virus o sistemi di trasferimento delle cellule, la microscopia è più semplice e si possono fare misure fisiologiche di singole cellule. Al di là delle limitazioni il sistema in vitro delle colture cellulari presenta vantaggi. È un sistema molto utilizzato per il trasporto e utile anche per capire come avviene il trasporto e se l'RNA che viene trasportato viene tradotto. Trovare RNA in un determinato compartimento è di dimostrare che l'RNA va incontro a traduzione. Si è cercato di vedere se ci fossero ribosomi nei dendriti e si nota come ci sono in particolare all'interno delle spine dendritiche. In zone molto distanti dal corpo cellulare ci sono RNA e la macchina dedicata alla loro traduzione. La localizzazione avviene per aumentare l'efficienza in quanto trasportando RNA e traducendola n vengono prodotte più proteine localmente. In oltre è un sistema sicuro in quanto previene le interazioni tra proteine ectopiche non volute. Come la mielina basic protein (MBP) che forma la mielina delle cellule nervose, la guaina di isolamento che permette la trasmissione corretta ed efficiente dell'impulso nervoso. Tende ad interagire molto con le membrane e trasportarla potrebbe creare problemi. Traducendola localmente si previene questo problema. Un altro motivo per il trasporto è la rapidità: volendo modificare la regione della cellula in maniera rapida si ha già l'RNA presente e si può tradurre l'RNA in proteine che modificano direttamente la regione altrimenti si dovrebbe inviare segnale da periferia a nucleo, che trascrive RNA che viene tradotto e la proteina trasportata alla periferia. La cellula trasporta l'RNA in periferia per proteggerlo dalla degradazione. La cellula vuole mantenere l'RNA e tradurlo in un secondo momento la cellula lo può degradare o impedire questo spendendolo in un altro compartimento. Il trasporto avviene dal nucleo dal processo di trascrizione e dopo le modifiche post-trascrizionali viene legato a proteine che legano l'RNA e si formano le RNP (ribonucleoparticles) alcune delle quali lo seguono nel trasporto altre si separano appena entrano nel citoplasma. L'RNA una volta assemblato va nel citoplasma e si lega a proteine motrici come dineine e chinesine che usando ATP trasportano usando i microtubuli. L'RNA e le proteine vengono ancorate e si fermano e quando serve la produzione locale di proteine l'RNA viene tradotto. Non tutti gli RNA vengono trasportati in determinati compartimenti e per il trasporto specifico servono delle sequenze cis-acting elements normalmente nella 3' UTR a valle della zona

codificante detti zipcodes e hanno una localizzazione specifica peculiare tra questi si trova l'MLS (mitochondria localization sequence), DTE (dendritic targeting element), ALS (axonal localization sequence), si noti come i cis acting elements sono diversi tra di loro. Oltre a questi elementi servono i trans acting factors, proteine che si legano a RNA sui cis-acting elements, si legano ad essi, reclutano altri fattori e li trasportano con le proteine motrici. Guarda microiniezione. La microiniezione può essere utilizzata anche per seguire il trasporto del trafficking di proteine. Un'altra tecnica per seguire il trasporto di RNA che non prevede la microiniezione è un sistema basato sull'MS2, un sistema indiretto per evidenziare il trafficking dell'RNA. Consiste di due costrutti trasfettati all'interno delle cellule. Uno esprime MS2-GFP caratterizzata da una GFP fusa con MS2 un dominio che lega le strutture a stem loop MS2-binding site che si lega a queste strutture a forcina che normalmente vengono clonate a monte dell'RNA di cui si vuole tracciare il trafficking. Coesprimendo MS2-GFP e il costrutto dell'RNA la cellula li produce entrambi e epoduce la proteina Ms2-GFP si lega al sito di legame a monte dell'RNA. In questo caso come nella microiniezione è possibile seguire il tutto in vivo. I trans acting factors sono proteine che si legano ai cis acting elements nelle 3' UTR con le RNA binding proteins: alcune sono importanti per il trasporto altre importanti per altri aspetti come la traduzione: è importante che gli RNA durante il trasporto non vengano tradotti e alcune di queste sono coinvolte nel mantenere silenti gli RNA come pumilio che legano il RNA a singolo filamento, ELAV e hnRNPs altre invece sono connesse con il trasporto spesso e se togliendole l'RNA non viene più trasportato altre sono coinvolte nella stabilità dell'RNA IL numero è elevato. Le proteine Staufen e Pumilio sono state identificate da studi effettuati su *Drosophila*. Staufen è responsabile di Oskar nella parte posteriore dell'ovocita e per l'ancoraggio anteriore del bicoid. Staufen è una proteina che lega l'RNA a doppio filamento, contiene cinque dsRBD (double stranded binding domains) e dopo di che si identifica l'omologo nei mammiferi mStau1 più piccolo rispetto alla *Drosophila* ma con quattro dsRBD e ha un dominio TBD (dominio che lega la tubulina) e permette alla proteina di interagire direttamente con i microtubuli, dominio importante per ancorare la proteina e l'RNA al microtubuli. Non tutti i domini hanno la stessa affinità per l'RNA 3 maggiore poi 4 e gli altri lo legano con affinità ridotta. Il resto della proteina è diversa in quanto l'omologo nei mammiferi è stata utilizzata come regione per identificare il dominio che lega l'RNA con maggiore conservazione. Si trova diversità tra i domini dsRBD, si trova conservazione tra i domini tra le diverse specie. Per vedere se il trasporto è attivo si può utilizzare il nocodazolo che disassembla i microtubuli utilizzato come antitumorale in quanto responsabile della divisione dei cromosomi durante la divisione cellulare. Si tratta le cellule con nocodazolo e vedere se si trovano ancora le RNA nei dendriti, se il trasporto dipende dai microtubuli non si deve più vedere e questo infatti non succede. Questo esperimento dimostra che si trova trasporto attivo basato sui microtubuli e staufen lega gli RNA anche su mammiferi. Non c'è un omologo di bicoid o oskar nei mammiferi, ha mantenuto la funzione ma ha cambiato cargo. Nei mammiferi inoltre ci sono due geni per staufen e il secondo codifica mStau2 più complessa rispetto a 1 con tre isoforme di 62, 59, 52 kilodalton con cinque domini che legano RNA si trova il dominio che lega la tubulina TBD. Questa proteina è espressa esclusivamente nel sistema nervoso. La funzione di mStau2 è presente lungo l'asse dendritico e si trova vicino alle sinapsi in cui il dendrita riceve informazioni da altri assoni. Le due proteine sono in prossimità l'una all'altra e una domanda è cosa succede quando si toglie l'espressione di stau2, per fare questo si usa l'approccio di utilizzare la tecnica di short interference RNA di inserire all'interno della cellula degli RNA a forcina che vengono modificati dalla cellula e producono degli RNA molto piccoli che legandosi all'mRNA ne bloccano la traduzione. Si può prendere utilizzare questa tecnica per inibire in maniera specifica mStau1. Una tecnica precisa e potente per inibire l'espressione di una proteina molto simile con un'altra. Si nota come i neuroni le spine dendritiche senza staufen 1 e 2 non hanno strutture a fungo ma scompaiono e rimangono delle strutture filopoidali e non rassomigliano alle spine dendritiche mature. La rimozione di Stauf2 va a eliminare le sinapsi. Questo succede in quanto una volta tolta

la proteina si osserva una modifica a livello strutturale e funzionale delle sinapsi, cosa legata ad un riarrangiamento del citoscheletro: quando si vuole modificare una forma si modifica il citoscheletro sottostante. Si osserva l'actina e due neuroni, uno che non espone stau2 e l'altro che la esprime si vede come rispetto al controllo il neurone senza ha meno actina e nei dendriti ci sono zone senza actina, soprattutto delle sinapsi e delle spine dendritiche, la sua rimozione abolisce il pattern dell'actina, uno degli RNA che localizza nei leading edge e nei dendriti. Ci si è chiesti in che modo l'assenza di stau2 va a interferire con l'espressione dell'actina e con l'RNA che codifica per la β actina andando a vedere l'RNA per l'actina in neuroni senza stau2 e si è notato come stau2 sembra coinvolta nel trasporto di RNA, in realtà è coinvolta nella stabilità in quanto downregolando stau2 e monitorando i livelli di actina e si nota come i livelli dell'RNA di actina presente nella cellula in condizioni normali rimane costante nel tempo per almeno sei ore, invece la stabilità e i livelli di actina crollano del 60% dopo circa 6 ore. In *Drosophila* stau2 è coinvolta invece nel trasporto e nel controllo traduzionale. Durante il trasporto è importante che l'RNA non venga tradotto, ci sono fattori che interagiscono con l'RAN durante il trasporto con il ruolo di inibitori traduzionali, sono state caratterizzate proteine con questa funzione grazie a studi sul lievito come ASH1, ci sono mutanti di *pumilio* in cui ASH1 non viene trasportato e viene tradotto prematuramente all'interno della cellula madre con mutazioni per il gene *pumilio* e l'RNA ASH1 non viene trasportato nel figlio e rimane nella cellula madre e viene tradotto. Può essere pertanto un buon candidato. Ci sono omologhi nei mammiferi e sono Pum1 e Pum2, il lievito ne ha 6, nelle varie specie si tratta di una famiglia conservata con un dominio PHD (*pumilio* homology domain) con otto domini strutturati ripetizioni che legano l'RNA a singolo strand in base a una sequenza specifica e conoscendola è possibile fare un'analisi bioinformatica andare a vedere quali RNA contengono la sequenza specifica e vedere quali possono essere controllati da questa proteina. *Pumilio* nei mammiferi è associato a RNA nei mammiferi che localizzano e svolge un ruolo di controllo traduzionale. Gli RNA che non la legano vengono tradotti di più. Tra l'altro *pumilio* è espresso in *Drosophila* ed è upregolato durante l'apprendimento e la memoria durante questi organismi. L'apprendimento per le *Drosophila* lo si fa attraverso uno strumento con due camere con due odori che sono riconosciuti allo stesso modo dalla *Drosophila* (preferiti allo stesso modo). A questo punto si rifà l'esperimento dando shock elettrico nella camera con l'odore 1 e a quel punto le *Drosophila* imparano che l'odore 1 è associato ad uno shock e tendono ad andare nella camera con l'odore 2. Questo sistema permette di insegnare alle *Drosophila* e quando hanno appreso si possono isolare i neuroni e vedere quali geni sono stati attivati durante questo meccanismo e tra i geni upregolati che aumentano a seguito dell'esperimento si trovano *pumilio* e *stau2*. La loro importanza è legata alla funzione di trasporto e controllo di traduzione dell'RNA.

Capitolo 7

Traduzione

Si vede come l'informazione trascritta da DNA a RNA viene interpretata dall'apparato dedicato alla produzione di proteine. Innanzitutto i ribosomi sono le fabbriche traduttive, una componente importante nel processo traduzionale e sono quelle che svolgono il ruolo primario nella formazione del ruolo peptidico, l'efficienza è legata ad altri fattori che garantiscono un'efficiente traduzione. Gli attori principali sono i ribosomi. Sono costituiti da due subunità, una maggiore L e minore S sia nei procarioti che nei procarioti. Differiscono per il peso molecolare. l'S è il coefficiente di sedimentazione è il coefficiente che dà attraverso un lisato e si fa un gradiente di densità di saccarosio maggiore sul fondo della provetta meno e si carica l'estratto cellulare e si centrifuga le particelle tendono a sedimentare in maniera dipendente dalla loro massa e forma. Particelle molto grandi e pesanti tendono ad andare verso il fondo. La velocità di sedimentazione dipende dalla massa e dalla forma. Coefficiente S maggiore per il peso molecolare maggiore. S è una stima approssimativa del peso molecolare e non aumenta proporzionalmente alla massa in quanto la forma può dipendere dalla massa. Il completo per i procarioti è di 70S e le due subunità sono di 50S e di 30S. Gli eucarioti L è 60S S 40S e completo 80S. I ribosomi sono dei complessi riboproteici perché contengono proteine e RNA sottoforma di RNA ribosomali in particolare la subunità 50S contiene nei procarioti due specie di RNA il 5S e il 23S il tutto insieme e 34 proteine formano la subunità maggiore nei ribosomi, una delle strutture più difficili da caratterizzare dal punto di vista strutturale. La subunità minore nei procarioti contiene un RNA 16S e 21 proteine. Negli eucarioti ci sono tre RNA nella 60S il 5S, il 28S e il 5.8S con 49 proteine, mentre nella subunità minore si trova la 40S con il 18S e 33 proteine tutti trascritti dalla polimerasi I tranne il 5s dalla III. Conengono un numero variabile di ribosomi. Si tratta di componenti molto frequenti all'interno delle cellule. Uno degli RNA più presenti nelle cellule è l'rRNA. La maturazione e la produzione dei ribosomi avviene all'interno del nucleolo nel nucleo il cui numero dipende dal tipo cellulare e dallo stato fisiologico. In attiva mitosi hanno forma e dimensione di nucleoli diverse. I nucleoli sono strutture prive di membrana e sono costituiti da diversi centri; uno fibrillare F e da una zona più densa e una zona granulare. Il nucleolo contiene 500 proteine associate ad esso e il 30% ha funzione sconosciuta. La funzione in generale del nucleolo si pensa abbia sede di produzione dei ribosomi ma invece avviene il contatto tra mRNA e alcune RNA binding proteins con diverse funzioni. Vi sono dei marcatori che vanno a marcare e localizzare nella componente fibrillare altre nella componente granulare. Gli rRNA vengono processati ad eccezione del 5s vengono trascritti dall'RNA polimerasi I per generare un unico e lungo precursore come un gene policistronico che poi va incontro a processamento in cui viene tagliato e si formano gli rRNA maturi 18S, 5.8S e 28S. Gli RNA ribosomali hanno una struttura secondaria complessa importante per la loro attività di catalizzare la formazione del legame

peptidico. Le loro sequenze sono molto conservate e le basi che li costituiscono possono andare incontro a modifiche come i tRNA e altre classi di RNA. Questa struttura secondaria facilita la loro interazione con le proteine ribosomiali. Alcune delle modifiche delle basi post trascrizionali come l'aggiunta di uno zolfo per la tio-uridina, metilazione. Le proteine ribosomiali sono caratterizzate come L o S in base alla subunità cui appartengono. Alcune interagiscono direttamente con l'RNA e altre con altre proteine. Il core è costituito da RNA e quelle che interagiscono con l'RNA e si trovano più all'interno mentre quelle con le proteine più all'esterno. Sono stati caratterizzati modificando la forza ionica e vedendo quali proteine si staccavano, legate debolmente tra di loro e non interagiscono con RNA tendono a dissociarsi più velocemente. Si tratta di una struttura complessa. Non si trova un unico ribosoma sull'mRNA ma più ribosomi si attaccano formando i polisomi. È possibile caratterizzarli e isolare l'RNA a loro associato attraverso centrifugazione che mostra le frazioni e le cellule vengono lisate e centrifugate su un gradiente e si isolano delle frazioni dall'alto verso il basso e si nota analizzando l'assorbanza dei picchi che corrispondono a subunità questo è determinato attraverso un anticorpo, altri picchi corrispondono alla frazione polisomale con ribosomi e mRNA in fase traduzionale. Questo permette di caratterizzare due linee cellulari in base a quali e quanti RNA vengono tradotti isolando l'RNA dalle frazioni polisomiali e capire quali e quanti sono presenti e fare paragoni con linee cellulari analoghe e valutare le differenze. I ribosomi si trovano liberi nel citoplasma che traducono gli mRNA che danno origine proteine ed enzimi la cui attività si svolge all'interno della cellula e ci sono ribosomi associati all'ER rugoso delimitato da una membrana e si trovano ribosomi per la traduzione di proteine secrete o che vanno ancorate alla membrana. Oltre a questo si trovano ribosomi attorno ai mitocondri. La struttura dei ribosomi è una struttura complessa e particolare ed è tale che la subunità maggiore e minore delimitano tre camere, siti E, P e A. Il sito E per exit, P per peptidico e A per acceptor. Il motivo per le tre camere A è dove viene accettato il tRNA con l'amminoacido, P è il sito dove avviene la formazione del legame peptidico e E è il punto dove il tRNA che ha donato l'amminoacido rimane vuoto e se ne va.

7.1 Biogenesi dei ribosomi

La subunità maggiore e minore si assemblano nel nucleolo prima di essere trasportate nel citoplasma. È un processo altamente coordinato che richiede la sintesi e modifica degli rRNA, il loro assemblamento con proteine, interazione transitoria con fattori non ribosomiali che sono sia RNA come gli snoRNA e proteine non ribosomiali che aiutano l'assemblamento dei ribosomi. L'assemblaggio intervengono degli snoRNA che modificano gli rRNA e altre proteine e fattori non ribosomiali che facilitano l'assemblamento dei pre ribosomi. All'inizio si forma un precursore 90S caratterizzato da proteine e RNA ribosomiali e fattori non ribosomiali e snoRNA e a questo punto il precursore si dissocia e si forma la subunità pre 40S e la subunità pre 60S, la subunità pre 40S lascia il nucleo come la pre 60S, vanno nel citoplasma dove i fattori non ribosomiali si dissociano e si hanno le subunità 40S e 60S mature. La sintesi dei ribosomi nei batteri è in grado di produrre 20 amminoacidi al secondo mentre negli eucarioti solo 2. Nei procarioti si nota come un certo numero di proteine e RNA che rendono la macchina complessa si sottolineano come la subunità minore nei procarioti che negli eucarioti contiene degli RNA 16-18S che riconoscono sequenze specifiche all'interno dell'mRNA e permettono un inizio della sintesi corretto. Si è poi visto come vengono prodotti gli RNA ribosomiali come un unico trascritto che va incontro a modifica dalla polimerasi I tranne il 5s che viene prodotto dalla III la composizione degli rRNA è molto conservata ed è importante per l'attività della formazione delle subunità e per la formazione del legame peptidico. La struttura del ribosoma è complessa e va a delineare quando unite le subunità tre siti: sito A dove vengono accettati ed entrano i tRNA con

l'amminoacido, il sito P dove avviene il legame peptidico tra la catena nascente e l'amminoacido portato dall'RNA e il sito E che è il sito di uscita. Contiene quattro siti di legame per l'RNA, uno per l'mRNA e tre per i tRNA. La struttura di un tRNA sono ipotizzati da Crick come molecole adattatrici costituiscono il 10-15 percento degli RNA un tRNA per ciascun amminoacido. Ci sono 20 tipi di tRNA si tratta di molecole dai 70 ai 95 nucleotidi e hanno una struttura a trifoglio legata alla presenza di sequenze complementari che permettono alla molecola di andare incontro a folding. Vengono trascritti come precursori che vanno incontro a splicing particolari. La caratteristica dei tRNA è che vanno incontro a modifiche post trascrizionali con l'aggiunta di gruppi specifici importanti per la sua funzione. Ci sono tre domini detti bracci, c'è quello dell'anticodone che forma una struttura alla periferia che porta la tripletta che riconosce la parte terminale, un braccio D e un braccio T ψ C per la presenza di pseudouridina, la D dalla diidrouridina. L'altro braccio con funzione importante è il braccio accettore che porta su cui avviene il legame con l'amminoacido corrispondente. Il braccio accettore è caratterizzato da tre nucleotidi CCA su cui avviene il legame specifico su cui avviene il legame con l'amminoacido *tRNA^{leu}* specifico per la leucina *Leu tRNA^{leu}* specifico per il leu con l'amminoacido legato. L'accoppiamento tra un tRNA specifico e l'amminoacido corrispondente avviene ad opera dell'amminil tRNA sintetasi, un enzima che sintetizza il legame tra il tRNA e l'amminoacido. Contiene una serie di cavità, una per il tRNA, uno per l'amminoacido e uno per l'ATP e un altro per il controllo del corretto accoppiamento. Il legame accoppiamento avviene tramite due step: nel primo l'amminoacido va incontro e si lega all'ATP formando l'amminoacido adenilato con la formazione di pirofosfato. L'amminoacido adenilato poi nel secondo step catalitico comporta la rottura dell'amminoacido adenilato e la formazione del legame con il 3' OH con la prima base del tRNA formando un legame ad alta energia con la liberazione di AMP. Queste due fasi vengono catalizzate dall'amminil tRNA sintetasi. L'accoppiamento corretto tra un tRNA e l'amminoacido, un meccanismo regolato deve esserci una perfetta corrispondenza e questo avviene in due modi: l'amminil tRNA sintetasi ha un sito per un amminoacido che se troppo grande non trova spazio. Per quanto riguarda amminoacidi con le stesse dimensioni esiste un altro sito detto sito di editing in cui può trovare alloggiamento con dimensioni simili ma più piccolo, se trova alloggiamento nel sito avviene la scissione e rimosso il legame tra amminoacido e tRNA e l'errore viene rimosso. Questo meccanismo permette il controllo qualitativo e che il determinato tRNA è stato unito all'amminoacido corretto. Questo effetto di correzione causa un errore ogni 10000 sintesi o caricamento di tRNA. Nei procarioti la prima differenza è che la sintesi proteica è quasi contemporanea alla trascrizione, negli eucarioti è successiva in quanto gli RNA vanno incontro a modifica. In entrambi i casi si distinguono tre fasi: una fase di inizio lenta in cui la macchina ribosomiale interagisce con l'RNA, il riconoscimento del corretto inizio della traduzione, poi una fase di allungamento che procede come la duplicazione in maniera processiva in cui il ribosoma scorre e ingloba i tRNA dando origine alla catena peptidica e infine si trova una fase di terminazione. Nei batteri il primo amminoacido che viene inserito è la metionina che viene modificata, formata in cui un gruppo aldeidico è stato aggiunto al residuo amminico tramite la metionil tRNA transformilasi. Il riconoscimento della tripletta AUG di inizio avviene grazie alla presenza dell'RNA 16S nella subunità minore che riconosce e si accoppia con la sequenza di Shine-Dalgarno, Kozak negli eucarioti e si trova a monte della parte codificante. Il ribosoma si attacca, scannerizza il 5' fino a quando trova la sequenza di Shine-Dalgarno. A quel punto si ferma, si assembla la subunità maggiore e inizia la traduzione dell'RNA messaggero. La presenza di queste due sequenze a monte del sito di inizio è estremamente importante. Questo è stato visto utilizzando un esperimento in cui lasciando ribosomi interagire con l'RNA, degradato quello libero e quello protetto dal ribosoma e sequenziato si è trovata la sequenza conservata. I fattori di iniziazione del processo traduzionale per i procarioti sono IF e il processo di sintesi coinvolge diversi fattori di inizio, coinvolti nel processo di allungamento e di fine, diversi fattori e tutti i quali vengono reclutati favorendo un processo traduzionale efficiente

o per il controllo. Alcuni per i procarioti. Il complesso di inizio 30S è il complesso che si forma con il mRNA la subunità minore, il tRNA con la metionina formilata e GTP e IF2 più altri due complessi IF1 e IF3, è il complesso che si forma all'inizio del processo di traduzione ed è uno step critico in quanto i due fattori permettono alla subunità di non associarsi dalla subunità maggiore e di accettare il tRNA che porta la metionina formilata. Il fattore IF1 e IF3 si dissociano e permette il reclutamento della subunità maggiore che reclutata causa l'idrolisi del GTP da parte di IF2 che viene rilasciata e si forma il complesso di inizio 70S pronto a dare inizio al processo traduzionale. Il processo di traduzione negli eucarioti inizia similmente anche se con step aggiuntivi e in molti casi sono legati al fatto che l'mRNA ha subito modifiche con l'aggiunta di un capping e la poliadenilazione, il capping legato e protetto da fattori che legano il cap rimossi al citoplasma a cui si aggiungono altri fattori coinvolti nel regolare l'inizio della traduzione. I fattori di inizio eucariotici o eIF anche negli eucarioti si forma un complesso di inizio 43S che è costituito dall'rRNA, dalla subunità minore, dal fattore eIF2 legato al GTP, il tRNA con la metionina e il fattore che si lega al cap, il eIF4G, ci sono diversi fattori che si legano al cap e fanno parte del complesso di inizio. Il meccanismo è simile e nel caso degli eucarioti è reso complesso dalla presenza di fattori che si legano al cap e che vengono reclutati nel complesso iniziale. Una volta che si è formato questo inizia la scansione dell'rRNA messaggero fino a quando trova la sequenza di Kozak in cui il complesso si ferma, si ha la rimozione dei fattori che impedivano l'unione delle subunità maggiore e si forma il ribosoma completo e alla rimozione di altri fattori inizia la traduzione. La subunità ribosomale maggiore e minore formano i siti E, P e A, il legame peptidico avviene grazie al trasferimento dell'amminoacido al tRNA proveniente dal sito accettore da quello presente nel sito P che porta la catena in fase di crescita. Questo è importante in quanto il tRNA nel sito A non può uscire. Pertanto il tRNA in P è vuoto e a seguito del cambio conformazione della subunità maggiore il tRNA si trova in E e può uscire. La formazione del legame peptidico è mediata dall'rRNA e comporta un cambio conformazionale che fa scorrere la subunità maggiore di tre nucleotidi. Scorrendo la subunità maggiore il tRNA che era in P si trova in E e quello che si trovava in A si trova in P. Interviene un altro fattore detto fattore di elongazione G che cambia e fa in modo che la subunità minore si sposti di tre nucleotidi andando a riformare i siti E P ed A. A questo punto il tRNA in E esce, il sito A è libero e può accettare un ulteriore tRNA con il corrispettivo amminoacido. Questo processo avviene grazie al reclutamento di fattori di allungamento EF come EF-Tu che è accoppiato ai tRNA, sono delle GTPasi che legano il GTP e lo idrolizzano, questo fattore ha il ruolo di controllare che il tRNA entrato sia quello corretto, ovvero che l'anticodone trovi il corrispondente codone sull'mRNA. Se questo non avviene allora viene rimosso. Se invece il tRNA è corretto si ha la stabilizzazione del legame, l'idrolisi del GTP in GDP, il rilascio del fattore di elongazione, il tRNA rimane in loco e può essere utilizzato. A questo punto interviene EF-G che permette la traslocazione della subunità minore. Grazie a questo fattore si forma il ribosoma completo e il ciclo continua fino a quando il ribosoma trova una sequenza corrispondente a uno stop. (UAA, UAG e UGA) per cui non c'è un tRNA ma viene riconosciuta da una proteina detta fattore di rilascio i quali riconoscono queste triplette di stop, simile ad un RNA come struttura, caso di mimetismo molecolare: una proteina che mima l'attività di un tRNA. Una volta che si lega alla tripletta di stop catalizza l'idrolisi del legame tra tRNA e proteina in P. Si trova un canale nel ribosoma che impedisce la formazione di strutture secondarie all'interno del ribosoma. All'interno del citoplasma può cominciare ad assumere strutture secondarie e terziarie in maniera spontanea o guidata da chaperonine. Si può sfruttare un IRES, internal ribosomal entry site: nel caso degli eucarioti il riconoscimento al livello del 5' è un' condizione importante per iniziare in maniera corretta la traduzione. Ci sono sequenze IRES che quando introdotte permettono la traduzione senza l'utilizzo kozak consenso o shine dalgarno. Cosa utilizzata dai virus per utilizzare l'apparato traduzionale della cellula a favore dei propri mRNA. Questa sequenza può essere utilizzata a scopi pratici per esprimere due RNA contemporaneamente basta inserire una sequenza IRES tra i due

mRNA, uno tradotto dall'approccio canonico, l'altro grazie al reclutamento della sequenza IRES. Le modifiche post traduzionali sono importanti in quanto poliadenilazione e capping contribuiscono a rendere più efficienti la traduzione. La regolazione a livello traduzionale può avvenire a diversi livelli: stabilità dell'RNA, post-trascrizionale o si agisce sulla traduzione, sui fattori coinvolti nel processo traduzionale mediante fosforilazioni o modifiche che rendono il processo più o meno efficiente.

Capitolo 8

Segnalazione cellulare: trasduzione del segnale

Le cellule sono delle strutture con individualità e isolate dall'ambiente circostante ma con cui devono rimanere in contatto per quanto riguarda la capacità di ricevere segnali. Le cellule hanno una membrana plasmatica sede di una serie di processi e importanti per permettere alle cellule di comunicare con l'ambiente esterno. Le cellule comunicano tra di loro in 4 vie: una via contatto-dipendente, segnalazione paracrina, sinaptica e endocrina che le permettono di ricevere informazioni dall'esterno o da altre cellule. La comunicazione contatto-dipendente la cellula riceve segnale grazie all'interazione diretta con un'altra cellula mediata da recettore e ligando: la cellula che segnala esprime sulla propria membrana un receptito dalla cellula che riceve grazie a un recettore che riceve il segnale. Si necessita di contatto. Nella paracrina il messaggio viene rilasciato nell'ambiente circostante che viene riconosciuto grazie alla presenza di recettori. Nella segnalazione sinaptica e la si trova nel sistema nervoso in cui si trova una cellula che riceve il segnale e il neurone che lo rilascia sottoforma di vescicole che rilasciate in un ambiente circostante molto ristretto e il neurotrasmettitore si lega ai recettori sulla cellula target simile a quella contatto dipendente ma non c'è contatto in quanto si trova uno spazio intersinaptico. La cellula target può essere nervosa, muscolare o una ghiandola. Il rilascio di neurotrasmettitori si lega a recettori su ghiandole per rilasciare sostanze come ormoni. La segnalazione endocrina è legata al rilascio di ormoni che vengono rilasciati nell'apparato circolatorio e raggiungono la cellula target che può trovarsi a notevole distanza. La comunicazione endocrina è molto specifica: bastano piccole quantità di ormoni per avere una risposta dal recettore con alta affinità nella cellula recettrice. La comunicazione sinaptica il rilascio del neurotrasmettitore è molto elevato e le cellule presentano delle invaginazioni in quanto la quantità di segnale è molto elevato in modo da avere più recettori per esso. L'altra differenza sta nella velocità: la segnalazione sinaptica è molto rapida: il rilascio del neurotrasmettitore in stretta prossimità con il bersaglio determina una risposta molto rapida, mentre quella endocrina è molto lenta in quanto la cellula che risponde dà origine a una serie di eventi che richiede un certo tempo. Lo svantaggio della comunicazione sinaptica nella giunzione neuromuscolare: al muscolo dopo un certo periodo che va incontro a stimolazione va incontro ad affaticamento come avviene ai neuroni il rilascio massivo porta ad un affaticamento delle cellule coinvolte nella comunicazione, cosa che non avviene nella modalità endocrina. La distanza nelle sinapsi è molto piccola (quasi a contatto), quando la cellula riceve il segnale può dare origine a una serie di attivazioni a cascata che possono comportare diverse cose: ci possono essere delle risposte rapide da secondi a minuti che comportano un'alterazione funzionale di alcune proteine della cellula che riceve o altre risposte più lente, minuti o ore meccanismi legati al

processo di trascrizione, sintesi di mRNA, traduzione di proteine e che possono alterare il citoplasma che si traduce in una risposta cellulare al messaggio. Le modifiche veloci che agiscono la funzione sono modifiche post traduzionali delle proteine come fosforilazione o defosforilazione che altera la funzione delle proteine. Lente vuol dire che si trova una trascrizione, traduzione e modifiche post traduzionali. Un altro modo in cui le cellule comunicano è quella delle gap junctions, in cui le cellule sono in contatto quasi citoplasmatico tra di loro, giunzioni tra cellula e cellula in cui mettono in comunicazione il citoplasma delle due cellule. Non è una condivisione di tutti i componenti in quanto le gap junction hanno un certo diametro ma passano piccoli ioni, piccole molecole e grosse proteine. Le gap junctions sono costituite da un'esamero di connesine che formano una struttura funzionale detta connessione ce ne sono diversi tipi: omotipici o eterotipici se sono formati dallo stesso tipo o da tipi diversi di connesina. Questo tipo di giunzione si trova nel muscolo cardiaco in quanto le fibre muscolari devono contrarsi contemporaneamente e le informazioni delle gap junctions possono passare molto velocemente. Il diametro delle gap junctions è regolata dal pH e dallo ione calcio. Si devono regolare queste connessioni per salvare la cellula dall'apoptosi dell'altra non propagando la causa. I meccanismi sono due: abbassamento del pH che avviene durante l'apoptosi e l'altro è l'aumento dello ione calcio sempre legato a fenomeni di morte cellulare. Molte sequenze IRES endogene vengono attivate in condizioni di stress cellulare. Il costrutto è caratterizzato da un promotore che trascrive un mRNA con la sequenza di Kozak, viene inserito il gene che si vuole esprimere, IRES e poi il marcatore dopo IRES, si può far esprimere ad un unico mRNA due geni. Nel plasmide si può trovare un'origine di replicazione che gli permette di andare incontro a un processo di replicazione in modo da averne una grande quantità e un sito di poliadenilazione per la modifica post trascrizionale importante nel contesto di esporto e stabilità. Un IRES si tratta di una sequenza di centinaia di nucleotidi. La trasduzione del segnale può essere legata a cinque modalità di segnalazione in tutti i casi visti si trova il ruolo importante del recettore che riceve l'informazione che dà origine a una serie di cascate che coinvolgono una serie di fattori, proteine che vanno ad attivare proteine e fattori che portano alla produzione di messaggeri secondari come calcio cAMP e cGMP che amplificano il segnale e vanno ad attivare altre molecole. In molti casi possono dare origine a una risposta rapida nel momento in cui si altera l'attività di proteine esistenti oppure può dare origine a una risposta lenta quando coinvolge la trascrizione e traduzione di RNA specifici. La risposta cellulare può essere diversa a seconda del tipo di messaggio: quando viene a contatto con molecole che inducono la divisione cellulare la cellula entra in mitosi e va ad attivare tutti i cammini intracellulari come la trascrizione di geni che portano la cellula a dividersi. In presenza di sostanze chemotossiche una cellula può allontanarsi dalla zona in cui sono presenti. In questo caso la cascata di segnalazione va a convergere sugli elementi del citoscheletro importanti per la motilità. La risposta a messaggi può essere diversa. Un tipo di trasmissione avviene grazie alla presenza delle gap junctions. La trasmissione di tipo sinaptico: La trasmissione di un segnale sull'utilizzo della sinaptica si ha una cellula nervosa che forma la fibra pre sinaptica che invia il segnale contenuto all'interno di vescicole che contengono un neurotrasmettitore di diversi tipi. All'interno di queste vescicole si trova il neurotrasmettitore e si fondono alla terminazione sinaptica e la fusione mediata da calcio e clatrine con la terminazione sinaptica determina il rilascio del neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico, tra la cellula pre sinaptica e quella che riceve il messaggio postsinaptico su cui sono presenti recettori specifici. Il neurotrasmettitore si lega a recettori specifici che portano alla risposta della cellula postsinaptica. L'arrivo di un potenziale d'azione, il meccanismo con cui la cellula nervosa trasmette il segnale è una variazione del potenziale di membrana e si tratta di un segnale elettrico che una volta che giunge alla terminazione sinaptica determina un'entrata dello ione calcio che fa fondere le vescicole con la membrana che fa fuoriuscire il neurotrasmettitore che si lega con recettori e il legame determina l'apertura dei canali e l'ingresso di ioni e portano a una modifica del potenziale di membrana. Il potenziale d'azione sta alla base del funzionamento delle

cellule nervose, dove non funziona bene può nascere alla sclerosi multipla, risposta immunitaria alle cellule che avvolgono gli assoni e una perratno sbagliata diffusione del potenziale di membrana. Il potenziale d'azione è amplificato da canali di ioni sodio che si aprono in risposta a depolarizzazione di membrana aumentandone l'effetto e poco dopo si richiudono e refrattari all'apertura ripristinando il potenziale di membrana. Le cellule nervose trasducono il segnale da natura elettrica con potenziale d'azione che avviene sempre con la massima intensità e l'informazione che viene portata è legata alla frequenza: più eccitata maggiore la frequenza della propagazione del segnale e maggior rilascio del neurotrasmettitore, maggior eccitazione per la cellula post sinaptica. I neurotrasmettitori rilasciati sono diversi come glutammato, il maggior rilasciato è l'acetilcolina: viene prodotta a partire dalla colina (vitamina J) e costituisce insieme all'inositolo della lecitina agente emulsionante che mantiene grassi in soluzione nel sangue e nei fluidi organici. La lecitina prende il nome dal tuorlo d'uovo e componete importante delle membrane plasmatiche. La colina è un componente importante introdotto con la dieta e utilizzata per la formazione dell'acetilcolina che entra all'interno della cellula grazie ad un cotrasport che sfrutta un gradiente di natura elettrochimica dello ione sodio in maggiore concentrazione all'esterno e sfruttandolo si possono importare altre molecole come la colina che viene trasformata in acetilcolina grazie all'acetilcolin sintetasi, una volta che viene prodotta viene inserita in vescicole che poi si fondono nella membrana in cui il potenziale d'azione apre i canali dello ione calcio, le vescicole si fondono con la membrana e l'acetilcolina viene rilasciata e va a legarsi con il suo recettore nella membrana post sinaptica, l'acetilcolina nell'ambiente intrasinaptico deve essere poi rimossa e questa viene rimossa grazie alla presenza dell'enzima acetilcolinesterasi che scinde l'acetilcolina in colina e acetato. La colina può essere reimportata e il ciclo può reiniziare. È uno dei neurotrasmettitori più diffusi responsabile della contrazione dei muscoli e del rilascio di ormoni da parte di ghiandole innervate. La miastenia gravis si tratta di una risposta autoimmune nei confronti del recettore per l'acetilcolina i sintomi è una debolezza muscolare che comporta una difficoltà nei movimenti e peggiorano con il tempo. Uno dei metodi per lenire il decorso della malattia è di inibire l'enzima che degrada l'acetilcolina nello spazio intersinaptico aumentando il segnale e si rende più efficiente la contrazione muscolare. I recettori per l'acetilcolina sono di due tipi e costituiscono i recettori muscarinici e nicotinici, il nome deriva dal fatto che hanno un'affinità secondaria molto elevata per la nicotina che si lega a questa famiglia di recettori e i muscarinici affinità per la muscarina, alcaloide presente in funghi velenosi, oltre affinità i muscarinici sono recettori con 7 domini transmembrana e regolano messaggeri secondari di tipo metabotropico, recettori che si legano all'acetilcolina e trasducono un segnale all'interno della cellula che comporta l'attivazione di molecole che producono messaggeri secondari come cAMP e IP3 (inositolo tre fosfato) i recettori nicotinici sono recettori canali, una volta che l'acetilcolina si lega al recettore questi si aprono e fanno entrare ioni come lo ione sodio, due tipi di recettori hanno affinità diversa per molecole e trasducono il segnale in maniera diversa. I recettori muscarinici trasducono il segnale attivando altri fattori. Nel muscarinico l'acetilcolina si lega al recettore cambia conformazione e a ad attivare una serie di proteine all'interno della cellula, le proteine G che vanno poi ad aumentare i livelli di messaggeri secondari che possono interagire con altri canali o attivare altre vie di segnalazione intracellulari. L'acetilcolina è uno dei neurotrasmettitori più diffusi ed ha attività diverse in base al recettore e al tipo cellulare. Nel muscolo scheletrico si lega a un recettore nicotinico e determina una contrazione. Nel caso del muscolo cardiaco il legame con recettore muscarinico determina un rilassamento muscolare. A livello della ghiandola salivare induce la secrezione e la fusione di vescicole contenenti enzimi con un recettore muscarinico. Un'altra molecola utilizzata come messaggio è l'ossido di azoto. L'ossido di azoto è interessante come messaggio a livello dei capillari, delimitato da cellule endoteliali che poggiano su una lamina basale circondati da cellule innervate della muscolatura liscia che determina la vasodilatazione e la vasocostrizione. La terminazione è importante per la regolazione del diametro e l'apporto sanguigno. L'ossido di azoto in questo viene prodotto dopo il

rilascio dell'acetilcolina su recettori presenti su cellule endoteliale, NO è un gas e passa la membrana e interagisce con le cellule muscolari e al loro interno l'ossido di azoto determina l'aumento di livelli di cAMP, messaggero secondario che determina un rilassamento muscolare e una vasodilatazione. Questo meccanismo è stato studiato e importante in quanto ha comportato lo sviluppo di farmaci vasodilatatori che causano un aumento di produzione di cAMP all'interno di cellule muscolari come il viagra che agisce in questo cammino e ha un rilassamento delle fibre muscolari e un aumento dell'afflusso sanguigno all'interno dei corpi cavernosi. Un'altra sostanza importante sono gli ormoni quelli steroidei la sintesi parte dal colesterolo che oltre a essere un problema se la quantità non viene regolata a livello circolatorio, è una componente importante delle membrane plasmatiche che è una molecola compatta con grande porzione idrofobica e una porzione OH è il luogo di partenza per la sintesi di molti ormoni come gli ormoni tiroidei, il testosterone. Il colesterolo conferisce rigidità alle membrane, limita e riduce la fluidità delle membrane importante per l'interazione per conferire proprietà biofisiche alla membrana. Il recettore per gli ormoni sono estremamente specifici e bastano piccole quantità di ormoni per interagire e la risposta porta generalmente una trascrizione di geni specifici per quel particolare tipo di ormoni e la sintesi di fattori specifici, si tratta di una risposta lenta. Le cellule possono regolare la sensibilità ad un segnale e regolare la capacità di un recettore di legarsi e regolare la sua risposta. La cellula può rendere meno sensibile un recettore se la segnalazione persiste per evitare un'iper-risposta al messaggio continuo. La sensibilità del recettore può avvenire in diversi modi: da un lato ci può essere il sequestro del recettore tramite endocitosi e viene portato da membrana a interno della cellula tramite endocitosi e la cellula non presenta più il recettore sulla membrana questo non comporta la degradazione del recettore, si tratta di un'inibizione temporanea. L'altro meccanismo, la down-regolazione mediata da lisosomi in cui il recettore internalizzato viene degradato da lisosomi. Un altro meccanismo è quello di lasciare il recettore in membrana e inattivarlo agendo a livello post traduzionale su amminoacidi critici nella porzione citoplasmatica che porta la presenza del recettore che inattivato è incapace di trasdurre il segnale. Un altro meccanismo si ha un'attivazione indiretta in cui si attiva la molecola che viene attivata dal recettore, il segnale si lega al recettore che va ad attivare una seconda molecola che è stata inattivata. L'altro meccanismo consiste di attivare una proteina inibitoria che ha un ruolo di feedback negativo che comporta un'inibizione della trasduzione del segnale inibendo l'interazione e attivazione di un'effettore da parte del recettore. Questi meccanismi consentono alla cellula di modulare il messaggio alterando la sensibilità o presenza di recettori sulla propria membrana. Trasduzioni molto rapide alla base degli organi di senso avvengono grazie alla produzione rapida di messaggeri secondari e stanno alla base di fenomeni rapidi e vengono prodotti e rimossi rapidamente, questi sono calcio, cAMP, cGMP, inositolo 3 fosfato e altri. La trasduzione del segnale in molti casi va a convergere su proteine con un ruolo nel nucleo e va a attivare molecole nel nucleo che possono trascrivere per geni specifici o va a modificare proteine citoplasmatiche per una risposta più rapida. I recettori di membrana sono essere distinti in tre categorie: recettori di superficie legati a canali ionici come recettori nicotinici per l'acetilcolina, recettori di superficie legati a proteine G, normalmente sono recettori di tipo muscarinico con diversi domini che attraversano la membrana e vanno ad attivare delle proteine G e i recettori di superficie collegati ad enzimi. La trasduzione del segnale che parte dall'interazione tra recettore e molecola segnale porta all'attivazione da molecole che fungono da trasduttori intermedi detti interruttori molecolari e possono essere molecole attivate a seguito di fosforilazione dopo l'arrivo del segnale che va ad attivare altri fattori, si tratta di una modifica post traduzionale e la molecola viene attivata grazie alla fosfatasi che rimuove il gruppo fosfato e inattiva la molecola, in altri casi il segnale viene trasdotto da molecole che legano GTP, il segnale arriva, le proteine legano GTP e vengono attivate attivando molecole a valle e vengono disattivate quando si ha l'idrolisi in GDP e le molecole vengono disattivate, si ha molecola, recettore, interruttori molecolari e messaggeri secondari. Vi sono fattori che facilitano attivazione o disattivazione di molecole che legano GTP

rendendo il segnale più rapido o mantenendolo più a lungo, le GEF (GDP exchange factor), fattori che facilitano lo scambio rapido da GDP a GTP attivando le molecole che legano GTP in maniera più rapida e i GAP che facilitano l'idrolisi e aumentano la velocità di inattivazione permettendo l'idrolisi del GTP in GDP e questi fattori interagiscono con gli interruttori molecolari favorendo l'attivazione o disattivazione rendendo più rapida la trasduzione del segnale o viceversa. Una proteina che lega il GTP sono Rho Rac, Cdc42 che si trovano nello stato attivo quando legano GTP e tornano nello stato inattivo quando viene idrolizzato in GDP e possono essere attivate o inattivate grazie a GAP e GEF, sono fattori numerosi. La funzione di queste proteine che legano il GTP come le Rho si tratta di proteine associate con il citoscheletro e regolano lunghezza, organizzazione e comportamento dinamico degli elementi del citoscheletro, modifica di migrazione della cellula, risposta durante la mitosi, il citoscheletro importante durante la fase di divisione cellulare, coinvolti nella separazione di cromosomi, attività importante per la funzionalità e risposta a messaggi che hanno i segnali del citoscheletro, segnali cellulari possono attivare recettori di superficie che convergono sul gruppo di proteine. Diversi recettori possono essere attivati da diversi tipi di segnali che attivano cascate di segnali che agiscono su diversi gruppi di proteine. I canali di tipo metabotropico sono i canali che comprendono recettori di superficie legati a proteine G. Questi recettori collegati a proteine G sono recettori transmembrana con domini 7 domini di membrana e porzioni idrofobiche del recettore che attraversano la membrana, porzione N terminale rivolta all'esterno nello spazio extracellulare dove avviene l'interazione con la molecola messaggio e una porzione citoplasmatica con residui che vanno incontro a modifiche post trascrizionali come fosforilazione e sumoilazione e importante in quanto è quella che interagisce con le proteine G trimeriche, una proteina G trimerica il recettore una volta che riceve il segnale attiva la proteina G trimerica di tre subunità α che lega il GTP o GDP e legandosi a GDP è inattiva mentre viene attivata quando si ha lo scambio da GDP a GTP, la molecola segnale attiva interagisce con il recettore che cambia conformazione nella porzione citoplasmatica che facilita il reclutamento con la proteina G trimerica inattiva che interagisce con la membrana grazie a un dominio in α e γ , mentre la β non interagisce direttamente, l'interazione con il recettore favorisce lo scambio da GDP a GTP che attiva la subunità della proteina G trimerica che si dissocia in subunità α e complesso attivato $\beta\gamma$. La subunità α può a sua volta interagire e attivare una proteina target successiva, una volta che è stata attivata da parte di α questa viene attivata attraverso l'idrolisi del GTP e comporta la sua disattivazione e il riasssemblamento della proteina G trimerica inattiva dal momento che lega il GDP. Se lo stimolo persiste il recettore viene inattivato grazie alla presenza della chinasi GRK che fosforila la porzione citoplasmatica del recettore che determina il reclutamento dell'arrestina che blocca l'attività del recettore pur in presenza del ligando e questo avviene quando si ha l'attivazione continua e persistente. L'arrestina può anche indurre l'endocitosi del recettore dove può andare incontro a degradazione, alcune tossine batteriche impedisce la disattivazione delle proteine G che rimangono attivate in maniera costitutiva come quella del colera che lega la subunità α che comporta un aumento dei livelli di cAMP che provoca il rilascio di ioni sodio e acqua nell'intestino con conseguente diarrea e squilibrio degli elettroliti, queste tossine bloccano in uno stato costitutivamente attivo la subunità α la cui attivazione determina degli aumenti di cAMP che rimangono sempre alti, i messaggeri secondari devono ritornare a concentrazioni basse. L'adenilato ciclasi viene attivata dalle proteine G, una proteina di membrana che produce un messaggero secondario il cAMP che viene prodotto partendo da ATP tramite il rilascio di pirofosfato si crea il messaggero secondario che viene modificato e la sua attività cessa quando interviene la cAMP fosfodiesterasi che rompe l'anello formando il 5' AMP che non è un messaggero secondario. L'adenilato viene attivata dalla subunità α della proteina Gs stimolatoria una volta che sono aumentati il cAMP va ad attivare la chinasi PKA (proteina chinasi A) tra le tante e la PKA è un enzima di quattro subunità, due regolatorie e due catalitiche, in assenza di cAMP le due subunità catalitiche sono legate a quelle subunità regolatorie, quando cAMP aumenta quattro molecole di cAMP si legano le subunità re-

goaltorei liberando e attivando le subunità catalitiche che entrano nel nucleo dove vanno ad attivare la proteina CREB (cAMP responsive element binding protein) che si lega ad una sequenza specifica nel DNA e la cui attività dipende dai livelli di cAMP. L'attivazione di CREB si lega insieme ad altri fattori su sequenze specifiche in zone promotrici e legandosi va ad attivare la trascrizione di geni. I livelli di cAMP in diversi tessuti presenta diverse risposte: nel muscolo l'adrenalina determina la produzione di glicogeno che rilascia il glucosio del sangue aumentando la capacità muscolare, il glucagone nel fegato compie la rottura del glicogeno e il rilascio nel sangue di zucchero.

Ci sono tre famiglie di recettori ionotropici come il recettore per la nicotina che legandosi ad un ligando come l'acetilcolina cambia conformazione, si apre e determina un flusso di ioni che porta delle modifiche fisiche all'interno della membrana e una risposta da parte della cellula. Un recettore è pertanto canale. La seconda sono i recettori legati a proteine G trimeriche come il recettore muscarinico per l'acetilcolina con 7 domini transmembrana, una extracellulare che interagisce con la molecola e una citoplasmatica che va incontro a cambi conformazionali e amminoacidi che vanno incontro a modifiche post traduzionali inibendolo e la parte citoplasmatica importante perché attivava una proteina G trimerica formata da tre subunità e al legame del ligando che determina il reclutamento e attivazione della proteina G trimerica, α che lega GTP e una β e una γ l'attivazione della proteina porta all'attivazione del complesso adenilato ciclasi che è un enzima che catalizza la formazione del cAMP partendo dall'ATP, un messaggero secondario che aumenta notevolmente quando l'adenilato ciclasi viene attivata dalla proteina G trimerica. Ci sono altri tipi di messaggeri secondari, come vengono prodotti e come la trasduzione del segnale viene amplificata e da origine a una risposta come nei fotorecettori e quelli dell'olfatto. I messaggeri secondari si trovano a bassa concentrazione in condizioni normali, aumentano rapidamente con il segnale e rimossi rapidamente quando smette. Messaggi portati da diversi ormoni agendo su diversi tessuti possono originare aumenti di cAMP che si traducono in una risposta specifica. Un componente importante è la proteina chinasi A costituita da due subunità regolatorie che legano cAMP e due catalitiche che in assenza di cAMP rimangono inattive. Sono necessarie 4 molecole per determinare la scissione delle subunità catalitiche che vanno a fosforilare diversi effettori come il CREB, un fattore trascrizionale attivato quando PKA viene attivata e si lega in regioni specifiche a monti di geni particolari detti sequenze CRE (cyclic AMP response element), riconosciute quando CREB viene e attivata dall'aumento di cAMP. La serie di cascate porta a CREB. Un altro esempio di attivazione della PKA la cui funzione è diversa la si trova nella via attivata dal glucagone, un ruolo opposto dal ruolo dell'insulina (che è un ormone deputato alla regolazione dei livelli di glucosio, rimuovendolo dal sangue favorendo la formazione di glicogeno che rappresenta la riserva di zuccheri come polimero del glucosio, quando l'organismo necessita il glucosio viene scisso) Il glucagone fa l'opposto e determina un rilascio di glucosio nel sangue: il glucagone si lega a un recettore che attiva una proteina G che aumenta i livelli di cAMP dopo aver attivato l'adenilato ciclasi e la PKA fosforila che fosforila la glicogeno sintetasi e la fosforilasi chinasi. A seguito della loro fosforilazione, della glicogeno sintetasi determina il blocco della sintesi del glicogeno e si fosforila l'enzima che causa la degradazione del glicogeno formando glucosio. Lo stesso segnale che comporta l'attivazione di un effettore può avere conseguenze differenti in base al tipo cellulare e alle molecole che vengono attivate, diverso per CREB e metabolismo del glucosio, l'aumento dei livelli di cAMP e in tessuti diversi può portare all'attivazione di elementi che hanno un ruolo diverso. Oltre al cAMP vi sono altri messaggeri secondari e questi vengono prodotti a seguito dell'attivazione da parte di altre molecole segnale in diversi tessuti a seguito di una serie di passaggi enzimatici come l'inositolo tre fosfato e il diacilglicerolo prodotti dall'attivazione della fosfolipasi C e producono aumenti di inositolo tre fosfato e di diacilglicerolo che derivano da un fosfolipide di membrana fosfatidilinositolo. Un lipide importante è il fosfatidilinositolo con un gruppo polare (inositolo) e due catene di acidi grassi: una satura e una insatura. Il fosfatidilinositolo è una molecola anfipatica con una porzione polare e una apolare. Da questo precursore a seguito della

fosfatidilinositolo chinasi si forma un fosfatidil inositolo 4 fosfato, la chinasi aggiunge un gruppo fosfato in posizione 4 creando il fosfatidilinositolo 4 fosfato e interviene la fosfatidilinositolo fosfato chinasi che usando ATP aggiunge un gruppo fosfato in posizione 5 creando il fosfatidil 4, 5, bifosfato. Questa forma viene tagliata dalla fosfolipasi C attivata a seguito di ormoni che taglia il fosfatidilinositolo 4, 5, bifosfato creando il diacilglicerolo e l'inositolo 1, 4, 5 trifosfato (IP₃), due messaggeri che funzionano come messaggeri secondari. Uno rimane associato alla membrana mentre l'altro viene rilasciato nel citoplasma. Si forma un messaggero secondario di membrana e uno secondario. L'inositolo 3 fosfato citoplasmatica diffonde rapidamente e va ad aprire i canali del calcio sulla membrana del reticolo endoplasmatico in quanto riserva di calcio presente a bassissime concentrazioni nel citoplasma ma accumulato nell'ER liscio e queste pompe devono fare un lavoro contro il gradiente per pompare il calcio dal citoplasma nell'ER, aprendo i canali che lasciano passare il calcio questo tende a uscire secondo il gradiente chimico ed elettrostatico. Il IP₃ determina pertanto il calcio che funziona come messaggero secondario. L'inositolo 3 - fosfato viene inattivato mediante fosfatasi e il calcio viene riaccumulato o nell'ER o nei mitocondri o portato fuori dalla cellula. L'inositolo 3 fosfato e il diacilglicerolo vengono prodotti dalla fosfolipasi C attivata da una proteina G trimerica attivata dall'interazione con un recettore e una molecola segnale. Il diacilglicerolo rimane in membrana e l'IP₃ apre i canali di calcio che esce ed attiva altre proteine come la proteina chinasi C che va a forforilare altri fattori e viene attivata grazie al reclutamento in membrana del diacilglicerolo e poi fosforila proteine di membrana o prossime alla membrana. Sono importanti per le chinasi e per l'attivazione in un punto particolare della chinasi. Si è aggiunto ai messaggeri secondari l'inositolo 3 fosfato, il diacilglicerolo e lo ione calcio. L'altro messaggero è lo ione calcio, importante coinvolto nell'attivazione di molti cammini nella cellula come l'attivazione di proteine che attivano le chinasi e svolge un ruolo importante durante il processo di fecondazione dell'oocita da parte dello spermatozoo che porta all'ispessimento della membrana impedendo ad altri spermatozoi di fecondarla. Lo ione calcio è importante per la segnalazione delle cellule nervose l'attività dei neuroni può essere visualizzata grazie alle fluttuazioni delle concentrazioni di ione calcio. Lo ione calcio è visibile attraverso marcatori, sostanze che legano lo ione calcio ed emettono fluorescenza in base alla sua concentrazione. Le gap junction permettono la creazione di onde di calcio in quanto questo può passare attraverso loro. La presenza di trasportatori di ioni calcio nella membrana plasmatica, nell'ER e nei mitocondri facendo lavoro contro gradiente chimico ed elettrico queste pompe utilizzano ATP importante per fare in modo che questi trasportatori accumulino ione calcio o mitocondri. Questo gradiente che si viene a creare può essere sfruttato da altri trasportatori per portare altre molecole contro gradiente (simporti-antiporti), il calcio dopo che aumenta all'interno della cellula attiva la calmodulina in un caso, una proteina con una forma simile ad un manubrio in grado di legare 4 ioni calcio e a quel punto cambia conformazione e possono interagire con altri effettori attivandoli. Uno degli effettori attivati è la proteina chinasi II la cui attività dipende dallo ione calcio (CAMKII) il cui RNA localizza nei dendriti delle cellule nervose e la sua attività è dipendente dal calcio e viene attivata grazie all'attivazione della calmodulina. La calmodulina lega domini elicali. La fluorescenza di FRET per la quantità di calmodulina legata al calcio. Nel momento in cui il calcio si lega le due estremità vanno in contatto tra di loro e si eccitano e si ha il fenomeno della FRET. In base alla quantità di fluorescenza si determina il passaggio di calcio.

8.1 Effetto dell'acetilcolina sul cuore

L'acetilcolina ha un effetto diverso a seconda del tipo di recettore con cui interagisce. Può interagire con un recettore muscarinico con una proteina G_i inibitoria che inibisce l'adenilato ciclasi tramite la subunità α diminuendo i livelli di cAMP e si riducono se viene attivata la fosfodiesterasi che

inibisce ulteriormente i livelli di cAMP, il complesso $\beta\gamma$ apre i canali del postassio di membrana del muscolo cardiaco con un'iperpolarizzazione e rende più difficile la partenza di potenziali d'azione trasducendo nell'effetto opposto alla contrazione. L'acetilcolina legandosi ad un recettore canale nel muscolo scheletrico invece attiva la contrazione.

8.2 Recettori del sistema olfattivo

Nel sistema olfattivo importante per la sopravvivenza della maggior parte delle specie animali in particolare la memoria è connessa con questo tipo di senso. Nei mammiferi il DNA contiene circa 1000 geni per diversi recettori per gli odori e nell'uomo sono attivi il quaranta per cento in quanto l'olfatto è sceso in secondo piano rispetto al sistema visivo. La capacità di sentire gli odori è presente fin dal momento in cui si nasce, un senso sviluppato durante la nascita. Il sistema olfattivo è caratterizzato dalla presenza di neuroni olfattori specifici per determinate molecole che contengono delle ciglia che sono immerse in un muco grazie al quale gli odori si dissolvono e possono interagire con i recettori presenti sulle ciglia. Questi neuroni olfattori mandano le informazioni all'interno del sistema nervoso nei glomeruli olfattori la caratteristica che neuroni olfattori che esprimono lo stesso tipo di recettori convergono sullo stesso glomerulo olfattorio. L'epitelio olfattorio esprime diversi recettori e quelle che esprimono lo stesso recettore convergono sullo stesso glomerulo. L'informazione viene mandata nel sistema limbico e sulla corteccia celebrale. In molti organismi il sistema olfattorio è estremamente sviluppato. Axel e Buck premio nobel in quanto furono i primi a clonare i recettori olfattori. A livello di microscopia ottica ed elettronica la morfologia dei neuroni si trova il corpo cellulare un unico dendrita la cui sommità si trovano le ciglia. Nell'epitelio olfattorio neuroni che esprimono un unico tipo di recettore e tutti quelli che esprimono lo stesso tipo di recettore convergono nello stesso glomerulo olfattorio. La presenza di una determinata molecola si trasduce i neuroni devono trasmettere l'informazione da molecola a potenziale d'azione. La molecola si lega a un recettore muscarinico con diversi domini di membrana legata a una proteina Golf trimerica che attiva attiva l'adenilato ciclasi che aumenta i livelli di cAMP che quando aumenta vanno a cambiare la permeabilità della membrana grazie all'apertura dei canali del sodio la cui apertura causa l'entrata del sodio e della modifica delle proprietà bioelettriche della membrana e la creazione di un potenziale elettrico portata dal sistema nervoso. Il meccanismo passa dall'attivazione della proteina G che attiva l'adenilato ciclasi e dei livelli di cAMP

8.3 Trasduzione visiva

Non si ha la produzione di cAMP ma il messaggero secondario è il cGMP prodotta da una guanilato ciclasi che cicizza il GTP il trasduzione è la risposta mediata da proteine G più veloci. La luce provoca una caduta dei livelli di cGMP. L'arrivo di un fotone causa una riduzione dei livelli di cGMP. I fotorecettori sono presenti nella porzione della retina e sono all'inizio di una lunga catena di diversi tipi cellulari la cui segnalazione converge sulle cellule gangliari che mandano l'informazione nel sistema nervoso centrale tramite il nervo ottico. La trasduzione del segnale visivo avviene tra coni e bastoncelli. Tra i modelli usati per lo studio del sistema visivo si trova il pollo con occhi molto grandi e rappresentano un sistema nervoso molto ben evidente e facilmente manipolabile del tetto ottico che corrisponde alla corteccia visiva dove convergono e vengono elaborate le informazioni date dal nervo ottico è facilmente manipolabile in quanto si prende l'uovo fecondato lo si lascia qualche ora e l'embrione si trova nella parte alta. È possibile evidenziarlo con dell'inchiostro. ed è facilmente manipolabile. È possibile inserire, overesprimere regolare geni iniettandoli direttamente. Un altro organismo utilizzato per lo studio è lo zebrafish un modello più facile da manipolare e

meno costoso rispetto al pollo e si ha che uno zebrafish da origine a un elevato numero di embrioni. Anche lo zebrafish ha occhi molto grandi e facilmente accessibili e si ha la presenza della struttura detta tetto ottico in cui convergono le informazioni dalla retina. Lo zebrafish è un buon modello per le problematiche connesse al sistema visivo e si sa se ci sono problemi nella trasduzione del sistema visivo nello zebrafish ci sono due procedure: quello più evidente è il fenotipo in quanto la pigmentazione alterata ha dei difetti della trasduzione del segnale in quanto la pigmentazione riflette ciò che l'animale vede (pigmentazione legata ai melanofori). Nel secondo screening si vede a livello ultrastrutturale se ci sono problemi nella struttura della retina che è costituita da una serie di strati. Vi sono mutanti in cui la struttura della retina è alterata o in cui può essere più o meno normale ma con un cristallino alterato o una retina alterata. I fotorecettori sono i coni e i bastoncelli con struttura peculiare con un nucleo e corpo cellulare, un segmento interno citoplasmatico caratterizzato da molti mitocondri e un sistema di membrane detti dischi con il pigmento e i recettori che raccolgono i fotoni. Infine si trova la terminazione sinaptica dove la presenza di un neurotrasmettitore che quando rilasciato eccita o inibisce i neuroni a valle. Il recettore è simile al recettore con domini transmembrana, una porzione citoplasmatica e una interna e trasduce il segnale in maniera simile ma viene attivato dalla luce. La rodopsina contiene un pigmento cromoforo detto 11-cis retinale e questo che raccogliendo il fotone cambia conformazione e si ha il passaggio da una conformazione cis a una trans più lineare. La modifica retinaria a seguito da un fotone modifica la rodopsina che attiva la proteina G α transducina, la subunità α attiva la fosfodiesterasi che degrada il cGMP, si chiudono i canali del sodio che essendo permeabili al calcio provoca una riduzione del rilascio del neurotrasmettitore e l'attivazione della guanilato ciclasi che fa risalire i livelli di cGMP. La riduzione di calcio riduce il rilascio del neurotrasmettitore a livello sinaptico e attiva la guanilato ciclasi che fa risalire i livelli di cGMP in quanto si dovrà poter trasdurre un nuovo segnale. In presenza di luce non si trova il rilascio di neurotrasmettitore. In questo caso il fotorecettore reagisce bloccando il rilascio del neurotrasmettitore. Alla fine nel momento in cui arriva la luce si trova una stimolazione il blocco è legato al fatto che il neurotrasmettitore rilasciato dalla cellula è un inibitore e la fine dell'inibizione produce un'eccitazione.

8.4 Lezione 16

NON ha registrato. IL tutto avviene a livello della giunzione neuromuscolare, ovvero il punto in cui la terminazione del motoneurone è adiacente e in prossimità della cellula muscolare. La giunzione a livello post sinaptico è caratterizzata dalla presenza di diverse invaginazioni che sono importanti per aumentare la superficie per mantenere il maggior numero possibile di recettori per l'acetilcolina, il più importante neurotrasmettitore in quanto permette la contrazione del muscolo. Viene rilasciata nello spazio intersinaptico e va a legarsi in recettori presenti a livello della membrana post sinaptica del muscolo. Queste invaginazioni permettono un numero elevato di recettori ionotropici per l'acetilcolina il cui legame causa l'apertura e l'entrata di ione sodio che determina una modifica delle proprietà biofisiche causando una depolarizzazione che si ripercuote all'interno della fibra dando origine alla contrazione. La giunzione muscolare è caratterizzata dalla terminazione nervosa, da una membrana post sinaptica invaginata e delle cellule che circondano la giunzione che fanno parte a livello del sistema nervoso periferico di Schwann che proteggono e aiutano il funzionamento e l'attività della giunzione neuromuscolare o placca neuromuscolare la terminazione nervosa è ricca in mitocondri e in vescicole che contengono acetilcolina che si fondono con la membrana pre sinaptica rilasciandola nello spazio intersinaptico a livello post sinaptico è presente una zona densa agli elettroli con canali e proteine legate al di sotto della membrana con ruolo importante nel mantenere i recettori in loco e con ruolo strutturale importante. I puntini nel citoplasma del muscolo sono

fibre di actina e miosina organizzate in modo regolare e precisa, l'organizzazione è importante per il funzionamento del muscolo per permettere la contrazione efficace. Il muscolo non è una cellula singola ma un sincizio, durante lo sviluppo le cellule mioblasti differenziano, si fondono tra di loro e formano una struttura polinucleata, cellule unite e formano una struttura polinucleata più elevata di organizzazione. La formazione e il differenziamento muscolare e la formazione della sinapsi si formano in contemporanea e richiedono diverse settimane. Quando si forma il sincizio sono presenti recettori per l'acetilcolina che prima della formazione della giunzione si trovano sparsi. Quando si ha il contatto tra il motoneurone e la fibra muscolare i recettori che prima erano sparsi clusterizzano in prossimità al di sotto dei punti di contatto che il motoneurone ha sviluppato formando le placche muscolari. Ogni motoneurone lega una singola fibra. Il modello è molto studiato e semplice in quanto animale con grande quantità di muscoli e grande quantità di recettori e la giunzione neuromuscolare è un grado di rigenerarsi e possibile da ricreare in vitro. Esperimenti che hanno portato a capire come avviene la contrazione. Il muscolo è caratterizzato dalla presenza di tante fibre muscolari, i nuclei si trovano alla periferia della fibra in quanto altrimenti comprometterebbero l'organizzazione dei filamenti di actina e miosina impedendo un'efficiente contrazione i nuclei si trovano alla periferia. Si dice striata in quanto prendendo a sezione longitudinale con staining si nota che oltre ai nuclei compaiono striature trasversali che da nome al muscolo scheletrico striato tipico del muscolo cardiaco e quelli volontari. La fibra muscolare è ricoperta dalla membrana endomisio, più fibre formano un fascio contenuto dal perimisio e l'epimisio circonda più fasci che costituiscono il muscolo. Queste striature che caratterizzano la muscolatura sono delle striature legate alla presenza di due proteine: actina e miosina. Sono organizzate in modo da creare delle bande e linee, si identificano le linee Z e al loro interno a metà si trova la linea M le due linee Z delimitano l'unità funzionale del muscolo detta sarcomero che in parallelo formano la fibra muscolare. Oltre alle linee si identificano le bande I, A e H. Durante la contrazione nel sarcomero va incontro a contrazione, più sarcomeri si contraggono e il muscolo si accorcia. Al sarcomero quando si contrae durante la contrazione le linee Z si avvicinano e la distanza tra le due linee Z diminuisce. La linea A rimane costante la linea I diventa più piccola e la linea H sparisce. Quando il muscolo si contrae le bande A si accorciano, la linea M rimane e sparisce la banda H. Le linee Z sono i punti in cui i filamenti di actina si uniscono tra di loro nella terminazione, tra i filamenti di actina si trova un'altra proteina filamentosa la miosina. La linea M è il punto dove le code dei filamenti di miosina si uniscono tra di loro, durante la contrazione i filamenti di actina scivolano all'interno dei filamenti di miosina e spiega perché le linee Z si avvicinano tra di loro e la linea M non cambia in quanto miosina entra nei filamenti di actina. Le due componenti principali del muscolo sono la miosina e l'actina. Sono di fatto delle proteine che formano filamenti, l'actina costituita da monomeri lineari che formano filamenti (simile al rosario). La miosina è caratterizzata da teste globulari, un collo mobile e una dominio rettilineo che permette l'interazione tra le molecole di miosina. La presenza di filamenti di actina e miosina che formano i sarcomeri, i nuclei si trovano in periferia e i mitocondri, tanti per produrre ATP. L'altra caratteristica del muscolo è quella di avere un reticolo sarcoplasmatico esteso che circonda la fibra muscolare che contiene lo ione calcio importante per la contrazione. Sono presente un sistema a tubuli T delle invaginazioni della membrana che circonda la fibra muscolare e sono a stretto contatto con il reticolo sarcoplasmatico, importante per trasformare la variazione del potenziale di membrana in un messaggio di natura chimica che comporta il rilascio dello ione calcio e della contrazione muscolare. I tubuli T penetrano dalla membrana all'interno. Oltre alle due proteine actina e miosina vi sono altri due complessi: la tropomiosina, una proteina filamentosa che sovrasta i filamenti di actina e il complesso della troponina costituito da tre diverse molecole che interagisce da un lato con la troponina e con i filamenti di actina. La miosina presenta una coda con doppia elica proteica, un collo mobile e una testa globulare che interagisce con i monomeri di actina. La miosina è formata da un dimero con una catena leggera e da una pesante il dimero ha

un'estremità con due teste che interagiscono con i monomeri di actina e la coda che unita tra di loro formano la linea M quando si uniscono tra di loro. L'ATP permette il movimento. La troponina ha tre subunità troponina T, I, C, la subunità T lega la troponina alla tropomiosina, la I lega la tropomiosina all'actina. Nel momento in cui I si lega all'actina impedisce alla miosina di legarsi della miosina con l'actina inibendo il legame tra le teste di miosina con i monomeri di actina. La terza componente, la subunità C che lega lo ione calcio, di fatto è un sensore per il calcio e il legame porta ad una serie di modifiche conformazionali della troponina che si muove e rimuove la tropomiosina dall'actina lasciando libera la testa di miosina di interagire con l'actina. Il motoneurone rilascia acetilcolina che si lega ai recettori presenti nella giunzione neuromuscolare e l'apertura dei canali determina un'onda di depolarizzazione che penetra grazie ai tubuli T, quando arriva apre i canali voltaggio dipendenti e sono presenti sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico. L'apertura dei canali causa un rilascio dello ione calcio che interagisce con la subunità C della troponina. Il legame causa un cambio conformazionale, la troponina rimuove la tropomiosina dall'actina che permette l'attacco della miosina che permette la contrazione ad opera della miosina. La contrazione avviene in quanto la miosina ha due teste motrici indipendenti con un nucleo catalitico e un braccio di leva la coda la lega al filamento spesso e all'inizio la miosina contiene ADP e fosfato e ha affinità debole per l'actina. Quando una delle teste si lega all'actina il fosfato è rilasciato. Quando l'interazione rimane stabile il fosfato è rilasciato e si forma un legame più stabile tra testa della miosina e actina. E causa un cambio conformazionale della miosina che causa il suo avanzamento lungo il filamento di actina. ADP si dissocia e si associa ATP causando lo stacco della testa di miosina dall'actina e l'ATP è idrolizzato causando il ritorno nella conformazione originaria dell'actina. L'actina non ritorna indietro in quanto sono presenti altre miosine attaccate al filamento. Quando il livello di calcio diminuisce le miosine si staccano e l'actina ritorna nella conformazione di riposo della miofibrilla. Il muscolo consuma tanto ATP per svolgere la propria funzione una delle riserve che il muscolo ha una riserva di ATP prodotta dalla creatina che diventa creatina fosfato che può cedere un gruppo fosfato all'ADP creando ATP. Si crea una riserva di ATP al muscolo. La reazione avviene in assenza di ossigeno ma non produce acido lattico. Quando i livelli si abbassano e il muscolo si affatica si comincia a produrre ATP in condizione anaerobica con la produzione di acido lattico che abbassa il pH che va a compromettere la contrazione muscolare in quanto il muscolo tende a ridurre l'ampiezza delle contrazioni e va incontro a affaticamento muscolare, l'abbassamento di pH blocca la reazione di stacco delle teste di miosina che rimangono legate ai filamenti di actina e si ha la contrattura da fatica. Dopo di che il consumo di ossigeno rimane elevato per ripristinare i livelli di ATP e CP normali e per demolire l'acido lattico. Anche lo ione magnesio favorisce il distacco delle teste di miosina e facilita la decontrazione del muscolo. Questo è un esempio di trasduzione del segnale con rilascio dello ione calcio. Un altro muscolo scheletrico che lavora in maniera analoga è quello del cuore. Ci sono i muscoli lisci senza questa contrazione. Sono i muscoli involontari come per esempio quelli della peristalsi intestinale che favorisce lo spostamento del cibo. Sono le stesse responsabili della vasocostrizione e della vasodilatazione. Non formano sincizi e non hanno l'organizzazione dei filamenti di actina e miosina e la velocità di contrazione è inferiore rispetto al muscolo scheletrico. Legato e connesso all'apparato scheletrico responsabile dei movimenti volontari anche se alcune contrazioni sono involontarie e permettono il mantenimento del tono muscolare, contrazioni che permettono di far fronte alla gravità e mantenere la postura che viene regolato a livello del cervelletto. In generale il muscolo scheletrico è volontario. È chiamato striato in virtù dell'organizzazione precisa dei filamenti di actina e miosina alla base del funzionamento e permette la contrazione. Ci sono altri tipi di muscoli come quello cardiaco con caratteristiche analoghe. La muscolatura liscia presenta cellule fusiformi mononucleari prive di striatura trasversale e il controllo della contrazione è indipendente dalla volontà. Le caratteristiche principali che le contraddistinguono dal muscolo striato. La muscolatura liscia si trova nei vasi per vasocostrizione, nella pelle e nelle viscere, per la peristalsi

intestinale, onda di contrazione che permette il movimento del cibo nell'apparato gastrointestinale, è involontario e l'idrolisi di ATP è importante per la contrazione che è più lenta e prolungata (fase di contrazione più lunga) e richiede una minor quantità di ATP nel muscolo liscio è distinguibile dalla muscolatura scheletrica in quanto non ci sono striature il nucleo presente nel citoplasma e la quantità di mitocondri è minore. Inoltre a differenza del muscolo scheletrico le contrazioni della cellula possono essere parziali i filamenti coinvolti sono l'actina la miosina che non hanno organizzazione precisa. Anche in questo caso la trasduzione del segnale è mediata dallo ione calcio il cui rilascio va ad attivare i meccanismi di contrazione leggermente diversi nel caso della fibra muscolare scheletrica.

8.5 Recettori ad attività enzimatica intrinseca

I recettori ad attività enzimatica intrinseca sono proteine di membrana monopasso che posseggono un dominio catalitico ovvero tirosine chinasi in grado di fosforilare l'amminoacido tirosina. Sono loro che a seguito del legame con la molecola esterna si attivano o vanno ad attivare e sono collegati in maniera funzionale con degli enzimi. Questi enzimi sono chinasi, proteine che attivano fosforilano altre molecole. Le caratteristiche di questi recettori sono di membrana monopasso con un solo dominio transmembrana, possono avere un dominio catalitico e la famiglia più grandi è costituita da tirosine chinasi che fosforilano residui di tirosina. Ci sono diversi recettori come fattori di crescita mitogeni ed ormoni come PDGF (platelet derived growth factor per le piastrine), NGF (fattore di crescita per le cellule nervose), EGF (fattore di crescita dell'epidermide). Questi recettori possono avere essi stessi attività chinasi o associati a proteine chinasi che fosforilano altre molecole in tirosina, serina o treonina, associati a istidina chinasi (fosforila a livello di istidina), tirosine fosfatasi.

8.5.1 recettori associati a tirosina chinasi

Per antigene, interleuchine, integrine e citochine. In particolare il recettore per le citochine, molecole che vanno a stimolare l'attività mitotica delle cellule. Questi recettori che si legano alle citochine comprendono una famiglia di recettori e in particolare vi sono i recettori associati alle JAK che vanno ad attivare una via di segnalazione Jak-Stat, prendono il nome da Janus kinase e prende questo nome perché hanno la proprietà di autofosforilarsi di cross fosforilazione e di fosforilare altre proteine. Questo tipo di recettore per le citochine è associato ad una proteina con attività chinasi. Si ha il recettore un dimero che in assenza della citochina sono separati. La citochina determina la dimerizzazione del recettore, i due monomeri vengono a contatto e favorisce l'attivazione della JAK che attivata fosforila la JAK presente sull'altra subunità e quando si sono autoattivate fosforilano il recettore. La citochina promuove la dimerizzazione del recettore, le due JAK si attivano a vicenda e il recettore viene fosforilato in modo che tale fosforilazione determina il reclutamento delle STAT che vengono reclutate al recettore quando è stato fosforilato. Sono normalmente citoplasmatiche STAT1, 2 l'interazione tramite il dominio SH2 che permette l'interazione con il recettore fosforilato e tale presenza permette la loro attivazione da parte delle proteine JAK. Questa fosforilazione è importante in quanto normalmente sono monomeri che fosforilati formano dimeri che sono in grado di entrare nel nucleo e di attivare la trascrizione di geni specifici attivati quando il recettore interagisce con le citochine. Le JAK sono 4: 1, 2, 3, e tyk 2 e quattro sono coinvolte a diversi livelli che riconoscono specifiche citochine, loro mutazioni compromettono la trasduzione del segnale in presenza della molecola. Un altro esempio di segnalazione simile con attivazione di recettore con attività serina/treonina chinasi sono il transforming growth factor $TGF\beta$ e BMP bone morphogenetic proteins il rilascio di questi fattori e il loro legame con un loro recettore attiva una via di segnalazione che coinvolge le SMAD, simile a quella precedente ma che ha delle differenze: il recettore non è costituito da due monomeri ma due subunità diverse: per il $TGF\beta$ si lega al recettore

costituito da un recettore di tipo 1 e di tipo 2 che ha attività di serina / treonina chinasi e determina la dimerizzazione del recettore che va ad attivare il sito chinasi del recettore di tipo 2 che fosforila l'altra subunità del recettore di tipo 1. La subunità catalitica fosforila al livello di serina e treonina l'altra subunità. La fosforilazione recluta SMAD2, 3 fattori citoplasmatici ed è importante in quanto permette la loro fosforilazione che porta alla formazione di dimeri con SMAD4 e la formazione di questi dimeri permette la loro entrata nel nucleo e il dimero di SMAD va ad attivare la trascrizione di geni specifici per la segnalazione attivata da TGF β . Il meccanismo è simile ma ha un meccanismo diverso. Questa via di segnalazione viene bloccata attraverso un meccanismo di feedback: quando il dimero inizia a trascrivere geni specifici si rova un meccanismo di trascrizione che trascrive SMAD6 e SMAD7 con funzione inibitoria. UN feedback negativo che permette di bloccare la via di segnalazione. Le SMAD6 e 7 si legano al recettore e competono con le SMAD2 e 3 in modo che la trasmissione del segnale sia bloccata. Si è visto che anche in un altro meccanismo di inibizione comporta l'attivazione di ubiquitina smurf: SMAD ubiquitylation regulatory factor una molecola che va ad ubiquitinare il recettore e ne promuove la degradazione. Un altro meccanismo prevede il reclutamento di una fosfatasi che rimuove il gruppo fosfato sul recettore di tipo 1 disattivandolo. Ci sono tre vie di inibizione attivate dalla via di segnalazione che blocca la trasmissione del segnale. Un esempio di trasduzione del segnale che porta alla regolazione dell'attività del flagello dei batteri che si muovono grazie alla presenza di questa struttura con un dominio iniziale rigido e una coda flessibile e la rotazione permette al batterio di muoversi in una direzione verso una sostanza chemoattrattiva o allontanandosi da una sostanza chemorepellente. Questo avviene tramite un recettore per la sostanza, e una via di segnalazione che va a regolare l'attività e la rotazione del flagello, costituito da una serie di strutture: un rotore, uno stator che ancora il flagello alla parete batterica, un uncino rigido e un filamento flagellare. La via di trasduzione coinvolge almeno due proteine regolatrici CheA e CheY il tutto è mediato dalla sostanza con il recettore che attiva una proteina di legame tra il recettore e CheA che viene fosforilata. CheA viene fosforilata e attivata dall'interazione della sostanza con il recettore mediata da CheW. L'attivazione di CheA porta all'attivazione grazie a fosforilazione di CheY che si dissocia dal recettore, diffonde nel citoplasma e si lega al motore flagellare facendolo girare in una determinata direzione che può avvicinare o allontanare il batterio dalla sostanza. CheY viene inattivata grazie alla presenza di CheZ che la defosforila. Struttura del filamento e suo metodo di movimento. CheA istidina chinasi la quale trasmette il segnale che regola il senso di rotazione del flagello. Non è chiaro il meccanismo con cui il rotore funziona, è importante lo ione H⁺, due ioni idrogeno entrano permettendo un primo scatto di rotazione. Il gradiente è importante in quanto permette la motilità e la produzione di ATP che avviene sfruttando il gradiente di ioni. ATP sintesi. Il gradiente quando si inverte idrolizza ATP producendo ADP e fosfato il gradiente viene mantenuto tale grazie ad una pompa che butta fuori gli ioni, quando smette di funzionare il gradiente si dissipa e i meccanismi di produzione di ATP si interrompono.

Capitolo 9

Membrana

Non ha registrato La membrana è esternamente fluida, cosa che dipende dalla composizione dei lipidi, in grado di cambiare le caratteristiche biofisiche in grado ai lipidi di cui è costituita, una membrana di una sola classe passa da una fase semisolido ad una più solida in uno stato di gel a una determinata temperatura modificata in base alla composizione dei fosfolipidi. Una membrana costituita da catene idrocarburica insature ha una transizione di fase ad una temperatura più basse rispetto a fosfolipidi con catene idrocarburiche sature, importante in quanto organismi tendono ad andare incontro a variazioni della temperatura esterna che influiscono sulla transizione di fase modificando la composizione delle membrane. Il colesterolo può modificare a questo tipo di proprietà rendendo le membrane molto meno fluide e fornisce aumenta la selettività della membrana nei confronti di determinate molecole. Le specie lipidiche nelle membrane plasmatiche sono colesterolo, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, sfingomielina, glicolipidi e altri. L'altra componente importante dei lipidi di membrana sono i glicolipidi con uno zucchero associato al lipide. Si pensa che la membrana fosse omogenea dal punto di vista di caratteristiche biofisiche, ma i lipidi tendono a formare domini con caratteristiche particolare dette zattere lipidiche all'interno delle quali sembrano avere un ruolo funzionale importante in quanto permettono il reclutamento e aggregazione di proteine creando domini specifici all'interno della membrana stessa. Le zattere lipidiche sono zone di disomogeneità della composizione lipidica possono per esempio più ricchi di colesterolo che favorisce il mantenimento in loco di proteine associate alla membrana che formano domini con funzioni specifiche di membrane. Questi domini esistono e hanno un ruolo funzionale importante. Il doppio strato lipidico presenta delle differenze in termini di tipo di lipidi presenti: il movimento da un monolayer all'altro è accentuato grazie all'opera di molecole dette flippasi che favoriscono lo scambio lipidico. Si trova asimmetria di composizione lipidica tra i monolayer, in particolare i glicolipidi, lipidi con zuccheri si trovano esclusivamente nella parte extracellulare e vengono prodotti in parte nell'ER e poi nell'apparato del Golgi e conferiscono delle cariche a un ambiente all'esterno della cellula che può essere riconosciuto da molecole che si legano agli zuccheri e mediano le interazioni tra una cellula e l'altra hanno ruolo di riconoscimento e interazione cellula cellula e contribuiscono un ambiente ionico diverso rispetto a quello intercellulare. La condizione asimmetrica varia in condizioni particolari: in una cellula che va incontro ad apoptosi normalmente presenta la fosfatidilserina localizzata nel monolayer che guarda il citosol, quando va incontro ad apoptosi la fosfatidilserina viene portata nel monolayer che guarda l'ambiente extracellulare che viene riconosciuta dai macrofagi, le cellule del sistema immunitario deputate alla fagocitosi e la presenza della fosfatidil serina permette il reclutamento dei macrofagi. I glicolipidi si trovano esclusivamente nel monolayer verso l'esterno e costituiscono il 5% delle molecole del monolayer esterno, si trovano tutte

le membrane esterno, si trovano in alcuni casi nelle membrane intracellulari nell'ER e nell'apparato del Golgi. Le più complessi sono i glicolipidi che contengono oligosaccaridi con uno o più residui di acido sialico. È una famiglia numerosa con più di 40 membri, sono abbondanti nella membrana plasmatica delle cellule nervose. Alcuni glicolipidi vengono utilizzati come porta d'ingresso per tossine batteriche e di virus. Come per la tossina del colera che aumento di cAMP e richiamo di acqua con squilibrio ionico e conseguente diarrea che porta in molti casi alla morte. La tossina del colera entra interagendo con il glicolipide Gm1 e viene portata all'interno della cellula dove va a bloccare l'attività dell'adenilato ciclasi. Le proteine di membrana vi sono alcune che di fatto sono presenti dei domini che attraversano la membrana plasmatica, normalmente ad α elica e possono essere un unico o più dominio, mono e multipasso. Come nei recettori muscarinici multipasso con 7 domini di membrana. In altri casi ci sono proteine con domini di membrana a struttura β che formano cesti di strutture a barile come le pore forming protein nei batteri e poi delle proteine presenti nella membrana ma non la attraversano e associate in maniera meno forte con essa e presentano un dominio idrofobico che ne permette interazioni, ci sono proteine legate a membrana con legami specifici con i lipidi di membrana, categorie attraverso legame GPI con il glicosilfosfatidilinositolo, proteine extracellulari, inizialmente di membrana poi tagliate e si forma il legame con esso e può essere spezzato da delle fosfolipasi e rilasciare la proteina nell'ambiente extracitoplasmatico, ci sono proteine che interagiscono con la membrana attraverso proteine di membrana nell'ambiente citoplasmatico o extracitoplasmatico. Per capire se una proteina ha un dominio idrofobico per capire se può interagire con la membrana plasmatica con uno strumento che identifica amminoacidi con una certa affinità con il bistrato ed è possibile identificare i domini. Questo si misura con l'indice di idropatia, negativo parte citosolica, positivo domini di membrana. Questo può essere utilizzato per identificare le regioni potenzialmente più antigeniche rispetto ad altre: per produrre un anticorpo contro una proteina si sceglie la regione non inserita nella membrana. Si vedono regioni con scarse interazioni con la membrana in quanto sono le parti più esposte e ottime per indurre la capacità di formazione di anticorpi. L'aquaporina è una proteina di membrana che forma tramite strutture idrofobiche ad α elica delimita un canale per il passaggio delle molecole d'acqua che possono comunque passare in maniera diffusiva ma con permeabilità estremamente bassa. La luce crea un gradiente di ioni H^+ importante per la produzione di ATP grazie alla rodopsina, un meccanismo simile alla trasduzione del segnale visivo. I detergenti vengono utilizzati per dissociare proteine ancorate alla membrana e dissolvono la componente lipidica permettendo di isolare proteine con domini di membrana, come il sodio dodecil solfato, il triton X 100 e così via. Le proteine possono diffondere lungo tutta la cellula ma non avviene tramite un trafficking intracellulare specifico che porta le proteine negli epiteli dalla parte apicale e quella basolaterale e non diffondono in quanto tra una cellula ci sono delle giunzioni strette che impediscono la diffusione laterale. Sono giunzioni particolari che coinvolgono elementi del citoscheletro che creano una barriera che impedisce la diffusione delle proteine che permette alla cellula di acquisire una polarità apicale con proteine con funzione particolare con altre proteine nella parte basolaterale.

Capitolo 10

Organelli

I compartimenti intracellulari e il trasporto delle proteine all'interno della cellula. Si è partiti da meccanismi molecolari piccoli si vede come i lipidi e le membrane formano delle strutture e dei compartimenti all'interno della cellula e si trovano dalle cellule eucariotiche, nei batteri tutto avviene all'interno del citoplasma, non esistono membrane, solo la membrana cellulare e la parete batterica. Nelle cellule eucariotiche esiste un sistema di membrane alla base della loro funzionalità e successo evolutivo. Questa compartimentazione delimita degli ambienti con caratteristiche e funzioni specifiche. Il Golgi per esempio aggiunge zuccheri alle proteine della membrana, i mitocondri producono energia e i lisosomi degradano molti dei processi biochimici che avvengono sulle superfici delle membrane avvengono al loro interno. Questo comporta delle problematiche legate al trasporto delle proteine necessarie per il funzionamento dell'organello. Le proteine prodotte nel citoplasma per raggiungere il compartimento ed entrare in esso devono compiere delle cose. Questo campo va a studiare i meccanismi di trasferimento di proteine specifiche all'interno dei compartimenti. Nelle cellule eucariotiche ci sono una struttura compartimentazione omogenea. Si trova un nucleo che contiene il materiale genetico circondato dalla membrana nucleare con una membrana interna e una esterna. La membrana nucleare è ricca di pori detti pori nucleari caratterizzati e formati da proteine dette nucleoporine, il nucleo è uno scolapasta pieno di buchi il cui numero dipende dal tipo cellulare e dallo stato fisiologico della cellula. Le membrane nucleari sono in continuità con il reticolo endoplasmatico che può essere liscio importante in quanto al suo interno si accumula lo ione calcio e avviene la sintesi dei lipidi e l'ER rugoso che prende il nome dalla morfologia da come appare in microscopia, presenta sulla superficie i ribosomi. Le proteine che entrano nell'ER possono essere inserite in concomitanza con la loro traduzione. Ci sono proteine che vanno in compartimenti in cui la proteina deve essere fatta completamente per essere poi indirizzata come lisosomi e perossisomi. In prossimità dell'ER rugoso si trova l'apparato di Golgi che prende il nome da Camillo Golgi che prese il premio nobel insieme a Cajal per la messa a punto di un sistema di colorazione che ha permesso l'identificazione di molti compartimenti cellulari e di formulare a Cajal la teoria neuronale in cui il sistema nervoso è caratterizzato da cellule singole dei neuroni. L'apparato del Golgi attua una serie di modifiche post trascrizionali a carico di proteine a ciò vengono aggiunti zuccheri e vengono prodotte le glicoproteine e i glicolipidi e le glicoproteine vengono portate sulla membrana plasmatica o secrete. Altri compartimenti sono i mitocondri, tutte le strutture che sono delimitate da membrana sono dette organelli. I mitocondri la cui funzione è di produrre energia, ATP, gli endosomi sono delle strutture che si originano dalle invaginazioni della membrana plasmatica e portano all'interno materiale presente dall'ambiente extracellulare. Altri organelli sono i lisosomi, organelli di membrana che contengono diversi enzimi in grado di degradare i polimeri biologici, l'apparato

digestivo della cellula. Oltre i lisosomi si trovano i perossisomi, organelli racchiusi da una membrana, contengono enzimi coinvolti nelle reazioni metaboliche in cui viene coinvolta l'ossidazione. Non contengono a differenza dei mitocondri del DNA proprio e le proteine che vanno entrano nei lisosomi e dei perossisomi vengono prodotte nel citoplasma e inserite in maniera specifica. Un altro organelli sono gli autofasogomi o fasogomi. Si trova anche una diverso posizionamento all'interno della cellula in base al tipo cellulare. Si può pertanto distinguere una certa polarità in termini di posizionamento di questi elementi. Alcune di queste strutture sono visibili ad un microscopio ottico, è difficile vedere altre strutture e pertanto si utilizza la microscopia elettronica o degli anticorpi che riconoscono componenti specifici dei vari compartimenti. Come proteine esclusive dell'apparato del Golgi attraverso immunofluorescenza. Un anticorpo della proteina del mitocondrio si identifica il mitocondrio. È possibile andare a studiare nel dettaglio morfologia struttura e caratteristiche dei compartimenti. I volumi relativi in una cellula epatica, la maggior parte del compartimento è costituito dal citosol, sostituito dai mitocondri, l'ER rugoso, ER liscio e cisterne del Golgi, nucleo (6%), perossisomi, lisosomi ed endosomi. Queste percentuali variano in base al tipo cellulare. Si vede come le cellule del sistema immunitario T che media la risposta immunitaria cellulo mediata e il linfocita B produce anticorpi, proteine glicosilate che vengono secrete dal linfocita e vanno ad attaccare una determinata sostanza o un antigene che non appartiene all'organismo. Ci sono diverse immunoglobuline M durante il primo incontro con l'antigene dopo di che le G che riconoscono in maniera più precisa l'antigene, motivo del richiamo delle vaccinazioni. Sia le immunoglobuline M che G sono proteine glicosilate e presentano dei gruppi e degli zuccheri dopo modifiche post traduzionali che avvengono nell'apparato del Golgi e prodotte dal reticolo endoplasmatico. La percentuale e il volume relativo dei compartimenti all'interno della cellula dipende dal tipo cellulare anche se la maggior parte del volume è occupata da mitocondri e reticolo endoplasmatico. Si trova un movimento di vescicole che si producono dal Golgi e che ritornano nell'ER e c'è pertanto un movimento di vescicole dall'ER al Golgi e dalla membrana ma anche dal Golgi indietro. Si nota come è interessante capire come la cellula regoli questi trasporti e il trasporto delle proteine all'interno di questi compartimenti. E come il trasporto sia specifico. Da un punto di vista evolutivo per capire come le cellule hanno acquisito questi organelli. Indicazioni della prima cellula eucariotica è datata 1,4 miliardi di anni fa. I primi organismi pluricellulari di cui si ha evidenza fossile si hanno nel cambriano nel 225000 anni fa. Per un certo periodo di tempo c'è stato uno stallo che ha creato gli organismi pluricellulari. Un passaggio importante è stato il passaggio dalla cellula procariotica a quella eucariotica con la formazione di una membrana nucleare per proteggere reazioni regolare che avvengono che coinvolgono il DNA. Un altro step importante è stato l'acquisizione di organismi che erano in grado di utilizzare ossigeno per produrre energia tramite un meccanismo di simbiosi questi organismi batteri in grado di usare l'ossigeno sono stati inglobati all'interno dando origine a una cellula eucariotica in grado di produrre energia usando ossigeno. Questo ha portato a un passaggio di competenze dal mitocondrio alla cellula: la maggior parte dei geni importanti per l'organismo sono stati presi in carico dal nucleo dalla cellula ospitante comportando che le proteine prodotte nel citoplasma dovessero andare a finire nel mitocondrio. Sono stati creati segnali particolari per svolgere la funzione. Le cellule vegetali hanno acquisito la capacità di fissare CO₂ atmosferica attraverso cloroplasti che appartengono alla famiglia di plastidi. Una proteina è in grado di muoversi ed essere indirizzata in un compartimento. Questo meccanismo può avvenire secondo un trasporto regolato come avviene per esempio nel trasporto di proteine dal nucleo al citoplasma e viceversa. Le proteine si muovono in questi compartimenti passando attraverso i pori nucleari e si tratta di un trasporto che coinvolge delle importine e delle esportine che riconoscono particolari segnali presenti all'interno delle proteine che subiscono il trasporto e mediano il passaggio attraverso i pori nucleari. La seconda modalità è la translocazione proteica o trasporto di transmembrana che avviene nelle proteine che vanno nei plastidi negli organelli deputati alla fotosintesi, nei mitocondri e nei perossisomi, un trasporto in cui

le proteine prodotte nel citosol arrivano in prossimità del mitocondrio e riconosciute da recettori che mediano utilizzando ATP o un gradiente per trasportare le proteine all'interno degli organelli. Infine si ha un trasporto vescicolare che permette il trafficking di proteine da ER a Golgi con direzione in entrambi i sensi, lo stesso trasporto vescicolare porta le proteine modificate nel Golgi sulla membrana e secrete, lo stesso avviene per i trasporti che vedono proteine andare in lisosomi, endosomi. Queste sono le tre modalità con cui la cellula indirizza proteine componenti nei vari organelli. Il trasporto specifico di una proteina avviene grazie a segnali scritti nella sequenza amminoacidica che fungono da zip codes, la sequenza di una sequenza con lis lis lis arg lis è un segnale di importo nel nucleo (NLS) e vi sono segnali specifici per l'esporto, segnali per l'importo nei mitocondri che è localizzato nella porzione N terminale con lunghezza maggiore all'NES e con amminoacidi specifici e sequenza comune predicibile e delle sequenze che permettono di indirizzare la proteina all'interno dei plastidi e sequenze di importo nei perossisomi, che si trovano nella coda C terminale. Sequenze di importo per proteine all'interno dell'ER localizzata nella porzione N terminale peptide o leader segnale ed infine c'è una sequenza che permette a proteine nel citoplasma di rientrare nell'ER e localizzata nella coda C terminale. Queste sequenze sono importanti in quanto vengono riconosciute dai fattori che mediano importo o esporto di proteine nei compartimenti. Se modificate possono indirizzare proteine in altri compartimenti. Molti dei marcatori fluorescenti prodotti e sintetizzati dalla cellula sono state modificate in modo tale da entrare in compartimenti in modo da renderli visibili. Mutazioni a carico di questi amminoacidi interferiscono e compromettono il trafficking e l'indirizzamento di proteine verso i compartimenti. Il citoscheletro nel trafficking ha un ruolo fondamentale: perché fornisce la base per il trasporto stesso. I microtubuli sono binari su cui avviene il trasporto di vescicole e proteine e forniscono supporto al trafficking e stabilizzano gli organelli stabilendo il loro assemblamento e l'ER collapsa in assenza. Sono importanti dineine e chinesine che trasportano le proteine o le vescicole all'interno della cellula.

10.1 Trafficking tra nucleo e citoplasma

Si vede come avviene il trasporto di proteine dal nucleo al citoplasma e viceversa. Il nucleo è delimitato dall'involucro nucleare, una struttura formata da due membrane, una interna e una esterna la quale è discontinua con il reticolo endoplasmatico. Queste due membrane sono differenti con proteine diverse e la membrana interna è in contatto con una rete di filamenti proteici intermedi detta lamina nucleare, un intreccio costituito che riveste la superficie nucleare, un reticolo fibroso che mette in contatto componenti del DNA che si associano ad esso e mette in contatto proteine presenti sulla membrana nucleare interna. Questi filamenti proteici intermedi sono lamine e i mammiferi possiedono tre geni A, B e C che codificano per sette proteine. Queste lamine hanno uno stelo, un manico e una testa come le mazze da golf. Mettendo due mazze da golf si forma un dimer di lamina e più dimeri di lamina interagiscono tra di loro formando una rete di lamine che sostiene la membrana interna nucleare. Le loro mutazioni danno patologie diverse come quella di Emery Dreufus o la progeria di Hutchinson Gilford con Sammy basso caratterizzata da un precoce invecchiamento dovuto a queste mutazioni per la lamina A che compromette funzionalità del nucleo. Questa membrana è importante in quanto isola l'ambiente del DNA da quello esterno ed è sede di molti trasporti di acidi nucleici come mRNA, microRNA e lncRNA e di proteine che lasciano il nucleo da sole o assieme agli acidi nucleici o che dal citoplasma entrano nel nucleo per svolgere le funzioni. Le proteine sono sintetizzate nel citoplasma e poi entrano nel nucleo. La membrana deve pertanto permettere il passaggio delle sostanze. La membrana presenta dei pori che formano il complesso dei pori nucleari NPC, ciascun complesso è composto da 30 proteine nucleoporine una struttura notevole dal punto di vista del peso che strutturale. Il numero di questi pori nucleari dipende

può variare all'interno dello stesso tessuto come tra glia o del cervelletto il numero varia dal tipo cellulare anche all'interno dello stesso tessuto. Il trasporto che avviene attraverso questi pori è di circa 1000 macromolecole al secondo. Un poro nucleare ha una forma asimmetrica: la porta rivolta verso il nucleo a forma a cono e quella citoplasmatica è caratterizzata da proteina filiforme. Ci sono proteine che delimitano il canale, altre che lo ancorano alla membrana e altre proteine strutturali. È una composizione notevole. Le proteine nella parte interna fungono da filtro, creano un gel e sono proteine ricche in amminoacidi di glicina e fenilalanina che rendono le proteine non strutturate e senza struttura ben determinata e formano una sorta di gel filtro che funge da barriera per l'entrata di proteine che lascia passare proteine a basso peso molecolare mentre proteine più grandi ne vengono escluse. Le proteine grandi come le proteine ribosomali che vengono assemblate nel nucleo prima di uscire permettono la fuoriuscita grazie a dei trasportatori. Le componenti del poro nucleare possono svolgere funzioni al di fuori della struttura come ruolo di mantenere rendendo stabile la zona dove si genera il potenziale d'azione nell'assone e colocalizza con marcatori dell'ER (NUP358). Per passare il filtro le proteine devono avere la NLS nuclear localisation / import signal. Quando presente la proteina viene importata nel nucleo, mutando un singolo amminoacido la proteina rimane citoplasmatica. La presenza di un NLS è una condizione necessaria per un trasporto specifico attivo. L'NLS è indipendente dal peso molecolare. Si può marcare la proteina in esame con nanoparticelle d'oro che appaiono opache in microscopia elettronica. La proteina interagisce con la componente fibrillare del nucleoporo, si avvicina e viene inserita nella rete al centro del poro nucleare e dopo di che passa alla parte citoplasmatica. L'NLS media il trasporto dal citoplasma grazie ad un recettore, una molecola che la riconosce che prende il nome di importina che mediano l'entrata nel nucleo e le proteine che contengono l'NLS la mediazione può essere diretta o può essere indiretta tramite la presenza di un adattatore, la proteina viene riconosciuta da un adattatore e quando la proteina cargo interagisce con l'adattatore che cambia conformazione esponendo l'NLS che viene riconosciuta dall'importina. L'adattatore introduce una problematica in quanto l'adattatore rende non necessario l'NLS sulla proteina cargo. Accanto al segnale che consente il trafficking da citoplasma a nucleo si trova una sequenza a una proteina presente nel nucleo di lasciarlo e di andare nel citoplasma. Si trovano entrambi in proteine che vanno avanti e indietro come le proteine adattatrici. La sequenza NES nuclear export sequence questa molto spesso è meno chiara in quanto i software predicono con una precisione inferiore rispetto all'NLS. L'NES è ricca in leucina a una certa distanza e separati da altri amminoacidi, il consensus è meno evidente rispetto ad un NLS. L'NES permette a proteine nel nucleo di essere riinviate nel citoplasma. L'importo di proteine attraverso il nucleoporo avviene grazie alla presenza di importina e alla presenza dei molecular switches (trasduzione del segnale) interruttori molecolari, le RAN GTPasi, interruttori molecolari che possono trovarsi in due conformazioni a seconda che leghino GDP o GTP sono importanti in quanto consentono e mediano il trasporto dal nucleo al citoplasma e viceversa. Nel citosol si ha una percentuale di RAN legate al GDP, mentre nel nucleo RAN è legato a GTP. Il cambio conformazionale è mediata da una Ran-GAP, una proteina che attiva la GTPasi, quando RAN lega il GTP passa in RAN-GDP quando idrolizza il GTP, cosa promossa da Ran-GAP che attiva la GTPasi (GTPasi activating protein) il passaggio inverso viene mediato da Ran-GEF (Ran fattore di scambio della guanina GTP exchange factor) questi due fattori promuovono il legame di GTP o GDP. I due fattori si trovano nel citoplasma per Ran-GAP e Ran-GEF nel nucleo con un gradiente di Ran-GTP nel nucleo e di Ran-GDP nel citoplasma. L'idrolisi da GTP a GDP e lo scambio inverso può avvenire anche senza attivatori, ma in loro presenza il loro turnover è più rapido ed efficiente. La proteina cargo è legata da importina che una volta che lo lega interagisce con la componente citoplasmatica del poro e lo avvicina al poro, l'importina ora tende ad interagire con domini con le proteine ricche di glicina e fenilalanina che forma il filtro e le rimuove spostandole e permette creando un buco di passaggio per l'entrata del complesso. All'interno del nucleo l'importina si lega al Ran-GTP e legandosi a Ran GTP

cambia conformazione e si distacca dal cargo che viene rilasciato nel nucleo e il complesso Ran-GTP importina fuoriesce dal nucleo, ritorna nel citoplasma e Ran passa a Ran GDP in quanto trova Ran-Gap che determina un cambio conformazionale dell'importina che porta al rilascio di Ran-GDP. Il meccanismo di trasporto è analogo ma che avviene nel senso opposto, l'esportina lega il Ran-GTP e il cargo con l'NES, il complesso esce e nel citoplasma si trova il fattore che promuove l'attività GTPasica di RAN che diventa Ran-GDP che porta al cambio conformazionale dell'esportina che causa il rilascio della proteina cargo all'esterno del citoplasma. Lo stesso meccanismo viene utilizzato per importare ed esportare proteine. Ran-GAP interagisce con la parte fibrillare esterna del poro nucleare e di fatto la si trova tra le fibrille, quando il complesso esce trova Ran-GAP in loco che favorisce l'interazione con Ran-GTP e ne stimola l'attività GTPasica con la produzione di Ran-GDP e il fosfato. Una stessa proteina che potenzialmente contiene un NLS non sia presente nel nucleo: questo avviene con significato biologico importante in quanto il trafficking nucleo citoplasma è altamente regolato. Si può mantenerlo nel citoplasma attraverso modifiche come fosforilazioni che avvengono a carico dell'NLS che presente nella sequenza e quando si vede nella proteina si vede nel citoplasma. L'embrione della drosophila è un sincizio e il fattore di trascrizione è presente in alcuni nuclei in cui il fattore ha subito delle modifiche per cui entra solo in alcuni nuclei, pertanto le cellule hanno un pattern trascrizionale (mRNA) diversi tra di loro. Il meccanismo può essere regolato come nella proteina delle proteine nuclear factor activated T cells, fattore nucleare delle cellule T attivate e in condizioni di non attivazione si trova nel citoplasma e contiene un NLS. NON va nel nucleo in quando quando non è attivato è fosforilato che va a mascherare l'NLS che in qualche modo viene reso invisibile. Quando il fattore viene attivato a seguito della presenza di un antigene in cui occorre trascrivere geni che aiutano la risposta immunitaria, quando questo è presente crea una cascata intracellulare che porta un aumento dei livelli di calcio che va ad attivare la calcineurina, una fosfatasi che attivata dal calcio rimuove i gruppi fosfato del fattore nucleare NF-AT, rimuovendoli rende accessibile il segnale di localizzazione nucleare e la proteina viene portata all'interno del nucleo dove trascrive geni. Questo è un esempio di come una modifica post traduzionale è in grado di mascherare in segnale di localizzazione. UN altro esempio è quello della proteina SREBP coinvolta nella sintesi del colesterolo (sterol response element binding protein) che è coinvolta nella sintesi del colesterolo e quando la cellula la necessita la proteina la attiva e va nel nucleo e trascrive una serie di enzimi importanti per la sintesi del colesterolo. In presenza di colesterolo la proteina non serve e il colesterolo interagisce con SCAP (SREBP cleavage activation protein). Il fattore SREBP è il fattore trascrizionale e SCAP è un fattore che taglia SREBP: in presenza di colesterolo SCAP lo lega e si attiva nel tagliare SREBP, il tutto rimane quindi bloccato a livello dell'ER in presenza di colesterolo. In sua assenza i due componenti lasciano l'ER vanno nell'apparato del Golgi e trovano delle proteasi che vanno a tagliare il fattore SREBP enzimi che lo modificano post traduzionalmente e modificandolo liberano un frammento che va nel nucleo e attiva la trascrizione per fattori coinvolti nella sintesi del colesterolo. Il passaggio da ER a Golgi è determinato dal cambio conformazionale ad opera di SCAP che non è più legato al colesterolo che attiva il processo di trasporto, il taglio del fattore trascrizionale, rilascio e che contenente NLS va nel nucleo e trascrive per elementi coinvolti nella biosintesi del colesterolo. Durante la mitosi l'apparato nucleare e la membrana e l'ER, apparato del Golgi vengono disassemblati che inizia a coinvolgere la struttura a lamina e il tutto viene regolato da meccanismi di modifica post-traduzionale come fosforilazione delle lamine e delle proteine del poro nucleare. Quando si ha la separazione dei cromosomi all'interno delle cellule figlie si riforma la membrana nucleare e la lamina con le due cellule figlie perfettamente funzionanti.

10.1.1 Trasporto in mitocondri e plastidi

I plastidi sono organismi presenti nelle cellule vegetali e svolgono funzioni importanti nell'ambito della fotosintesi clorofilliana e metabolismo delle cellule vegetali. Il trasporto nei mitocondri prevede il riconoscimento da parte di recettori di segnali peptidici di proteine che devono essere trasportati. Sia il mitocondrio che il cloroplasto sono delimitati da una membrana esterna, ne presentano una interna che nel mitocondrio presenta diverse creste dove sono presenti l'apparato deputato alla produzione di ATP. All'interno si distingue una regione detta matrice, tra membrana esterna e interna si trova uno spazio intermembrana, nei cloroplasti si trova anche un sistema di membrane dette membrane tilacoidi che delimitano lo spazio tilacoide dove si trova il pigmento coinvolto nel processo di fotosintesi clorofilliana. A differenza di quello che accade per proteine che entrano nell'ER che possono entrare in esso in contemporanea alla loro traduzione, per proteine introdotte nei mitocondri o in altri organelli queste devono essere completamente tradotte da ribosomi che possono essere liberi nel citoplasma o che si trovano sulla superficie esterna dei mitocondri. Una proteina deve essere completamente tradotta in quando le sequenze che permettono il targeting possono trovarsi anche nella porzione C terminale. Il peptide segnale che interagisce con i recettori presenti sui recettori è caratterizzato da una sequenza di 18 amminoacidi alcuni dei quali polari e altri non polari e questo peptide forma una struttura ad alpha elica con la distribuzione asimmetrica, con da una parte amminoacidi polari e dall'altra non polari. Questo viene riconosciuto dal complesso che costituisce il traslocatore per le proteine mitocondriali che prende il nome di TOP per il trasporto dal citoplasma attraverso la membrana esterna e prende il nome di TIM responsabile del trasporto attraverso la membrana interna nella matrice del mitocondrio. Il primo riconoscimento della sequenza segnale avviene ad opera del complesso TOP con una componente recettoriale e una che forma un canale come botte nella membrana che permette l'entrata della proteina attraverso la membrana. La proteina che entra all'interno del mitocondrio viene tradotta nel citoplasma e questa inizia ad assumere una struttura secondaria caratteristica e per potersi infilare in realtà esiste una proteina detta HSP70 (heat shock protein 70), un chaperon, una proteina che aiuta le proteine ad assumere una struttura secondaria peculiare e in questo caso impedisce alla proteina di assumere la struttura che ne impedirebbe l'entrata all'interno del canale, la mantiene il più lineare possibile permettendole di entrare attraverso la membrana mitocondriale esterna. La proteina possiede il peptide segnale riconosciuto dal recettore del complesso TOM e una volta che interagisce la proteina viene forzata ad entrare nel canale, passa la membrana esterna ed entra nello spazio intermembrana ed entra in contatto con il complesso TIM con una componente a canale e passa attraverso di esso e trova altre proteine chaperon che le impediscono di assumere una struttura terziaria prima che abbia completato il passaggio e quando finisce assume la struttura specifica e si ha il taglio del peptide segnale. Il complesso TOM e TIM lavorano insieme anche se possono lavorare in maniera indipendente: ci sono proteine residenti dello spazio intermembrana. A cavallo della membrana interna si trova un gradiente elettrochimico di ioni H^+ creato da pompe che lo pompano dalla matrice allo spazio intermembrana, uno dei due fattori che fornisce energia per la traslocazione delle proteine dal citoplasma alla matrice cellulare, l'altro è l'idrolisi dell'ATP a carico del complesso TOM e la seconda fonte di energia è il gradiente elettrochimico creato dalla pompa protonica. Dissipando il gradiente si blocca il trasporto. Da un lato si ha idrolisi dall'altro il gradiente elettrochimico che spinge il meccanismo. L'inserimento di una proteina che deve rimanere associata alla membrana interna questo tipo di proteine contengono la sequenza segnale e una sequenza di stop-transfer, quando la proteina grazie alla sequenza segnale passa a TOM, passa a TIM e quando viene inserita la sequenza di stop-transfer di fatto si blocca l'ulteriore passaggio dalla membrana interna verso la matrice. La proteina continua ad entrare dal citoplasma e si blocca nello spazio intermembrana, viene rilasciata da TIM e rimane ancorata alla membrana. Un altro meccanismo prevede il ruolo

del complesso OXA che è associato con il complesso TIM e un meccanismo che prevede l'inserzione di proteine nella membrana interna del mitocondrio che proviene dal citoplasma, la proteina entra attraverso il complesso TIM e si trova un secondo peptide segnale riconosciuto dal complesso OXA che ancora la proteina all'interno della membrana interna. Si trova una parte bloccata dal complesso OXA. La presenza di una peptidasi che taglia il dominio di ancoraggio della membrana permette al mitocondrio di ottenere proteine solubili presenti nello spazio intermembrana. Un altro meccanismo coinvolge la Mia40, una disolfuro isomerasi che catalizza formazione e rotture di legami disolfuro che avvengono in presenza di determinati amminoacidi all'interno di una proteina che quando viene attraversata dal mitocondrio Mia40 forma un ponte disolfuro temporaneo con la proteina che sta arrivando e il ciclo di formazione e rottura di ponti disolfuro permette di dare l'energia per introdurre la proteina nello spazio intermembrana, successivamente si formano ponti disolfuro nella proteina stessa che formano la struttura secondaria. La funzione dei mitocondri è quella di produrre ATP usando l'ossigeno e loro altri ruoli come il processo apoptotico.

10.2 Perossisomi

I perossisomi del trafficking avviene con modalità simile a quella dei mitocondri e i perossisomi non hanno DNA e tutte le componenti importanti per l'attività dei perossisomi vengono prodotti dalla cellula e vengono indirizzati in questi organelli. Si pensa siano vestigia di antichi organelli con ruolo nel metabolismo dell'ossigeno. L'ossigeno è importante in quanto rende efficiente la produzione di ATP ed è una molecola reattiva e alcuni dei suoi metaboliti sono molecole reattive come H_2O_2 , molecola potenzialmente dannosa, si pensa che i perossisomi fossero organelli deputati a detossificare la cellula dall'ossigeno e da molecole reattive che si formano a seguito della presenza di ossigeno. Abbassano la concentrazione intracellulare dell'ossigeno per svolgere reazioni utili. Sono delimitati da membrana e contengono enzimi con diverse funzioni: una delle quali è di rimuovere degli atomi di idrogeno da substrati organici specifici come $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$, la formazione di acqua ossigenata è una specie altamente reattiva e grazie alla catalasi questa molecola viene poi inattivata ad acqua. Il meccanismo per cui le cellule inattivano sostanze dannose come acido formico, formaldeide e alcol andando a produrre nell'ultimo caso acetaldeide. Andando a vedere le cellule epatiche hanno un elevato numero di perossisomi. L'altra funzione è la demolizione di acidi grassi o beta ossidazione che vengono convertiti in sostanze a due atomi di carbonio come acetil CoA che viene coinvolta in altre reazioni biosintetiche. Una funzione importante è quella di catalizzare le prime reazioni che portano alla formazione di plasmalogeni, fosfolipidi presenti nella mielina, una guaina che riveste gli assoni delle cellule nervose e permette una trasposizione efficiente dell'impulso nervoso. Come il rivestimento isolante dei fili di rame che permette il flusso. La guaina mielinica introdotta dalle cellule di Schwann permette una trasmissione efficiente e a lunga distanza. Mutazioni di enzimi coinvolti nella formazione dei plasmalogeni porta gravi conseguenze. I perossisomi hanno una struttura rotondeggiante e con la presenza di inclusioni dette inclusioni paracrystalline costituite dall'enzima dell'urato ossidasi coinvolti nei meccanismi di ossidazione all'interno dei perossisomi. Presenti nelle cellule vegetali dove sono coinvolti in vari meccanismi come il ciclo del glicosilato, la conversione di acidi grassi in zuccheri importante per la germinazione del seme, non presente nelle cellule animali. Il targeting di proteine ed enzimi verso i perossisomi avviene grazie a segnali, una sequenza di serina, lisina, leucina nella porzione N o C terminale nelle proteine peroxisomal localization sequence (PLS), proteine che la presentano vengono riconosciute dai trasportatori perossine (Pex) ce ne sono diverse come uno è la Pex5 che riconosce la sequenza PLS C terminale. Normalmente il trasporto e riconoscimento nei perossisomi avviene con diverse Pex1, e 6 che usano ATP e permettono l'importo di queste proteine. La sindrome di Zellweger che porta anomalie cerebrali, fegato e rete con mutazio-

ni di Pex con pazienti con perossisomi che non svolgono la loro funzione e cosa che comporta danni notevoli all'interno di questi tessuti. Un'altra proteina che riconosce la sequenza PLS è Pex7 che la riconosce a livello N terminale. I perossisomi originano dal reticolo endoplasmatico che gemma e forma una struttura vescicolare grazie a Pex3 transmembrana e Pex19 associata alla membrana tramite un legame con lipidi e Pex3 e Pex19 sono importanti per la formazione della vescicola a partire dal reticolo endoplasmatico per gemmazione che dopo funge da protoperossisoma arricchito di altre componenti e poi i perossisomi possono andare incontro a divisione e formare altri perossisomi. La funzione dei perossisomi si è relegata ai meccanismi di ossidazione di lipidi o alla degradazione e al metabolismo di alcol e altre sostanze e meno alla produzione di energia in quanto assunta dai mitocondri.

10.3 Reticolo endoplasmatico

Nel reticolo endoplasmatico oltre ad esserci meccanismi di trasporto mediante traslocazione proteica si trova un trasporto vescicolare. Un trasporto che prevede la formazione di vescicole che possono andare in membrana nel citoplasma, verso il Golgi o tornare verso l'ER. Si tratta di un organello che occupa il maggior volume all'interno della cellula, si tratta di un labirinto di tubuli e piatti appiattiti che si estende nel citosol. È in continuità con la membrana nucleare e delimita il lume del reticolo endoplasmatico o spazio delle cisterne del reticolo endoplasmatico, la sua funzione sono diverse e all'interno dell'ER si possono individuare zone diverse: la più evidente è la divisione in uno liscio e uno rugoso, dove appare evidente in quello rugoso la presenza di ribosomi presenti sulla membrana. Ha diverse funzioni. Quello liscio è importante come riserva di calcio con una struttura che avvolge l'intera fibra muscolare nei muscoli scheletrici e contiene calcio e rilasciarlo permettendo la contrazione del muscolo. È coinvolto nella formazione di lipidi e molecole che vengono indirizzate in diversi distretti. L'ER è dinamico, è una struttura dinamica che va incontro a un notevole riarrangiamento legato ai microtubuli e di proteine motrici che permettono il movimento di cisterne e reticoli di questo organello che portano alla fusione di una rete meno ramificata o più complessi. Si tratta di una struttura dinamica. Oltre a ER liscio e rugoso si può identificare un ER di transizione che è quella parte dell'ER liscio in cui si formano vescicole che trasportano componenti al Golgi. Il trasporto di proteine verso il reticolo può avvenire in modo cotraduzionale o un importo post traduzionale: le proteine possono essere importate in fase di traduzione o dopo che sono state completamente tradotte dai ribosomi, una differenza tra l'importo nei mitocondri in cui la proteina deve essere completamente tradotta. In questo caso esiste un importo cotraduzionale in cui una proteina inizia a essere tradotta, si trova una pausa e inizia il trasporto nell'ER e la traduzione riprende. Il ribosoma e la catena nascente vengono portati sull'ER dove la traduzione continua, nell'altro caso la proteina viene indirizzata dopo la traduzione, traslocazione co e post traduzionale. I ribosomi sono gli stessi e non cambiano strutturalmente. La differenza sta nella localizzazione. I ribosomi del primo da citoplasmatici diventano adesi all'ER gli altri rimangono liberi nel citoplasma. La differenza sta nella localizzazione dei ribosomi. Il reticolo endoplasmatico si sviluppa come cellule diverse hanno nel pancreas esocrino presenta un ER rugoso maggiore rispetto alle cellule che producono testosterone, composti a base lipidica. L'estensione dell'ER rugoso e liscio dipende dall'attività della cellula, in molti casi è difficile distinguere tra i due in quanto ci sono zone nell'ER rugoso prive di ribosomi. È possibile isolare il reticolo endoplasmatico attraverso un approccio biochimico in cui la cellula viene omogeneizzata e il processo comporta la rottura delle membrane dell'ER che tendono poi a riformare delle vescicole più piccole dette microsomi. L'ER omogenato dà origine a vescicole più piccole che possono essere lisce o rugose in quanto contengono i ribosomi. Quelle rugose sono parte dell'ER rugoso e quelle lisce potranno essere parte dell'ER liscio o derivare da altri organelli che

sono andati incontro a rottura e che si sono riformate come i mitocondri e perossisomi. I microsomi lisci contengono membrane da altri organelli. Per dividere i microsomi si usa una centrifugazione su gradiente di saccarosio. La popolazione più leggera si dispone nella zona a concentrazione minore, mentre la popolazione più pesante tende ad andare verso il fondo con concentrazione maggiore, la popolazione più leggera sono le membrane non associate a ribosomi. In questo modo si isola la frazione microsomale liscia da quella rugosa. Questo è stato utile per capire la funzione dell'ER rugoso rispetto al liscio. Alla base del meccanismo della traslocazione di entrambi i tipi c'è la presenza di un peptide segnale la cui sequenza può avere delle variazioni con certo consenso sconosciuto da un sistema di riconoscimento, il meccanismo è stato studiato grazie alla possibilità dei microsomi rugosi, identificato da Gunter Blobel. Il tutto partiva dall'osservazione che le proteine prodotte nell'ER e poi secrete avevano una lunghezza inferiore rispetto alla stessa proteina nel citosolo. Il passaggio da citosol a ER comportava la riduzione del peso molecolare. Si ipotizza la presenza di un peptide segnale prodotto da un ribosoma, tagliato e rimosso e la rimozione importante per la traslocazione poteva spiegare perché le proteine prodotte erano più corte rispetto a quella prodotta al di fuori. L'esperimento si è preso un RNA per una proteina prodotta nell'ER e lo si è tradotto usando da un lato i microsomi rugosi e dall'altro ribosomi liberi nel citoplasma e si nota che l'RNA tradotto nei ribosomi liberi ha una lunghezza superiore rispetto alla proteina prodotta dai microsomi rugosi ed entra nell'ER dove viene tagliata. Il passaggio dalla proteina citoplasmatica a quella del reticolo endoplasmatico comporta il taglio che avviene a carico della sequenza segnale. Il meccanismo di trasporto il peptide segnale permette alla proteina di essere portata sull'ER, esservi inserita, dopo una peptidasi rimuove il peptide segnale. Facendo correre su gel le proteine quella sul citoplasma corre più lentamente. Il peptide segnale a sua volta viene riconosciuto da un complesso detto SRN (complesso che riconosce il peptide segnale) e riconosciuto dal sito di legame nel polo del traslocatore, una struttura attraverso cui passa la proteina. La SRP signal recognition particle è quella che dirige le proteine che contengono la proteina segnale ad un recettore presente sulla membrana nell'ER. La struttura contiene, un complesso ribonucleoproteico con una catena ad RNA che ha associato diverse proteine che legano l'RNA. Il complesso costituisce il Signal recognition particle. All'interno di questi complessi ci sono 7 domini con diverse funzioni: una componente interagisce con i ribosomi, una componente che accoglie e riconosce la sequenza segnale presente sulla proteina in fase di sintesi o sintetizzata. Questa tasca riconosce diverse sequenze segnale perché ha una struttura costituita da amminoacidi metionina senza catene laterali con una sacca idrofobica in grado di riconoscere sequenze segnale con variazioni e poi una porzione interagisce con i ribosomi. Un'altra regione della proteina che interagisce con un recettore presente sulla membrana dell'ER: ci sono tre domini importanti per il riconoscimento della sequenza segnale, uno che interagisce con il ribosoma e uno che interagisce con il recettore specifico sulla membrana dell'ER. Il ruolo di questi domini per quanto riguarda il riconoscimento della sequenza segnale è obvio, quello dell'interazione del ribosoma è di bloccare temporaneamente la traduzione, quando SRN si lega alla sequenza segnale, l'interazione del ribosoma blocca temporaneamente la sintesi proteica permettendo al complesso di essere reclutato sulla membrana dell'ER grazie all'interazione con il recettore. La fase di stallo se non avvenisse la proteina se avesse con attività degradativa o dovrebbe essere attivata potrebbe creare danni nel citoplasma. Bloccando la sintesi temporaneamente e permettendo l'avvicinamento del complesso all'ER e si ha il distacco di SRP, il ribosoma interagisce con un altro componente dell'apparato deputato all'importo, la proteina traslocatrice e può continuare la sintesi. La proteina entra nell'ER e la si trova al suo interno. La proteina traslocatrice è il complesso Sec61. Sulla membrana dell'ER si trovano dei poliribosomi in quanto la sintesi di un mRNA avviene a carico di più ribosomi e si possono trovare poliribosomi presenti sull'ER. Il complesso Sec61 consiste di tre subunità conservate α , β e γ , questo complesso è un poro e ogni subunità ha funzioni diversi. I domini che attraversano la membrana sono costituiti da α elica come quello che funge da tappo

quando il traslocatore è chiuso, dominio α che quando deve aprirsi cambia conformazione e si apre creando un poro. Un altro dominio, l'hinge, il dominio che permette apertura e chiusura del poro stesso. Il plug permette l'entrata della catena in fase di sintesi e due domini che permettono al poro di aprirsi e traslocare proteine sintetizzate che rimangono in membrana. L'hinge è la cerniera che permette i cambi conformazionali. Una volta che la proteina è passata nell'ER viene legata da un'aproteina BiP (binding protein), un chaperon che impedisce alla proteina di assumere una conformazione e la mantiene il più non strutturata possibile per facilitare il passaggio attraverso il traslocatore come nella membrana mitocondriale. Associata al complesso del traslocatore si trova una peptidasi che va a rimuovere il peptide segnale. Oltre al traslocatore associato ad esso si trova la peptidasi che riconosce e taglia il peptide segnale. La sintesi di proteine transmembrana avviene in maniera analoga e contiene un peptide segnale che la porta a livello del traslocatore e proteine con dominio transmembranico contengono una sequenza di stop transfer: la proteina viene portata nell'ER e la presenza del peptide segnale consente l'inserimento della proteina che contiene fino a quando viene sintetizzata la sequenza dello stop transfer che quando entra determina l'apertura del traslocatore e la proteina viene rilasciata sulla membrana dell'ER e si ancora ad essa. La peptidasi taglia il peptide segnale. In questo modo vengono sintetizzate proteine transmembrana con la terminazione N nell'ER e la terminazione C nel reticolo citoplasmatico. Tramite un altro meccanismo è possibile avere la porzione N terminale verso il citosol, questo avviene grazie al fatto che la sequenza che inizia il trasferimento sia interna e crea porzioni diverse. Per le proteine che attraversano le membrane più volte: più domini transmembrana, questo avviene, queste proteine presentano una sequenza di inserimento all'interno del traslocatore seguito da una sequenza di stop del trasferimento e quando entra e il traslocatore interagisce con la sequenza di stop e viene lasciata una sequenza che presenta due domini transmembrana, quando sono di più si ha un'alternanza di inizio stop e crea proteine che passano la membrana diverse volte. Le proteine che sono legate alla membrana tramite un dominio corto nella porzione C terminale come le proteine SNARE, che mediano la fusione delle vescicole tra i vari compartimenti. Queste proteine vengono ancorate tramite un corto dominio idrofobico C terminale, il targeting all'ER vengono coinvolti attraverso altre proteine dette Cet con meccanismo simile a SRP, la proteina riconosce la sequenza la porta sull'ER usando Get tre dove viene riconosciuta da Get1-Get2, l'ER controlla la sintesi di diverse proteine con diverse caratteristiche. Un'altra funzione dell'ER è quella di modificare le proteine che vengono prodotte, in particolare è coinvolto nella modifica post traduzionale che porta alle glicoproteine che verranno processate nell'apparato del Golgi, molte proteine sono glicoproteine e presentano questa modifica. Nell'ER viene aggiunto un oligosaccaride precursore costituito da 14 zuccheri che sono due molecole di N acetilglucosammina, nove molecole di mannosio e tre molecole di glucosio. Molte delle proteine sintetizzate nell'ER rugose sono glicosilate mediante l'aggiunta del precursore comune costituito da 14 zuccheri. Il legame avviene attraverso l'amminoacido asparagina. Tre molecole di zucchero e una di mannosio vengono rimossi in modo che l'ER possa capire che la proteina ha assunto una conformazione corretta ed è pronta per andare o in membrana o nell'apparato del Golgi. L'aggiunta di questi zuccheri avviene grazie al precursore di 14 zuccheri è ancorato alla membrana tramite il dolico una molecola lipidica, la proteina è presente nel lume del reticolo endoplasmatico e sulla membrana si trova l'enzima oligosaccaril transferasi che trasferisce l'oligosaccaride alla proteina. L'oligosaccaril transferasi presenta il dominio catalitico nel lume dell'ER. Si libera pirofosfato, si forma il legame tra oligosaccaride e proteina. La produzione del precursore oligosaccaride avviene attraverso diversi step con diversi enzimi che portano a un'aggiunta progressiva di molecole di zucchero. I primi passi avvengono nel citosol con dolico e si aggiungono le prime componenti. A un certo punto quando sono stati aggiunti l'N acetilglucosammina e il mannosio avviene il flipping: la componente citosolica viene rivolta nel lume del reticolo endoplasmatico dove continua l'aggiunta degli zuccheri fino alla formazione del precursore definitivo. In questo caso il precursore legato al dolico presente nella membrana interna

dell'ER in quanto la modifica avviene all'interno. Le proteine prodotte e modificate nell'ER prima di lasciarlo vanno incontro a un controllo qualità che verifica che il folding sia corretto, altrimenti vanno incontro a degradazione. Per alcune proteine l'80% dei tentativi fallisce. Alla base del riconoscimento questa modifica svolge un ruolo importante. Sono coinvolti dei chaperon come calnessina e calreticulina la cui attività è legata al calcio. Per la traslocazione post traduzionale il poro è costituito da Sec61 insieme a Sec62, 63, 71 e 72 che sono associati a Sec61 e sono quelli che mediano la traslocazione di proteine formate nel citoplasma. In questo modello la proteina Bip ha la funzione della HSP70 nei mitocondri, una chaperon che legandosi alla porzione di proteina presente nell'ER permette il trasferimento della proteina all'interno del lume attaccandosi impedendo la formazione di strutture secondarie e idrolizzando ATP e attaccandosi e staccandosi crea la forza necessaria e per il passaggio della proteina nel traslocone. In questo caso pertanto il trasporto prevede l'idrolisi di ATP. Il reticolo endoplasmatico ha il ruolo di glicosilare le proteine, un processo importante che svolge un ruolo importante nel riconoscimento di proteine che non hanno assunto una conformazione corretta. Questo meccanismo avviene a carico dell'asparagina e comporta l'aggiunta dell'oligosaccaride precursore di cui gli ultimi 4 sono rimossi. Il tutto è mediato dall'oligosaccaril trasferasi con la porzione catalitica nel lume dell'ER e media la glicosazione portando il complesso oligosaccaridico ancorato alla membrana da dolicolo e media la formazione del legame. I precursori del complesso oligosaccaridico viene assemblato all'inizio della parte citosolica della membrana dove si trova il dolicolo attivato tramite fosforilazione tramite CTP, dopo di che i vari monomeri di zuccheri sono aggiunti e sono attivati e legati a dei nucleotidi UDP e GDP fino a quando si forma un complesso intermedio con 7 molecole di glucosio attaccato al dolicolo, interviene un enzima che flippa il complesso dove enzimi all'interno dell'ER finiscono la formazione del complesso di 14 molecole di zucchero. Il meccanismo e aggiunta di zuccheri è importante per riconoscere se le proteine inserite nell'ER assumono una struttura tridimensionale corretta i chaperon, proteine che si legano a proteine fatte nell'ER e sono state glicosilate e la calnessina e calreticulina e differiscono in cui la calnessina è ancorata in membrana mentre la calreticulina è presente nel lume, aiutano le proteine ad assumere la struttura funzionale corretta e impediscono a proteine senza la struttura corretta che tendono a interagire tra di loro formando complessi dannosi per la cellula. Aiutano la proteina ad assumere la struttura corretta e impediscono che le proteine in fase di acquisizione della struttura interagiscono formando aggregati pericolosi. La calnessina riconosce la proteina a cui è stato attaccato il complesso dei 14 zuccheri a cui ne sono stati rimossi 3, vengono rimossi tre molecole di glucosio lasciando il precursore con proteina e la catena di zuccheri con un'unica catena di glucosio. Riconosciuta dalla calnessina e il polipeptide che sta assumendo la struttura tridimensionale. La calnessina si lega e dopo di che interviene la glucosidasi che rimuove l'ultima molecola di glucosio. A questo punto se la proteina ha la struttura corretta lascia l'ER e va in un altro compartimento, se invece non assume la struttura corretta interviene la glucosil trasferasi che riattacca un'altra molecola di glucosio e la proteina viene riconosciuta dalla calnessina che la aiuta a riprendere la forma corretta. Non è chiaro come si faccia a riconoscere la struttura corretta. Il mannosio viene perso in un passaggio successivo. Nel momento in cui la proteina non assume la struttura in maniera corretta è potenzialmente pericolosa in quanto possono essere insolubili e formare aggregati che alla fine comporta un grave danno per la cellula. Di conseguenza questo meccanismo aiuta le proteine ad assumere la proteina corretta e quando questo non succede devono essere eliminate, esiste un meccanismo che prevede la rimozione di proteine misfolded dal reticolo endoplasmatico verso l'esterno. Una volta che raggiungono il citosol vengono degradate grazie all'aggiunta di ubiquitina che porta le proteine nell'apparato del proteasoma per essere degradate. Alcune proteine dell'ER l'80% non riescono a raggiungere lo stato corretto. Il folding delle proteine dipende da molti fattori, in molti casi uno stato di stress porta a proteine ad assumere conformazioni errate come l'aumento della temperatura. Il trasferimento di una proteina misfolded avviene grazie ad un traslocatore, un complesso la cui proteina viene riconosciuta e legata

da una disolfur isomerasi che aiuta la formazione e rottura di ponti disolfuro, va incontro a questa modifica e vengono creati dei ponti disolfuro, una lectina riconosce la componente glicidica e si forma il complesso proteina chaperon isomerasi e lectina, il complesso lascia l'ER dove il processo di traslocazione è accoppiato da un'ubiquitina ligasi che attacca le ubiquitine alle proteine e viene subito modificata mentre lascia l'ER. La proteina associata al complesso è una ATPasi che idrolizza l'ATP e permette alla proteina di uscire e una N glicanasi rimuove il complesso glicidico, la proteina ubiquitinata viene indirizzata al proteasoma per essere degradato. Quando si trova un accumulo di proteine non corrette vengono attivati altri meccanismi che permettono alla cellula di ridurre il più possibile la quantità di proteine con struttura scorretta. Da un lato producono una maggior quantità di chaperon che aiutano il folding delle proteine nell'ER e questo può avvenire in diverse vie: in una si attiva il complesso IRE1 presente sulla membrana dell'ER con una componente citosolica attivata mediante fosforilazioni di chinasi specifiche e una porzione nel lume dell'ER che funge da sensore per il misfolding proteico, una volta che il complesso IRE1, un dimero viene attivato causa una cascata di attivazione intracellulare che porta alla regolazione di un RNA detto XBP1 che va incontro a splicing nel citoplasma dell'RNA che codifica per XBP1, un fattore trascrizionale e la modifica post trascrizionale di XBP1 che viene tradotta produce la proteina che va nel nucleo, funge da regolatore trascrizionale e porta alla trascrizione di geni che aumentano la capacità della cellula di portare avanti il folding delle proteine. Vi sono altri due meccanismi di regolazione, uno attiva ATF6 che attivato viene importato nell'apparato del Golgi dove un enzima lo taglia e causa la formazione e rilascio di subunità che entra nel nucleo e agisce da fattore trascrizionale. Un altro meccanismo attiva PERC in cui si ha un blocco traduzionale di alcuni RNA e si va ad aumentare la traduzione in maniera specifica di fattori regolatori della trascrizione e si ha un aumento di traduzione di questi fattori che aumentano la traduzione dei fattori. Il reticolo endoplasmatico produce i lipidi di membrana, una delle modifiche che porta a formazione di proteine legate al glicosilfosfatidilinositolo, inserita nell'ER con componente C terminale che lo ancora alla membrana all'interno dell'ER avviene la rottura a livello della membrana della proteina e un attacco della proteina al lipide di membrana formano la proteina legata alla membrana mediante ancoraggio GPI, questo importante in quanto non è più attaccata alla membrana con dominio ma tramite il legame rotto e rimosso da enzimi come la fosfolipasi C presente nell'ambiente extracellulare e una proteina che se tagliata diventa secreta. Queste molecole le si trovano in alcuni meccanismi con cui le cellule nervose riconoscono un particolare target. Questo tipo di modifica permette a una proteina di membrana di diventare ancorata ad essa e rilasciata quando l'ancoraggio viene rotto. Questo avviene all'interno dell'ER. Queste proteine si riconoscono hanno una coda C terminale altamente idrofobica. Il motoneurone riconosce nell'ambiente circostante molecole che lo attirano verso una determinata zona e grazie a questa guidance raggiunge la cellula con cui forma la connessione. Questi tipi di molecole che guidano la risposta dei neuroni sono presenti sulla membrana del neurone e altri sulle cellule che si trovano sul percorso. Le proteine che trova utilizzano questo ancoraggio e viene utilizzato in quanto permette all'enzima di tagliare e il cartello di indirizzamento può diffondere a una distanza maggiore ed essere attraente a distanza maggiore. L'ER è coinvolto nella produzione della maggior parte dei lipidi di membrana come la fosfatidilcolina e viene prodotto in tre step: un primo l'acido grasso che è associato ad una proteina viene portato nella porzione citosolica della membrana dell'ER e viene ancorato e introdotto nel monolayer citosolico dove viene attivato grazie all'aggiunta di due coenzimi A e interviene un enzima che attacca il glicerolo trifosfato formando l'acido fosfatidico e infine l'attacco della colina formando la fosfatidilcolina con il diacilglicerolo come intermediario. Si nota come il monolayer citosolico è asimmetrico rispetto alla parte verso il lume e il meccanismo comporta aggiunta di molecole aggiuntive. In realtà si osserva che i due monolayer sono omogenei, questo avviene in quanto intervengono enzimi detti scramblasi che prendono i lipidi su un monolayer e li spostano nell'altro monolayer in modo da avere una crescita simmetrica di entrambi i monolayer. Questi enzimi sono diversi rispetto

a quelli visti da membrana che determinano il flip flop in quanto non si altera il numero di molecole presenti nei due monostrati nell'ultimo caso. La membrana plasmatica contiene un altro di trasportatore detti flippasi che riconoscono in particolare i fosfolipidi con cariche fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina e le spostano verso la parte esterna e nella membrana plasmatica grazie alle flippasi specifiche ha composizione omogenea di fosfolipidi della parte citoplasmatica rispetto a quella esterna, permettendo il riconoscimento di cellule in apoptosi in quanto i fosfolipidi vengono esposti verso l'esterno, segnale da parte del sistema immunitario. L'ER produce colesterolo e ceramide l'ultima prodotta dall'amminoacido serina attaccato a un acido grasso formando la sfingosina costituita da un acido grasso e dall'amminoacido serina, successivamente una seconda catena di acido grasso viene aggiunta alla sfingosina cosa che avviene nell'apparato del Golgi e la formazione della Ceramide è importante in quanto componente di molte membrane come quelle del sistema nervoso importanti per la trasmissione corretta del sistema nervoso.

10.4 Traffico intracellulare di vescicole

Ci sono due meccanismi principali con cui la cellula è in grado di introdurre sostanze con l'ambiente esterno e l'altro di rimuovere e trasportare sostanze dall'interno, rispettivamente endocitosi ed esocitosi. L'endocitosi comporta un inflessione della membrana plasmatica, la formazione di una vescicola che viene internalizzata, mediante questo meccanismo la molecola è in grado di internalizzare molecole esterne che possono interagire con recettori presenti sulla membrana e l'endocitosi può essere attivata tramite interazione con le sostanze e recettori, come per la transferrina legata all'ione ferro che induce la formazione di una vescicola endocitotica internalizzata e subisce delle modifiche. L'esocitosi consiste nel trasferimento del materiale dall'interno della cellula verso l'esterno. Questi due meccanismi comportano la formazione di vescicole di trasporto che possono essere più o meno sferiche. Queste vescicole possono formarsi anche all'interno di organelli come nel reticolo endoplasmatico e tali vescicole stanno alla base del trasferimento dall'ER all'apparato del Golgi. La formazione di vescicole comporta la presenza di un compartimento donatore in cui si origina la vescicola. Al suo interno si trovano le proteine cargo, proteine per il riconoscimento del cargo che interagiscono con altre molecole importanti per la formazione della vescicola. Quando raggiunge il target la vescicola si fonde causando il rilascio della sostanza il target può essere extracellulare o un organello intracellulare. Si tratta di un via vai intenso di vescicole e questo comporta la nascita di domande come si formano le vescicole e cosa le guida verso il giusto compartimento. Si trova un traffico bidirezionale tra ER e Golgi e tra il Golgi e la membrana plasmatica con la formazione di vescicole contenenti sostanze che andranno nello spazio extracellulare. Si ha poi la formazione di un trafficking tra il Golgi e formazione di vescicole bidirezionale tra Golgi e late endosome o endosomi tardivi e da questi verso i lisosomi, il compartimento in cui avviene la degradazione di sostanze interne o esterne della cellula. Attraverso l'endocitosi la cellula è in grado di introdurre sostanze dall'esterno attraverso la formazione di endosomi con la presenza di vescicole che formano gli endosomi tardivi che si fondono con i lisosomi. Le molecole coinvolte nel trafficking sono proteine ben caratterizzate che formano e caratterizzano le vescicole di ciascun compartimento, sono ben caratterizzate e sono le clatrine, COPI e COPII, (coat protein), i tre tipi di proteine che caratterizzano tre tipi specifici di vescicole. Si trovano le clatrine che caratterizzano le vescicole che si originano dall'apparato del Golgi nel trans Golgi network, l'apparato del Golgi consiste in una serie di cisterne e si possono distinguere tre aree: una zona che guarda verso la parte citosolica e verso la membrana (trans golgi) e una parte che guarda verso l'ER (cis golgi) e una zona intermedia. Il cis golgi accoglie vescicole che si formano dall'ER che si fondono con le membrane del cis golgi e migrano nei diversi compartimenti del Golgi fino a quando giungono nel trans golgi dove vengono modificate e smistate nei vari organelli o

andare in membrana. L'appareato del Golgi contiene degli enzimi e marcatori diversi a seconda della regione. La clatrina caratterizza le vescicole che si originano dal trans golgi. COP1 si trova nelle vescicole che si originano a livello dell'apparato del Golgi intermedio e cis, le proteine COPII sono specifiche per le vescicole che si originano nel reticolo endoplasmatico e vanno nella parte del Golgi cis. Questo permette di utilizzare le vescicole come marcatori delle posizioni del Golgi o per identificare l'ER. Si può fare un immunostochimica individuando la porzione dell'ER che forma vescicole che poi vanno all'apparato del Golgi, un anticorpo che riconosce le clatrine per la parte trans dell'apparato del Golgi. Possono essere usate come marcatori per identificare le posizioni degli organelli. Queste proteine e in particolare le vescicole rivestite da clatrina, le prime scoperte e studiate, sono vescicole che trasportano materiale dalla membrana plasmatica e tra i componenti endosomiali e del Golgi. Sono caratterizzate dalla presenza di clatrina, una proteina che forma una struttura detta trischelio formata dalle proteine clatrina questa struttura è caratterizzata da tre catene pesanti e da tre catene leggere importanti per le interazioni tra i trischeli che ne permettono l'unione, la porzione N terminale interagisce con le proteine adattatrici che mediano l'interazione tra il complesso e la membrana plasmatica. Più trischeli si uniscono tra di loro formando la struttura che ingloba la membrana plasmatica e il contenuto interno, possono essere strutture esameriche e pentameriche le cui dimensioni variano in base al tipo cellulare e dell'organismo. I vari trischeli si uniscono tra di loro formando il cesto che si trova all'esterno e all'interno si trova la membrana. Queste strutture globulari presenti nella porzione N terminale della catena terminale interagiscono con le proteine adattatrici che sono proteine che fungono da ponte tra le molecole di clatrina e i recettori che sono presenti sulla membrana che va incontro alla formazione della vescicola che riconoscono la proteina cargo, riconoscono i recettori con la molecola cargo e la clatrina. Queste proteine normalmente sono AP2 costituite da quattro subunità α , β , γ e δ riconoscono non solo i recettori sulla membrana dell'organello ma anche componenti della membrana: i fosfoinositoli presenti sulla membrana. Nel momento in cui riconoscono entrambi contemporaneamente queste due componenti si ha un cambio conformazionale che permette l'apertura con la proteina adattatrice e la interazione con la membrana da cui si formerà la vescicola. Le due componenti quella recettoriale che si legano a proteine all'interno del lume che entrano nella vescicola di trasporto e la funzione è legata alla componente dei lipidi di membrana in particolare l'inositolo (10% dei fosfolipidi della membrana) con ruolo di regolazione importante. Inositolo va incontro a modifiche fosforilazioni ad opera di chinasi: il fosfatidil inositolo 3 - fosfato. Il meccanismo di fosforilazione è legato all'attivazione di chinasi che va a fosforilare nella posizione 3 o 4 nello zucchero del fosfoinositide formando il fosfoinositolo 3, 4, bifosfato, si tratta di processi reversibili in quanto si ha la rimozione di gruppi fosfato ad opera di fosfatasi che tolgono i gruppi fosfati. I lipidi così processati si trovano distribuiti in maniera diversa il fosfatidilinositolo 4, 5 bifosfato nelle cisterne del cis Golgi e la distribuzione dei lipidi è specifica e marca in maniera particolare le membrane che vengono riconosciute da proteine adattatrici specifiche. Ci sono proteine che aiutano a deformare la membrana con domini Bar la cui funzione è quella di interagire con la membrana e facilitarne la deformazione permettendo l'interazione dei trischeli tra di loro e la costituzione del cesto che avvolge la vescicola e la formazione della vescicola matura per il trasporto. Sono importanti quando si modifica a formare vescicole di membrana in quanto a differenza di quelle intracellulari quella plasmatica è molto più rigida in quanto contiene una rete di filamenti di citoscheletro ed è più rigida ed è più difficile deformare la membrana stessa. Si tratta di domini ad alfa elica con residui idrofobici che aiutano la membrana a formarsi. Quando si è iniziata a formare la vescicola di trasporto entra in gioco la dinamina che ha la funzione di rompere il legame tra la membrana permettendo la formazione della vescicola matura, rompendo il collo della struttura a gemma. Questo viene effettuato grazie alla dinamina al collo delle vescicole che si stanno formando. È una proteina con diversi domini ad alfa elica e GTPasi e a seguito della sua idrolisi cambia conformazione e restringe il collo formato fino alla rottura e alla formazione della

vescicola di trasporto. Una volta che si è formata la vescicola di trasporto questa viene rilasciata dalla membrana da cui si è originata e va a perdere il rivestimento di clatrina, importante in quanto la vescicola deve andare a fondersi con la membrana di un altro organello o quella plasmatica, ci sono delle fosfatasi che eliminano le modifiche dei lipidi della membrana che determina il distacco della proteina adattatrice e il rivestimento esterno si stacca e permette la fusione con tra la vescicola di trasporto e l'organello bersaglio. Vi sono altre proteine GTPasi monomeriche che sono importanti per la formazione delle vescicole che coinvolgono COPI e COPII e possono essere coinvolti nella formazione di vescicole di clatrina dell'apparato del golgi. Possono essere GTPasi in una conformazione inattiva quando legano GTP e inattiva quando legano GDP, sono la proteina ARF, proteina per la formazione di vescicole che contengono COPI e clatrina e Sar1 per la formazione di vescicole COPII sull'ER. L'attività di queste GTPasi monomeriche è controllata dai fattori GEF che le attivano in quanto permettono lo scambio GDP - GTP e GAP che favoriscono lo scambio GTP - GDP disattivandole. Il meccanismo si svolge con la proteina Sar1 per le vescicole da COPII che è inattiva in quanto nel citosol si lega a GDP, la presenza di Sar1 GEF che ne promuove lo scambio GDP in GTP permette a Sar1 attivata di legarsi alla membrana e quando si trova in uno stato inattivo Sar1 presenta un'elica con una certa affinità per la membrana che è mascherata, quando passa a legare il GTP attivandosi con Sar1-GEF sulla membrana dell'ER Sar1 viene attivato esponendo il dominio e va a legarlo alla membrana dell'ER, importante in quanto la presenza di Sar1 recluta il fattore Sec23 e Sec24, l'ultimo è una proteina adattatrice che lega il recettore che ha riconosciuto il cargo e recluta altre proteine Sec13 Sec31 i quali formano il cesto costituito da COPII. Si tratta di un meccanismo complesso in quanto comporta la presenza di proteine G monomeriche la cui attività è regolata da GEF e GAP che determinano il reclutamento di molecole adattatrici che portano alla formazione di vescicole COPII, quando si vuole disassemblare la capsula si attiva la GAP che determina lo scambio Sar1 GTP in GDP che viene scisso e determina il cambio conformazionale di Sar1 che ripassa in forma solubile e determina il disassemblamento della struttura. Non tutte le vescicole di trasporto sono sferiche, vescicole con il protocollagene che non sono sferiche ma hanno una forma diversa in quando trasportano proteine con un ingombro molto elevato. Il complesso COPII si parla di un complesso costituito da Sar1, Sec23 e Sec24, 13 e 31. Uno dei fattori importanti in quanto contribuisce a rendere il trasporto specifico sono i fattori RAB che danno un contributo rendendo specifico il trasporto vescicolare verso un organello. È una famiglia di proteine GTPasi attivate nel momento in cui passano da uno stato GDP a GTP con localizzazione precisa, Rab1 ER e Golgi, Rab2 cis Golgi e Rab3 sinapsi secrete. Le proteine Rab garantiscono la specificità, che una vescicola che deve andare a un determinato compartimento lo raggiunga, Rab lavora grazie alla presenza di effettori Rab che possono essere proteine motrici che interagendo con Rab spostano la vescicola utilizzando i microtubuli o possono essere proteine di attracco e favoriscono il riconoscimento della vescicola con la membrana dell'organello con cui deve fondersi. La cascata di Rab può attivare altre Rab creando formando dei domini ricchi di Rab ed effettori di Rab e creare domini importanti per il riconoscimento specifico delle vescicole. L'attivazione di Rab ad opera di GEF che passa da una situazione citosolica al seguito dell'attivazione da parte di GEF Rab5 va in membrana e l'arrivo in membrana determina l'attivazione di una chinasi che forforila in fosfatidil inositolo 3 fosfato che recluta altri Rab GEF che attiva altre Rab e le clusterizza in membrana, si forma una zattera sulla membrana con reclutamento di Rab5 e fattori ad esso associati, importante in quanto garantisce il riconoscimento specifico di una vescicola nei confronti di un determinato organello. Nel momento in cui la vescicola grazie a Rab raggiunge il target deve avvenire la fusione tra le membrane e questo avviene grazie a due proteine dette SNARE v e t dove v sta per vesicle sulla vescicola e t si trova sul target. Le v Snare sono monomeri e le t snare sono trimeri. Le snare sono proteine che si inseriscono sulla membrana tramite un corto dominio idrofobico e mediano la fusione tra la vescicola di trasporto e il target, le due proteine si avvicinano entrano in contatto, si forma una struttura tetramerica

stabile, si rimuovono le molecole d'acqua e si ha emifusione e fusione le due membrane. E il rilascio del contenuto della vescicola con l'altro compartimento. Quando si sono fuse tra di loro è importante che il complesso formato delle quattro snare venga rimosso altrimenti potrebbe indurre la fusione delle vescicole, effettuato grazie al fattore NSF con proteine accessorie che è un'ATPasi che svolge il complesso tetramerico riformando v snare e t snare grazie all'utilizzo di ATP. Molti fattori del trasporto sono stati identificati e se ne sottolinea l'importanza dove mancano. Alcune domande rimangono aperte.

10.5 Apparato del Golgi

L'apparato del Golgi può essere distinto in cis Golgi, porzione intermedia e trans Golgi. Le vescicole che si formano nell'ER normalmente prive di ribosomi. Le vescicole che contengono proteine che devono essere smistate si formano nell'ER liscio e si fondono con la porzione cis dell'apparato del Golgi, le proteine dall'ER vanno nel Golgi (alcune devono rimanere nell'ER come enzimi e fattori coinvolti nella modifica di proteine). Il trafficking viene regolato, le proteine rimangono nell'ER in quanto proteine che risiedono nell'ER contengono delle sequenze segnale che sono localizzate nella porzione C terminale e consistono di due lisine seguite da altri due amminoacidi e questo avviene per le proteine ancorate alla membrana, proteine stazionarie nell'ER presentano le lisine C terminali. Le proteine solubili la sequenza segnale è costituita da quattro amminoacidi: lisina aspartato glutammato e leucina o sequenza KDEL. Le proteine secrete dal Golgi e solubili nell'ER può capitare che proteine residenti vadano nel Golgi e quando vi arrivano l'apparato presenta dei recettori che riconoscono la sequenza segnale nelle proteine che devono rimanere nell'ER e si lega in quanto l'interazione recettore sequenza segnale quando si abbassa il pH che avviene nel Golgi, il recettore nel Golgi riconosce la proteina con sequenza KDEL interagisce, forma una vescicola che dal Golgi ritorna nell'ER, questo meccanismo permette il recupero di proteine andate nel Golgi ma che devono essere presenti nell'ER per svolgere la loro funzione. La sequenza è sufficiente per far rimanere la proteina nell'ER si tratta di un meccanismo importante che permette la permanenza nell'ER di proteine solubili che svolgono un'attività importante nell'organello. I due meccanismi non sono le uniche che garantiscono la permanenza di proteine residenti nell'ER e ce ne sono altre con meccanismi non noti. L'apparato del Golgi ha un dominio cis in cui si ha un movimento di vescicole da ER al Golgi e viceversa, si tratta di un movimento bidirezionale, dal trans si formano vescicole vescicole di membrana o destinate ad altri compartimenti come endosomi o lisosomi. Queste cisterne al loro interno avvengono delle reazioni, l'apparato del Golgi ha la funzione di processare proteine con modifiche post traduzionali con la formazione di glicoproteine e l'aggiunta di zuccheri. Le classi di oligosaccaridi prodotti nel Golgi sono gli oligosaccaridi complessi e quelli ad alto contenuto di mannosio. Nell'ER si aggiungono zuccheri del complesso di 14 zuccheri che comprende due molecole di n acetilglucosammina, due di mannosio e il glucosio che viene rimosso con un mannosio prima dall'uscita. Questi zuccheri vengono modificati nel golgi e possono dare origine ai due gruppi precedenti. Nel caso dell'oligosaccaride complesso si ha la rimozione di gruppi di mannosio e l'aggiunta di altri gruppi di acetilglucosammina, galattosio e acido sialico, il precursore dell'ER viene modificato, si taglia le catene di mannosio e a quelle restanti si aggiungono altri zuccheri. Nel caso dell'oligosaccaride ad alto mannosio consiste nell'aggiunta di gruppi di mannosio. La glicosilazione è importante per modificare post traduzionalmente proteine. La formazione e questa modifica è complessa da aver fatto nascere un ramo che va a studiare i meccanismi di regolazione di aggiunta di zuccheri e la loro funzione. L'acido sialico contribuisce a creare cariche negative e esposte in membrana creano un ambiente che svolge fenomeno per l'interazione delle cellule modifica delle proprietà biofisiche della membrana. Partendo dall'ER si forma l'oligosaccaride a 14 zuccheri e poi si formano le prtoeine

ad alto contenuto di mannosio o oligosaccaridi complessi. Un'altra modifica è la glicosilazione non sul gruppo N dell'asparagina ma a carico del gruppo OH nelle catene laterali di amminoacidi come treonina, serina, prolina, lisina e in questo caso si dice O - glicosilazione. Questi due tipi di glicosilazione danno origine a una modifica strutturale diversa e si inserisce un altro grado di complessità alla struttura. La maturazione e il mantenimento del compartimento del Golgi ha due modelli, uno della maturazione delle cisterne dal ER si formano vescicole che clusterizzano e maturano dando origine alla zona cis dell'apparato del Golgi e poi maturano acquisendo altri fattori diventando parte mediana e poi trans e si trova un continuo riciclo tra le componenti avanti e indietro permettendo la formazione di nuove cisterne. Il modello di vescicola non si trova una maturazione in toto di una cisterna verso la successiva ma un trasporto di vescicole che provvede a mantenere la funzionalità e specificità dei compartimenti. Non si sa quale modello sia corretto. Il trasporto dall'apparato del Golgi ai lisosomi.

10.6 Lisosomi

I lisosomi sono organelli con enzimi idrolitici come proteasi, glicosilasi, lipasi, fosfolipasi, fosfatasi, tutto quello che è importante per degradare le componenti. Sono enzimi che lavorano ad un pH basso (idrolasi acide), l'acidità è mantenuta grazie alla presenza di una pompa che usa ATP e pompa ioni H^+ dall'esterno all'interno creando un gradiente di ioni H^+ e uno di tipo elettrico a cavallo della membrana. Questo gradiente può essere sfruttato per l'importo ed esporto di altre proteine. I lisosomi sono strutture sferiche e dense il cui numero dipende dal tipo cellulare e lo stato fisiologico della cellula, sono elementi molto eterogenei in quanto possono fondersi con gli endosoma formando l'endolisosoma. Si fonde in quanto il lisosoma contiene le idrolasi acide e l'endosoma è quello che si forma sulla membrana plasmatica che permette alla cellula di catturare materiale all'esterno che viene digerito e il lisosoma si fonde con l'endosoma in modo da digerirne il contenuto. Gli enzimi è importante che trovino il pH basso solo nei lisosomi in quanto altrimenti potrebbero produrre danni in altri compartimenti. Vi sono altre vie utilizzate dalla cellula per degradare materiale che convergono nei lisosomi, questi sono endocitosi, fagocitosi che avviene ad opera di cellule particolari in cui si ha un batterio o una cellula viene inglobata e si forma un complesso detto fagosoma che si fonde con il lisosoma. L'altro meccanismo di pinocitosi che si tratta dell'assorbimento di materiale non specifico come fluidi membrane o particelle attaccate a membrana come nel caso della macropinocitosi e l'autofagia è il quarto meccanismo che consiste nella degradazione dei materiali interni al citoplasma, la cellula usa componenti per ottenere materiale, si formano componenti detti autofagosomi che convergono nei lisosomi le vie permettono la degradazione del materiale per un suo utilizzo. Le proteine che vengono processate nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi per andare nei lisosomi subiscono un'aggiunta di zuccheri e contengono il mannosio 6 fosfato, modifica importante in quanto forma vescicole il cui trasporto è specifico nei lisosomi. Proteine lisosomali contengono questa modifica che se non avviene le proteine vengono secrete. Le malattie lisosomiali sono mutazioni di enzimi nei lisosomi che porta la formazione di lisosomi deficitari con accumulo di materiale per la cellula con conseguenze abbastanza gravi. L'autofagia si tratta di un meccanismo è il processo con cui la cellula usa sostanze in caso di starvation, quando si trova in una condizione di stress dell'apporto di sostanze, ci può essere un'autofagia non specifica con l'accoglienza di materiale citoplasmatico o specifica quando può essere attivata nel caso in cui i mitocondri sono danneggiati e viene attivata l'autofagia specifica con una *pink1* che invece di essere importata rimane all'esterno che viene riconosciuta da *parkin* che va a indurre l'autofagia che comporta la formazione di autofagosoma con mitocondrio che va incontro a degradazione, *parkin* sue mutazioni comportano l'insorgenza del morbo di parkinson. Nelle cellule vegetali la degradazione avviene ad opera del vacuolo. Nelle

modifiche post traduzionali con la formazione di proteine all'interno dell'apparato del Golgi nel caso della funzione dell'ER la maggior parte delle proteine va incontro a modifica di un gruppo di 14 molecole di zucchero modificato nell'ER la cui è impotente nel folding, permette ai chaperons presenti nel reticolo endoplasmatico di vedere se la proteina è stata foldata in maniera corretta, se no viene degradata altrimenti passata nel Golgi dove viene modificata in proteine con catena di oligosaccaride complessa o in una proteina con polisaccaridi ad alto contenuto di mannosio. Il tutto avviene ad opera di mannosidasi nell'ER e la mannosidasi I rimuove tre gruppi di mannosio e un'altra da origine a un precursore con 3 molecole di mannosio a quelli si aggiungono mannosio o altri zuccheri come acetil glucosammina, acido sialico e galattosio. Si sa poco di tutte le funzioni connesse con l'aggiunta di questi zuccheri, alcuni importanti per il riconoscimento delle cellule per il substrato per modificare la carica dell'ambiente caratteristico (studiato dalla glicobiologia). Le proteine destinate ai lisosomi vanno incontro a una modifica post traduzionale che consiste nell'aggiunta di un mannosio 6 fosfato, importante in quanto ci sono recettori che la riconoscono specificatamente e le proteine che devono essere portate presso l'apparato lisosomiale, alcuni di questi enzimi vengono portati fuori dalla cellula, entrano in vescicole secrete, trovano dei recettori, si legano, interagiscono con recettori e mediante meccanismi di endocitosi vengono reindirizzati verso i lisosomi. L'aggiunta del gruppo mannosio 6 fosfato solo per le proteine che devono andare nei lisosomi usando tecniche di ingegneria genetica esiste un segnale in queste proteine detto zona segnale o regione segnale la quale viene riconosciuta dall'acetilglucosammina fosfotransferasi che è quella deputata a fare la modifica specifica per le proteine lisosomiali, la fosfotransferasi si lega alla proteina, ne provoca la modifica e in altri processi la proteina viene modificata che permette il trasporto. Vi sono patologie in cui le proteine lisosomiali non vengono modificate, patologie che coinvolgono mutazioni a carico di questo enzima non può in grado di riconoscere la sequenza segnale o apportare la modifica, con conseguenza che le proteine invece di andare nei lisosomi vengono secrete con gravi danni ai tessuti con accumulo di proteine dannose.

10.7 Endosomi

L'endocitosi è il meccanismo che porta la cellula ad introdurre materiale presente nell'ambiente extracellulare al suo interno, meccanismo portato avanti grazie alla formazione di vescicole endocitiche che si formano sulla membrana plasmatica e inglobano materiale che si trova all'esterno, ci può essere endocitosi non mediata da recettori o mediata dal legame con un ligando. Il caso più estremo è la fagocitosi dove si ha l'endocitosi di cellule danneggiate o batteri. La pinocitosi in cui si ha introduzione di sostanze liquide portato avanti dalla formazione di piccole vescicole introdotte all'interno della cellula e la macropinocitosi. La formazione degli endosomi è complessa e prevede una serie di fasi e maturazione. La formazione da origine a una prima struttura detto endosoma precoce e il trafficking è bidirezionale, una volta che si è formato questo può formare una vescicola che può ritornare in membrana. Una volta che si è formato l'endosoma più endosomi precoci possono fondersi tra di loro e modificare la composizione interna ed esterna e si formano gli endosomi tardivi, una parte di questi si fonde con i lisosomi per la degradazione degli elementi endocitati. Più vescicole endocitiche possono fondersi tra di loro formando un endosoma precoce, e in qualche modo si muovono grazie alla presenza di microtubuli raccogliendo altre vescicole endocitiche. Successivamente questo va incontro a maturazione, una parte dell'endosoma gemma e ritorna in membrana o forma gli endosomi di riciclo o può andare a maturare formando gli endosomi tardivi, da precoci e tardivi comporta la formazione di vescicole all'interno dell'endosoma stesso che viene detto corpo multivescicolare. Il late endosome si fonde con il lisosoma formando l'endolisosoma in cui le sostanze dell'endosoma vengono digerite. La formazione delle vescicole endocitiche avviene

grazie alla presenza di proteine clatrine che tendono a formare delle zone accumulandosi determinando le fosse rivestite da clatrina dove avviene l'introflessione della membrana insieme ad altri fattori che porta alla formazione della vescicola. Ci sono altre strutture dette caveole che sono delle fiasche a forma di fiasca, invaginazioni di membrana rivestite da caveoline strutturali, un modo che la cellula ha per produrre introflessioni per introdurre sostanze. Le caveoline a differenza delle clatrine tendono a rimanere associate con la membrana mentre le clatrine vengono rimosse dalla membrana. Le caveoline sono associate alla membrana e formano dei domini all'interno della membrana (lipid raft) che contengono zone ricche di colesterolo e sfingolipidi e proteine di membrana legate tramite il legame GPI glicosilfosfatidilinositolo ancorare proteine extramembrana anche senza dominio transmembrana. Le caveoline si formano nelle vescicole pinocitotiche e un meccanismo che avviene e la cellula ha per introdurre sostanze dall'esterno è la macropinocitosi che non comporta il reclutamento di clatrine o caveoline ma un riarrangiamento del citoscheletro dell'actina, un componente importante del citoscheletro. Normalmente viene attivato dalla presenza di un ligando che interagisce con un recettore specifico, solitamente fattori di crescita che possono indurre questo tipo di cascata di attivazione, virus, fattori di crescita, ligandi per le integrine, questo meccanismo attiva il recettore che dà una serie di cascate che convergono sull'actina riordinando il citoscheletro formando protrusioni di membrana (ruffle), evaginazioni che si richiudono su sé stesse formando vescicole dette macropinosoma che si fonde con i lisosomi. L'endocitosi non sempre è specifica, può essere attivata anche senza legame specifico, questo avviene e l'endocitosi mediata da recettori, un esempio coinvolge l'endocitosi delle particelle lipoproteiche a bassa densità, il colesterolo circola nel sangue complessato con queste particelle costituite da un monostato di fosfolipidi e all'interno si accumulano le molecole del colesterolo attorno ad esso si trova una componente proteica riconosciuto da un recettore esposto quando queste lo necessitano. Porta in membrana i recettori che riconoscono la componente dell'LDL e quando il recettore interagisce induce endocitosi e porta al suo interno recettore con attaccata LDL, il recettore viene riciclato in membrana mentre il colesterolo viene rilasciato nella cellula, vi sono mutazioni che portano una scarsa capacità di internalizzare il colesterolo e il sangue presenta un elevato numero di LDL che nell'ipercolesterolemia che forma delle placche che vanno a ostruire i vasi che da origine a infarto può insorgere con l'età o avere una causa genetica legata a mutazioni a carico del ligando o del recettore e di conseguenza non si trova endocitosi. Una delle proteine coinvolte nel processo di endocitosi della lipoproteina a bassa densità è la proteina AP2 che è quella che fa da ponte da clatrine e i recettori presenti sulle membrane. Coinvolta nel meccanismo di endocitosi e hanno i fosfolipidi di membrana come fosfatidil inositolo 4, 5 difosfato presente sulla membrana. Devono riconoscere contemporaneamente particolari lipidi di membrana oltre al recettore legato. Le vescicole endocitiche convergono nell'endosoma precoce. Non tutte le molecole endocitate vanno incontro a degradazione e il recettore può essere rimandato in superficie dove può svolgere la sua funzione. Di conseguenza l'endosoma precoce è una stazione di smistamento iniziale per i recettori che possono essere riportati in membrana. Ruolo importante dall'endosoma precoce. Il colesterolo con il ligando al recettore viene degradato, in alcuni casi viene portato in superficie con il suo ligando come accade del metabolismo del ferro. Il recettore per la transferrina e la tranferina vengono riportati insieme sulla membrana. In altri casi il recettore e il ligando vengono entrambi degradati. Il recettore da solo viene riportato da solo in superficie in altri casi solo il ligando in altri entrambi vengono degradati. Il complesso deve essere marcato per la degradazione. Dall'endosoma precoce poi si passa all'endosoma maturo il quale si fonde con i lisosomi formando l'endolisosoma e degradando il contenuto. Un recettore che si lega ad un ligando, entrambi vengono incorporati nell'early endosome il recettore va incontro a degradazione e questo avviene in quanto quando il ligando si è legato al recettore questo viene ubiquitinato, che non comporta la degradazione del complesso con il proteasoma ma si tratta di una marcatura, un tag che indirizza il recettore ligando all'interno dell'endosoma e lo porta alla degradazione. Questo meccanismo è mediato dal complesso

ESCRT (complessi proteici citosolici) che riconoscono il recettore ubiquitinato (mono), riconoscono un fosfolipide di membrana il PI(3)P, il primo legame di uno dei quattro componenti determina il reclutamento di altri tre fattori e comporta la formazione di una vescicola all'interno dell'endosoma, vescicole intraluminali l'ubiquitina viene rimossa prima che si formi la vescicola, i recettori con il ligando si trova nell'endosoma e si fonde con il lisosoma e si ha la degradazione del ligando con il recettore. I recettori che subiscono questo destino sono quelli delle EGF (epidermal growth factor), tutto questo meccanismo avviene dopo che il legame del ligando con il recettore ha dato origine alla cascata di segnali intracellulari. Per la fagocitosi si formano pseudopodi estroflessioni del citoscheletro che poi si fondono e incorporano il batterio. La formazione delle vescicole dall'apparato del Golgi che vanno incontro a secrezione può essere di due tipi, una costitutiva in cui le vescicole si formano e quando si formano vengono portate in membrana dove si fondono o può essere regolata, la regolazione dipende da segnali esterni che vanno ad attivare una cascata che porta la fusione delle vescicole con la membrana e il rilascio del loro contenuto. Le vescicole di secrezione il cui destino è regolato sono caratterizzate da un'elevata concentrazione del materiale al loro interno, durante la formazione è accompagnata da un accumulo notevole come le vescicole di acetilcolina con un'elevata quantità di neurotrasmettitore, vengono prodotte, maturano e rimangono in prossimità della membrana e rimangono in attesa nel caso dell'acetilcolina di un potenziale d'azione che comporta il rilascio di calcio, il segnale che inizia la fusione. Come esempio di secrezione regolata le vescicole di neurotrasmettitore. Le vescicole contengono sostanze che sono dei precursori come enzimi, sostanze che vengono attivate nel momento in cui trovano ambiente favorevole in pH o vengono processate all'interno di vescicole svolgono funzione al momento della funzione, si possono trovare precursori che possono essere modificati all'interno o all'esterno. Il meccanismo che permette alle vescicole contenenti neurotrasmettitore di fondersi alla membrana all'arrivo del segnale, l'ingresso di calcio alla terminazione nervosa. La vescicola e la fusione tra vescicole è mediata dalle SNARE, la v SNARE e la t SNARE in questo caso sulla terminazione nervosa. Nel caso delle cellule nervose v SNARE è sinaptobrevina e t SNARE è syntaxina. Le SNARE lavorano quelle che si trovano sul target come trimero e dall'altra parte monomero (sinaptobrevina), il trimerico ha syntaxina e snap25, un'unica proteina con due domini costituiscono e formano il trimero della t SNARE e da un dominio poco strutturato e molto flessibile con ruolo importante. La fusione della vescicola con la membrana, esocitosi regolata richiede un segnale, che è il calcio, quando la cellula nervosa manda il segnale e arriva alla terminazione nervosa va ad aprire dei canali che fanno entrare calcio che quando entra causa la fusione della vescicola con la membrana e il rilascio del neurotrasmettitore. La fusione è mediata dal calcio in quanto un ruolo è svolto dallo SNARE e l'altro dalla sinaptotagmina che è una calcium binding protein con quattro siti di legame presente nella vescicola. Un altro componente è la complexina che interagisce sia con v SNARE che con t SNARE e forma un complesso e impedisce la formazione di un tetramero utile per la fusione della vescicola, la presenza della complessina impedisce che v SNARE e t SNARE vadano a promuovere la fusione della membrana. Il complesso che si forma è uno che non permette la fusione se non in presenza di calcio, se il calcio non è presente la vescicola, t e v SNARE che interagiscono ma non svolgono la funzione in quanto è presente la complessina che blocca l'attività. In presenza di calcio questo si lega alla sinaptotagmina che cambia conformazione e rimuove il blocco legato alla presenza della complessina e le t e v SNARE sono libere e promuovono la fusione della vescicola con la membrana sinaptica che determina il rilascio del neurotrasmettitore e determina l'eccitamento della cellula che riceve il messaggio. È un meccanismo mediato dalla v e t SNARE e in qualche modo viene bloccato dalla complessina che viene rimosso dalla presenza della sinaptotagmina che lega calcio e rimuove complexina e permettendo la fusione delle due vescicole. I meccanismi di endocitosi ed esocitosi sono strettamente correlati e si riequilibrano tra di loro mantenendo costante la grandezza della membrana, si tratta di meccanismi che è importante siano regolati. È importante che l'esocitosi sia promossa per portare materiali sulla membrana plasmatica

durante divisione cellulare, fagocitosi, riparazione della membrana e cellularizzazione di un sincizio. Un meccanismo poco noto legato alla modalità con cui la cellula e l'apparato del Golgi mantiene la polarità cellulare. Considerando un epitelio costituito da cellule che delimitano uno spazio esterno e uno interno, con porzione apicale e una basolaterale. Le cellule sono polarizzate con componente apicale che dal punto di vista morfologico (tanti villi che aumentano la possibilità di assorbire sostanze) diversa dalla membrana basolaterale e con proprietà enzimatiche diversa rispetto a quella basolaterale. Si trovano delle specializzazioni di membrana nono presenti nell'altra zona, differiscono anche per la composizione dei lipidi. Questa polarità viene mantenuta in quanto occorre che ci sia un trasporto specifico e una via specifica che permetta la polarizzazione. Ci sono due modelli, con entrambi veri, il primo detto sorting diretto dal trans Golgi che nel trans golgi si distinguono dei domini che producono vescicole trasportate in maniera specifica verso una delle due polarità. L'altro modello di tipo indiretto: il trans golgi produce vescicole proteine indirizzate in entrambe le parti che si fondono con la membrana laterale e dopo di che si ha un processo di riciclo in cui proteine destinate alla parte apicale sono endocitate e si formano endosomi precoci che portano le proteine specifiche alla parte apicale. Un'altra componente importante per il mantenimento della polarità sono le tight junction, barriere intorno alla parte apicale della cellula e saldato dalla cellula successiva che impedisce la migrazione dei lipidi del monolayer esterno verso la zona basolaterale e alle proteine di diffondersi tra le polarità. Sono importanti in quanto impediscono alle sostanze di passare all'interno e passare i trasportatori specifici e forniscono una resistenza a stress e trazione.

Capitolo 11

Citoscheletro

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

11.1 Actina

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

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

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

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

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

11.2 Microtubuli

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

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

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

11.3 Filamenti intermedi

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

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

11.4 Movimento cellulare

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

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

Capitolo 12

Esperienza di laboratorio

12.1 Giorno 1 - esame di uno striscio di sangue

12.1.1 Descrizione

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

12.1.1.1 Dati raccolti

Lo striscio di sangue permette di valutare:

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

12.1.1.2 Risvolti clinici

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

12.1.2 Allestimento di uno striscio

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

12.1.3 Qualità dello striscio

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

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

12.1.4 Colorazione dello striscio

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

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

12.1.4.1 Eosina

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

12.1.4.2 Coloranti tiazinici

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

12.1.4.3 Procedimento

Dopo aver fatto fissare lo striscio sotto cappa:

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

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

12.1.5 Esame dei vetrini

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

12.1.5.1 Globuli rossi

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

12.1.5.1.1 Tipologie di globuli rossi

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

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

12.1.5.1.2.1 Sintomi

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

12.1.5.2 Piastrine

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

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

12.1.5.3 Globuli bianchi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12.1.5.4 Distinguere le cellule presenti nel sangue

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

12.2 Giorno 2 - estrazione di proteine e DNA

12.2.1 Cellule *Hela*

Le cellule *Hela* sono parte della prima linea cellulare creata. Sono cellule immortalizzate raccolte nel 1951 dai tessuti di un cancro alla cervice uterina di Henrietta Lacks. Queste cellule possono osservarsi ad alta densità o a bassa densità in base alla risoluzione necessaria all'esperimento.

12.2.1.1 Cellule immortalizzate

Si intende per cellule immortalizzate cellule che, se vengono mantenute nell'ambiente appropriato *in vitro* possono dividersi un indefinito numero di volte. Le cellule normali, invece hanno un numero massimo di divisioni possibili.

12.2.1.2 Stato di salute delle cellule

Prima di compiere degli esperimenti su di esse ci si deve assicurare del loro stato di salute. Questo si controlla osservando la loro forma: ogni cellula in adesione alle piastre ha una forma particolare. Le cellule *Hela* in particolare assumono forma trapezoidale e altre conformazioni indicano uno stato di stress. Per esempio in caso di infezione batterica le cellule si arrotondano e si osservano pallini neri che viaggiano per il terreno.

12.2.1.3 Confluenza

Si intende per confluenza delle cellule quanto queste si trovano vicine tra loro. Con il tempo questo valore aumenta in quanto le cellule si dividono e riempiono la superficie della piastra. Si può passare in un giorno dal 10% al 90% di confluenza. Un valore di confluenza ottimale si pone al 80% in quanto le cellule sono confluenti ma non ammassate. È importante durante i controlli osservare tutta la piastra.

12.2.2 Estrazione di proteine

12.2.2.1 Protocollo

1. Osservazione delle cellule *HeLa* al microscopio ottico (obiettivo 10×).
2. Eliminazione del terreno della piastra con le cellule *HeLa*, versandolo nel becker di vetro e lavando con 5ml di *PBS* utilizzando pipetta pasteur.
3. Aspirazione del resto di *PBS* con pipetta *P1000* mantenendo la piastra inclinata di 45°.
4. Aggiunta di 500µl di protein lysis buffer mantenendo la piastra sul ghiaccio.
5. Stacco delle cellule con lo scraper e raccolta della sospensione con la *P1000* trasferendola in una delle eppendorf.
6. Centrifuga a 13 000 *rpm* per 10 minuti a 4°.
7. Preparazione di una provetta eppendorf mettendola in ghiaccio.
8. Trasferimento del surnatante (lisato proteico) nella provetta eppendorf in ghiaccio, senza toccare il pellet.
9. Eliminazione della provetta eppendorf con il pellet.

12.2.2.2 Tampone di lisi - *RIPA buffer*

Il *RIPA* buffer è una soluzione tampone che viene utilizzata per l'estrazione di proteine da cellule di mammifero.

12.2.2.2.1 Composizione

- 50mM *Tris-HCl*, pH 7.4: tampone per prevenire la denaturazione delle proteine.
- 150mM *NaCl*: impedisce l'aggregazione proteica non specifica.
- 1% *NP-40*: detergente non ionico per estrarre le proteine, distruzione delle membrane.
- 0.1% *SDS*: detergente ionico per solubilizzare le proteine.

Si aggiungono inoltre cocktail inibitori contenenti:

- Inibitori delle proteasi: leupeptina o pepsatina
- DNAasi.
- RNAasi.

12.2.2.3 Cell scraping

Il cell scraping è il processo di rimozione delle cellule dalla piastra. Per farlo si utilizza una sorta di spazzolino con setole di plastica semirigida che grattano via le cellule dalla superficie della piastra.

12.2.2.4 Protocollo di quantificazione

1. Aggiunta di 20 μ l di lisato proteico in una cuvetta.
2. Trasferimento della cuvetta sotto cappa e aggiunta di 1mL di reagente di Bradford, chiudere con “parafilm” e mescolare la soluzione.
3. Attesa di 2 minuti.
4. Impostazione dello spettrofotometro con standard method/single λ .
5. Lettura dell'assorbanza dei campioni a 595nm:
 - (a) Misurazione del bianco composto da 20 μ l di buffer di estrazione e 1mL di reagente di Bradford. Elimina il segnale di fondo.
 - (b) Misurazione del campione.
6. Eliminazione della cuvetta.

12.2.2.4.1 Bradford - metodi colorimetrici Essendo che proteine e DNA non assorbono nel visibile si rende necessario utilizzare metodi colorimetrici. Il saggio Bradford è basato sull'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue *G-250*. Il meccanismo di base è il legame del colorante a *pH* acido con i residui basici di arginina, istidina, fenilalanina, triptofano e tirosina (a *pH* basico)

12.2.2.4.1.1 Colorante libero Il colorante libero in forma cationica presenta un massimo di assorbimento a 465nm e un colore rosso.

12.2.2.4.1.2 Legato a proteine Dopo il legame con le proteine si osserva uno spostamento del massimo di assorbimento a 595nm a causa della stabilizzazione della forma anionica del colorante. Questo ora presenta un colore blu.

12.2.2.4.1.3 Vantaggi e svantaggi

Vantaggi:

- Semplice da preparare.
- Immediato sviluppo del colore.
- Complesso stabile (osservazione possibile fino a 2 ore dopo la creazione della soluzione).
- Sensibilità elevata (fino a 22 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$).
- Compatibilità con la maggior parte di tamponi comuni, agenti denaturanti come guanidina *HCl* 6*M* e urea 8*M* e preservanti come sodio azide.

Svantaggi:

- Il reagente colora le cuvette ed è difficile da rimuovere.
- La quantità di colorante che si lega alle proteine dipende dal contenuto di amminoacidi standard, rendendo difficile la scelta di uno standard.
- Molte proteine non sono solubili nella miscela di reazione acida.

12.2.2.4.2 Curva standard La curva standard per la concentrazione proteica viene ottenuta utilizzando concentrazioni già note di albumina sierica bovina *BSA*, proteina sierica che trasporta acidi grassi e importante per il mantenimento del *pH* del plasma. La *BSA* ha pertanto il ruolo di proteina di riferimento.

12.2.2.4.2.1 Creazione Per creare una curva standard si misura l'assorbanza a concentrazioni crescenti sulla proteina di riferimento *BSA* e si misura il bianco. Occorrono numerosi punti di osservazione (almeno 5) e misure ripetute in doppio o triplo. Inoltre si nota come il bianco deve contenere tutti i reagenti tranne la sostanza da determinare.

1. Incubazione la soluzione per 5 minuti.
2. Lettura dell'assorbanza a 595nm.
3. Costruzione della retta di taratura.

12.2.2.4.3 Retta di taratura Si costruisce la retta di taratura mettendo i valori di assorbanza sull'asse delle *Y* e i valori crescenti di concentrazione di *BSA* sull'asse delle *X*. Si ottiene pertanto una retta che mette in relazione concentrazione proteica e assorbanza.

12.2.2.4.4 Quantificazione Usando l'equazione fornita dalla retta di taratura ottenuta si può ricavare la concentrazione del campione incognito:

$$y = a + bx$$

Dove:

- *y* è il valore di assorbanza letto.
- *x* è l'incognita, concentrazione delle proteine.

La concentrazione delle proteine del campione sarà pertanto:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

12.2.2.4.5 Range di lettura È importante per avere letture precise rimanere in un certo range di concentrazione, ottimale da 0.1 a 0.7: se il blu è troppo brillante o troppo poco lo spettrofotometro non riesce ad essere preciso. Per ovviare a questo problema in caso di eccesso si fanno diluizioni del campione, prima 1 : 10, poi 1 : 50 e infine 1 : 100. Queste concentrazioni andranno poi tenute in considerazione nel calcolo della concentrazione finale.

12.2.3 Estrazione di DNA

12.2.3.1 Protocollo

1. Osservazione delle cellule *HeLa* al microscopio ottico (obiettivo 10×).
2. Eliminazione del terreno della piastra con le cellule *HeLa*, versandolo nel becker di vetro e lavando con 5ml di *PBS* utilizzando pipetta pasteur.
3. Aspirazione del resto di *PBS* con pipetta *P1000* mantenendo la piastra inclinata di 45°.

4. Aggiunta di 1ml di lysis buffer.
5. Stacco delle cellule con lo scraper e raccolta della sospensione con la *P1000* trasferendola nel tubo con 3mL di acqua bidistillata.
6. Aggiunta del restante 1ml di lysis buffer.
7. Capovolgere il tubo 5 volte, facendo attenzione e non agitare con forza.
8. Aggiungere 300µl di proteasi *K* al tubo.
9. Capovolgere il tubo 5 volte, facendo attenzione e non agitare con forza.
10. Incubare il tubo a 50° per 10 minuti nel bagnetto.
11. Versare lentamente nel tubo 10mL di isopropanolo freddo mantenendo il tubo inclinato a 45°.
12. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
13. Capovolgere il tubo 5 volte, facendo attenzione e non agitare con forza.

12.2.3.2 Tampone di lisi *DNA*

Il tampone di lisi contiene un detergente capace di rompere la membrana cellulare fosfolipidica e la membrana nucleare rilasciando il DNA in soluzione. La soluzione contiene anche un agente tamponante per mantenere il *pH* della soluzione in modo da preservare la stabilità del DNA. Viene anche aggiunta una proteasi per rimuovere le proteine legate al DNA e distruggere enzimi cellulari che lo digerirebbero. L'estratto cellulare contenente la proteasi viene incubato a 50°, temperatura ottimale per l'attività della proteasi.

12.2.3.3 Precipitazione o flocculazione del *DNA*

12.2.3.3.1 Metodo di precipitazione

12.2.3.3.1.1 Sali Il tampone di lisi contiene anche sali che rendono il DNA meno solubile nell'estratto cellulare. La carica negativa del DNA legata ai gruppi fosfato lo rende solubile. Quando un sale viene aggiunto al campione gli ioni sodio del sale sono attratti dalle cariche negative del DNA e le neutralizzano, permettendo alle molecole di DNA di unirsi tra di loro.

12.2.3.3.1.2 Alcol L'aggiunta di alcol freddo precipita il DNA in quanto insolubile in presenza di un'alta concentrazione salina e di alcol.

12.2.3.3.2 Visualizzare il DNA Il DNA precipitato è visibile come fini filamenti bianchi al limite dello strato alcolico, mentre le altre sostanze cellulari rimangono in soluzione. Sono necessari migliaia di filamenti di DNA per formare una fibra grande abbastanza da essere visibile. Il DNA in caso di contaminazioni può assumere colorazione giallognola o rossiccia e non galleggiare nella soluzione.

12.2.3.3.2.1 Contaminazioni In caso di contaminazioni il DNA deve essere fatto precipitare di nuovo: si pelletta il floccolo, si rimuove il surnatante, si aggiunge alcol freddo e si lascia incubare a basse temperature e lo si risospende in *TE* (tris-edta) o acqua.

12.2.3.3.3 Altre molecole Le altre molecole rimangono in soluzione e non sono pertanto visibili.

12.3 Giorno 3 - Colture cellulari

Si intende per coltura cellulare, una coltura di cellule che deriva da un tessuto e fatta crescere in un ambiente artificiale a loro favorevole. Dal tessuto di origine animale o vegetale si rimuove pertanto una porzione di cellule.

12.3.1 Disgregazione del tessuto

Il tessuto deve essere disgregato per generare un coltura. La disgregazione può essere:

- Enzimatica: enzimi proteolitici.
- Meccanica: disgregatori meccanici per rompere i legami cellula cellula.

12.3.2 Coltura primaria

Si definisce coltura primaria lo stadio successivo all'isolamento delle cellule. È eterogenea in quanto i tessuti contengono diversi tipi di cellule. Il mantenimento è limitato in quanto le cellule non possiedono capacità di replicazione infinita ma permette di osservare caratteristiche delle cellule in vivo. Queste proliferano in appropriate condizioni fino a che saturano il terreno e devono essere trasferite. Il passaggio o subculture genera una linea cellulare.

12.3.3 Linea cellulare

La linea cellulare è una coltura cellulare omogenea, costituita ovvero da un solo tipo cellulare.

12.3.3.1 Finita

Le cellule si dividono e propagano solo per un numero limitato di volte prima di perdere l'abilità di proliferare ed andare incontro a senescenza.

12.3.3.2 Continua

Le cellule si propagano in maniera indefinita in quanto sono diventate immortali spontaneamente (derivano da un tumore) in seguito a trasformazione con oncogeni virali o trattamenti chimici. Le cellule trasformate crescono molto velocemente ma perdono molte delle caratteristiche originali in vivo.

12.3.4 Morfologia della coltura cellulare

12.3.4.1 Colture in sospensione

Le colture in sospensione sono cresciute nel terreno di coltura in piccoli gruppi o solitarie. Crescono senza aderire. Sono tipicamente derivate dal sangue, non costituiscono tessuti solidi e sono libere di circolare nel fluido.

12.3.4.2 Colture in adesione

Le colture in adesione o su monostrato necessitano per crescere di superfici solide trattate con sostanze specifiche. Aderiscono alla superficie del contenitore. Queste cellule possiedono morfologie specifiche in base al tipo cellulare: allungate bipolari o multipolari.

12.3.4.3 Forma

La forma delle cellule dipende dal tessuto dal quale si ricavano e può essere:

- Sferica per le cellule in sospensione.
- Allungata per cellule bipolari o multipolari come i fibroblasti.
- Poligonale con dimensioni più regolari come le cellule *HeLa*.

12.3.5 Età delle colture

L'età delle colture può essere indicata come numeri di passaggi (numero di volte in cui una linea cellulare viene sottocoltivata) o come livello di raddoppio.

12.3.5.1 Passaggi

Seminando le cellule in un substrato queste cominciano a replicarsi e a ricoprire tutta la superficie disponibile. Quando saturano l'ambiente vanno diluite altrimenti si bloccano nella fase G_1 e vanno incontro ad apoptosi. Si rende necessario pertanto fare un passaggio: le si diluisce in un altro contenitore per dargli il tempo di crescere. Il tempo di passaggio dipende dalla velocità di replicazione delle cellule.

12.3.5.2 Livello di raddoppio

Si intende per livello di raddoppio il numero di volte totali in cui una popolazione cellulare ha raddoppiato a partire dal suo isolamento primario. È analogo al population doubling time, il tempo in cui una popolazione raddoppia.

12.3.6 Ottenere una coltura cellulare

Oltre alla messa a punto della coltura primaria in laboratorio si può acquistare da organizzazioni come *ATCC* o richiederle da altri laboratori.

12.3.7 Applicazioni della coltura cellulare

Una coltura cellulare è uno dei maggiori strumenti della biologia cellulare e molecolare. È un eccellente sistema modello in vitro per studiare:

- Normale fisiologia, biochimica e biologia.
- Sviluppo di nuovi farmaci e produzione di composti biologici.
- Effetto di farmaci e composti tossici.
- Terapia genica.
- Mutagenesi e carcinogenesi.
- Consulenza genetica.

12.3.8 Ambiente cellulare - terreno di coltura

Per coltivare una linea cellulare le cellule devono essere mantenute con un alto grado di sterilità, devono ricevere i nutrienti e trovarsi a temperatura e pH stabili.

12.3.8.1 Costituenti base

I costituenti base di un terreno di coltura sono le componenti e sostanze nutritive necessarie alla crescita delle cellule.

- Sali inorganici: bilanciamento osmotico, adesione cellulare, mantenimento del potenziale di membrana.
- Vitamine per crescita e proliferazione cellulare
- Cofattori enzimatici.
- Acidi grassi.
- Carboidrati come fonte di energia, glucosio e galattosio.
- Lipidi.
- Fattori di crescita e ormoni (siero fetale bovino *FBS*).
- Amminoacidi per la proliferazione cellulare.
- Assenza di virus o micoplasmi.

12.3.8.1.1 Siero Il siero è uno dei costituenti base del terreno di coltura, è un mix di albumine, fattori e inibiti di crescita che serve per:

- Crescita cellulare.
- Neutralizzazione di tossine.

Un siero è il siero bovino fetale *FBS* che deve essere controllato in ogni batch per l'assenza di virus e micoplasmi.

12.3.8.2 Mantenimento del pH

Le cellule necessitano di un pH neutro tra 7.2 e 7.4. La regolazione del Ph avviene tramite due sistemi di tamponamento o buffering.

12.3.8.2.1 Tamponamento naturale Il bilanciamento avviene attraverso CO_2 atmosferica, nell'incubatore si trova a pressione parziale al 5-10%. Nel terreno si inserisce anche bicarbonato che si accoppa con CO_2 per creare un tampone. È poco costoso e non tossico.

12.3.8.2.2 Tamponamento chimico Si aggiunge *HEPES* al terreno. Questo garantisce una capacità di tamponamento maggiore e non richiede atmosfera gassosa controllata. È costoso e tossico ad elevate concentrazioni.

12.3.8.2.3 Rosso fenolo Molti terreni ne contengono un identificatore come il rosso fenolo. Questo cambia colore quando cambia il pH : con pH neutro è rosso, ma diventa giallo con pH acido e viola con pH basico. In caso di cambio di colore si rende necessario cambiare il terreno.

12.3.9 Contenitori e strumenti per le colture cellulari

Per far crescere le colture cellulari si rendono necessari diversi strumenti.

12.3.9.1 Contenitori per cellule

Si dividono in:

- Flask, con tappo ventilato per permettere lo scambio di CO_2 .
- Piastra di coltura con chiusura non ermetica.
- Microplate con chiusura non ermetica. Le microplate permettono di osservare colture diverse in parallelo: verrà utilizzata quella a 6 pozzetti per contenere le colture, di cui 4 verranno colorate.

12.3.9.2 Altri strumenti

- Tubi da 50 e 15mL.
- Microtubi da 0.5, 1.5 e 2mL.
- Pipette sierologiche 1, 2, 5, 10, 25mL.
- Pipette.
- Puntali.
- Micropipette a volume variabile.

12.3.10 Area di lavoro

12.3.10.1 Cappa biologica

La cappa biologica è un'area di lavoro asettica che garantisce:

- Il contenimento di liquidi e aerosol infettivi che si generano durante una procedura di lavoro.
- Protezione da polvere e contaminanti microbici presenti nell'aria.

È presente un flusso costante unidirezionale di aria filtrata da filtri *HEPA* sull'area di lavoro che è orizzontale e verticale per proteggere operatore e coltura cellulare.

12.3.10.1.1 Utilizzo Si disinfetta la superficie con etanolo 70% e si asciuga con carta prima e dopo il lavoro. Si sterilizza prima e dopo con raggi *UV*. Si noti come è un'area di lavoro e non di conservazione. Non si deve coprire le griglie esterne in quanto sono quelle responsabili del mantenimento del flusso.

12.3.10.2 Incubatore

L'incubatore è il luogo in cui vengono conservate le cellule in crescita. È in grado di mantenere la temperatura ottimale (37°) e una quantità fissa di CO_2 5% a pressione parziale in grado di contrastare l'acidificazione dei terreni. Anche l'umidità rimane stabile in modo da impedire l'evaporazione del terreno di coltura.

12.3.10.3 Contaminazioni

12.3.10.3.1 Contaminazioni chimiche Possono essere origine di contaminazioni chimiche endotossine, ioni metallici, tracce di disinfettanti. La contaminazione chimica è difficile da rilevare.

12.3.10.3.2 Contaminazioni biologiche Se la coltura non viene lavorata correttamente può venir contaminata da batteri, funghi o micoplasmi. Quando questo avviene non è più utilizzabile: questi organismi cambiano infatti le condizioni di crescita. Si nota la presenza di batteri grazie a caratteristici pallini nella coltura. Un'altra contaminazione comune è quella da lievito, presente nell'aria.

12.3.10.3.3 Evitare contaminazioni La sorgente principale di contaminazioni è l'operatore. La cappa biologica dedicata a colture cellulari si trova in una stanza dedicata ad esse. L'operatore deve lavorare in maniera asettica:

- Lavarsi le mani.
- Indossare guanti e camice.
- Disinfettare i guanti con etanolo 70%.
- Disinfettare la superficie prima e dopo il lavoro.
- Disinfettare tutto ciò che viene messo sotto cappa.
- Dispensare liquidi con pipette o pipettatore.
- Usare materiale sterile.
- Aprire pipette, scatole di puntali, fiasche, tubi e reagenti solo sotto cappa.
- Dopo aver aperto un contenitore posizionare il tappo all'in giù.
- Richiudere ogni contenitore con cellule o reagenti appena possibile.
- Utilizzare antibiotici nel terreno

12.3.10.4 Norme di sicurezza

Un laboratorio di coltura cellulare presenta rischi specifici: manipolazione delle colture di cellule umane e animali e reagenti tossici, corrosivi e mutageni.

- Autoclavare tutti i rifiuti biologici solidi che vengono a contatto con cellule o reagenti.
- Raccogliere rifiuti liquidi dopo ciascun esperimento e trattare con candeggina.
- Si assuma che le colture cellulari sono pericolose in quanto possono contenere virus o altri organismi.
- Leggere il safety data sheet dei reagenti.
- Non si mangia e non si beve.
- Si indossano guanti e camice dedicato.
- Si usa materiale sterile.
- Si usano dispositivi appropriati per maneggiare liquidi contenenti cellule.
- Si lavora sotto cappa biologica.
- Si decontaminano le superfici di lavoro con disinfettante.
- Si lavano le mani dopo aver lavorato con le cellule e prima di lasciare il laboratorio.

12.3.11 Mantenimento delle cellule

12.3.11.1 Controllo delle cellule

Le cellule vanno controllate ogni giorno, osservando colore del terreno di coltura e la loro morfologia. In caso di terreno esausto lo si rimuove e se ne aggiunge di fresco. In presenza di stato di semi-confluenza delle cellule si rimuovono e si fa un passaggio o semina in altre fiasche.

12.3.11.2 Rimozione delle cellule - harvesting

In caso le cellule risultino sane si può staccarle dal substrato.

12.3.11.2.1 Rimozione meccanica La rimozione meccanica delle cellule avviene attraverso pipetta o cell scraper.

12.3.11.2.2 Rimozione con enzimi proteolitici Per la rimozione con enzimi proteolitici si utilizzano enzimi che disgregano i legami cellula-cellula in quanto pone meno stress alle cellule. Esempi sono tripsina, collagenasi, accutasi o *EDTA*. Questi causano il distacco delle cellule dalla superficie in maniera veloce ed efficace. La reazione di proteolisi può essere bloccata aggiungendo il terreno con siero.

12.3.12 Esercitazione

Si indossano guanti e camice e si utilizzano cellule *HeLa* in fiasca *T-75* per ogni gruppo. Nell'aula di microscopia vengono osservate le cellule al microscopio invertito in campo chiaro con obiettivo 2.5× e 10× e si valuta la confluenza cellulare. Sotto cappa si controllano i reagenti.

12.3.12.1 Conta cellulare

1. Aprire la fiasca con le cellule ed aspirare il terreno.
2. Aggiungere 10mL di *PBS*, chiudere la fiasca e muoverla per lavare la superficie interna.
3. Aspirare il *PBS* e aggiungere 1mL di tripsina.
4. Mettere la fiasca a 37° nell'incubatore per 2 minuti,
5. Bloccare l'azione della tripsina aggiungendo 8mL di terreno di coltura.
6. Spipettare la sospensione cellulare cercando di lavare tutta la superficie della fiasca.
7. Raccogliere la sospensione cellulare e trasferirla nel tubo da 50mL.
8. Trasferire 20µl di sospensione con la pipetta in una vial e aggiungere 20µl di trypan blue. Mescolare con la pipetta.
9. Trasferire 10µl nella camera di Buerker.
10. Contare le cellule di 3 quadrati, fare la media a calcolare il numero di cellule per millilitro con:

$$\text{numero medio cellule} \cdot \text{fattore di diluizione} \cdot 10\,000$$

12.3.12.1.1 Camera di Buerker La camera di Buerker è un vetrino particolare in cui si posiziona la porzione di coltura. Il vetrino portaoggetto va fissato con acqua in modo da impedirne movimenti. Il vetrino contiene delle scanalature che lo suddividono in 9 quadrati. Quelli esterni sono a loro volta divisi in 16 quadratini e quello centrale in 25. Queste divisioni rendono più facile la conta. Per convenzione si contano anche le cellule presenti nel quadrato anteriore di destra e sui bordi.

12.3.12.1.2 Trypan blue Trypan blue è internalizzato dalle cellule morte, che pertanto diventano blu opaco. Le cellule vive invece sono bianche e luminose e rifrangono la luce emessa dal microscopio. Essendo che diluisce la coltura introduce un fattore di diluizione di 2.

12.3.12.2 Preparazione delle colture

1. Aggiungere alle due colture dish 7mL di terreno e alla 6-well plate 2mL per pozzetto.
2. Seminare $1 \cdot 10^6$ cellule in un culture dish per l'estrazione del DNA.
3. Seminare $1 \cdot 10^6$ cellule in un culture dish per l'estrazione delle proteine.
4. Seminare $2 \cdot 10^5$ cellule in ogni pozzetto della 6-well plate.
5. Indicare su ogni culture disc e sulla 6-well plate il numero della linea cellulare, data e nome del gruppo.
6. Mettere tutto nell'incubatore a 37°.

12.4 Giorno 4 - Colorazione di organelli citoplasmatici

La colorazione di organelli citoplasmatici avviene attraverso coloranti a fluorescenza.

12.4.1 Fluorescenza

La fluorescenza è un caso particolare di luminescenza che si verifica per eccitazione: è la proprietà di alcune sostanze di rimettere a lunghezza d'onda maggiore le radiazioni elettromagnetiche ricevute.

12.4.1.1 Fluorocromi

I fluorocromi sono molecole che assorbono radiazione magnetica e sono eccitate da una luce di un colore ed emettono una luce di colore diverso con lunghezza d'onda maggiore. Quando si smette di eccitarli non continuano ad emettere luce.

12.4.1.1.1 Struttura Contengono tipicamente anelli aromatici che permettono la più intensa e utile emissione fluorescente molecolare.

12.4.1.1.2 Vantaggi

- Molecole piccole.
- Vasta gamma di colori.
- Possibilità di legarsi ad altre molecole.

12.4.1.1.3 Svantaggi

- Tendenza a decadere d'intensità nel corso dell'osservazione o photobleaching.

12.4.1.1.4 Photobleaching Si intende per photobleaching la diminuzione della fluorescenza di un campione dovuta alla degradazione fotochimica del fluoroforo. Avviene quando un fluoroforo perde permanentemente la capacità di fluorescere a causa di danneggiamenti chimici introdotti da fotoni e modifiche di legami covalenti.

12.4.1.1.4.1 Ridurre il photobleaching Per ridurre il photobleaching si può:

- Diminuire l'intensità dell'indicatore luminoso.
- Diminuire il tempo di esposizione all'indicatore luminoso.

12.4.1.2 Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è un tipo di microscopia ottica in cui il campione viene colorato con anticorpi fluorescenti o sostanze specifiche coniugate con fluorocromi. La luce utilizzata ha lunghezze d'onda specifiche per essere eccitate ed emetteranno nel visibile.

12.4.1.2.1 Struttura del microscopio Il microscopio possiede una lampada a sorgente luminosa che emette luce diversa a seconda di filtri. Questa luce a una lunghezza d'onda specifica eccita il fluoroforo che emette la luce catturata dall'oculare.

12.4.2 Scopo dell'esercitazione

Lo scopo dell'esercitazione è preparare colorazioni vitali e fissare le cellule in coltura per colorarne strutture intracellulari con fluorofori. Successivamente avviene l'osservazione di strutture intracellulari tipiche della cellula eucariote. La coltura cellulare proviene da cellule umane in coltura cresciute su vetrino.

12.4.3 Reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico è un sistema membranoso composto da vescicole, cisterne, sacculi e canali con aspetto reticolare. Tra i diversi compartimenti il reticolo endoplasmatico è quello più esteso e arriva ad occupare fino al 90% della totalità delle membrane.

12.4.3.1 Composizione

Il reticolo endoplasmatico si divide in:

- Reticolo endoplasmatico ruvido *RER*.
- Reticolo endoplasmatico liscio *SER*.
- Reticolo endoplasmatico transizionale.

12.4.3.2 Funzioni

Le funzioni del reticolo endoplasmatico sono:

- Trasporto di proteine appena tradotte dall'insieme o pool di ribosomi della cellula.
- Glicosilazione di proteine e loro indirizzamento verso le sedi finali come Golgi e altri organelli o secrezione.
- Controllo e degradazione di proteine mal-ripiegate.
- Riserva di ioni calcio, utile in caso di processi come contrazione, apoptosi, iniziazione di processi cellulari ciclici, vie di segnalazione.
- Detossificazione di sostanze esterne come xenobiotici.

12.4.3.3 ERTracker

La glibenclamide è un farmaco utilizzato da pazienti diabetici per correggere l'iperglicemia. Fa parte della famiglia delle sulfaniluree. La molecola stimola e favorisce la secrezione di insulina da parte delle cellule β del pancreas. Si lega al recettore *SUR1* associato al canale K^+ *ATP*-dipendente. Questi canali sono prominenti sul reticolo endoplasmatico. Questo colorante assorbe a 504nm nel blu ed emette a 511nm nel verde.

12.4.4 Mitochondri

I mitocondri sono organelli citoplasmatici delle cellule eucariote.

12.4.4.1 Composizione

Sono a forma di fagiolo con due membrane sovrapposte. La membrana interna forma creste che si ripiegano dentro ad una matrice.

12.4.4.2 Funzione

La funzione principale dei mitocondri è la produzione di energia sotto forma di *ATP* dalla demolizione di carboidrati in ambiente aerobico.

12.4.4.3 MitoTracker

Il MitoTracker è una molecola permeabile alla membrana cellulare che contiene un'estremità di clorometile reattiva ai tioli. Quando entra nel mitocondrio durante la respirazione cellulare viene ossidata e viene coniugata a tioli che la rendono fluorescente. Questo colorante assorbe a 579nm nel verde ed emette a 599nm nell'arancione.

12.4.5 Membrana citoplasmatica

12.4.5.1 Wheat germ agglutinin WGA

La membrana citoplasmatica viene marcata con *WGA*, una lectina che protegge il grano da insetti, lieviti e batteri. È una proteina agglutinina e si lega al N-acetil-D-glucosammina. Questo colorante assorbe a 590nm nel verde ed emette a 617nm nel rosso.

12.4.5.1.1 Lectine Le lectine sono una famiglia di proteine altamente specifiche per determinati zuccheri. Svolgono un importante ruolo biologico nel processo di riconoscimento dei polisaccaridi sulle membrane cellulari.

12.4.6 Citoscheletro

12.4.6.1 Composizione

Il citoscheletro è composto da polimeri di *G*-actina che si polimerizza in *F*-actina e altri polimeri.

12.4.6.2 Funzioni

Il citoscheletro:

- Esercita la trazione sui cromosomi.
- Separa la cellula in divisione.
- Dirige il traffico intracellulare.
- Sostiene la membrana plasmatica.
- Crea collegamenti meccanici per la resistenza allo shock.
- È responsabile del movimento cellulare e dell'estensione delle protrusioni cellulari.

12.4.6.3 Falloidina

Il marcatore del citoscheletro è la falloidina che reagisce stechiometricamente con il citoscheletro e crea un legame specifico con actina. Il colorante assorbe a 495nm nel blu e trasmette a 518nm nel verde.

12.4.7 Nucleo

12.4.7.1 Composizione

Il nucleo è un organello a doppia membrana e contiene il *DNA* e nucleoli.

12.4.7.2 DAPI

DAPI o 4', 6'-diammin-2-fenilindolo si lega nel solco minore della doppia elica del *DNA* (ad adenina e timina) attraverso un prolung antifade. Passa attraverso le membrane cellulari di cellule fissate e vitali. Il nucleolo non viene colorato in quanto ricco di proteine e RNA. Permette inoltre di determinare la fase del ciclo cellulare della cellula. Questo colorante assorbe a 359nm nel viola ed emette a 461nm nel blu.

12.4.8 Colorazione vitale

12.5 Laboratorio 4

Lo scopo della preparazione è di effettuare colorazioni vitali con fluorofori specifici, si fissano che serve in quanto le cellule vengono freezeate nella condizione in cui sono e crea una fotografia perfetta della cellula e si osservano le strutture: membrana plasmatica, citoscheletro, mitocondri, reticolo endoplasmatico e nucleo.

Le cellule dopo aver aggiunto il tracker le si incubano per mezz'ora a 37 in quando temperatura ottimale di crescita e mantenimento. Visto affinché questi coloranti possono essere in grado di penetrare le cellule devono essere messe nell'ambiente più favorevole. Dopo l'incubazione le cellule vanno fissate in quanto le cellule hanno svolto la reazione e il colorante è attivato. Le cellule si fissano in modo da ottenere che le cellule rimangano intatte riducendo al minimo il danno alle strutture del

campione. Si usano composti organici come aldeidi in grado di conservare la struttura cellulare (4% di paraformaldeide), sono composti tossici per cui ogni volta che si usa la si deve usare sotto cappa chimica e si usa una pipetta sierologica per rimuovere il terreno, uccedno ma mantenendo intatta la struttura. Si aspira totalmente il campione cercando di rimuovere il terreno, si aggiunge la soluzione di paraformaldeide e lo si fa utilizzando una micropipetta e va maneggiata sotto cappa chimica, la sterilità non è necessario mantenerla. La cappa biologica è incapace di aiutare e prevenire il passaggio delle aldeidi da dentro a fuori si deve pertanto usare la cappa chimica. Il fissaggio è importante in quanto permette di mantenere le cellule fisse e stabili senza alterare la struttura. Le cellule bloccate avranno strutture interne intatte, mitocondri e ER fluorescente. A questo punto per quanto riguarda colorazione WGA-594 per membrana cellulare le cellule son pronte, mentre per la falloidina si deve fare un altro proecssso in quanto la membrana non è permeabile a tutto. Per permeabilizzare si deve utilizzare una miscela di saponi che servono a distruggere la membrana fosfolipidica SDS o tryphon che aiutano a formare pori di membrana e renderla più permeabile all'ingresso di alcune molecole. Se si vogliono usare anticorpi con immunofluorescenza usando anticorpi diretti per proteina o struttura sono molto più grandi dei fluorofori e per fare questo bisogna rendere la membrana cellulare più prona a farsi attraversare e per cui viene utilizzata la permeabilizzaizone.

La parte di colorazione è semplice dopo aver aggiunto la paraformaldeide si toglie e aggiunge PBS, all'interno della soluzione fisiologica ottenuta si aggiunggono i corolanti. In questo caso le colorazioni sono fotosensibili e si mette in incubazione coperte da stagnola per evitae la degradazione del campione. Attesi i 20 minuti di incubazione si deve recuperare dalla superficie cellulare il vetrino e montarlo sul vetrino portaoggetti. Il vetrino portaoggetti nei pozzetti non ci sta, pertanto abbiamo usato quello copriorgetti, diametro piccolo ma abbastanza grande per permettere la visualizzazione. Le cellule messe a crescere, colorate e fissate, alcune permeabilizzate e colorate per marcare membrana e citoscheletro per poterle visualizzare si deve spostare su vetrino in quanto i supporti di crescita permettono una visualizzazione in campo chiaro ma in caso di fluorescenza la plastica non è ottimale, si usa il vetro che dà meno dispersione ottica. La plastica dà una diffrazione non ottimale, oppure hanno inventato delle piastre da 96 con fondo ottico similvetro. Quello che si fa è utilizzare i vetrini in quanto danno risoluzione migliore, per prendere le cellule serve fissare il copriorgetto al portaoggetto, per fare questo si usa un mounting media fatto da sostanze che fungono da colla, liquide che solidificano senza alterare la struttura ottica del campione, all'interno dei quali si trova un colorante in grado di colorare il nucleo: il DAPI è stato integrato nel mounting media, fondamentale in quanto si deve usare il microscopio con un olio per proteggere l'obiettivo per fare in modo che l'obiettivo possa scorrere in maniera sufficiente. Il mezzo di montaggio permette pertanto di fissare in modo molto forte il vetrino copriorgetto a quello portaoggetto si rischia altrimenti scivolamento che distrugga il campione. Un'altra possibilità è che gli obiettivi si avvicinano e allontanano per metterlo a fuoco, se non si presta attenzione essendo molto vicino l'olio può evitare che si vada troppo strettamente a contatto con il vetrino e lo si rompa. Il DAPI è coniugato con il mezzo di montaggio, basta aggiungere il mezzo di montaggio e il DAPI nel momento in cui il mezzo di montaggio comincia a legare i vetrini il DAPI penetra nelle cellule e colora il nucleo, ha molti anelli aromatici ed ha la colorazione più visibile e quella che si usa per capire dove sono le celule. Si può voler fare in modo che tutte le cellule stiano nella stessa fase e per fare questo bisogna sottoporre le cellule a uno stress: togliendo dal terreno di coltura il siero le cellule smettono di crescere e si bloccano tutte in fase G1. Non l'avremmo fatto e avremmo potuto osservare cellule in diversi stati del ciclo cellulare. Il DAPI si trova in tutte le colorazioni in quanto evidenzia i nuclei e permette di contare le cellule